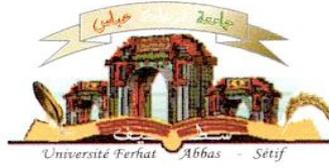


الجمهورية الجزائرية الديمقراطية الشعبية
وزارة التعليم العالي و البحث العلمي

Université Ferhat Abbas Sétif 1
Faculté des Sciences de la
Nature et de la Vie



جامعة فرحات عباس، سطيف 1
كلية علوم الطبيعة و الحياة

DEPARTEMENT DE BIOLOGIE ET D'ÉCOLOGIE VÉGÉTALE

N°...../SNV/2014

THÈSE

Présentée par

GHADBANE Mouloud

Pour l'obtention du diplôme de

DOCTORAT EN SCIENCES

Filière: BIOLOGIE

Spécialité: BIOLOGIE VÉGÉTALE

THÈME

**Microflore rhizosphérique de quelques Fabacées
(légumineuses) endémiques dans les régions de Boussaâda
et de Biskra (Algérie)**

Soutenue publiquement le 16/12/2014

DEVANT LE JURY

Président	LAOUER Hocine	Pr. UFA Sétif 1
Directeur	HARZALLAH Daoud	Pr. UFA Sétif 1
Examineurs	KACEM CHAUCHE Noredine	Pr. UM Constantine
	BAHLOULI Fayçal	Pr. UMB M'sila

Laboratoire de Microbiologie Appliquée

Résumé

L'activité antimicrobienne, l'effet phytostimulateur et les modes d'action des rhizobactéries isolées à partir de trois Fabacées endémiques d'Algérie (*Ononis angustissima*, *Astragalus gombo* et *Calobota saharae*) ont été évalués. L'identification phénotypique et génotypique des isolats à fortes activité antimicrobienne, a mis en évidence les souches *Brevibacillus brevis* GM100, *Bacillus clausii* GM17, *Streptomyces* sp. 21, 2A26, 1B10 et 2C34. La sensibilité des extraits purifiés à activité antimicrobienne des souches productrices des bactériocines *B. brevis* GM100, *B. clausii* GM17 aux différentes protéases démontre leurs natures protéiques. En plus, les analyses par MALDI-TOF/MS, ont démontré que les deux bactériocines Bac-GM100 et Bac-GM17, sont des protéines monomériques de poids moléculaire de 4375,66 Da et 5158,11 Da, respectivement. Ces deux bactériocines sont thermostables, actives dans un pH de 3 à 10 et présentent un large spectre d'activité antimicrobienne. Les quatre *Streptomyces* sp., solubilisent le phosphate et produisent les enzymes extracellulaires qui dégradent la paroi des cellules fongiques (chitinase et protéase), ainsi qu'une production marquée de l'acide- β -indolacétique (AIA). Les résultats du test *In vivo*, ont révélés que les quatre souches de *Streptomyces* sp. stimulent de manière significative la croissance et réduisent l'indice de maladie causée par *Fusarium oxysporium* chez le pois chiches (*Cicer arietinum* L.). Ces résultats indiquent que les souches de *Streptomyces* sp., *Brevibacillus brevis* GM100 et *Bacillus clausii* GM17 isolées à partir de rhizosphère d'*Ononis angustissima* pourrait être une source intéressante de substances bioactives à fort potentiels en lutte biologique.

Mots clés: *Brevibacillus brevis*, *Bacillus clausii*, *Streptomyces* sp., Bactériocine, lutte biologique

Abstract

The antimicrobial activity, phytostimulating effect and mechanism of action of rhizobacteria isolated from three endemic legumes in Algeria (*Ononis angustissima*, *Astragalus gombo* and *Calobota saharae*) were evaluated. Phenotypic and genotypic identification of isolates with high antimicrobial activity revealed the strains *Brevibacillus brevis* GM100, *Bacillus clausii* GM17, *Streptomyces* sp. 21, 2A26, 1B10 and 2C34. The sensitivity of the antimicrobial purified extracts from a bacteriocin-producing strains *B. brevis* GM100 and *B. clausii* GM17 in the presence of different proteases demonstrate their proteinaceous nature. Furthermore, analyses by MALDI-TOF/MS, demonstrated that both bacteriocins Bac-GM100 and Bac-GM17, are monomeric proteins with molecular weight of 4375,66 Da and 5158,11 Da, respectively. These two bacteriocins are thermostable, active in pH range from 3 to 10 and have a large specter of activity. The four *Streptomyces* sp., solubilize phosphate and produce extracellular fungal cell-wall degrading enzymes chitinase and protease, as well as a marked production of acid- β -indoleacetic (AIA). The *In vivo* results have revealed that the four strains of *Streptomyces* sp. significantly stimulate growth and reduce the disease incidence caused by *Fusarium oxysporium* in chickpea (*Cicer arietinum* L.). These results indicate that the strains of *Streptomyces* sp., *Brevibacillus brevis* GM100 and *Bacillus clausii* GM17 isolated from rhizosphere of *Ononis angustissima* could be an interesting source of bioactive substances with a high potential for biological control.

Keywords: *Brevibacillus brevis*, *Bacillus clausii*, *Streptomyces* sp., Bacteriocin, Biocontrol.

ملخص

اختبرت الإمكانات العـدائية ضد الجراثيم، القدرة على التحفيز لنمو النباتات و طريقة التأثير لمجموعة من بكتيريا المنطقة الجذرية لثلاث بقوليات متوطنة في الجزائر (*Calobota saharae* و *Astragalus gombo* , *Ononis angustissima*). أظهر الكشـف المظهري و الوراثة للعزلات النشطة انها عبارة عن السلالات *Bacillus clausii* GM17 , *Brevibacillus brevis* GM100 و اربع سلالات لـ *Streptomyces* sp. 21, 2A26, 1B10 و 2C34 . ان تأثير المستخلصين المنقيين من وسط زرع السلالتين المنتجة للبكتيريوسين *Brevibacillus brevis* GM100 و *Bacillus clausii* GM17 بمختلف الانزيمات المحللة للبروتينات يثب طبيعتهما البروتينية. بالإضافة الى ذلك بينت التحاليل بواسطة MALDI-TOF/MS ان هذين البكتيريوسينين عبارة عن مونوميـرين بروتينيين بوزن جزيئي يقدر بـ 4375.66 دالتون و 5158.11 دالتون بالنسبة الى Bac-GM100 و Bac-GM17 على التوالي. أظهر هذين البكتيريوسينين ثبات لدرجة الحرارة المرتفعة , نشاط في مجال درجة حموضة من 3 الى 10 و مدى واسع للتضاد الجرثومي. للسلالات الاربع لـ *Streptomyces* sp. القدرة على تحليل الفوسفات , انتاج الانزيمات كيتيناز و بروتيناز المحطمة للجدار الخلوي للفطر و كذا انتاج هرمون حمض اندول الخليك بكمية معتبرة. كشفت نتائج الاختبار في الوسط الحي لسلالات الأربعة *Streptomyces* sp. أنها تحفز النمو وتحد بشكل كبير من مؤشر الأمراض الناجمة عن *Fusarium oxysporium* للحمص (*Cicer arietinum* L.). تشير هذه النتائج ان السلالات *Brevibacillus* , *Streptomyces* sp. و *Bacillus clausii* GM17 و *brevis* GM100 المعزولة من المنطقة الجذرية لـ *Ononis angustissima* يمكن ان تكون مصدر هام للمواد النشطة بيولوجيا ذات قدرات عالية للمكافحة البيولوجية.

الكلمات المفتاحية: *Brevibacillus brevis*, *Bacillus clausii*, *Streptomyces* sp. بكتيريوسين, المكافحة البيولوجية.

Remerciements

J'exprime mes profonds remerciements et les plus sincères à mon directeur de thèse Monsieur le Professeur **HARZALLAH Daoud** pour m'avoir donné la possibilité de réaliser ce travail ainsi que pour son encadrement et ses conseils.

Je remercie les membres du jury qui ont bien voulu consacrer une partie de leur temps à ma thèse

Je remercie Monsieur **LAOUER HOCINE** Professeur Université Ferhat Abbas Sétif 1 qui a accepté de présider ce jury, qu'il trouve ici l'expression de ma profonde reconnaissance.

Je remercie Monsieur **KACEM CHAUCHE NOREDDINE**, Professeur à l'Université de Constantine 1 qui a accepté de juger ce travail de thèse en qualité d'examineur

J'adresse également mes remerciements à Monsieur **BAHLOULI Fayçal**, Professeur à l'Université de M'sila, qui a accepté de juger ce travail de thèse en qualité d'examineur.

Je tiens à remercier Messieurs, **BELHADJ Hani**, **JAOUADI Bassem**, **TOMASZ Stępkowski** et **JOSE E. González-Pastor**

Merci à tous mes amis **Djaidja Ahmed**, **BENDERRADJI Laid**, **KELLOU Kamel**, **BOUAZZA Lyas**, **BAAZIZ Karim**, **CHAHREDINE Sadek**, **MEDJKAL Samir**.

Merci à tous.

Dédicace

A ma mère, mon père et mes frères

A ma petite famille, Sabah et mon fils Amdjed

Table des matières

Introduction	1
Chapitre I : Synthèse bibliographique	
I.1 . Rhizosphère	5
I.1.1. Facteurs influençant la structure des communautés microbiennes de la rhizosphère	5
I.1.1.1. Facteurs abiotiques	8
I.1.1.2. Facteurs biotiques	9
I.2. Méthodes de lutte contre les agents phytopathogènes	10
I.2.1. Lutte chimique.....	10
I.2.2. Lutte génétique.....	13
I.2.3. Pratiques agronomiques	14
I.2.4. Lutte biologique	16
I.3. Rhizobactéries promotrices de la croissance des plantes (Plant growth promoting rhizobacteria (PGPR))	17
I.3.1. Contrôle biologique par les PGPR	18
I. 3.1.1. Antibiose	19
I. 3.1. 2. Production des sidérophores	20
I. 3.1. 3. Induction de la résistance systémique	22
I. 3.1.4. Compétition pour l'espace et les nutriments dans la rhizosphère.....	25
I. 3.1. 5. Parasitisme.....	26
I.3.2. Stimulation de la croissance par les PGPR	27
I. 3.2.1. Synthèse des phytohormones	27
I. 3.2.2. Fixation biologique de l'azote	29
I. 3.2.3. Solubilisation et minéralisation des phosphates organiques et inorganiques	30
I.4. Actinomycètes comme des agents de lutte biologique	31
I.5. Bactériocines comme des agents antimicrobiens	35

I.5.1. Définition des bactériocines.....	35
I.5.2. Classification des bactériocines	35
I.5.3. Le mécanisme de production des bactériocines et sa régulation	37
I.5.4. Les applications des bactériocines	37
I.5.4.1 Les applications des bactériocines dans l'industrie alimentaire.....	37
I.5.4.2. L'application des bactériocines dans le domaine médical et pharmaceutique	40
I.5.4.3. L'application des bactériocines dans le domaine de la médecine vétérinaire	42
I.5.4.4. L'application des bactériocines dans le domaine agricole	43
I.5.5. Combinaison des bactériocines avec d'autres agents.....	44

Chapitre II : Matériel et méthodes

II. 1. Zone d'étude et matériels végétal.....	45
II.2. Caractérisation des Actinomycètes de la rhizosphère de trois Fabacées (<i>Ononis angustissima</i> Lam., <i>Calobota saharae</i> Coss. & Dur. et <i>Astragalus gombo</i> Cos. & Dur.)	46
II.2.1. Isolement des Actinomycètes	46
II.2.2. Conservation des isolats d'Actinomycètes.....	47
II.2.3. Antagonisme <i>In Vitro</i> des isolats d'Actinomycètes.....	47
II.2.4. Activités chitinolytique des isolats d'actinomycètes de la rhizosphère d' <i>Ononis angustissima</i> Lam.	48
II.2.5. Hydrolyse de la caséine (production des protéases).....	48
II.2.6. Test de solubilisation de phosphore	48
II.2.7. Production de L'acide-β-indolacétique (AIA).....	49
II.2.8. Identification des souches de <i>Streptomyces</i>	49
II.2.8.1. Identification phénotypique des isolats d'actinomycètes.....	49
II.2.8.1.1. Morphologie des mycéliums (aériens et de substrats).....	49
II.2.8.1.2. Pigment de mélanoïde	50
II.2.8.1.3. Test de catalase.....	50
II.2.8.1.4. Test d'oxydase.....	50
II.2.8.1.5. Analyse chimique des constituants cellulaires	50

II.2.8.1.6. Identification biochimique des <i>Streptomyces</i>	51
II.2.8.1.7. Influence de la température	51
II.2.8.1.8. Tolérance des <i>Streptomyces</i> au NaCl.....	51
II.2.8.1.9. Effet de pH sur la croissance des <i>Streptomyces</i>	51
II.2.8.1.10. Résistance des souches de <i>Streptomyces</i> aux antibiotiques.....	51
II.2.8.2. Identification moléculaire des isolats d'actinomycètes	52
II.2.8.2.1. Extraction de l'ADN	52
II.2.8.2.2. Contrôle et purification de l'ADN extrait.....	52
II.2.8.2.3. Amplification du gène d'ARNr 16S des <i>Streptomyces</i> sp.	52
II.2.8.2.4. Electrophorèse sur gel d'agarose	53
II.2.8.2.5. Clonage.....	53
II.2.8.2.6. Séquençage.....	54
II.2.8.2.7. Analyses phylogénétiques	54
II.2.9. Essai de lutte biologique	55
II.2.10. Calcul de l'incidence la maladie.....	55
II.3. Identification des <i>Bacillus</i> spp et caractérisation des bactériocines	56
II.3.1. Souches bactériennes et conditions de croissance.....	56
II.3.2. Recherche de la production des bactériocines.....	57
II.3.3. Identification des souches de <i>Bacillus</i>	58
II.3.3.1. Identification morphologique des isolats GM100 et GM17	58
II.3.3.2. Identification biochimique des isolats GM100 et GM17	58
II.3.3.3. Caractérisation moléculaire des isolats GM100 et GM17	58
II.3.3.4. Séquençage de l'ADN et les analyses phylogénétiques des isolats GM100 et GM17	59
II.3.4. Caractérisation de la nature des agents inhibiteurs produits par des isolats GM100 et GM17.....	59
II.3.5. Etapes de purification de Bac-GM100 et de Bac-GM7	60
II.3.5.1. Précipitation au sulfate d'ammonium, dialyse et traitement thermique de Bac-GM100 et de Bac-GM7	60
II.3.5.2. Purification de Bac-GM100 et de Bac-GM7 par chromatographie Sephadex G-75	60

II.3.5.3. Purification de Bac-GM100 et de Bac-GM7 par chromatographie échangeuse d'ions.....	61
II.3.6. Caractérisation moléculaire des bactériocines GM100 et GM17	61
II.3.6.1. Dosage de l'extrait protéique par la méthode de Bradford.....	61
II.3.6.2. Dosage de Bac-GM100 et de Bac-GM7 par électrophorèse SDS PAGE.....	62
II.3.6.3. Masse moléculaire des bactériocines par Spectrométrie de masse (MALDI-TOF)	62
II.3.6.4. Détermination des séquences N-terminaux des bactériocines par la méthode de Dégradation d'Edman	63
II.3.7. Sensibilités des bactériocines Bac-GM100 et Bac-GM17 au pH.....	63
II.3.8. Stabilités thermiques de bac-GM100 et de GM17	63
II.3.9. Effet des surfactants et des solvants organiques sur la stabilité de l'activité biologique de Bac-GM100 et de Bac-GM17	63
II.3.10. Effets des protéases sur la stabilité des bactériocines GM100 et GM17	64
II.3.11. Spectre d'inhibition de Bac-GM100 et de Bac-GM17	64
II.3.12. Mode d'action de Bac-GM100 et Bac-GM17	64
II.3.13. Phytotoxicité de Bac-GM100 et Bac-GM17 sur la tomate et le melon ..	64
II.4. Analyses statistiques.....	65
II.5. Numéro d'accession de nucléotides	65

Chapitre III : Résultats et discussion

III. 1. Actinomycètes isolées de la rhizosphère d' <i>Ononis angustissima</i> , <i>Astragalus gombo</i> et <i>Calobota saharea</i>	66
III. 1.1. Densité des actinomycètes dans les sols rhizosphériques	67
III. 1.2. Activité antimicrobienne des actinomycètes isolés à partir des Fabacées endémique d'Algérie	69
III.1.3. Activité enzymatiques des actinomycètes isolés de la rhizosphère	71
III.1.4. Activité antimicrobienne des quatre souches de <i>Streptomyces</i> sp. (2A26, 1B10, 2C34 et 21)	74
III.1.5. Production de l'acide- β -indolacétique (AIA) par les souches de <i>Streptomyces</i>	77

III.1.6. Identification et phylogénie moléculaire des isolats d'actinomycètes ...	78
III.1.6.1. Caractérisation phénotypiques	78
III.1.6.1.1. Caractères morphologiques	79
III.1.6.1.2. Caractères culturaux	79
III.1.6.1.3. Caractères physiologiques et biochimiques	82
III.1.6.2. Caractérisations génotypiques	84
III.1.7. Réduction de l'indice de maladie par les <i>Streptomyces</i>	86
III.1.8. Effet des <i>Streptomyces</i> sp. sur la germination des graines de pois chiche (<i>Cicer arietinum</i> L.)	87
III.1.9. Effets des <i>Streptomyces</i> sur la croissance de pois chiche (<i>Cicer arietinum</i> L.) et la protection des plants contre <i>Fusarium oxysporum</i>	89
III.2. Identification morphologique et activité antibactérienne de <i>Bacillus</i> spp isolées à partir de la rhizosphère	96
III.2.1. Caractéristiques morphologiques des isolats de <i>Bacillus</i> spp.....	96
III.2.2. Sélection des isolats actifs	97
III.3. Purification et caractérisation biochimique des bactériocines produites par <i>Brevibacillus brevis</i> GM100 et <i>Bacillus clausii</i> GM17	98
III.3.1. Identification des isolats GM100 et GM17	98
III.3.1.1. Caractéristiques phénotypiques des isolats GM100 et GM17	99
III.3.1.2. Identification moléculaire des isolats GM100 et GM17.....	100
III.3.2. Effets des enzymes sur l'activité antimicrobienne des extraits des souches GM100 et GM17.....	103
III.3.3. Effets des détergents et des solvants organiques sur l'activité antimicrobienne des extraits des souches GM100 et GM17.....	104
III.3.4. Etapes de purification et masse moléculaire des bactériocines des souches GM100 et GM17	104
III.3.4.1. Etape de purification de la bactériocine GM100	104
III.3.4.2. Etape de purification de la bactériocine Bac-GM17.....	106
III.3.5. Détermination de la masse moléculaire de Bac-GM100	108
III.3.6. Détermination de la masse moléculaire de Bac-GM17	110
III.3.7. Séquençage des N-terminaux des bactériocines purifiées Bac- GM100 et Bac-GM17.....	111
III.3.7.1. Séquence N-terminale de la bactériocines purifiée Bac-GM100	111

III.3.7.2. Séquence N-terminale de la bactériocines purifiée Bac-GM17	112
III.3.8. Spectre d'inhibition de Bac-GM100 et Bac-GM17	112
III.3.9. Mode d'action de Bac-GM100.....	115
III.3.10. Propriétés biochimiques des bactériocines purifiées Bac-GM100 et Bac-GM17	118
III.3.10.1. Effet des traitements thermiques sur l'activité antimicrobienne de Bac-GM100 et de Bac-GM17.....	118
III.3.10.2. Effet des détergents, des solvants organiques et des protéases sur la stabilité de Bac-GM100 et de Bac-GM17 pures.....	120
III.3.10.3. Effet de pH sur l'activité des bactériocines Bac- GM100 et Bac-GM17....	121
III.3.11. Phytotoxicité de Bac-GM100 et Bac-GM17 sur la tomate et le melon.....	122
Conclusion et perspectives	127
Références	131

Liste des Figures

Figure 1. Les interactions dans la rhizosphère.....	6
Figure 2. Facteurs écologiques influençant le processus d'exsudation racinaire et par conséquent, la colonisation de la rhizosphère par les rhizobactéries du sol.....	7
Figure 3. Pourcentage d'utilisation de pesticides en fonction de la répartition géographique	11
Figure 4. Illustration schématique des importants mécanismes connus pour la promotion de la croissance et la protection des plantes par les PGPR (Plant growth promoting rhizobacteria).....	18
Figure 5. Des exemples représentatifs de sidérophores microbiens et phytosidérophores avec la constante de stabilité de chaque type.	21
Figure 6. La résistance systémique induite chez les plantes par des rhizobactéries	23
Figure 7. Model montre l'activation de la résistance induite (RI) par les microorganismes bénéfiques.....	25
Figure 8. Cycle de développement de <i>Streptomyces</i> sur milieu solide	32
Figure 9. Les métabolites secondaires représentatifs chez les espèces de <i>Streptomyces</i>	34
Figure 10. Photographie d'un fromage fabriqué à partir de lait de brebis et inoculées par <i>Clostridium beijerinckii</i> INIA 63 (après 60 jours) et (A) <i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>lactis</i> INIA 415-2 (mutant non producteur bactériocine) ou (B) <i>L. lactis</i> subsp. <i>lactis</i> INIA 415 (producteur de bactériocine), après une incubation à 25 °C pendant 15 jours	39
Figure 11. Mécanismes par lesquels la production de bactériocines pourrait contribuer au fonctionnement des probiotiques	42
Figure 12. Sites de prélèvement des sols rhizosphériques de trois Fabacées (<i>Ononis angustissima</i> Lam., <i>Calobota saharae</i> Coss. & Durieu. et <i>Astragalus gombo</i> Cos. & Dur.) ..	45
Figure 13. Photos montrent les trois Fabacées endémiques d'Algérie: (A) <i>Ononis angustissima</i> Lam., (B) <i>Astragalus gombo</i> Cos. & Dur. et (C) <i>Calobota saharae</i> Coss. & Dur.).....	46
Figure 14. Carte de restriction des plasmides pGM21-16S, pGM2A26-16S pGM1B10-16S et pGM2C34-16S	54

Figure 15. Couleurs et formes des colonies de quelques Actinomycètes isolées à partir de la rhizosphère de <i>Calobota saharae</i> , <i>Astragalus gombo</i> et <i>Ononis angustissima</i>	66
Figure 16. Densité des actinomycètes (Log ₁₀ UFC/g) de sol rhizosphérique d' <i>Ononis angustissima</i> , <i>Astragalus gombo</i> et <i>Calobota saharae</i>	68
Figure 17. Production de l'acide-β-indolacétique (AIA) par les quatre <i>Streptomyces</i> sp. 1B10, 21, 2C34 et 2A26 (μg.ml ⁻¹).....	78
Figure 18. Arbre phylogénétique basé sur l'analyse des séquences du gène codant pour l'ARNr 16S, montrant la relation entre les souches de <i>Streptomyces</i> sp. antagonistes et les souches types des espèces les plus proches du genre <i>Streptomyces</i> , obtenu par la méthode Neighbor-Joining.	85
Figure 19. Effet de quatre souches de <i>Streptomyces</i> sp. sur la réduction de l'incidence de maladie (%) causée par <i>Fusarium oxysporum</i> sur le pois chiche (<i>Cicer arietinum</i> L.)..	86
Figure 20. Effet des <i>Streptomyces</i> sp. (21, 2A26, 1B10 et 2C34) sur le taux de germination des graines de pois chiche (%) lorsque elles sont confrontées à l'agent pathogène <i>Fusarium oxysporum</i> (F.o.).....	88
Figure 21. Effet des <i>Streptomyces</i> sp. (21, 2A26, 1B10 et 2C34) sur le poids frais (g) des racines des plants de pois chiche lorsque ils sont confrontés à l'agent pathogène <i>Fusarium oxysporum</i> (F.o.).....	90
Figure 22. Effet des <i>Streptomyces</i> sp. (21, 2A26, 1B10 et 2C34) sur le poids frais (g) de la partie aérienne des plants de pois chiche lorsque ils sont confrontés à l'agent pathogène <i>Fusarium oxysporum</i> (F.o.).....	92
Figure 23. Effet des <i>Streptomyces</i> sp. (21, 2A26, 1B10 et 2C34) sur la longueur des racines (cm) des plants de pois chiche lorsque ils sont confrontés à l'agent pathogène <i>Fusarium oxysporum</i> (F.o.).....	93
Figure 24. Effet des <i>Streptomyces</i> sp. (21, 2A26, 1B10 et 2C34) sur la taille du partie aérienne (cm) des plants de pois chiche lorsque ils sont confrontés à l'agent pathogène <i>Fusarium oxysporum</i> (F.o.).....	94
Figure 25. Distribution phylogénétique de l'isolat GM100, en utilisant les séquences du gène 16S ARNr et la méthode «neighbor-joining» et le mode le à deux paramètres avec rééchantillonnage de 1000 replicats de bootstrap.....	101

Figure 26. Distribution phylogénétique de l'isolat GM17, en utilisant les séquences du gène 16S ARNr et la méthode «neighbor-joining» et le mode le à deux paramètres avec rééchantillonnage de 1000 replicats de bootstrap.....	102
Figure 27. Fractions des éluions de Bac-GM100 par chromatographie échangeuse d'ions avec colonne de FPLC Mono Q Sepharose.....	105
Figure 28. Fractions des éluions de Bac-GM17 par chromatographie échangeuse d'ions avec colonne de FPLC Mono Q Sepharose.....	108
Figure 29. Electrophorèse, zymogramme et masse moléculaire de Bac-GM100 pure.....	109
Figure 30. Electrophorèse et zymogramme de Bac-GM17.....	110
Figure 31. Spectre de masse de la bactériocine Bac-GM17 par la technique MADI-TOF/MS (M/Z).....	111
Figure 32. Effet de la bactériocine Bac-GM100 sur la croissance d' <i>Agrobacterium tumefaciens</i> C58 (A) et <i>Candida tropicalis</i> R2 CIP203 (B).....	116
Figure 33. Effet de la bactériocine Bac-GM17 sur la croissance d' <i>Agrobacterium tumefaciens</i> C58 (A) et <i>Candida tropicalis</i> R2 CIP203 (B).....	117
Figure 34. Effet du pH sur l'activité antibactérienne relative (%) des bactériocines Bac-GM100 et Bac-GM17 sur le germe cible <i>A. tumefaciens</i> C58.....	121
Figure 35. Taux de germination chez la tomate et le melon dans l'eau distillée (contrôle), l'hypochlorite de sodium (10%), et dans deux concentrations de Bac-GM100 ..	123
Figure 36. Taux de germination chez la tomate et le melon dans l'eau distillée (contrôle), l'hypochlorite de sodium (10%), et dans deux concentrations de Bac-GM17	124
Figure 37. Effet de la bactériocine GM100 pure (50 UA mL ⁻¹ et 500 UA mL ⁻¹), hypochlorite de sodium (10%) sur les paramètres de croissance ((A) poids frais et (B) taille de la partie aérienne, (C) longueur des racines) de la tomate et du melon.....	125
Figure 38. Effet de la bactériocine GM17 pure (50 UA mL ⁻¹ et 500 UA mL ⁻¹), hypochlorite de sodium (10%) sur les paramètres de croissance ((A) poids frais et (B) taille de la partie aérienne, (C) longueur des racines) de la tomate et du melon.....	126

Liste des Tableaux

Tableau 1. Exemples d'antibiotiques produits par le genre <i>Streptomyces</i>	33
Tableau 2. Ecologie des espèces végétales étudiées	45
Tableau 3. Les séquences des différents oligonucléotides utilisés pour les amplifications des gènes de l'ARNr 16S des souches d'actinomycètes	52
Tableau 4. Activité antibactérienne, antifongique et antimicrobienne des actinomycètes isolés à partir des rhizosphères d' <i>Ononis angustissima</i> , d' <i>Astragalus gombo</i> et de <i>Calobota saharea</i>	70
Tableau 5. Activités qualitatives de quelques enzymes des actinomycètes isolés à partir de la rhizosphère des Fabacées étudiées	72
Tableau 6. Activité antimicrobienne des souches de <i>Streptomyces</i> sp. 21, 2A26, 1B10 et 2C34.....	76
Tableau 7. Caractéristiques culturales des quatre isolats de <i>Streptomyces</i> sp. 21, 2A26, 1B10 et 2C34	80
Tableau 8. Caractéristiques phénotypiques des isolats de <i>Streptomyces</i> sp. 21, 2A26, 1B10 et 2C34	81
Tableau 9. Profile enzymatique des isolats de <i>Streptomyces</i> sp. 21, 2A26, 1B10 et 2C34	82
Tableau 10. Assimilation des carbohydrates par les isolats de <i>Streptomyces</i> sp. 21, 2A26, 1B10 et 2C34	83
Tableau 11. Activité antibactérienne des isolats de <i>Bacillus</i> spp contre <i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 6538 et <i>Escherichia coli</i> ATCC 8739	98
Tableau 12. Utilisation de source de carbone par les isolats GM100 et GM17.....	99
Tableau 13. Effet des protéases, température, détergents, et solvants organiques sur l'activité antimicrobienne résiduelle (%) du surnageant des souches GM100 et GM17	103
Tableau 14. Rendement des étapes de purification de la bactériocine GM100 de la souche <i>Brevibacillus brevis</i> GM100.....	106
Tableau 15. Rendement des étapes de purification de la bactériocine GM17 de la souche <i>Bacillus clausii</i> GM17	107

Tableau 16. Activité antimicrobienne des bactériocines Bac-GM100 et Bac-GM17 pures exprimée en zone d'inhibition (mm).....	113
Tableau 17. Effet des traitements thermiques, détergents, solvants organiques et protéases sur l'activité antimicrobienne résiduelle (%) des bactériocines Bac-GM100 et Bac-GM17 produite par <i>B. brevis</i> GM100 et <i>B. clausii</i> GM17 respectivement	119

Liste des abreviations

- ADN:** Acide désoxyribonucléique
- ARNr:** Acides Ribonucléiques Ribosomaux
- ATCC:** American Type Culture Collection
- BSA :** Bovine Serum Albumin
- CFBP :** Collection Française des Bactéries Phytopathogènes, INRA (Angers, France)
- CIP:** Collection de l'Institut Pasteur
- DAP:** Acide Diaminopimélique
- DMSO:** Dimethyl Sulfoxide
- DO:** densité optique
- EDTA:** Ethylenediaminetetraacetic acid
- Hz:** Hertz
- ICARDA:** International Center for Agricultural Research in the Dry Areas
- INRA:** Institut National de la Recherche Agronomique
- IPTG:** Isopropyl β -D-1-thiogalactopyranoside
- ISP:** International Streptomyces Project
- kDa:** Kilodalton
- LB:** Luria Bertani
- MALDI-TOF/MS:** Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionisation-Time-Of-Flight mass spectrometry
- NCBI:** National Center for Biotechnology Information
- PAGE:** Polyacrylamide gel electrophoresis
- Pb :** paire de base
- PCR:** Polymerase Chain Reaction
- PMSF:** Phenylmethanesulphonylfluoride
- RMN:** Résonance Magnétique Nucléaire
- SDS:** Sodium Dodecyl Sulphate
- TBE:** Tris, Borate, EDTA
- tpm:** toures par minute
- UA:** Unité arbitraire
- UFC:** Unité Formant Colonies
- X-gal:** 5-bromo-4-chloro-3-indolyl-beta-D-galactopyranoside

Introduction

La microflore de la rhizosphère des plantes joue un rôle essentiel sur le développement des plantes. En effet, les microorganismes associés aux racines des végétaux sont d'une importance fondamentale pour la nutrition et la stimulation de la croissance des plantes, ainsi que la lutte contre les maladies phytopathogènes. Pour cette raison, il y a eu un intérêt considérable dans la caractérisation des communautés de la rhizosphère des plantes.

La toxicité des pesticides de synthèse chimique, leur faible durée de persistance d'action sur les champignons phytopathogènes, ainsi que l'impact néfaste des résidus sur l'environnement et la santé humaine rend ce moyen de lutte en recours obligé en absence d'autres moyens de lutte efficaces. Cependant, la lutte biologique via l'utilisation de rhizobactéries promotrices de la croissance des plantes (Plant Growth Promoting Rhizobacteria, PGPR) peut être une alternative pour le contrôle de ces champignons phytopathogènes. Les travaux récentes effectués par plusieurs chercheurs, montrent que la recherche des sources de lutte biologiques contre les maladies des plantes reste un objectif important pour des pratiques agricoles durables (Park et *al.*, 2012).

Les microorganismes issus de la rhizosphère ont attiré une attention considérable ces dernières années en raison de ses activités biologiques et principalement en raison de ses capacités à produire de nouveaux composés bioactives à haute valeur commerciale (Saurav et Kannabiran, 2012). Parmi les microorganismes présentant un intérêt biotechnologique, les actinomycètes occupent une place prépondérante (Sabaou et *al.*, 1998). Les actinomycètes représentent un groupe bien connu et très diversifié de bactéries Gram-positifs, aérobies et filamenteuses, appartenant à l'ordre Actinomycetales. Ces bactéries sont l'une des composantes majeures des populations microbiennes présentes dans le sol. Elles synthétisent de nombreux métabolites secondaires biologiquement actifs, tels que des agents antimicrobiens.

Les bactéries appartenant au actinomycète comme le genre *Streptomyces*, sont largement connus comme des microorganismes d'importance industrielle (Baltz, 2008; Lopez et *al.*, 2010; Atta et *al.*, 2011; Ababutain et *al.*, 2012). En effet, les *Streptomyces* synthétisent, des antifongiques (Prapagdee et *al.*, 2008; Kumar et *al.*, 2010; Valanarasu et *al.*, 2010; Li et *al.*, 2011b), des anticancéreux (Anibou et *al.*, 2008; Gu et Codd, 2012; Jhaveri et *al.*, 2012), des antioxydants (Anzai et *al.*, 2008; Saurav et *al.*, 2012), des

Introduction

insecticides (Gadelhak et al., 2005; Kekuda et al., 2010), des herbicides (Lee et al., 2003), des hormones de croissance, des enzymes et d'autres composants d'intérêt agricole (Khamna et al., 2009a, b; Fialho de Oliveira et al., 2010; Zhao et al., 2011). La recherche de nouveaux agents à haute activité biologiques n'est pas limité au domaine médical, mais aussi s'étendre vers des applications agricoles.

Le genre *Streptomyces* a fait l'objet de nombreuses recherches comme antagoniste en vue d'une éventuelle utilisation comme agent de contrôle biologique de certaines maladies phytopathogènes. En effet, plusieurs espèces de *Streptomyces* ont été utilisés comme des agents de lutte biologique contre les champignons phytopathogènes (Li et al., 2011b; Patil et al., 2011; Singh et Chhatpar, 2011; Gnanamangai et Ponmurugan, 2012; Bubici et al., 2013). Parmi les agents de lutte biologique Tian et Zheng, (2013), citent quelques produits commerciaux : Actinovate (*Streptomyces lydicus*, souche WYEC108), Serenade MAX (*Bacillus subtilis*, souche QST713), Mycostop (*Streptomyces griseoviridis*, souche K61), RootShield (*Trichoderma harzianum*, souche T-22) et Prestop WP (*Gliocladium catenulatum*, souche J1446); Elmhirst et al., (2011), citent aussi d'autres produits commerciaux de lutte biologique comme Prestop® WP (*Gliocladium catenulatum*), PlantShield® (*Trichoderma harzianum*) et Serenade® MAXMD, Rhapsody® ASOMD (*Bacillus subtilis*).

Dans un contexte où la résistance aux antibiotiques est un phénomène de plus en plus préoccupant, la recherche des autres molécules bioactives semble fondamentale en pathologie infectieuse et la lutte contre les agents phytopathogènes. Les microorganismes ont une gamme extraordinaire des systèmes de défense. Cette dernière inclue la synthèse des antibiotiques, des métabolites secondaires (acides organiques), des agents lytiques (lysozymes), de nombreux exotoxines protéiques et des bactériocines (Harzallah et al., 2004; Messaadia et Harzallah, 2011). Dans le monde microbien, les peptides antimicrobiens sont des molécules important dans les systèmes de défense des bactéries, ils sont classés comme des bactériocines. Les antibiotiques sont aussi produits par les bactéries, mais ces composés antimicrobiens sont classés dans un groupe différent à celle des bactériocines. Un critère important pour considérer une molécule comme une bactériocine est la synthèse ribosomique de celle-ci. La majorité des bactériocines ont un spectre étroit comparé aux antibiotiques conventionnels. De plus, la plupart des bactériocines sont potentiellement plus actives avec des faibles concentrations contre les bactéries cibles. Cependant, des

Introduction

concentrations élevées d'antibiotiques sont recommandé pour l'éradication des bactéries cibles (Zhang *et al.*, 2011).

Les bactériocines sont produites par les bactéries Gram positifs et Gram négatifs. Ce pendant, les bactériocines des bactéries Gram positifs apparaitre qu'elles ont un spectre d'activité large sur microorganismes susceptibles (Riley et Wertz, 2002).

Généralement, plusieurs espèces du genre *Bacillus* sont considérées comme des agents de contrôles biologiques prometteurs. En effet, leurs efficacité est comparable aux bactéries Gram négatifs. Elles reçoivent une attention plus ou moins importante et elles ont été étudiées pour leur production des composés potentiellement utilisé dans des différentes applications (Kim *et al.*, 2003). Les composés produites par les bactéries Gram positifs ont un intérêt plus important, particulièrement leur potentielle agricultural, comme ils peuvent ouvrir des opportunités nouvelles pour l'élimination de plusieurs agents pathogène.

Les végétaux impliqués dans la sélection des populations microbiennes bénéfiques, représente un enjeu majeur des recherches en agroécologie. Les activités biologiques des microorganismes dans les sols rhizosphériques dans des conditions extrêmes, constituent des atouts pour lutter contre les maladies fongiques des plantes causées par les champignons phytopathogènes (Zitouni *et al.*, 2004, 2005; Aouar *et al.*, 2012; Aouiche *et al.*, 2012). Les études approfondies sur les microorganismes bénéfiques de la rhizosphère peuvent apporter des informations sur des agents d'intérêt biotechnologique, permettant à d'éventuelles applications dans le domaine agricole.

En agriculture, un nombre sans cesse croissant de microorganismes de la rhizosphère sont développés comme agents de lutte biologique contre les agents phytopathogènes. Ainsi, l'emploi d'organismes vivants en phytoprotection a généré de nouveaux défis pour les secteurs de la recherche et du développement de l'industrie des produits de lutte biologique.

La rhizosphère des plantes endémiques d'Algérie méritent une attention particulière à fin d'explorer les potentialités de la microflore rhizosphérique diversifiée de ces plantes. Le but de cette étude, était de valoriser des bactéries issues de la rhizosphère de quelques Fabacées endémiques (*Ononis angustissima* Lam., *Astragalus gombo* Coss. & Dur. et *Calobota saharea* Coss. & Dur.) des zones arides et semi-arides

Introduction

d'Algérie comme agents de lutte potentiels contre les maladies phytopathogènes. Il s'est concentré en particulier sur des souches de *Bacillus* spp et d'actinomycètes.

Les objectifs de cette présente étude sont :

- L'isolement et l'identification des actinomycètes de la rhizosphère de quelques Fabacées endémique (*Ononis angustissima* Lam., *Calobota saharae* Coss. & Dur. et d'*Astragalus gombo* Coss. & Dur.);
- La sélection des actinomycètes ayant une activité antimicrobienne;
- L'étude de la potentialité d'utiliser les actinomycètes comme des agents de lutte biologique contre *Fusarium oxysporum* chez le pois chiche (*Cicer arietinum* L.).
- L'identification des *Bacillus* spp. de la rhizosphère des Fabacées ayant une activité antimicrobienne ;
- La sélection des souches productrices des bactériocines ;
- La caractérisation biochimique des bactériocines ;
- L'étude du spectre et le mode d'action des bactériocines ;
- L'étude de la potentialité d'utiliser ces bactériocines comme agent de biocontrôle contre des agents phytopathogènes de tomate (*Lycopersicon esculentum* L.) et de melon (*Cucumis melo* L.).

Chapitre I



Synthèse Bibliographique

Chapitre I : Synthèse Bibliographique

I.1. La rhizosphère

Le terme «rhizosphère» défini pour la première fois en 1904 par Lorenz Hiltner, indique le volume de sol soumis à l'influence de racines vivantes (Bakker et *al.*, 2013; Bouizgarne, 2013; Prescott et Grayston, 2013). La zone du sol rhizosphérique se caractérise par des conditions biotiques et abiotiques différentes de celles dans le sol non rhizosphérique (Ibekwe et *al.*, 2010). La densité des populations de bactéries est considérablement augmentée dans le sol rhizosphérique et diminue dans le sol non rhizosphérique (Karthikeyan et *al.*, 2008; McGahan et *al.*, 2014).

Les exsudations des acides organiques, des acides aminés ou de lipides par les racines et la décomposition des matières organiques mortes (débris issus des cellules végétales mortes) modifient l'environnement rhizosphérique (Brimecombe et *al.* 2001). Il s'ensuit par conséquent une modification de la structure et de la composition des populations bactériennes au contact des racines (Kennedy, 1999).

En d'autres termes, la rhizodéposition influence largement le développement de la flore rhizobactérienne qui s'en nourrit et probablement sélectionnent des espèces physiologiquement bénéfiques pour la nutrition de la plante (Richardson et *al.* 2009).

Berendsen et *al.*, (2012), schématisent comment les exsudats racinaires influencent l'activité et la structure des communautés microbiennes de la rhizosphère et les interactions entre la plante et les différents microorganismes dans la rhizosphère (figure 1).

I.1.1. Facteurs influençant la structure des communautés microbiennes de la rhizosphère

La rhizosphère est une niche écologique constituée par le voisinage proche des racines et caractérisée par une forte densité de microorganismes. Leurs interactions avec les racines sont régies par une multitude d'échange de signaux chimiques.

Chapitre I : Synthèse Bibliographique

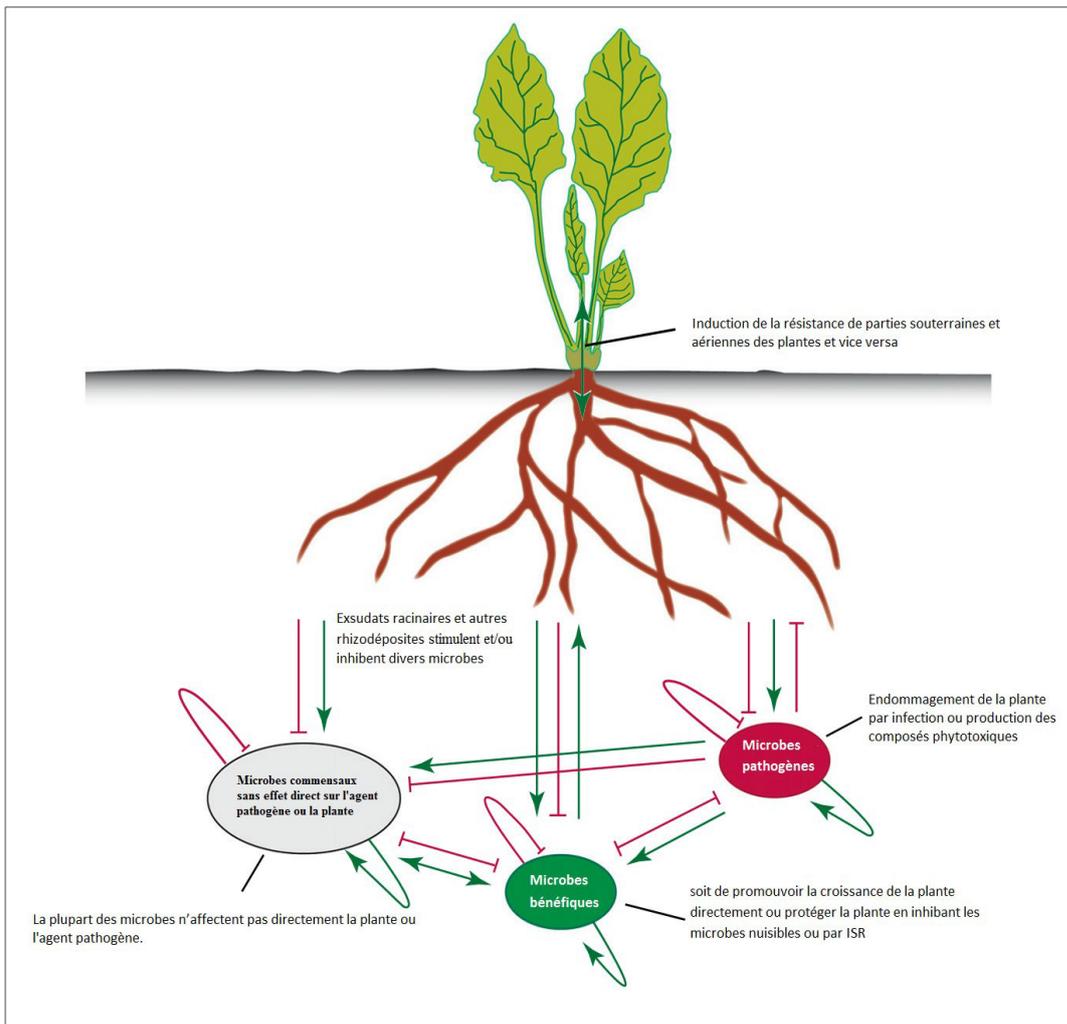


Figure 1. Les interactions dans la rhizosphère (Berendsen et *al.*, 2012). Les plantes sont capables d'influencer la composition et l'activation de leur microbiome rhizosphérique par l'exsudation des composés qui les stimulent (flèches vertes) ou les inhibent (flèches rouge bloqués). Une large gamme d'agents pathogènes transmis par le sol, sont en mesure d'affecter la santé des plantes et vice versa. Avant l'infection, les microbes nuisibles sont en compétition pour les nutriments et l'espace avec de nombreux autres microbes présents dans la rhizosphère. Dans cette obligation pour les ressources, les microbes bénéfiques vont limiter le succès de l'agent pathogène à travers la production de composés bactériostatiques, la consommation de (micro) nutriments ou en stimulant le système immunitaire de la plante. La plupart des microbes ne peuvent pas affecter la plante et l'agent pathogène directement puisqu'ils occupent des niches écologiques différentes (de microbes commensaux), mais dans une certaine mesure ils sont susceptibles d'affecter tous les autres organismes à travers un réseau complexe d'interactions. ISR: résistance systémique induite.

Chapitre I : Synthèse Bibliographique

Plusieurs paramètres biotiques et abiotiques interviennent pour modeler la structure des communautés microbiennes de la rhizosphère tant en termes de diversité que d'effectifs (Marschner et *al.*, 2001; Dias et *al.*, 2013). Plusieurs études, ont permis d'identifier certains facteurs présentant une influence marquée sur la structure des communautés microbiennes de la rhizosphère. Nihorimbere et *al.*, (2011), schématisent les principaux facteurs biotiques et abiotiques qui influencent le processus d'exsudation racinaire et par conséquent, la colonisation de la rhizosphère par les rhizobactéries du sol (Figure 2).

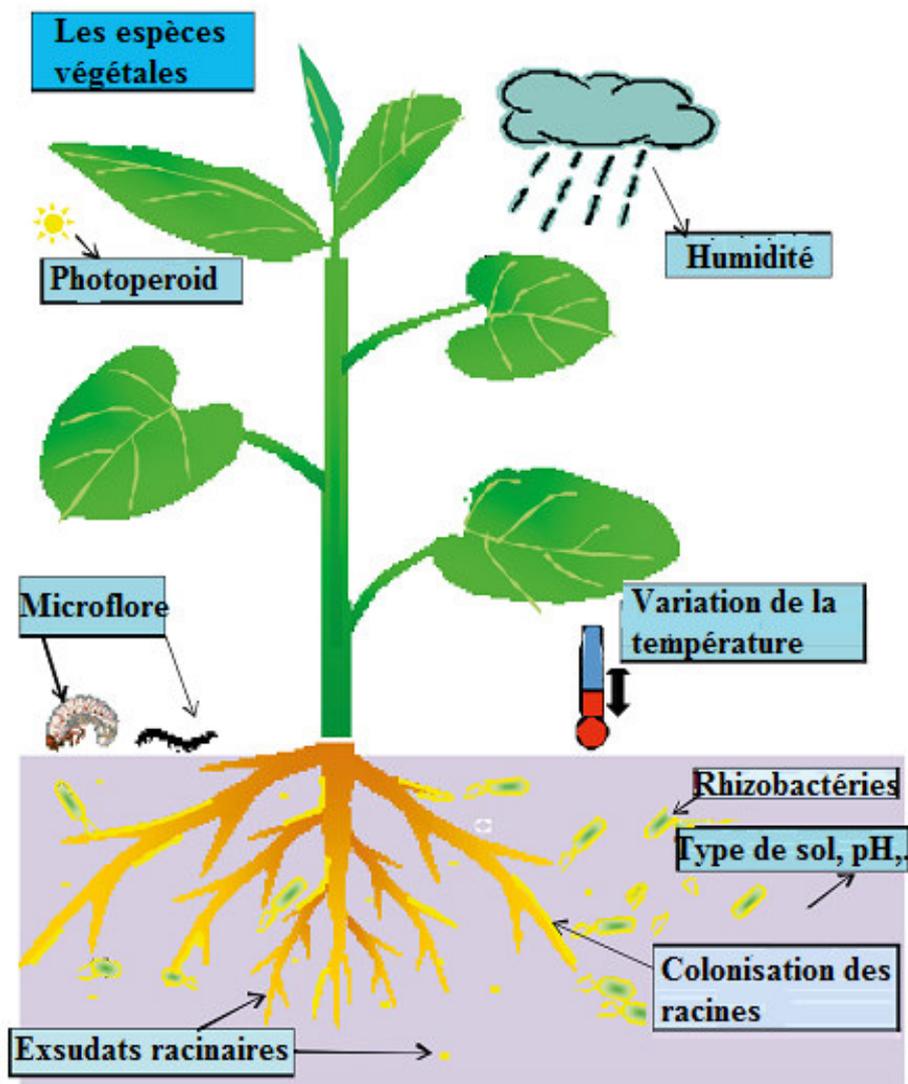


Figure 2. Facteurs écologiques influençant le processus d'exsudation racinaire et par conséquent, la colonisation de la rhizosphère par les rhizobactéries du sol (Nihorimbere et *al.*, 2011).

Chapitre I : Synthèse Bibliographique

I.1.1.1. Facteurs abiotiques

Les structures des communautés microbiennes de la rhizosphère sont variables et dépendent de nombreux facteurs abiotiques (Noguez, 2005; Colares et Melo, 2013). Plusieurs études suggèrent que les caractéristiques des sols (Marschner et *al.*, 2001; Valé et *al.*, 2005; Singh et *al.*, 2007; Tian et *al.*, 2009; Xu et *al.*, 2009; Raynaud, 2010; Sanaullah et *al.*, 2011; McGahan et *al.*, 2014), sont les facteurs les plus importants dans le modelage des structures des communautés microbiennes de la rhizosphère. Par exemple le pH influence fortement la composition des Acidobactéries et des Actinobactéries. En effet, le pH est l'un des forts prédicateurs de la composition des communautés bactériennes et de la diversité, mais suivant le type de sol et d'autres facteurs peuvent agir sur la structure des communautés comme la disponibilité des nutriments, la solubilité des métaux et le contenu en carbone (Asuming-Brempong et *al.*, 2008; Sul et *al.*, 2013) et en azote (Fierer et *al.*, 2003), l'humidité des sols, la salinité (Nelson et Mele, 2007; Rajendhran et Gunasekaran, 2008; Buyer et *al.*, 2010) et les variations climatiques (Lauber et *al.*, 2009). Au cours du temps, le sol subit des changements, qui augmentent la complexité globale de l'environnement de sol (Zhou et *al.*, 2014). Comme exemple, Buyer et *al.*, (2010), rapportent que la température, humidité, pH et texture de sol contrôlent la biomasse et la structure des communautés microbiennes dans la rhizosphère de tomate.

L'écosystème de sol, favorise le développement de communautés bactériennes distinctes (Tarlera et *al.*, 2008). Les changements d'utilisation des terres, particulièrement la conversion des forêts en pâturage ou en champs cultivés, est un événement fréquent et un facteur affectant la biodiversité et le fonctionnement des écosystèmes terrestres (Sala et *al.*, 2000). Les effets de l'utilisation des terres sur l'altération des propriétés physiques et chimiques des sols ont été beaucoup étudiés. En effet, des changements d'utilisation des terres (au niveau de la composition des espèces de plantes et des pratiques de gestion utilisées) peuvent avoir des impacts significatifs et de long terme sur le carbone du sol, le contenu en nutriments, la texture du sol et le pH (Murty et *al.*, 2002). La variabilité des facteurs édaphiques à travers différentes utilisations des terres peut avoir un effet significatif sur la structure des communautés bactériennes (Lauber et *al.*, 2008; Tian et *al.*, 2013). Selon les travaux de Buyer et *al.*, (2010), la température, humidité, pH et texture de sol contrôlent la biomasse et la structure des communautés microbiennes dans la rhizosphère de tomate.

Chapitre I : Synthèse Bibliographique

D'autre part, les études de Nelson et Mele, (2007), ont démontré que le bore (B) et l'excès de NaCl affecte la structure des communautés microbiennes de la rhizosphère de façon indirecte par la quantité et/ou qualité des exsudats racinaires et que la santé de la plante est le majeur déterminant de la structure des communautés microbiennes de la rhizosphère.

I.1.1.2. Facteurs biotiques

La rhizosphère est le volume du sol situé au voisinage immédiat des racines des plantes et qui se caractérise par la présence d'exsudats racinaires (rhizodépôts). Les exsudats racinaires des plantes jouent un rôle essentiel dans le processus de colonisation de la rhizosphère par les microorganismes. Ces exsudats sont utilisés par la microflore endémique en tant que signaux chimiques en plus d'être un substrat nutritif disponible pour la croissance et le développement de ces microorganismes dans la rhizosphère (Landi et al., 2006; Bais et al., 2006; Cregut et al., 2009; Aira et al., 2010; Nihorimbere et al., 2011; Guo et al., 2011; Zhang et al., 2011; Chao et al., 2013; Prescott et Grayston, 2013).

Il est important de remarquer que le génotype de plante a une influence importante sur la composition de la communauté microbienne de la rhizosphère. Plusieurs travaux scientifiques démontrent l'effet de génotype des plantes sur les structures des communautés microbiennes dans la rhizosphère (Xu et al., 2009; Koranda et al., 2011). En effet, Li et al., (2011a), démontrent que les espèces de plantes pourraient constituer le principal déterminant de la composition de la communauté microbienne des résidus miniers. D'autre part, Zhang et al., (2013), ont démontré que les groupes bactériens dominants dans la rhizosphère de *Phragmites australis* sont les Protéobactéries, Actinobactéries, Bactéroidetes, Chloroflexi, Gemmatimonadetes et Planctomycètes et que la structure des communautés bactériennes diffère d'un écotype à l'autre. Par contre, l'étude de Ladygina et Hedlund, (2010), montre que l'espèce de plante influence le carbone mais pas la masse microbienne totale dans la rhizosphère. La rhizodéposition varie selon l'espèce végétale, le cultivar et le stade de développement de la plante.

Les propriétés phénotypiques racinaires telles que la structure du système racinaire, le profil d'exsudation racinaire, la capacité d'acquisition de nutriments et d'eau diffèrent en fonction du génotype de la plante et influent sur les interactions avec

Chapitre I : Synthèse Bibliographique

les populations microbiennes (Marschner et *al.*, 2001; Xu et *al.*, 2009). Cela se traduit par des différences de structure entre communautés microbiennes associées aux différents génotypes végétaux.

Différentes études réalisées sur des plantes ont démontré que les exsudats racinaires varient en termes de qualité mais aussi de quantité selon les espèces végétales (Zhang et *al.*, 2011). L'exsudation varie également quantitativement et qualitativement avec l'âge de la plante (Xu et *al.*, 2009) et la zone racinaire (Marschner et *al.*, 2001).

Par ailleurs, de nombreuses études ont mis en évidence et ont quantifié l'impact des différentes espèces végétales sur la structure des communautés microbiennes de la rhizosphère (Zhou et *al.*, 2014). Cet effet est variable suivant l'espèce végétale ou suivant les variétés et les écotypes considérées (Marschner et *al.*, 2007; Zhang et *al.*, 2013; Blagodatskaya et *al.*, 2014), mais aussi suivant le stade de croissance des plantes (Li et *al.*, 2014). En effet, les travaux de Li et *al.*, (2014), révèlent que la rhizosphère de maïs par exemple est préférentiellement colonisée par les Protéobactéries, les Bactéroidetes et les Actinobactéries et que chaque phylum est représenté par un ou deux groupes, ainsi que les genres dominant sont *Massilia*, *Burkholderia*, *Ralstonia*, *Dyella*, *Chitinophaga* et *Sphingobium*.

En outre, Benizri et *al.*, (2002), ont mis en évidence des variations temporelles de la rhizodéposition en lien avec l'âge des plantes. En conséquence, la taille mais aussi la structure des communautés microbienne de la rhizosphère sont modifiées suivant le stade de développement de la plante (Xu et *al.*, 2009). Il ressort, que la plante, via sa rhizodéposition, constitué un facteur majeur influence la structure des communautés microbienne de la rhizosphère (Tian et *al.*, 2013).

I.2. Méthodes de lutte contre les agents phytopathogènes

I.2.1. Lutte chimique

L'Europe est le plus gros utilisateur de pesticides, principalement pour la protection du blé (*Triticum* L. spp.) et de la vigne (*Vitis vinifera* L.). De son côté, l'Amérique du Nord emploie environ 22 % de la production mondiale de pesticides (incluant les herbicides et les insecticides), surtout pour le contrôle des maladies affectant les cultures maraîchères et la vigne (Benhamou et Rey, 2012b) (Figure 3). Les données de l'Observatoire de résidus de pesticides (www.observatoire-

Chapitre I : Synthèse Bibliographique

pesticides.gouv.fr) actuellement disponibles indiquent que le marché mondial des pesticides chimiques est de l'ordre de 40 milliards \$ US, alors que celui des biopesticides se situe aux alentours de 1 milliard \$ US.

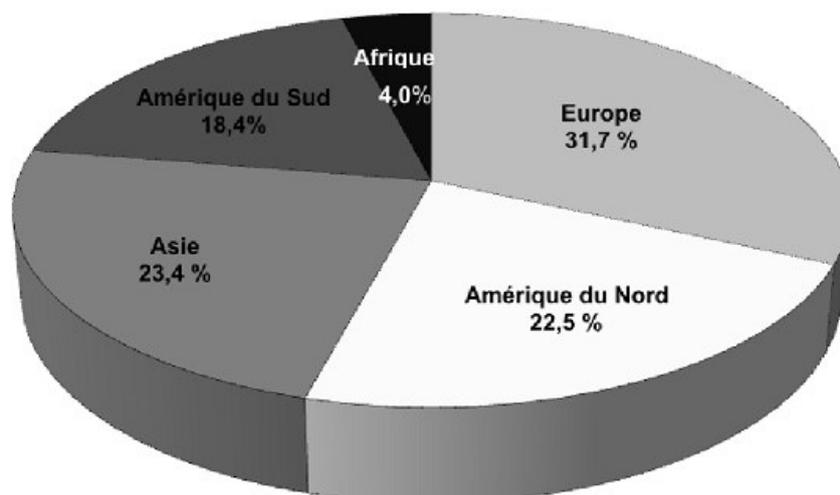


Figure 3. Pourcentage d'utilisation de pesticides en fonction de la répartition géographique (Benhamou et Rey, 2012b).

Les produits phytosanitaires ou pesticides utilisés dans l'agriculture permettent de limiter le développement d'organismes susceptibles d'affecter les cultures et les récoltes. La lutte chimique est dominée par trois classes de pesticides que sont les herbicides appliqués contre les mauvaises herbes, les insecticides contre les insectes et les fongicides contre les champignons. La lutte chimique contre les agents phytopathogènes concerne essentiellement les champignons responsables des maladies fongiques des plantes. La plupart des fongicides affectent directement des fonctions essentielles, comme par exemple la respiration, la biosynthèse des stérols ou la division cellulaire. Ce type de mode d'action peut entraîner, d'une part, des risques pour l'homme et les organismes non cibles et, d'autre part, le développement de souches fongiques résistantes (Leroux, 2003).

En effet, au vu des propriétés neurotoxiques de certains pesticides, observées expérimentalement ou lors de manifestations cliniques, de nombreuses études

Chapitre I : Synthèse Bibliographique

épidémiologiques se sont penchées sur les effets neurologiques en lien avec une exposition aiguë ou chronique à de telles substances. L'exposition aux pesticides a été beaucoup étudiée en lien avec la maladie de Parkinson, plus particulièrement l'exposition aux insecticides et aux herbicides, qui se sont révélés être des facteurs de risque de la maladie (Blanc-Lapierre et *al.*, 2012).

Les problèmes d'environnement sont devenus une préoccupation majeure de nos sociétés, et notamment le risque lié à l'exposition aux pesticides de synthèses. En effet, il est admis maintenant que la lutte chimique a des conséquences néfastes sur l'environnement; entre autres, par la toxicité dans la chaîne trophique, la pollution des eaux de surface et souterraine (Schiavon et *al.*, 1995), sur la santé humaine par les résidus de pesticides sur les aliments et les intoxications par inhalation (Multigner, 2005) et surtout la résistance acquise par les insectes ravageurs et les vecteurs de maladies infectieuses chez les humains, suite à l'utilisation intempestive, inconditionnelle et irrationnelle des pesticides chimiques (Bonnemain et Chollet, 2003).

Divers travaux ont montré, de manière consistante, la présence d'un excès de risque de cancer de la prostate chez les populations agricoles par rapport à la population générale. L'hypothèse qu'un tel excès de risque soit relié à l'utilisation de pesticides a fait l'objet de nombreuses publications. Pourtant, et jusqu'à ce jour, il n'a pas été possible de mettre en évidence, à quelques exceptions près, une association significative entre l'exposition à un pesticide ou à une famille chimique de pesticides et la survenue du cancer de la prostate (Ndong et *al.*, 2009).

La réduction des intrants chimiques, qui favorise la production par la plante de substances antioxydantes bénéfiques, favorise aussi celle de métabolites secondaires et toxines naturelles dont l'innocuité n'est pas garantie. Guéguen et Pascal, (2010), suggèrent que les faibles différences observées entre les aliments de l'agriculture biologique et de l'agriculture conventionnelle n'ont aucune répercussion significative sur la nutrition et la santé.

Pour que la lutte chimique puisse continuer à jouer un rôle important, il faut développer de nouvelles matières actives utilisables à faible dose, agissant curativement, possédant une bonne persistance d'action, peu exposées à la résistance et ne présentant pas de risques pour le manipulateur, le consommateur et l'environnement; les firmes souhaitent en plus qu'elles soient polyvalentes. Pour atteindre ces objectifs, il est

Chapitre I : Synthèse Bibliographique

indispensable de trouver de nouvelles cibles; la génomique fonctionnelle pourrait fournir des pistes. La diversification des structures chimiques, notamment par le biais de la chimie combinatoire ainsi que des systèmes de criblage à haute densité constituent des approches dont les retombées sont attendues dans la prochaine décennie (Leroux, 2003).

I.2.2. Lutte génétique

La résistance génétique des plantes représente une valeur économique importante. La sélection de variétés végétales résistantes aux pathogènes a fait l'objet de travaux incessants au cours du siècle dernier, avec des succès et des échecs. L'apport de la génétique dans la lutte contre les pathogènes s'appuie sur la variabilité génétique naturelle qui résulte de la co-évolution entre les plantes et leurs agresseurs. De nombreuses variétés végétales résistantes à un ou plusieurs pathogènes ont été obtenues et sont cultivées. Les biotechnologies pourront permettre d'obtenir des cultivars résistants plus rapidement que par les méthodes classiques de sélection, voire de cumuler plusieurs résistances (Durand-Tardif et Pelletier, 2003).

La génétique a apporté une forte contribution à la lutte contre les agents pathogènes. Les progrès de la recherche durant cette dernière décennie permettent une meilleure compréhension des mécanismes de défense des plantes vis-à-vis des pathogènes. L'identification de nombreux gènes de défense, l'exploration des voies de transduction, l'identification de mécanismes de défense contre les virus offrent de nombreux candidats pour une approche de transformation génétique des espèces cultivées. Cependant, les exemples de valorisation au champ de ce type d'approche sont encore assez rares (Verdaguer et *al.*, 2005).

Une infestation par un champignon pathogène induit souvent chez la plante l'expression de β 1-3 glucanases et de chitinases. Ces enzymes attaquent directement la paroi des champignons et permettent la libération de signaux moléculaires activateurs des réactions de défense de la plante. Une approche intéressante est proposée par Tesfaye et *al.*, (2005), qui ont associé le gène d'endochitinase ech42 à un peptide signal d'une phosphatase du lupin permettant l'exsudation de l'enzyme dans la rhizosphère de luzernes transgéniques. Shin et *al.*, (2008), ont montré que l'expression d'une chitinase classe II de l'orge améliore la résistance chez le blé contre *F. graminearum*. Cependant, les caractères d'intérêt agronomique tels que la résistance aux maladies ne sont pas

Chapitre I : Synthèse Bibliographique

contrôlés par un gène majeur unique, mais résultent le plus souvent de l'action de plusieurs gènes à effets variables.

Des gènes de résistance ont été clonés à partir d'espèces végétales diverses, vis-à-vis d'organismes aussi différents que des bactéries, des virus, des champignons ou des nématodes (Durand-Tardif et Candresse, 2004). Il s'agit en fait de gènes impliqués dans la reconnaissance de l'agresseur qui déclenchent des réactions de défense. Ils sont généralement regroupés à proximité les uns des autres et dérivent de réarrangements de séquences préexistantes. Ces découvertes ont encouragé la production par transgénèse de plantes possédant une résistance générale aux agents pathogènes (Cao *et al.*, 1998).

Cependant, l'opinion publique est globalement opposée à l'idée de " manger transgénique ", en absence de certitudes sur l'innocuité de la consommation de ces plantes pour l'homme. De plus, les effets délétères des produits chimiques et le manque d'efficacité des pratiques culturales ont nécessité la recherche d'une alternative durable par l'utilisation de la lutte biologique, non néfaste pour l'environnement.

I.2.3. Pratiques agronomiques

Les techniques agricoles défavorables au développement des ravageurs offrent une gamme extrêmement variée de méthodes de lutte. En effet, les pratiques agronomiques exercent un effet sur la taille de l'inoculum primaire et sa localisation, sur le développement des épidémies et leur extension spatiale, sur la concordance entre le cycle du parasite et celui de la plante cultivée, ainsi que sur les équilibres écologiques entre les pathogènes et les organismes qui leur sont antagonistes. En combinant les connaissances disponibles concernant les effets des techniques agronomiques sur les maladies et les effets physiologiques des maladies sur la croissance des plantes et leur production, il est maintenant possible de mettre au point de nouveaux itinéraires techniques, mettant en première priorité l'utilisation des méthodes non chimiques pour prévenir les risques parasitaires (Meynard *et al.*, 2003).

Les techniques culturales permettant d'empêcher la survie de l'inoculum sont un levier essentiel, notamment le choix de semences non contaminées et le raisonnement de la succession des cultures (Cruz *et al.*, 2012), auxquels il faut ajouter le rôle primordial de la gestion des résidus de cultures. Le choix d'une date de semis adaptée de la culture permet de mettre en œuvre des stratégies d'évitement, et une baisse de la

Chapitre I : Synthèse Bibliographique

densité de semis permet une atténuation des attaques en culture. En revanche, les atténuations par pilotage de l'alimentation azotée et hydrique sont beaucoup plus difficiles à réaliser, compte tenu des différences de réaction des mécanismes d'infection des pathosystèmes aux états nutritionnels des plantes (Broydé et Doré, 2013).

Le travail du sol modifie la répartition des résidus de culture et la structure du sol et affecte par conséquent les microorganismes du sol (nombre, structure génétique des populations) ainsi que les fonctions qu'ils assurent au premier rang desquelles la minéralisation de la matière organique (Vian et *al.*, 2009).

La solarisation est une parmi les méthodes de lutte qui se révèle efficace pour réduire le taux d'inoculum des champignons du sol. Boughalleb et El Mahjoub, (2005), indiquent que l'analyse mycologique du sol prélevé à partir des parcelles solarisées et celles non solarisées a montré que l'inoculum du sol est composé principalement par *Fusarium* spp. La solarisation a permis de réduire la densité de cet inoculum sans l'éradiquer.

Selon Lazarovits, (2001), les amendements organiques à teneur élevée en azote tels que le fumier de volaille, la farine de viande et d'os et le tourteau de soja réduisent significativement les populations d'une multitude d'agents phytopathogènes du sol.

Les travaux de Peng et *al.*, (2014), démontrent que dans les sols où il y avait de fortes populations de spores dormantes de *Plasmodiophora brassicae*, ni les biofongicides ni les fongicides de synthèse se sont avérés efficaces, par contre, une rotation de deux années, au cours desquelles des plantes résistantes sont cultivées entre les semis de canola, utilisée conjointement à des cultivars résistants, est recommandée pour réduire la charge de l'inoculum de *Plasmodiophora brassicae* dans le sol. D'autres travaux, montrent aussi que le champignon *Fusarium graminearum* survit sur les débris végétaux de la culture de l'année précédente, par exemple les cultures de céréales ensemencées sur un précédent de maïs ou d'autre céréale sont souvent fortement attaquées par la fusariose de l'épi. De même, Pageau et *al.*, (2008), montrent que l'effet du précédent cultural sur la teneurs en désoxynivalénol de l'orge produit par *Fusarium graminearum* est significatif.

La lutte contre les agents phytopathogènes nuisibles en agriculture biologique donne la priorité aux pratiques agronomiques compatibles avec les processus naturels : rotation des cultures, emplacement du champ et de la ferme, fertilité du sol, calendrier des pratiques culturales, barrières, résistance de la plante hôte non transgénique. Ces

Chapitre I : Synthèse Bibliographique

pratiques font partie d'un plan à long terme le long de l'échelle de la lutte intégrée et, bien qu'elles puissent subir des influences à l'échelle régionale ou nationale, s'appliquent à celle du champ ou de la ferme.

Les systèmes de culture exercent un effet sur la taille de l'inoculum primaire et sa localisation, sur le développement des épidémies et leur extension spatiale, sur la concordance entre le cycle du parasite et celui de la plante cultivée, ainsi que sur les équilibres écologiques entre les pathogènes et les organismes qui leur sont antagonistes. En combinant les connaissances disponibles concernant les effets des techniques agronomiques sur les maladies et les effets physiologiques des maladies sur la croissance des plantes et leur production, il est maintenant possible de mettre au point de nouveaux itinéraires techniques, mettant en première priorité l'utilisation des méthodes non chimiques pour prévenir les risques parasitaires. Cependant, les connaissances sur les effets à long terme des systèmes de culture, en particulier sur la structure génétique des populations de pathogènes, restent insuffisantes (Meynard et *al.*, 2003).

I.2.4. Lutte biologique

Les biopesticides, pourraient être définis de la manière suivante : « organismes vivants ou produits issus de ces organismes ayant la particularité de supprimer ou limiter les ennemis des cultures » sont utilisés depuis des siècles par les fermiers et paysans (Thakore, 2006). De nos jours, ils sont classés en trois grandes catégories selon leur origine (microbienne, végétale ou animale) et présentent de nombreux avantages. Ils peuvent être aussi bien utilisés en agriculture conventionnelle qu'en agriculture biologique, certains permettent aux plantes de résister à des stress abiotiques et d'une manière générale, ils sont moins toxiques que leurs homologues chimiques (Deravel et *al.*, 2014).

Depuis quelques années la protection biologique connaît un regain d'intérêt, de par une prise de conscience généralisée de la nécessité d'une meilleure protection de l'environnement et en raison d'un souci croissant de la qualité des produits imposée par les consommateurs. La lutte biologique contre les microorganismes phytopathogènes en utilisant des microorganismes antagonistes s'est déjà révélée comme une alternative aux fongicides de synthèse. En effet, des résultats très encourageants ont été rapportés par

Chapitre I : Synthèse Bibliographique

plusieurs auteurs (Saraf et *al.*, 2011; Liu et *al.*, 2014). Par contre, Guéguen et Pascal, (2010), rapportent que les faibles différences observées entre les aliments de l'agriculture biologique et de l'agriculture conventionnelle n'ont aucune répercussion significative sur la nutrition et la santé.

En agriculture, un nombre sans cesse croissant de bactéries sont développés comme agents de lutte biologique contre les agents phytopathogènes. Ainsi, l'emploi d'organismes vivants en phytoprotection a généré de nouveaux défis pour les secteurs de la recherche et du développement de l'industrie des produits de lutte biologique. Cette dernière, offre une stratégie alternative et respectueuse de l'environnement pour le contrôle d'agents phytopathogènes.

Une des composantes clés essentielles au succès commercial d'un produit de lutte biologique contre les agents pathogènes des plantes est sa préparation. La préparation des agents de lutte biologique peut être utilisée dans le but de: stabiliser les organismes lors de la production, de la distribution et de l'entreposage; servir lors de la manipulation et de l'utilisation du produit; protéger l'agent contre des conditions environnementales adverses; et renforcer l'activité des organismes (Leggett et *al.*, 2011).

I.3. Rhizobactéries promotrices de la croissance des plantes (Plant growth promoting rhizobacteria, (PGPR))

Parmi les microorganismes associés aux plantes se trouvent des espèces bénéfiques, qui protègent leurs hôtes contre les agressions. Ainsi, les microorganismes rhizosphériques protègent les plantes contre les composés toxiques et les pathogènes du sol. Les rhizobactéries du sol, appelées PGPRs (Plant Growth Promoting Rhizobacteria), sont capables de coloniser les racines ou bien encore la rhizosphère, mais à la différence des autres bactéries rhizosphériques elles ont, en retour, un effet bénéfique sur la plante. Cet effet bénéfique peut être direct, ou indirect. La promotion directe de la croissance est le résultat du pouvoir d'acquisition des nutriments ou de la stimulation des hormones de la plante. D'autres mécanismes indirects, mais le plus souvent liés à la croissance des plantes, sont impliqués dans la réduction/suppression des pathogènes des plantes (Hryniewicz et Baum, 2011; Nihorimbere et *al.*, 2011; Pérez-Montaño et *al.* 2014). Kumar et *al.*, (2011a), schématisent les importants

Chapitre I : Synthèse Bibliographique

mécanismes connus pour la promotion de la croissance et la protection des plantes par les PGPR (Plant growth promoting rhizobacteria) (figure 4).

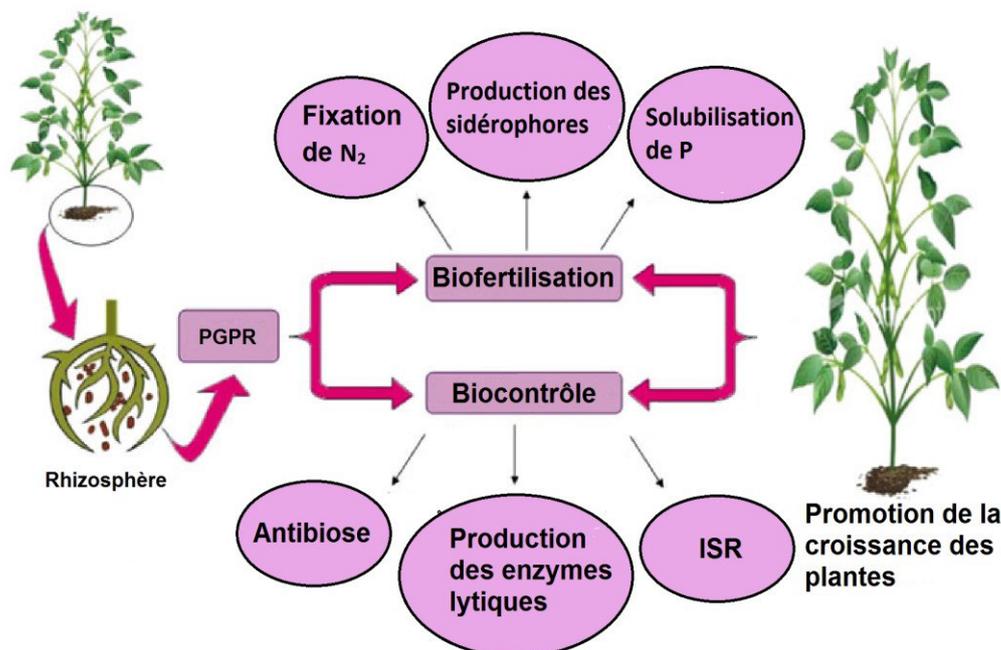


Figure 4. Illustration schématique des importants mécanismes connus pour la promotion de la croissance et la protection des plantes par les PGPR (Plant growth promoting rhizobacteria) (Kumar et al., 2011a).

I.3.1. Contrôle biologique par les PGPR

Parmi les microorganismes de la rhizosphère se trouvent des espèces bénéfiques, qui protègent leurs hôtes contre les agressions. Ces microorganismes, protègent la plante en agissant directement sur les facteurs d'agression (pathogènes et herbivores) ou en stimulant les défenses végétales (Avis et al, 2001; Selosse et al., 2004). La plupart des agents de lutte biologique agissent selon un ou plusieurs des modes suivants: compétition, parasitisme, antibiose et résistance induite.

Cependant, il est difficile de confirmer le mode d'action exact d'un agent de lutte biologique. En effet, selon Bélanger et al., (2012), des épreuves biologiques *in vitro*, des études au microscope électronique et des analyses chimiques ont toutes indiqué un seul mode d'action de l'agent de lutte biologique *Pseudozyma flocculosa* qui est l'antibiose, mais malgré cette solide preuve, il y a de nouveaux indices laissant croire que la flocculosine ne joue qu'un rôle secondaire, voire aucun, dans l'activité antagoniste de *P.*

Chapitre I : Synthèse Bibliographique

flocculosa. Le processus de lutte biologique semble plutôt relié à une interaction complexe impliquant des nutriments produits par la plante, récoltés par l'agent phytopathogène et utilisés par *P. flocculosa*.

I.3.1.1. Antibiose

La sécrétion de substances antibiotiques est un phénomène très commun dans la nature. Il y a une énorme quantité d'antibiotiques qui sont produits par les bactéries de la rhizosphère PGPR. Plusieurs travaux récents, démontrent l'antibiose comme mode d'action des agents de lutte biologique. En effet, des résultats très encourageants ont été rapportés par plusieurs auteurs montrent l'antibiose comme mode d'action chez la plus part des agents de lutte biologique.

Couillerot et *al.*, (2014), ont montré que *Streptomyces anulatus* S37 produisent trois antibiotiques streptochlorin, nigéricine et piericidin A1 à activité antifongique contre *B. cinerea*; Lin et *al.*, (2014), indiquent que les *Bacillus* sp. exercent une action d'antibiose contre le champignon *F. oxysporum* f. sp. *cucumerinum* et *R.solani*; Li et *al.*, (2012), rapportent que la souche *Streptomyces globisporus* JK-1 productrice des substances Volatiles est capable d'inhiber la croissance de *Botrytis cinerea*. Une étude récente a montré aussi que la souche *Streptomyces anulatus* S37 isolé de la rhizosphère de *Vitis vinifera*, protège la vigne, par l'induction de la défense naturelle contre des différents phytopathogènes et la synthèse de l'antibiotique streptochlorin qui inhibe la croissance de *Botrytis cinerea* (Couillerot et *al.*, 2014).

D'autres travaux réalisés par Zheng et *al.*, (2013), démontrent que les souches *Bacillus pumilus* et *Bacillus thuringiensis*, Synthétisent plusieurs composés volatiles comme 2-nonanone, b-benzenee-thanamine, 2-decanone et qui sont capables d'inhibée la croissance mycélienne de *Colletotrichum gloeosporioides*. Poritsanos et *al.*, (2006), ont rapporté aussi que la souche de *Pseudomonas chlororaphis* PA23 produit des antibiotiques non volatiles: l'acide phénazine-1-carboxylique et le 2-hydroxyphénazine.

Toussaint et *al.*, (1997), ont démontré que *Streptomyces hygroscopicus* var. geldanus, produise l'antibiotique geldanamycine et protéger les plants de framboisiers (*Rubus strigosus*) contre les infections causées par les *Phytophthora*. L'agent de lutte biologique, *Streptomyces melanosporofaciens* EF-76, produit de la geldanamycine, un

Chapitre I : Synthèse Bibliographique

antibiotique de la classe des ansamycines qui présente une activité antagoniste envers plusieurs bactéries à Gram-positif ainsi qu'envers les champignons (Clermont et *al.*, 2010).

I.3.1.2. Production des sidérophores

Le fer est un élément nutritif essentiel aussi bien pour les bactéries que les champignons et les plantes. Les microorganismes ont développé un mécanisme hautement spécifique de captation des ions ferriques basé sur la production de sidérophores dans des conditions de carence en fer. Ce sont des molécules organiques de faible poids moléculaire, chélatrices du Fe^{3+} et servant de transporteur de l'ion ferrique à l'intérieur de la cellule microbienne, présents chez nombreux microorganismes. Il y a donc dans le sol une compétition pour le Fe^{3+} , élément indispensable à tout organisme vivant.

Les sidérophores sont des molécules dont les masses moléculaires sont comprises entre 300 et 1300 Da et qui présentent une très forte affinité pour le fer. Ils sont produits par une grande variété de microorganismes (bactéries et champignons) et par certaines plantes (phytosidérophores des graminées) (Ahmed et Holmström, 2014). Ils sont classés selon la fonction chimique impliquée dans la chélation du fer (Figure 5).

Les rhizobactéries productrices des sidérophores, peuvent directement ou indirectement stimuler la croissance des plantes. La compétition pour le fer par la production de sidérophores représente un des caractères les plus connus pour sélectionner des agents de lutte biologique (Khamna et *al.*, 2009a; Sharma et Johri, 2003).

Chapitre I : Synthèse Bibliographique

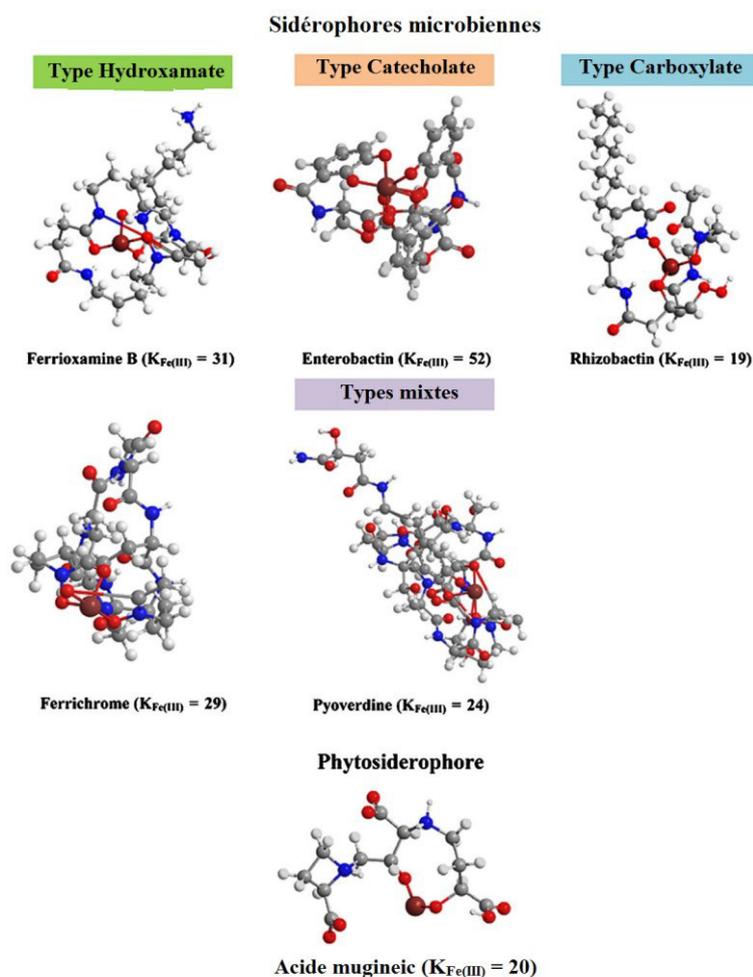


Figure 5. Des exemples représentatifs de sidérophores microbiens et phytosidérophores avec la constante de stabilité de chaque type. Les sidérophores microbiennes sont de quatre types principaux : Hydroxamates produites par les bactéries (ferrioxamine B) et les champignons (ferrichrome) ; Catécholate (entérobactine) ; Carboxylate (rhizobactin) et le type mixte (pyoverdine produite par des bactéries). L'phytosidérophore la plus courante est l'acide mugineic (Ahmed et Holmström, 2014).

Pseudomonas fluorescens est une espèce commensale chez les plantes, leur permettant d'atteindre les éléments nutritifs indispensables à leur croissance. Cette espèce est connue pour son aptitude à réduire l'incidence des maladies racinaires des plantes, ainsi qu'à inhiber la croissance d'un grand nombre d'agents phytopathogènes (Gao et al., 2012). Les modes d'action de *Pseudomonas fluorescens* dans la suppression des maladies des plantes incluent la production de sidérophores (molécules de faibles poids moléculaires ayant une très forte affinité pour l'ion Fe^{2+}) pour la compétition du fer disponible, l'antibiose, la production d'enzymes lytiques et le Système de Résistance

Chapitre I : Synthèse Bibliographique

Induit (ISR) (Ongena et al., 2005). *Pseudomonas fluorescens* a plusieurs applications, les plus connues concernent l'agriculture où elle est utilisée en lutte biologique et comme stimulateur de croissance des plantes PGPB (*Plant Growth Promoting Bacteria*) (Ongena et al., 2005; Anita et Samiyappan, 2012; Gao et al., 2012; Kanyinda et al., 2014).

Les travaux de Sharma et Johri, (2003), montrent que la bactérisation de semences de maïs avec les deux souches *Pseudomonas* spp. GRP3A et PRS9 productrices des sidérophores augmente le pourcentage de germination et stimule la croissance des plantes par l'augmentation de la disponibilité du fer soluble dans le sol rhizosphérique. Arif et al., (2012), rapportent que la disponibilité du fer est l'un des principaux facteurs qui déterminent la persistance des rhizobiums dans la rhizosphère et que l'acquisition des gènes récepteurs de sidérophores confèrent à la souche un avantage pour la compétition.

I.3.1.3. Induction de la résistance systémique

Après avoir été longtemps dépendante des pesticides, l'agriculture mondiale est aujourd'hui frappée par un courant qui favorise des pratiques plus durables et plus respectueuses de l'environnement. Pour répondre à ces nouvelles exigences, les agriculteurs doivent se tourner vers l'exploitation et la rentabilisation des ressources naturelles par le biais de pratiques agricoles combinant la performance et la protection des cultures à un moindre coût écologique.

Dans ce contexte, le développement de molécules biologiques capables de stimuler les défenses naturelles des végétaux (SDN) est une stratégie qui attire de plus en plus l'attention. Une molécule SDN est un éliciteur susceptible de déclencher une série d'évènements biochimiques menant à l'expression de la résistance chez la plante (Benhamou et Rey, 2012a).

Certains mécanismes de défense des plantes sont constitutifs, alors que d'autres sont induits lorsque la plante a reconnu un microorganisme (reconnaissance très spécifique de type «gène à gène») ou l'un de ses composants (reconnaissance moins spécifique d'un «éliciteur») (Klarzynski et Fritig, 2001).

Chapitre I : Synthèse Bibliographique

Les différentes approches en génétique, biologie et biochimie ont permis de mieux comprendre les interactions entre plantes et microorganismes dans le contexte de l'immunisation de l'hôte végétal. Certaines souches de PGPR, peuvent protéger les plantes d'une façon indirecte par la stimulation de mécanismes de défense de la plante, ce qui peut rendre l'hôte beaucoup plus résistant à l'agression future par des agents pathogènes.

La reconnaissance par la plante de certaines bactéries de la rhizosphère peut conduire à une réaction d'immunisation lui permettant de mieux se défendre vis-à-vis d'une attaque ultérieure par un organisme pathogène. Utilisé en combinaison avec d'autres approches phytosanitaires, ce phénomène d'induction de résistance systémique (ISR) par les rhizobactéries est considéré comme une stratégie prometteuse dans la lutte biologique contre les maladies des cultures (Jourdan et *al.*, 2008).

L'ISR peut être divisée en trois étapes principales que sont la perception des molécules actives produites par le PGPR ou élicitation, la transmission d'un signal systémique dans la plante et l'expression des mécanismes de défense de l'hôte (Nihorimbere et *al.*, 2011; Jourdan et *al.*, 2008) figure 6.

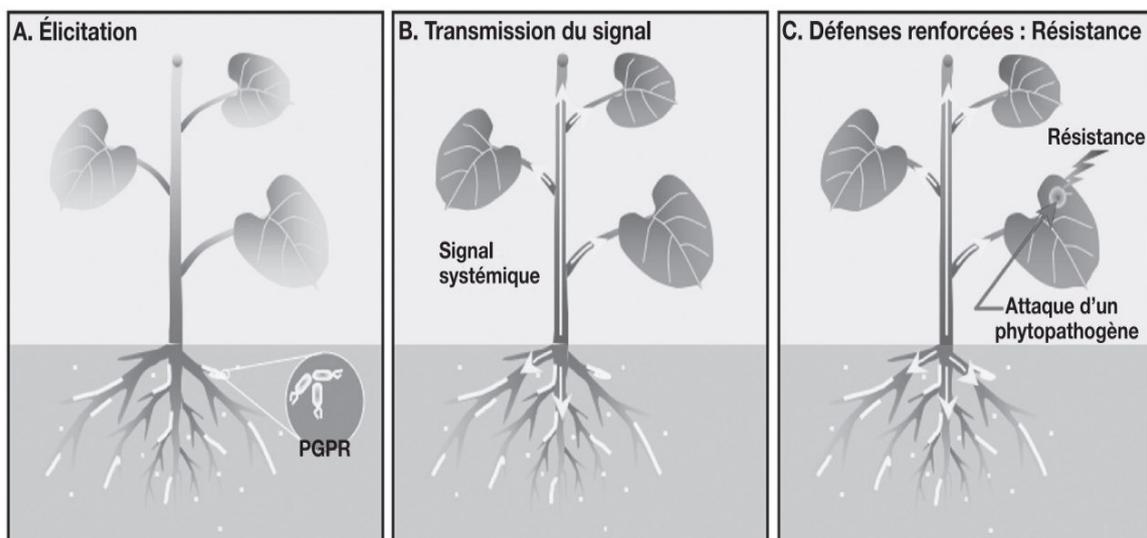


Figure 6. La résistance systémique induite chez les plantes par des rhizobactéries (Jourdan et *al.*, 2008). Les trois étapes principales sont: A) l'élicitation: les rhizobactéries ou PGPR (Plant Growth Promoting Rhizobacteria) interagissent avec les racines de l'hôte et produisent des éliciteurs qui sont perçus par la plante; B) après la reconnaissance des déterminants, un signal est véhiculé dans l'ensemble de la plante afin de l'alerter; C) enfin, lors d'une éventuelle attaque par un agent phytopathogène, la

Chapitre I : Synthèse Bibliographique

plante sera en mesure de répondre plus efficacement à l'agression, lui conférant ainsi une résistance.

De nombreuses études récentes ont clairement démontré que les plantes traitées avec des microorganismes antagonistes développaient la résistance aux maladies post-récoltes. Son et *al.*, (2014), ont montré que la souche *Brevibacterium iodinum* KUDC1716 déclenche l'expression des gènes des protéines de pathogenèse-relatées (PR) CaPR4 et CaChi2 chez la plante en absence de pathogène. Dans même, Yim et *al.*, (2013), ont prouvé qu'il était possible de stimuler la résistance des plants de tomate par *Methylobacterium* spp qui augmente la synthèse des enzymes de défense PR (pathogenèse-relatées) chez la plante par la régulation de la biosynthèse de l'éthylène. Chowdappa et *al.*, (2013), démontrent aussi que la bactérie *Bacillus subtilis* augmente dans les racines de tomate la concentration des enzymes reliées à la défense comme peroxydase, polyphénoloxidase et superoxyde dismutase chez la plante. D'autres travaux récents, démontrent que la sélection des agents de lutte biologique est basée essentiellement sur la capacité de l'induction de résistance des plantes : Alizadeh et *al.*, (2013), démontrent que l'utilisation d'une double inoculation par *Trichoderma harzianum* Tr6 et *Pseudomonas* sp. Ps14 ensemble, induit la résistance systémique chez cucumber et *Arabidopsis thaliana*; Couillerot et *al.*, (2014), montrent que la souche *Streptomyces anulatus* S37 isolé de la rhizosphère de la vigne *Vitis vinifera*, induit la défense naturelle contre des différents phytopathogènes comme *Botrytis cinerea*. Saravanakumar et *al.*, (2007), montrent que les rhizobactéries PGPR (*Pseudomonas* et *Bacillus*) protègent les plantes de thé (*Camellia sinensis*) contre *Exobasidium vexans* par l'induction de la résistance systémique (IRS). Joe et Sivakumar, (2010), démontrent que l'inoculation par les souches *Azospirillum* et *Pseudomonas* induit la résistance chez le riz contre l'agent pathogène *Pyricularia oryzae* par l'activité oxydase, peroxydase, l'accumulation de phénols et diminution de la concentration des sucres. Malathi et Mohan, (2013), montrent que l'inoculation de plants d'*Allium cepa* par une combinaison des agents de contrôle biologique peut induire la synthèse et l'accumulation des enzymes reliées à la défense chez les plantes comme peroxydase, polyphénoloxidase et phenylalanineammonia-lyase.

Chapitre I : Synthèse Bibliographique

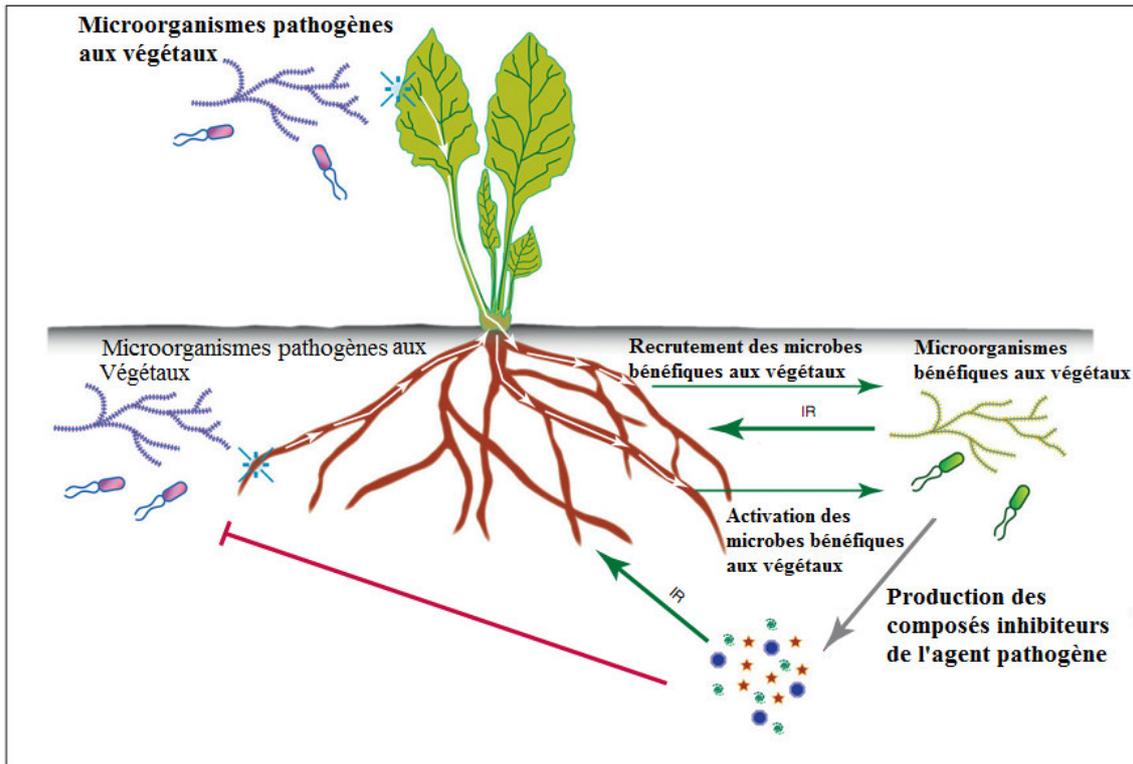


Figure 7. Model montre l'activation de la résistance induite (RI) par les microorganismes bénéfiques (Berendsen et *al.*, 2012).

L'efficacité de la défense de la plante déclenchée par les PGPR dépend d'une variété de facteurs environnementaux abiotiques et biotiques. Les bactéries PGPR se produisent naturellement dans une communauté des organismes complexe du sol dans la rhizosphère (figure 7). Afin, de comprendre comment les PGPRs influencent la défense de la plante contre les ravageurs et agents pathogènes, il est important de comprendre comment les interactions biotiques des organismes de la rhizosphère affectent la capacité des PGPRs pour améliorer la défense des plantes (Hol et *al.*, 2013).

I.3.1.4. Compétition pour l'espace et les nutriments dans la rhizosphère

Le manque de nutriments peut engendrer automatiquement la mort du pathogène. Ceci rend la compétition nutritive un moyen important de la lutte biologique (Beauchamp, 1993; Benitez et *al.*, 2004). Taqarort et *al.*, (2008), suggèrent que les rhizobactéries à croissance rapide, pourrait éliminer les champignons phytopathogènes par compétition pour les sources de carbone et d'énergie. La compétition spatiale contribue aussi à la réduction des infections racinaires par les agents phytopathogènes. En effet, les microorganismes ayant la capacité de coloniser les racines comme certaines bactéries promotrices de la croissance des plantes (Plant Growth Promoting

Chapitre I : Synthèse Bibliographique

Rhizobacteria, PGPR) protègent les racines et occupent les sites d'infection aux agents phytopathogènes (Compant et *al.*, 2005).

La réduction des maladies phytopathogènes, peut être associée à une colonisation importante des racines par les bactéries bénéfiques, ce qui réduit le nombre de sites habitables pour les pathogènes et par conséquent, leur croissance (Reyes et *al.* 2004; Nihorimbere et *al.*, 2011). Cependant, cette corrélation entre l'importance de la population de PGPR sur les racines et la protection observée n'est dans certains cas pas vérifiée et ne peut donc pas être considérée comme une règle générale.

Un cas particulier de compétition pour les nutriments repose sur la compétition pour le fer. Les microorganismes ont la capacité de synthétiser des siderophores qui sont des molécules chélatrices du fer nécessaire à leur croissance. Ces composés ont une grande affinité pour le Fe³⁺. En s'prenant les ions ferriques présents dans la rhizosphère, ils les rendent ainsi non disponibles pour le champignon pathogène, ce qui provoque une diminution de sa croissance.

I.3.1.5. Parasitisme

Les agents antagonistes produisant les enzymes lytiques et qui dégradent les parois du pathogène, ont comme mécanisme d'action le parasitisme. Le contrôle biologique par des agents développant des propriétés mycoparasitiques a été largement rapporté. Parmi ces antagonistes, les *Trichoderma* spp. sont les plus étudiés (Bélangier et *al.*, 1995; Carsolio et *al.*, 1999; Lorito et Woo, 1998; Tsahouridou et Tsahanassouloupoulos 2001, 2002; Viterbo et *al.*, 2002; Hibar et *al.*, 2005; Mukherjee et *al.*, 2007). Plusieurs bactéries, possèdent aussi ce mécanisme de parasitisme, comme les souches de *Bacillus subtilis* qui réduit les populations de *Pythium ultimum* et *Rhizoctania solani* par sécrétion de glucanases et de protéases (Paulitz et Bélangier, 2001); la souche *Bacillus* sp. BPR7 qui produise des enzymes lytiques (Kumar et *al.*, 2012); les isolats d'actinomycètes qui produisent des chitinases et glucanases pour dégrader la paroi de *Fusarium oxysporum* (El-Tarabily et *al.*, 1997; Sabaou et *al.*, 1998). Gopalakrishnan et *al.*, (2011 ;2012 ; 2013; 2014), ont démontré que les actinomycètes produisent des chitinase, lipase, protéases, β -1-3-glucanase et cellulase exercent une activité antagoniste contre *Fusarium oxysporum* f. sp. *ciceri*. Dans une étude récente Aouar et *al.*, (2012), démontrent que les souches appartiennent aux genres de *Streptomyces* et *Nocardiosis* de la rhizosphère la région semi-aride de l'Algérie sont capables de synthétiser des chitinases et de présenter de fortes aptitudes dans lutte

Chapitre I : Synthèse Bibliographique

biologique contre des maladies végétales. Ren et *al.*, (2013), démontrent aussi que la souche *Bacillus pumilus* JK-SX001, produire des cellulases et des protéases; Macagnan et *al.*, (2008), rapportent que des espèces appartiennent au genre *Streptomyces* sont capable de produire des chitinases. De même Brzezinska et *al.*, (2013), ont démontré que *Streptomyces rimosus*, produire de chitinase et elle est capable d'inhiber la croissances des champignons pathogènes; Lin et *al.*, (2014), indiquent que les souches de *Bacillus* sp. possèdent des activités cellulase, chitinase et protéase. Poritsanos et *al.*, (2006), ont rapporté que la souche *Pseudomonas chlororaphis* PA23 produit des protéases et des lipases. Karnwal, (2011) a montré aussi que les souches de *Pseudomonas fluorescens* peuvent produis des enzymes mycolytiques comme β -1,3-glucanases, β -1,4-glucanases et lipases.

Le principal mode d'action de *Coniothyrium minitans* est de parasiter les sclérotos de *Sclerotinia sclerotiorum*. Selon Penaud et Michi, (2009), l'utilisation de *C. minitans* peut être intégrée dans une stratégie de complémentarité des luttés biologique et chimique, surtout en situation à risque *Sclerotinia* élevé.

I.3.2. Stimulation de la croissance par les PGPR

Les PGPR améliorent directement la croissance de la plante par des différents mécanismes: (1) la fixation de l'azote atmosphérique qui est transféré à la plante, (2) la production de allélochimiques y compris sidérophores que chélatent le fer et rendent la disposition de la racine de la plante, (3) la solubilisation des sels minéraux tels que le phosphore, (4) la synthèse de phytohormones.

I.3.2. 1. Synthèse des phytohormones

Les rhizobactéries PGPR peuvent modifier l'architecture des racines et promouvoir la croissance des plantes en raison de leur capacité à synthétiser et sécréter des hormones végétales comme l'acide- β -indolacétique (AIA), les gibbérellines (GA), cytokines et certains composés volatiles (Bloemberg et Lugtenberg 2001). Certains, rhizobactéries qui produisent des hormones végétales, tels que l'acide- β -indolacétique, auxines, cytokinines et l'acide gibbérellique, induisent une stimulation de la croissance des racines, ce qui conduit à l'absorption accrue de nutriments (Morrone et *al.*, 2009; Nihorimbere et *al.*, 2011).

L'hormone de l'AIA est synthétisée par plusieurs rhizobactéries PGPR, tels que *Bacillus* sp. BPR7 (Kumar et *al.*, 2012), *Bacillus* sp. (Lin et *al.*, 2014), *Bacillus subtilis*

Chapitre I : Synthèse Bibliographique

OTPB1 (Chowdappa et al., 2013), *Bacillus licheniformis* A2 (Goswami et al., 2014), *Pseudomonas putida* PP3WT et *Bacillus cereus* BC1AW (Kurabachew et Wydra, 2013), *Kluyvera cryocrescens* KUDC1771 (Son et al., 2014), *Pseudomonas fluorescens* Psd (Kochar et al., 2011), actinomycètes (Gopalakrishnan et al., 2011, 2013, 2014) des souches appartiennent au genre *Streptomyces* (Kaur et al., 2013; Lin et Xu, 2013).

L'éthylène est une autre hormone semble jouer un rôle important sur la croissance des plantes. Les contraintes environnementales peuvent être la cause de la production d'éthylène hormonal chez les plantes, qui se traduit par des réactions d'inhibition de la croissance et du stress. En effet, des études montrent que, dans des conditions de stress comme la salinité, la sécheresse, la présence des métaux lourds et la pathogénicité, l'éthylène est considérablement augmenté chez les plantes, ce qui influence négativement la croissance de la plante (Gonçalves et al., 2013). Par exemple, la forte concentration de l'éthylène induit la défoliation et d'autres processus cellulaires qui peuvent conduire à la performance de la récolte réduite (Arshad et al., 2007; Bhattacharyya et Jha, 2012).

Habituellement, l'éthylène est formé dans les plantes à partir du précurseur acide 1-aminocyclopropane-1-carboxylate (ACC). Certaines bactéries produisent des ACC désaminases, qui dégradent l'ACC, réduisant ainsi la formation d'éthylène dans les plantes (Ahmad et al., 2011; Bal et al., 2013; Bhattacharyya et Jha, 2012; Barnawal et al., 2012; Shahzad et al., 2013; Yim et al., 2013). Plusieurs études ont démontré l'existence des rhizobactéries ont été isolées de la rhizosphère montrent qu'elles sont capables de produire ACC désaminases et d'induit une tolérance contre la sécheresse et le sel et favorise la croissance des plantes, comme *Achromobacter xylosoxidans* Fd2, *Serratia ureilytica* Bac5, *Herbaspirillum seropedicae* Oci9 et *Ochrobactrum rhizosphaerae* Oci13 (Barnawal et al., 2012), *Bacillus* sp. BPR7 (Kumar et al., 2012), *Pseudomonas thivervalensis* (STF3), *Serratia marcescens* (STJ5) (Shahzad et al., 2013). Ahmad et al., (2011), montrent que l'inoculation de haricot mungo par des PGPRs contenant une ACC désaminase et de rhizobiums stimule la croissance des plantes, réduisant ainsi l'effet inhibiteur de la salinité.

Plusieurs formes de stress ont été allégés par la présence des bactéries producteurs de l'ACC désaminase, tels que les effets de microorganismes phytopathogènes, la résistance au stress des hydrocarbures, les métaux lourds, les radiations, la blessure des plante, la prédation par les insectes, la concentration élevée en

Chapitre I : Synthèse Bibliographique

sel, les températures élevées, l'intensité lumineuse élevée, et les inondations (Glick, 2012). En conséquence, les principaux effets notables de l'inoculation des plants par rhizobactérie producteurs de ACC désaminase sont la stimulation de la croissance des racines, de la promotion de la croissance des pousses, et l'amélioration de la nodulation par *Rhizobium* et l'absorption de N, P et K ainsi que la colonisation mycorhizienne dans diverses cultures (Nadeem et al., 2007; Shaharoon et al., 2008; Nadeem et al., 2009; Glick, 2012).

I.3.2. 2. Fixation biologique de l'azote

L'azote (N) est l'élément nutritif le plus essentiel pour la croissance et la productivité des plantes. Bien que, il est d'environ 78 % de N₂ dans l'atmosphère, il est indisponible pour les plantes en croissance. Le N₂ atmosphérique est convertie en des formes utilisables par les plantes fixation biologique de N₂.

Les microorganismes de fixation de l'azote sont généralement classés comme (a) des bactéries symbiotiques de fixation (N₂) y compris les membres de la Rhizobiaceae de famille qui fait symbiose avec les plantes Fabacées (par exemple rhizobiums) (Ahemad et Khan, 2012; Zahran, 2001) et des arbres non-Fabacées (par exemple Frankia) et (b) formes non-symbiotique (vie libre, associative et endophytes) de fixation de l'azote tels que les cyanobactéries (*Anabaena*, *Nostoc*), *Azospirillum*, *Azotobacter*, *Gluconoacetobacter diazotrophicus* et *Azocarus* etc (Bhattacharyya et Jha, 2012). Cependant, les bactéries non symbiotiques fixatrices de l'azote fournissent seulement une petite quantité de l'azote fixé pour la plante hôte (Glick, 2012).

L'azote étant l'un des nutriments les plus limitant de la croissance végétale. Les bactéries fixatrices d'azote sont ubiquistes dans les sols et des espèces fixatrices ont été isolées de la rhizosphère de la majorité des plantes cultivées. Parmi les associations bénéfiques, la symbiose légumineuse-rhizobium est connue pour être une des plus répandues et des plus efficaces pour faire entrer par voie biologique de l'azote (N) sous forme organique dans les écosystèmes (Brunel, 2006). Du point de vue biologique, les associations mutualistes entre plantes et micro-organismes du sol sont des éléments importants à prendre en compte car elles sont essentielles pour la survie, la croissance et la santé des plantes dans les systèmes cultivés qui doivent être économes en intrants et dont des fonctions microbiennes du sol doivent être mieux exploitées (Brunel, 2006).

Chapitre I : Synthèse Bibliographique

Les bactéries hétérotrophes fixatrices d'azote sont abondantes dans la rhizosphère de certaines plantes. Plusieurs souches bactériennes fixatrices de l'azote ont été étudiées pour leurs effet PGPR, comme les *Streptomyces* (Kaur et al., 2013). Kim et al., (2005), ont montré que application des *Azospirillum* fixatrices de l'azote de la rhizosphère des céréales sur le blé donne des bons résultats. Lin et al., (2014), ont montré que les souches de *Bacillus* sp. sont capables de fixer l'azote atmosphérique et de stimuler la croissance de cucumbers. Dans un autre étude Franco-Correa et al., (2010), démontrent aussi que les actinomycètes fixatrices de l'azote, améliorent la croissance des plantes. Gupta et al., (2013), indiquent aussi que les souches PGPR de *Pseudomonas aeruginosa* fixent de l'azote atmosphérique et stimulent la croissance des plantes.

I.3.2.3. Solubilisation et minéralisation des phosphates organiques et inorganiques

Le phosphore (P), est le deuxième élément nutritif important qui limite la croissance des plantes après l'azote et il est disponible en abondance dans les sols, sous deux formes organiques et inorganiques (Ahemad et Kibret, 2014). Malgré le large réservoir de P dans les sols, la forme disponible pour les plantes est généralement faible. Cette faible disponibilité du phosphore pour les plantes est due que la majorité de P du sol se trouve sous des formes insolubles, tandis que les plantes absorbent seulement dans deux formes solubles, les ions monosodique (H_2PO_4^-) et la diabasique (HPO_4^{2-}) (Bhattacharyya et Jha, 2012). Pour surmonter la carence en P dans les sols, il existe des applications fréquentes d'engrais phosphatés dans les champs agricoles. Les plantes absorbent moins de quantités d'engrais phosphatés appliqués et le reste est rapidement converti en complexes insolubles dans le sol (Mckenzie et Roberts, 1990). Mais l'application régulière d'engrais phosphatés est non seulement coûteux, mais est également indésirable pour l'environnement.

Parmi les mécanismes les plus importants pour la promotion de la croissance des plantes est la solubilisation du phosphate minéral dans la rhizosphère (Oves et al., 2009; Ahemad et Khan, 2012). Cela a conduit à rechercher une option écologiquement sûr et économiquement raisonnable pour améliorer la production agricole dans les sols à faible P. Dans ce contexte, les microorganismes solubilisant le phosphate, peuvent fournir les formes disponibles de P sur les plantes et donc un substitut viable aux engrais chimiques phosphatés (Khan et al., 2009). Plusieurs rhizobactéries solubilisant le

Chapitre I : Synthèse Bibliographique

phosphate sont considérés comme des engrais biologiques prometteurs car elles peuvent fournir le P des à partir de sources non ou mal disponibles au plantes par des divers mécanismes.

Une étude de terrain d'une durée de 3 ans a été réalisée sur des champs de maïs a montré que les inoculation par des rhizobactéries favorisant la croissance des plantes et les champignons mycorrhizes arbusculaires et leur combinaison augmentent la croissance des plantes et leur récolte puissent augmenter la captation des nutriments, prélevant ainsi plus de nutriments du sol, notamment le N, le P et le K (Adesemoye et *al.*, 2008). Parmi les microorganismes qui solubilisent le phosphate, il y a des actinomycètes (Franco-Correa et *al.*, 2010) des souches appartiennent au genre *Streptomyces* (Kaur et *al.*, 2013), *Pseudomonas aeruginosa* (Gupta et *al.*, 2013), *Kluyvera cryocrescens* KUDC1771 (Son et *al.*, 2014), *Burkholderia cepacia* SCAUK0330 (Zhao et *al.*, 2014), *Bacillus licheniformis* A2 (Goswami et *al.*, 2014), Des isolats appartiennent aux genres *Pseudomonas*, *Burkholderia* et *Acinetobacter* (Azziz et *al.*, 2012), *Bacillus* sp. BPR7 (Kumar et *al.*, 2012), *Bacillus subtilis* CB (8) (Mehta et *al.*, 2013). Les bactéries appartiennent aux genres *Azotobacter*, *Bacillus*, *Beijerinckia*, *Burkholderia*, *Enterobacter*, *Erwinia*, *Flavobacterium*, *Microbacterium*, *Pseudomonas*, *Rhizobium* et *Serratia* sont signalées comme des bactéries les plus importantes qui solubilisent le phosphate (Bhattacharyya et Jha , 2012). En général, la solubilisation du phosphore inorganique se produit comme une conséquence de l'action des acides organiques de faible poids moléculaire qui sont synthétisés par diverses bactéries du sol (Zaidi et *al.*, 2009). A l'inverse, la minéralisation du phosphore organique se produit par la synthèse d'une variété de différentes phosphatases (Glick, 2012). La solubilisation et la minéralisation du phosphate peuvent coexister dans la même souche bactérienne (Tao et *al.*, 2008).

I.4. Actinomycètes comme des agents de lutte biologique

Les actinomycètes appartiennent au règne des procaryotes, division des fimicutes (bactéries Gram positif), classe des thallobacteria (bactéries filamenteuses) et à l'ordre des actinomycétales. Sur milieu solide, le cycle de développement des actinomycètes est très similaire à celui des champignons, à la différence essentielle que ces bactéries demeurent haploïdes durant tout le cycle. Les actinomycètes sont des bactéries filamenteuses dont la croissance donne lieu à des colonies constituées

Chapitre I : Synthèse Bibliographique

d'hyphes, c'est à dire des filaments qui irradient, par croissance centrifuge, tout autour du germe qui leur a donné naissance. Cela explique leur dénomination le mot «Actinomycètes» provient de deux substantifs grecs « Actino » et « Mycete » et signifie «champignons à rayon» ou «champignons rayonnants».

Sur milieu nutritif, la germination d'une spore à partir de laquelle croît un tube germinatif constitue le point de départ du cycle. De ce tube se développe un réseau constitué d'hyphes qui se ramifient, formant un mycélium primaire qui s'étend sur et dans le milieu. À partir de ce mycélium primaire s'élève par croissance apicale un mycélium secondaire aérien de forme variable selon les genres bactériens. Suivent un cloisonnement des hyphes aériens, un épaissement des cloisons et, finalement, la libération de spores (figure 8) (Delaunay *et al.*, 2003). Ces formes cellulaires permettent la survie dans des conditions défavorables à la croissance végétative.

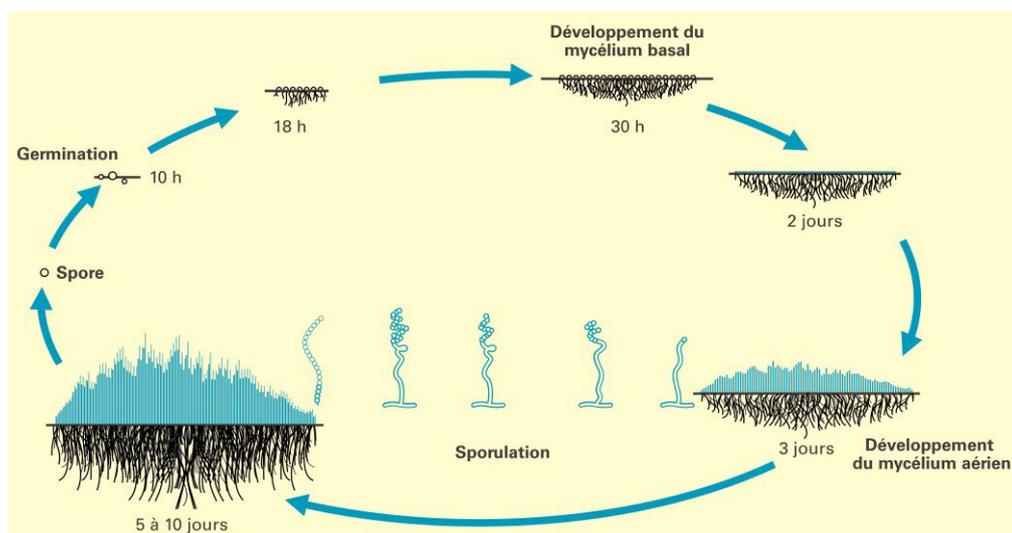


Figure 8. Cycle de développement de *Streptomyces* sur milieu solide (Delaunay *et al.*, 2003).

Les actinomycètes représentent une grande proportion de la biomasse microbienne du sol et ont la capacité de produire une large variété d'antibiotiques et d'enzymes extracellulaires. Plusieurs souches d'actinomycètes s'avèrent capables de protéger les plantes contre des maladies (Doubou *et al.*, 2002; Jayasinghe et Parkinson, 2008).

La classification des actinomycètes se fait à partir de critères morphologiques et biochimiques. Dans ce groupe bactérien, le genre *Streptomyces* est le plus abondant et il est responsable de la majeure partie de la production actuelle des antibiotiques

Chapitre I : Synthèse Bibliographique

(Delaunay et *al.*, 2003; Badji et *al.*, 2005; de Lima Procópio et *al.*, 2012; Hwang et *al.*, 2014).

Tableau 1 : Exemples d'antibiotiques produits par le genre *Streptomyces* (Delaunay et *al.*, 2003).

Classification	Antibiotique	Organisme producteur	Cible et spectre d'activité
Aminoglycosides	Streptomycine	<i>S. griseus</i>	Synthèse protéique ; spectre large, inactifs sur les streptocoques et anaérobies stricts
	Spectinomycine	<i>S. spectabilis</i>	
	Néomycine B	<i>S. fradiae</i>	
Tétracyclines	Chlortétracycline	<i>S. aureofaciens</i>	Synthèse protéique ; large spectre, mycobactéries, mycoplasmes
	Oxytétracycline	<i>S. rimosus</i>	
Polyènes	Nystatine	<i>S. noursei</i>	Membrane cytoplasmique ; fongicides : levures, champignons
	Amphotéricine	<i>S. nodosus</i>	
Macrolides	Spiramycine	<i>S. ambofaciens</i>	Synthèse protéique ; spectre étroit, bacilles Gram+ et -, anaérobies stricts
	Érythromycine	<i>S. erythreus</i>	
	Rapamycine	<i>S. hygrosopicus</i>	
	Natamycine	<i>S. natalensis</i>	
	Avermectine	<i>S. avermitilis</i>	
	Tylosine	<i>S. fradiae</i>	
	Oléandomycine	<i>S. hygrosopicus</i>	
Streptogramines	Pristinamycine	<i>S. pristinaespiralis</i>	Synthèse protéique ; Gram+, staphylocoques
	Virginiamycine	<i>S. virginiae</i>	
Glycopeptides	Vancomycine	<i>S. orientalis</i>	Synthèse pariétale ; Gram+, mycobactéries
Lincosamides	Lincomycine	<i>S. lincolnensis</i>	Synthèse protéique ; Gram+ (staphylocoques, anaérobies)
Autres	Chloramphénicol	<i>S. venezuela</i>	Synthèse protéique ; utilisé contre la fièvre typhoïde, les méningites cérébro-spinales (<i>Neisseria meningitidis</i>)

Le tableau 1 illustre quelques exemples d'antibiotiques produits par les *Streptomyces* avec cibles et spectres d'action. De nombreuses recherches se sont

Chapitre I : Synthèse Bibliographique

récemment développées en vue de trouver de nouveaux antibiotiques produits par des actinomycètes « rares », n'appartenant pas au genre *Streptomyces* (Delaunay et al., 2003). Hwang et al., (2014), récapitulent quelques métabolites représentatifs synthétisés par des différentes espèces appartenent au genre *Streptomyces* dans la figure 9.

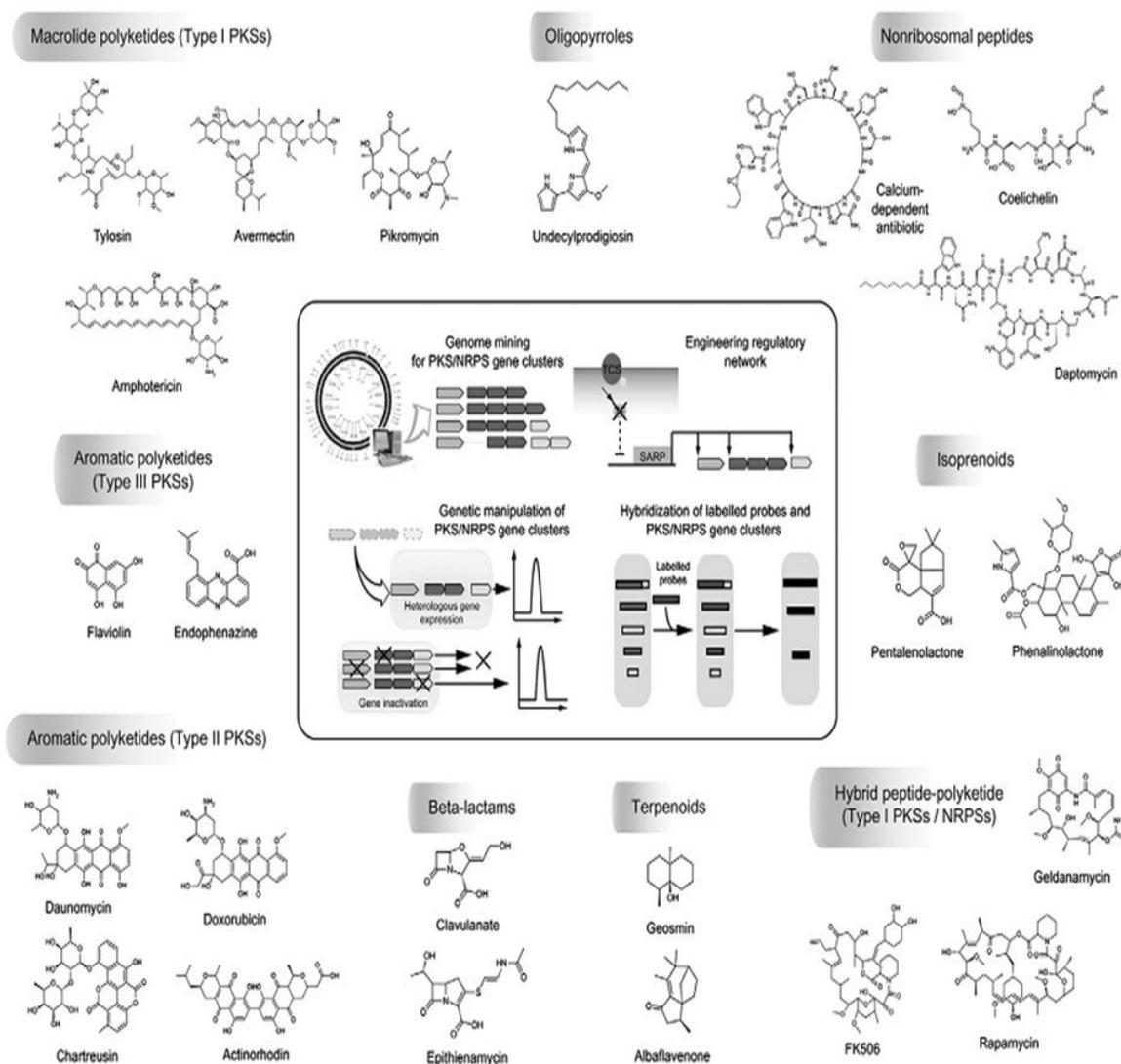


Figure 9. Les métabolites secondaires représentatifs chez les espèces de *Streptomyces* (Hwang et al., 2014). Entre parenthèses les types d'enzymes de biosynthèse associés. Abréviations: SARP, *Streptomyces* protéine régulatrice antibiotique; TCS, système à deux composants.

Les agents de lutte biologique basés sur les actinomycètes ont retenu l'attention des chercheurs au cours des dernières décennies. Ces actinomycètes antagonistes sont connus pour être très efficaces contre plusieurs maladies phytopathogéniques liées aux

Chapitre I : Synthèse Bibliographique

sols, ainsi que pour la dégradation de composés aromatiques (toxiques) présents aussi dans les sols. Les multiples enzymes lytiques, les antibiotiques et les hormones de croissance produits par ces bactéries leur confèrent la capacité de protéger les plantes contre les phytopathogènes, ainsi que d'accroître le contenu en nutriments des sols (Sastrahidayat et *al.*, 2011; Kaur et *al.*, 2013; Nagpure et *al.*, 2014; Gopalakrishnan et *al.*, 2014).

Récemment, Cerkauskas et Ferguson, (2014), ont montré l'efficacité des produits de lutte biologique, Sporodex (*Pseudozyma flocculosa*) et Actinovate (*Streptomyces lydicus*) contre la maladie de blanc du concombre (*Podosphaera xanthii*) qui cause des pertes annuelles importantes de rendement et de qualité dans les cultures en serre au Canada.

I.5. Bactériocines comme des agents antimicrobiens

I.5.1. Définition des bactériocines

Différentes définitions des bactériocines ont été données au cours du temps (Dortu et Thonart, 2009). Klaenhammer, (1988), définit les bactériocines comme des protéines, ou complexes de protéines, avec une activité bactéricide contre des espèces proches de la souche productrice. Cenatiempo et *al.*, (1996), définit les bactériocines comme toute molécule de nature protéique (fut-ce partiellement), synthétisée par la voie ribosomique et douée d'une activité bactéricide ou bactériostatique. Cependant, Yang et *al.*, (2014), définit les bactériocines comme des peptides antimicrobiens de synthèse ribosomique produits par les bactéries, qui peuvent tuer ou inhiber les souches bactériennes liées ou non à des bactéries productrices.

Les bactériocines représentent une large classe de substances antagonistes qui varient considérablement du point de vue de leur poids moléculaire, de leurs propriétés biochimiques, de leur spectre d'action et de leur mode d'action (Klaenhammer, 1988).

I.5.2. Classification des bactériocines

Les bactériocines diffèrent entre elles par leur structure, leur mode d'export et leur mode d'action. Cette forte divergence a rendu leur classification assez difficile. Il existe plusieurs classifications. Les connaissances acquises ont permis de créer une classification des bactériocines réparties en quatre classes, reposant sur les propriétés biochimiques et les mécanismes d'action (Klaenhammer, 1993).

Chapitre I : Synthèse Bibliographique

Classe I. Les antibiotiques : peptides de taille inférieure à 5 kDa, stables à la chaleur et qui contiennent des acides aminés inhabituels soufrés formés post-traductionnellement, c'est-à-dire la lanthionine, la β -méthyl lanthionine, la déhydrobutyrine et la déhydroalanine. Ils peuvent être divisés en deux types : la **classe Ia** qui comprend des peptides cationiques hydrophobes allongés contenant jusqu'à 34 acides aminés et la **classe Ib** qui comprend les peptides globulaires chargés négativement ou sans charge nette et contenant jusqu'à 19 acides aminés (McAuliffe et Hill, 2001; Twomey et al., 2002). Certains antibiotiques sont par ailleurs constitués de deux peptides agissant ensemble pour avoir une activité comme la lactacin 3147.

Classe II. Peptides de taille inférieure à 10 kDa, stables à la chaleur, ne contenant pas d'acides aminés modifiés. Leur point isoélectrique varie entre 8 et 10. Cette classe est divisée en trois sous-classes. Les bactériocines de la **sous-classe IIa** contiennent entre 27 et 48 acides aminés et ont toutes une partie N-terminale hydrophobe contenant la séquence consensus YGNGV ainsi qu'un pont disulfure et une partie C-terminale moins conservée, hydrophobe ou amphiphile qui détermine la spécificité d'action (Fimland et al., 2000; Richard et al., 2006; Cui et al., 2012). Elles ont toutes une activité contre *Listeria monocytogenes*. Certaines bactériocines de cette sous-classe contiennent également un deuxième pont disulfure dans leur domaine C-terminale qui semble être important dans la stabilisation de la structure tertiaire. Il semble par ailleurs qu'il leur conférerait une meilleure activité antimicrobienne, une meilleure résistance à l'exposition à des hautes températures et un spectre d'action plus large (Eijsink et al., 1998; Fimland et al., 2000; Drider et al., 2006; Richard et al., 2006). La **sous-classe IIb** comprend les bactériocines ayant besoin de deux peptides pour avoir une activité. Deux types de bactériocines de classe IIb peuvent être distingués : le type E (*Enhancing*) où la fonction d'un des deux peptides est d'augmenter l'activité de l'autre et le type S (*Synergy*) où les deux peptides sont complémentaires. La sous-classe IIc contient les bactériocines ne pouvant pas être classées dans les autres sous-classes.

Classe III. Protéines de taille supérieure à 30 kDa et sensibles à la chaleur. La structure et le mode d'action de ces bactériocines diffèrent complètement des autres bactériocines produites par les bactéries lactiques. Cette classe ne contient que quatre bactériocines : l'helveticin J produite par *Lactobacillus helveticus* A, l'enterolysin A produite par *Enterococcus faecium*, la zoocin A produite par *Spreptococcus zooepidemicus* et la millericin B produite par *Streptococcus milleri* (Papagianni et Papamichael, 2011).

Chapitre I : Synthèse Bibliographique

Classe IV. Peptides requérant une partie carbohydratée ou lipidique pour avoir une activité. Aucune bactériocine de cette classe n'a été décrite (Papagianni et Papamichael, 2011).

I.5.3. Le mécanisme de production des bactériocines et sa régulation

Différentes protéines sont impliquées dans la production des bactériocines et sa régulation. Les bactériocines sont produites sous forme d'un prépeptide non-biologiquement actif qui subira des modifications post-traductionnelles pour aboutir au peptide actif. Cette production est souvent régulée par un système de *Quorum Sensing*, un mécanisme permettant à certains gènes d'être exprimés en fonction de la densité de la population bactérienne (Dortu et Thonart, 2009).

I.5.4. Les applications des bactériocines

Les bactériocines sont habituellement reconnues comme sûres, sont sensibles aux protéases digestives et ne sont pas toxiques pour les cellules eucaryotes (Wijaya et al., 2006). Elles ont une grande tolérance aux variations de pH et aux traitements thermiques. Leur spectre antimicrobien peut être large ou étroit, elles peuvent donc cibler sélectivement des bactéries pathogènes ou altérantes sans inhiber les bactéries indispensables et ont un mode d'action bactéricide (Gálvez et al., 2007). Les bactériocines doivent cependant être considérées comme un moyen de préservation complémentaire à ceux déjà existant (Deegan et al., 2006).

L'émergence de souches bactériennes pathogènes résistant à plus d'un antibiotique force la communauté scientifique à développer des méthodes alternatives à l'utilisation d'antibiotiques lors du traitement des infections bactériennes. Une des solutions face à ce dilemme est basée sur l'utilisation des bactériocines par plusieurs groupes de recherche, comme voie d'avenir afin de réduire l'utilisation des antibiotiques (Reid et Burton, 2002).

I.5.4.1. L'application des bactériocines dans le secteur alimentaire

Les bactériocines sont généralement connues comme des composés naturels capables de protéger et d'influencer la qualité des aliments (Settanni et Corsetti, 2008; O' Shea et al., 2013). Les bactériocines peuvent être appliquées sous une forme purifiée, semi-purifiée ou sous la forme d'un concentré obtenu après fermentation d'un

Chapitre I : Synthèse Bibliographique

substrat alimentaire. Les bactéries productrices peuvent également être appliquées dans les produits alimentaires, la bactériocine sera alors produite *in situ*.

L'utilisation des bactéries productrices de bactériocines peut être intéressante tant au niveau législatif qu'économique. Les bactéries productrices de bactériocines peuvent être ajoutées comme starter dans des produits fermentés ou comme culture protectrice. Elles doivent être capables de croître et de produire des bactériocines dans l'aliment à conserver. La composition du produit (nutriments accessibles, pH, additifs alimentaires, etc.) et les conditions de stockage (température, atmosphère, activité d'eau, etc.) doivent donc permettre la croissance et la production de bactériocines. Cette production étant souvent sous le contrôle d'un système de *Quorum Sensing*, la concentration en molécule inductrice doit être suffisante, son interaction avec la matrice alimentaire peut donc être un facteur limitant (Dortu et Thonart, 2009).

L'application des bactériocines dans la conservation des aliments peut être bénéfique pour plusieurs raisons (Gálvez et *al.*, 2007; Messaoudi et *al.*, 2013): (1) diminuer les risques d'intoxication alimentaire, (2) diminuer la contamination dans la chaîne alimentaire, (3) améliorer la durée de vie des produits alimentaires, (4) protéger les aliments au cours des périodes de température élevée, (5) réduire les pertes économiques dues à la détérioration des aliments, (6) réduire l'ajouts des agents de conservation chimiques, (7) réduire l'intensité de traitements physiques, qui conduit ainsi à une meilleure préservation de la valeur nutritionnelle des aliments et peut-être réduire le coût de traitement (8), fournir des alternatives pour la préservation "nouveaux aliments" et satisfaire les demandes des consommateurs pour les aliments avec au goût frais, légèrement préservés et prêts à manger. Jusqu'à présent, seule la nisine, un antibiotique, est acceptée comme additif alimentaire (E234) (Guinane et *al.*, 2005).

Chapitre I : Synthèse Bibliographique

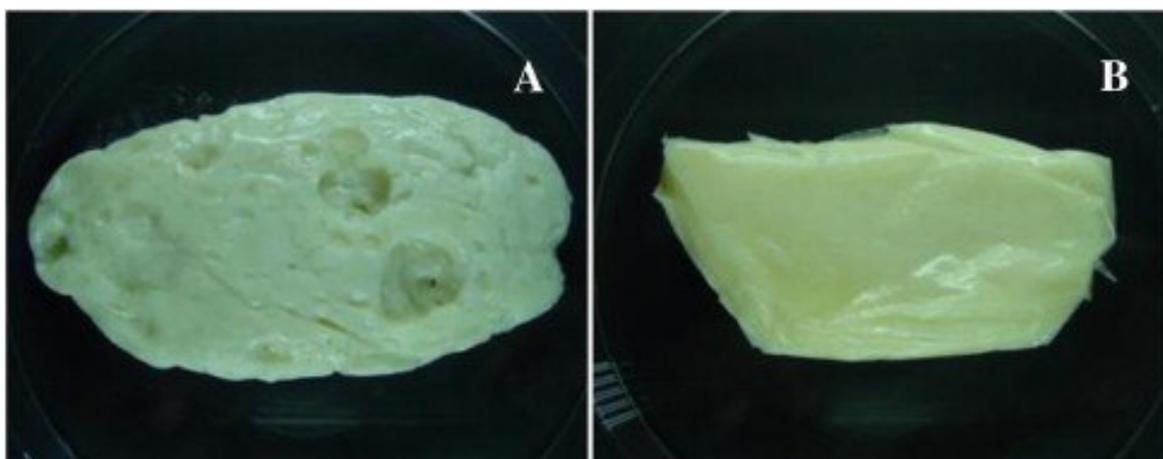


Figure 10. Photographie d'un fromage fabriqué à partir de lait de brebis et inoculées par *Clostridium beijerinckii* INIA 63 (après 60 jours) et (A) *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* INIA 415-2 (mutant non producteur bactériocine) ou (B) *L. lactis* subsp. *lactis* INIA 415 (producteur de bactériocine), après une incubation à 25 °C pendant 15 jours (Garde et *al.*, 2011).

Plusieurs souches bactéries lactique LAB (lactic acid bacteria) bactériocinogéniques ou leurs bactériocines peuvent être appliquées directement dans les produits du lait fermentés comme le fromage (figure 10) (Garde et *al.*, 2011), dans les produits des végétaux fermentés et non fermentés ou comme des additives alimentaires (Settanni et Corsetti, 2008 ; Khan et *al.*, 2010; Yang et *al.*, 2014). Lucas et *al.*, (2006), démontrent que l'enterocin AS-48 inhibe la croissance des *Bacillus coagulans* dans les produits alimentaires à base des végétaux.

Les *Enterococcus* font partie des aliments fermentés, principalement des produits laitiers. Aguilar-Galvez et *al.*, (2012), rapportent que la grande diversité des bactériocines (entérocoques) retrouvées dans les entérocoques pourrait être valorisée en développant des méthodes de purification qui permettraient de substituer l'utilisation de ces souches par l'emploi d'entérocoques sur les matrices alimentaires. Les entérocoques produit une grande diversité de bactériocines, considérées comme des agents de contrôle biologique dans les aliments, en conservant leurs propriétés organoleptiques et nutritionnelles. Elles constituent ainsi une alternative à l'utilisation d'additifs chimiques ou à celle de traitements physico-chimiques employés dans la conservation des produits alimentaires. De plus, les bactériocines présentent l'avantage d'être rapidement digérées

Chapitre I : Synthèse Bibliographique

par des protéases du tractus digestif humain sans produire de substances secondaires toxiques.

La nisine est actuellement la seule bactériocine légalement approuvée comme additif alimentaire (additif numéro E234) dans 80 pays. Elle a été évaluée comme sans danger pour l'Homme par l'organisation des Nations Unies pour l'Alimentation et l'Agriculture (ONUAA) et l'Organisation Mondiale pour la Santé publique (OMS) en 1969.

En supposant levées toutes les limitations réglementaires relatives à l'emploi des bactériocines en tant que des additifs, le problème serait de choisir la bactériocine la plus appropriée à une utilisation particulière, c'est-à-dire celle dont l'efficacité vis-à-vis des bactéries cibles est la plus grande, sans que la flore utile dans certains produits soit affectée (Richard, 1996).

I.5.4.2. L'application des bactériocines dans le domaine médical et pharmaceutique

Les bactériocines peuvent également trouver des applications dans le secteur médical ou elles peuvent être utilisées comme agents antimicrobiens dans l'industrie pharmaceutique.

Une des méthodes alternatives proposées pour réduire à long terme l'utilisation des antibiotiques pour le traitement de maladies infectieuses chez l'humain fait appel à la capacité de certaines bactéries à produire des bactériocines. En effet, l'utilisation des bactériocines n'est pas restreinte au domaine alimentaire, plusieurs études ont démontré que l'utilisation répandue des antibiotiques pour traiter et prévenir les infections, engendre de sérieux problèmes de toxicité et de résistance. Par leurs caractéristiques mentionnées précédemment, les bactériocines ont été énormément appréciées comme étant des agents de thérapie, naturelle. Selon, Yang et *al.*, (2014), les bactériocines agissent comme un arme immunitaire d'un système bactérien naturel.

Les probiotiques, définis par l'Organisation mondiale de la santé (OMS) comme des « microorganismes qui, administrés vivants et dans des quantités adéquates, confèrent un bénéfice à la santé de l'hôte ». Le champ d'application de ces micro-

Chapitre I : Synthèse Bibliographique

organismes et sursaux qui produits des bactériocines est vaste, touchant de nombreux domaines dont celui des maladies infectieuses et en particulier des infections respiratoires (Alexandre et *al.*, 2014). Les probiotiques pourraient exercer leur efficacité protectrice par différents mécanismes (ex.: compétition avec des bactéries pathogènes, production de bactériocine, acidification, production de vitamines ou d'enzymes bénéfiques) (Grangette, 2007). La production de bactériocine est devenue un critère important pour la sélection des probiotiques. Cependant, peu d'études ont clairement démontré l'impact de la production de bactériocine sur la capacité de la souche productrice à être compétitive vis-à-vis d'une communauté microbienne et à influencer positivement la santé de l'hôte. Les bactériocines pourraient agir de trois façons distinctes au niveau d'un écosystème complexe. Elles faciliteraient l'introduction de la souche productrice dans une niche préétablie en jouant le rôle de peptide de colonisation. Les bactériocines pourraient aussi agir en tant que peptides tueurs en ayant un effet direct sur l'inhibition de souches pathogènes. Enfin, elles pourraient agir comme peptide de signalisation et induire une modulation du microbiote colique tout en influençant la stimulation du système immunitaire de l'hôte. La figure 11 adapté de Dobson et *al.*, (2011), résume de façon schématique les différents rôles que peuvent jouer les bactériocines.

Les bactériocine sont utilisables dans des applications médicales pour l'espèce humaine et animale (Yang et *al.*, 2014). Récemment, des évidences ont clairement démontré le potentiel des bactéries productrices de bactériocines pour la prévention de certains types d'infections bactériennes chez l'humain comme le potentiel de la bactériocine produite par la souche l'infection *Pediococcus pentosaceus* SB83 contre les infections vaginale, qui a été démontré par Borges et *al.*, (2014) et Sandra et *al.*, (2014).

Une autre étude menée par Joseph et *al.*, (2013), suggèrent que la bactériocine partiellement purifiée de *Bacillus subtilis* peuvent être utilisée comme un agent antimicrobien chez l'homme pour traiter les bactéries pathogènes de l'ulcère du pied diabétique.

Chapitre I : Synthèse Bibliographique

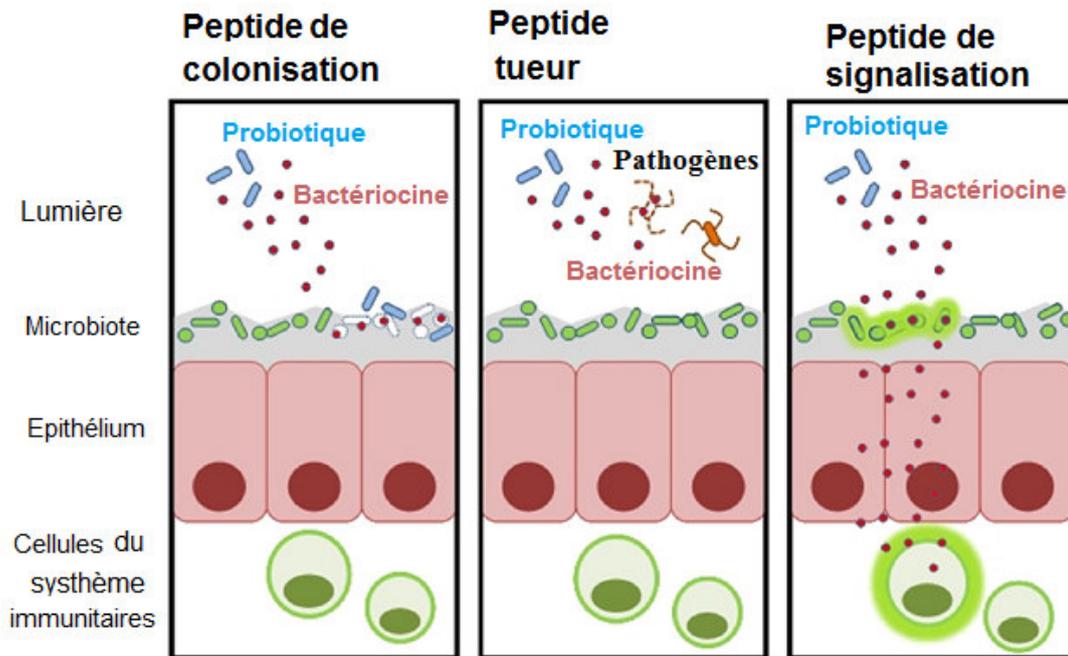


Figure 11. Mécanismes par lesquels la production des bactériocines pourraient contribuer au fonctionnement des probiotiques (Dobson et *al.*, 2011). Les bactériocines pourraient agir en tant que peptides de colonisation en apportent un avantage compétitif pour la souche productrice vis-à-vis du microbiote résident (Gillor et *al.*, 2009); les bactériocines pourraient agir en tant que peptide tueur, en éliminant directement les agents pathogènes (Corr *al.*, 2007); ou les bactériocines pourraient servir en tant que peptides de signalisation, pour stimuler d'autres bactéries du microbiote et/ou le système immunitaire (Kleerebezem et *al.*, 1997; Meijerink et *al.*, 2010; van Hemert et *al.*, 2010).

L'infection par *Clostridium difficile* est la majeure cause de la mortalité chez les patients hospitalisés et elle impose des problèmes de dépense financières considérables pour les services de la santé en Europe et en USA. Actuellement, des études montrent l'activité des bactériocines comme Nisin A, Nisin V, Thuricin CD, Lacticin, LFF571 et Actagardine A contre *Clostridium difficile* et que les antibiotiques peuvent être remplacés par ces bactériocines (Rea et *al.*, 2013). D'une autre part, plusieurs souches appartenant au genre *Bifidobacterium*, produisent plusieurs bactériocines qui ont des applications potentielles dans le domaine pharmaceutique (Martinez et *al.*, 2013).

I.5.4.3. L'application des bactériocines dans le domaine de la médecine vétérinaire

L'utilisation d'une bactériocine à la place d'un antibiotique, par intermittence, aiderait à détruire les populations résistantes. Les antibiotiques ont un très large spectre

Chapitre I : Synthèse Bibliographique

d'action, donc ils peuvent agir sur à peu près la moitié de la flore naturelle trouvée dans le rumen des bovins, alors que les bactériocines sont par contre extrêmement spécifiques, ce qui permet, par exemple, de cibler seulement les bactéries qui dégradent des protéines alimentaires ou seulement celles qui produisent du méthane. Un autre avantage qui s'ajoute, tient au fait que les bactériocines sont des protéines non toxiques qui se digèrent facilement. Comme elles sont digérées par l'animal, il n'y a aucun risque qu'il reste des résidus dans la viande ou le lait. Par contre, les antibiotiques classiques ne sont pas digestibles, sont très toxiques et doivent être manipulés et administrés avec précaution.

Plusieurs études ont démontré l'utilisation potentielle des bactéries probiotiques productrices des bactériocine comme des additifs dans les aliments des animaux. En effet, Stropfová et Lauková, (2007), suggèrent que la bactériocine nommé EF55 d'*Enterococcus* spp. d'origine de poulet est un agent probiotique prometteur comme un complément pour les volailles. Morovský et al., (1998), ont démontré que la bactériocine produite par *Enterococcus faecium* BC25 d'origine ruminale, exerce un effet bactériostatique contre *Streptococcus bovis* et elle peut être utile en tant que modulateurs de fermentation dans le rumen. De même, Amado et al., (2012), démontrent que les deux souches probiotiques *Lactococcus lactis* CECT 539 et *Pediococcus acidilactici* NRRL B-5627 qui produisent des bactériocines peuvent être utilisées comme inoculum dans l'ensilage pour contrôler *Listeria monocytogenes* chez les ruminants.

I.5.4.4. L'application des bactériocines dans le domaine agricole

La protection des plantes contre les microorganismes phytopathogènes ainsi que la préservation des semences, sont les objectifs de l'exploitation des bactériocines en agriculture. Dans ce cas, des substances antibactériennes et substances antifongiques seront associées afin de lutter contre les ravageurs phytopathogènes. Plusieurs travaux scientifiques, montrent les effets bénéfiques des souches bactériocinogéniques sur la croissance et la protection des plantes contre les agents phytopathogènes. Hafeez et al., (2005), montrent que la souche *Rhizobium leguminosarum* bv. viciae LC-31 produise une bactériocine qui joue un rôle important dans la compétition interspécifique et intraspécifique et qui est très importante pour la préparation des biofertilisants. D'autre part, Hammami et al., (2009), montrent que la souche *Bacillus subtilis* 14 B et leur

Chapitre I : Synthèse Bibliographique

bactériocine peuvent réduire le pourcentage d'infection des plantes par *Agrobacterium tumefaciens*. Jung et al., (2011), ont démontré que les bactériocine de classe IId (thuricin 17 and bacthuricin F4), purifiées à partir des souches *Bacillus* sont capables d'induire les enzymes reliées au système de défense chez le soya. De même, Panda et al., (2014), indiquent que les bactéries appartenant au genre *Brevibacillus* sont capables de synthétiser des bactériocines et elles peuvent être de bons candidats de lutte biologique. La thermophiline ST-1 est aussi une bactériocine produite par *Streptococcus thermophilus* ACA-DC 0001 et qui elle présente un large spectre d'activité contre les germes pathogènes alimentaires ainsi que contre certaines bactéries Gram-négatives phytopathogènes (Aktypis et Kalantzopoulos, 2003).

I.5.5. Combinaison des bactériocines avec d'autres agents

La combinaison des bactériocines avec d'autres traitements de conservation chimique ou physique donne des résultats prometteurs pour la conservation des aliments. Les molécules chimiques peuvent être des acides organiques, le nitrite, le chlorure de sodium, l'éthanol, des huiles essentielles (l'impact sur les propriétés organoleptiques doit être soigneusement évalué) ou des agents chélatants tel que l'EDTA, le phosphate trisodique, le citrate. Ces agents chélatants permettent de séquestrer les ions magnésium des lipopolysaccharides de la membrane externe des bactéries Gram⁻ permettant aux bactériocines d'atteindre la membrane interne, siège de leur activité. Les traitements physiques peuvent être des traitements thermiques, le stockage sous atmosphère contrôlée, l'application de champs électriques ou l'application des hautes pressions (Gálvez et al., 2007). D'autre part, l'utilisation d'inhibiteurs de protéases ou de protéines de soja a été suggérée afin de prévenir la dégradation des bactériocines par les protéases présentes dans le produit à conserver (Kouakou et al., 2008).

Chapitre II



Matériel et Méthodes

Chapitre II : Matériel et méthodes

II. 1. Zone d'étude et matériel végétal

L'étude a été conduite sur deux sites représentant les régions arides et semi-arides d'Algérie, à savoir : la station de Boussaâda à M'sila, zone semi-aride à aride (Nord-Est Algérien) (Guettouche et Guendouz, 2007); la station de Biskra, zone aride (Sud Algérien) (Hiouani et Bensaid, 2009). La figure 12 contient les informations sur la localisation des deux régions concernées par l'étude et les points de prélèvements des plantes et les échantillons de sols rhizosphériques.

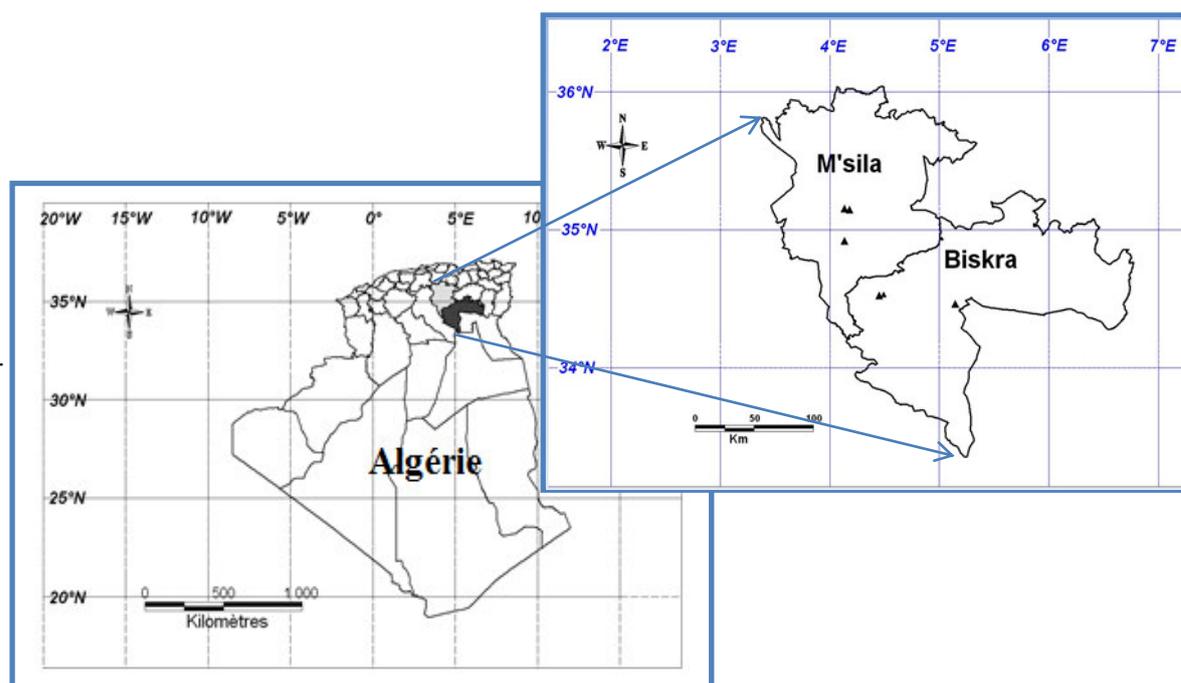


Figure 12. Sites de prélèvement des sols rhizosphériques de trois Fabacées (*Ononis angustissima* Lam., *Calobota saharae* Coss. & Dur. et *Astragalus gombo* Cos. & Dur.).

Tableau 2 : Ecologie des espèces végétales étudiées (Quezel et Santa, 1963).

Espèces	Habitats	Biogéographie	Type	Sol
<i>Ononis natrix</i> L. ssp. <i>angustissima</i> (Lam.)	Commun : Sahara et Tell	Méditerranéen Très Rare	Chaméophytes	Sableux
<i>Astragalus gombo</i> Cos. & Dur.	Désertique et aride	Endémique Saharien	Chaméophytes	Sableux
<i>Calobota saharae</i> Coss. & Dur.	Rocailles plus ou moins ensablées	Endémique Nord Saharien	Phanérophytes	Sableux

L'identification des trois Fabacées endémiques au sens large (S.L.) *Ononis angustissima* Lam., *Calobota saharae* (Coss. & Durieu) Boatwr. & B.-E. van Wyk (Nom scientifique ancien est *Genista saharae* Coss. & Durieu, *Spartidium saharae* (Coss. &

Chapitre II : Matériel et méthodes

Reboud) Pomel) et *Astragalus gombo* Cos. & Dur.) (Figure 13) est réalisée selon les caractères morphologiques et écologiques (Tableau 2) cités par Quezel et Santa, (1963) et Ozenda, (2004).

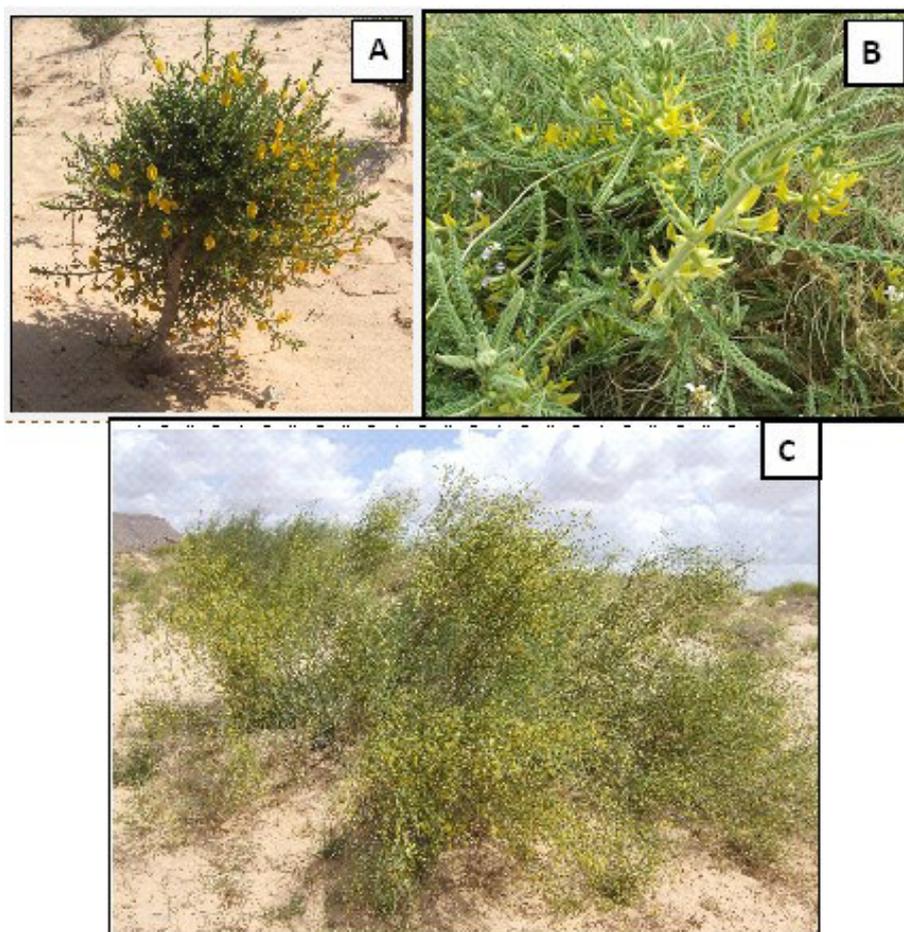


Figure 13. Photos montrent les trois Fabacées endémiques d'Algérie : (A) *Ononis angustissima* Lam., (B) *Astragalus gombo* Cos. & Dur. et (C) *Calobota saharae* Coss. & Dur.).

II.2. Caractérisation des Actinomycètes de la rhizosphère de trois Fabacées (*Ononis angustissima* Lam., *Calobota saharae* Coss. & Dur. et *Astragalus gombo* Cos. & Dur.)

II.2.1. Isolement des Actinomycètes

Des échantillons de sols rhizosphériques de trois Fabacées (*Ononis angustissima* Lam., *Calobota saharae* Coss. & Dur. et *Astragalus gombo* Cos. & Dur.) ont été pris à

Chapitre II : Matériel et méthodes

partir de deux sites à savoir Boussaâda et Biskra. Les racines avec le sol qu'ils l'entourent, ont été prélevées dans des cylindres stériles, fermés en novembre 2007 et stockés à 4 °C jusqu'à leur utilisation. Pour chaque échantillon prélevé, 10 g du sol ont été dilués dans 90 ml de l'eau physiologique stérile (NaCl à 9 g.l⁻¹), puis incubés à 50 °C dans un incubateur avec agitation 150 tpm pendant 30 min.

L'isolement des actinomycètes, a été effectué par la méthode de suspensions-dilutions et étalement sur milieu. Une série de dilutions de 10⁻¹ à 10⁻⁶ dans de l'eau physiologique stérile (NaCl 9 g.l⁻¹) a été préparée à partir de chaque échantillon. Après agitation au vortex, 0,1 ml de chaque dilution estensemencé à la surface des boîtes de Pétri contenant le milieu ISP2 (Internationale Streptomycète projet) (Shirling et Gottlieb, 1966), complétée par la streptomycine (2,5 mg.ml⁻¹) et l'amphotéricine B (75 mg.ml⁻¹) afin d'empêcher la contamination bactérienne et fongique, respectivement. Les boîtes Pétri ont été incubées à 28 °C, et la croissance a été suivie durant 14 jours.

Le dénombrement des bactéries était effectué en comptant le nombre total de colonies présentes sur la gélose, correspondant au nombre d'unités formant colonie (UFC), et en le rapportant par gramme d'échantillon en tenant compte du facteur de la dilution opérée. Pour une meilleure interprétation, les résultats ont été exprimés en logarithmes (Log₁₀ UFC.g⁻¹). Les boîtes dont le nombre était compris entre 100 et 300 ont été retenues pour dénombrement et identification. Les colonies qui se rapprochant par leur aspect macroscopique aux actinomycètes sont observées au microscope photonique à l'état frais. Après coloration de Gram, seuls les isolats à coloration de Gram positif et d'aspect filamenteux sont purifiés sur le milieu ISP2. Cette dernière opération a été répétée plusieurs fois, jusqu'à obtention de isolats purs.

II.2.2. Conservation des isolats d'Actinomycètes

Les isolats d'actinomycètes ont été conservés, d'une part à 4 °C sur des géloses inclinées avec un repiquage tous les deux mois et, d'autre part, à -20 °C en suspension en présence de glycérol à 20% (v/v) pour une longue durée (Kitouni et *al.*, 2005).

II.2.3. Antagonisme *In Vitro* des isolats d'Actinomycètes

Les germes cibles utilisés pour la mise en évidence de l'antagonisme des isolats d'actinomycètes sont les suivants: *Bacillus subtilis* ATCC 6633 (American Type Culture Collection, Manassas, VA, USA.), *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Klebsiella*

Chapitre II : Matériel et méthodes

pneumonie CIP 53-153 (Collection de l'Institut Pasteur, Algérie), *Escherichia coli* ATCC 25922, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, *Pseudomonas syringae* pv. *tomate* 1086, *Salmonella typhi* CLMA 12 (Collection de Laboratoire, Microbiologie Appliquée, (Université Ferhat Abbas, Sétif-1, Algérie), *Enterobacter* spp CLMA 04, *Citrobacter* spp. CLMA 4, *Fusarium oxysporum* CLMA 11, *Phytophthora* spp CLMA 43, *Aspergillus flavus* CLMA 19, *Aspergillus niger* CLMA 57 et *Candida albicans* ATCC 24433. L'antagonisme entre les actinomycètes et les germes cibles a été évaluée sur le milieu solide ISP2 par la technique des stries croisées (Aouiche et *al.*, 2012). Une anse remplie de spores de chaque isolat d'actinomycète mature (14 jours de culture sur milieu ISP2), est ensemencée en un seul trait sur le même milieu, en bordure de boîte de Pétri. Après 10 jours de croissance des actinomycètes à 28 °C, les microorganismes-cibles sont ensemencés en traits perpendiculaires à la culture de chaque isolat. L'activité antimicrobienne est évaluée en mesurant la longueur de la zone d'inhibition entre les bordures de la colonie de l'actinomycète et celles des microorganismes-cibles, après 24 heures pour les bactéries, 36 heures pour la levure et 72 heures pour les champignons filamenteux. Toutes les expériences ont été réalisées en triple.

II.2.4. Activités chitinolytique des isolats d'actinomycètes de la rhizosphère d'*Ononis angustissima* Lam.

L'activité chitinolytique des isolats d'actinomycètes a été révélée selon la méthode décrite par Reniwick et *al.*, (1991), sur gélose à la chitine colloïdale additionnée de glucose. La formation d'halos clairs autour des colonies après 5 jours d'incubation à 30°C indique une chitinase positive (Naik et Sakthivel, 2006).

II.2.5. Hydrolyse de la caséine (production des protéases)

L'hydrolyse de la caséine des isolats d'actinomycètes a été révélée selon la méthode de Williams et Cross, (1971). Les isolats ont été ensemencés sur un milieu gélosé contenant 5 % de lait écrémé. L'apparition de zone claire autour des colonies après 14 jours d'incubation à 28 °C indique l'hydrolyse de la caséine.

II.2.6. Test de solubilisation de phosphore

La capacité des isolats d'actinomycètes de la rhizosphère d'*Ononis angustissima* Lam., à solubiliser le phosphore a été testée selon la méthode décrite par Mohandas et *al.*, (2013). Les isolats d'actinomycète, ont été étalés sur milieu gélose nutritive solide

Chapitre II : Matériel et méthodes

complété avec du phosphate tricalcique (5g $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$). Après 14 jours d'incubation à 30 °C, l'apparition des zones claires autour des colonies indiquent la solubilisation du phosphore.

II.2.7. Production de l'acide- β -indolacétique (AIA)

La production de l'acide- β -indolacétique (AIA) par les isolats d'actinomycètes a été déterminée selon la méthode de Xue et *al.*, (2013). Des disques d'actinomycètes (6 mm), cultivés sur le milieu solide ISP2 et incubées (préalablement) à 28 °C pendant 7 jours, ont été inoculées dans 5 ml de bouillon ISP2 contenant 500 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ de L-tryptophane et incubées à 28 °C sous agitation à 125 tpm pendant 7 jours. Les cultures ont été centrifugées à 11.000 tpm pendant 15 min. Un millilitre du surnageant a été mélangé avec 2 ml de réactif Salkowski (1 ml de FeCl_3 (12 $\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$) et 49 ml de H_2SO_4 35%). L'apparition d'une couleur rose indique la production de l'AIA. La densité optique (DO) est lue à 530 nm en utilisant un spectrophotomètre. Le niveau de l'AIA produit a été estimé par comparaison avec une standard AIA (Sigma).

II.2.8. Identification des souches de *Streptomyces*

II.2.8.1. Identification phénotypique des isolats d'actinomycètes

Les caractéristiques phénotypiques des isolats ont été examinées selon les méthodes de Shirling et Gottlieb (1966) et le manuel de Bergey's de la systématique Bactériologique (Locci, 1989; Williams et *al.*, 1989).

L'aspect macroscopique des différentes souches actives est déterminé sur les milieux de l'International Streptomyces Project : ISP2, ISP3, ISP4, ISP5, ISP6 et ISP7 recommandés par Shirling et Gottlieb (1966). L'aspect macroscopique (couleur, forme, etc.) des colonies est observé après 21 jours d'incubation à 30 °C.

II.2.8.1.1. Morphologie des mycéliums (aériens et de substrats)

L'observation de la morphologie des chaînes de spores, du mycélium aérien et du mycélium du substrat est effectuée selon les méthodes de (Shirling et Gottlieb, 1966;

Chapitre II : Matériel et méthodes

Cuesta et *al.*, 2012). Locci, (1989), propose des différentes séries de couleurs pour le mycélium aérien et du substrat qui sont les suivants :

- a) **Mycélium aérien** : Selon la couleur de mycélium aérien mature (sporulé), il est possible de définir 7 séries : Gris (de gris à brun), Blanc, Rouge (bronze, rose et rose pâle), Jaune (jaunâtre à jaune-verdâtre), Bleu (bleuâtre à bleu-grisâtre pâle), Vert (verdâtre à gris-verdâtre pâle) et Violet.
- b) **Mycélium du substrat** : les couleurs distinctives du mycélium de substrat étaient les suivantes: beige, noir, bleu, brun, orange, violet, rose, rouge, rouge-violet, violet-pourpre, jaune, jaune-vert.

II.2.8.1.2. Pigment de mélanoïde

La production du pigment mélanoïde a été observée sur les milieux solides en gélose inclinée ISP6 et ISP7. La couleur brune noir caractéristique des pigments mélanoides a été observée après 1 à 2 jours d'incubation à 28°C, en comparant les tubesensemencés avec le témoin nonensemencé (Shirling et Gottlieb, 1966).

II.2.8.1.3. Test de catalase

Une colonie d'une culture de moins de 7 jours de chaque isolat a été déposée via une anse sur une lame, une goutte de peroxyde d'hydrogène (H₂O₂ 10%) a ensuite été ajoutée. La présence de catalase se traduit par l'apparition d'une effervescence. Les isolats qui ne possédant pas de catalase sont incapables de dégrader le peroxyde d'hydrogène; ils sont catalase négatifs.

II.2.8.1.4. Test d'oxydase

L'activité oxydase des quatre isolats d'actinomycètes (1B10, 21, 2C34 et 2A26), a été déterminée. Une colonie pure prise de chaque milieu gélosé est mise sur papier Watman imprégné de réactif oxydase (N, N, N',N'-tétraméthyl-1,4-phénylènediamine). Les isolats produisant l'enzyme oxydase, oxydent ce réactif pour former un composé violet ou bleu.

II.2.8.1.5. Analyse chimique des constituants cellulaires

L'analyse chimique des constituants cellulaires est effectuée selon les méthodes préconisées par Lechevalier et Lechevalier, (1970) et Becker et *al.*, (1964), pour la

Chapitre II : Matériel et méthodes

détermination de l'isomère de l'acide diaminopimélique (formes LL ou DL) et la présence ou non de glycine.

II.2.8.1.6. Identification biochimique des *Streptomyces*

Les profils biochimiques ont été déterminés à l'aide de galeries Api-système API50 CHB et API ZYM (Biomérieux SA, Marcy-l'Etoile, France) selon les recommandations du fournisseur pour étudier les caractéristiques physiologiques et biochimiques des quatre souches de *Streptomyces*.

II.2.8.1.7. Influence de la température

Pour tester l'effet de température d'incubation sur la croissance de quatre souches d'actinomycètes, 100 ml de milieu ISP2 bouillon contenus dans des fioles Erlenmeyer de 250 ml ont été inoculés avec une culture de 7 jours des souches d'actinomycètes sélectionnées à raison de 1% (v/v). Les cultures ont ensuite été incubées à 4 °C, 10 °C, 20 °C, 25 °C, 30 °C, 35 °C, 45 °C et 50 °C pendant 14 jours. Après d'incubation, la croissance bactérienne a été déterminée en mesurant la densité optique à 600 nm.

II.2.8.1.8. Tolérance des *Streptomyces* au NaCl

La tolérance des quatre isolats d'actinomycètes à la salinité a été testée sur un milieu solide ISP2 contenant diverses concentrations de NaCl: 1, 2, 4, 6, 8, 10 et 12 % (p/v).

II.2.8.1.9. Effet de pH sur la croissance des *Streptomyces*

La tolérance des souches aux différentes valeurs de pH a été étudiée sur milieu ISP2. Le pH a été ajusté aux valeurs suivantes : 5, 6, 7, 11, et 14.

II.2.8.1.10. Résistance des souches de *Streptomyces* aux antibiotiques

La résistance des souches à différents antibiotiques a été testée sur le milieu ISP2 solide, auquel des antibiotiques ont été ajoutés à des doses variables (10, 20, 50 et 100 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$). Les antibiotiques utilisés sont: ampicilline; chloramphénicol; rifampicine; streptomycine; kanamycine et tétracycline.

Chapitre II : Matériel et méthodes

II.2.8.2. Identification moléculaire des isolats d'actinomycètes

II.2.8.2.1. Extraction de l'ADN

L'ADN de chaque souche parmi les quatre sélectionnée et cultivée pure en milieu ISP2 liquide est extrait à l'aide d'un kit d'extraction QIAgen (QIAamp® DNA Mini Kit) suivant les instructions du fabricant.

II.2.8.2.2. Contrôle et purification de l'ADN extrait

La pureté de l'ADN extrait à partir des isolats est vérifiée au spectrophotomètre NanoDrop (ND-1000 UV-Vis Spectrophotometer).

II.2.8.2.3. Amplification du gène d'ARNr 16S des *Streptomyces* sp.

Le gène ARNr 16S a été amplifié par réaction en chaîne par polymérase (PCR) en utilisant deux amorces universelles: amorce avant, F125 et l'amorce inverse R125 (tableau 2), conçus à partir de 8 positions de base à 27 et 1541 à 1525, respectivement. En plus des deux amorces nucléotidiques internes ; l'amorce F156 et l'amorce R157. Ce sont les zones conservées dans l'opéron d'ARNr d'*Escherichia coli* (Gurtler et Stanisich, 1996). Les ADN génomique des isolats 21, 2A26, 1B10 et 2C34 ont été utilisés comme matrice pour l'amplification par PCR (35 cycles, 94 °C pendant 30 s, 65 °C pendant 1 min et 72 °C pendant 2 min).

Tableau 3 : Les séquences des différents oligonucléotides utilisés pour les amplifications des gènes de l'ARNr 16S des souches d'actinomycètes.

Oligonucléotides	Séquences d'oligonucléotides	Taille (Pb)	Température (°C)
F125	5'AGAGTTTGATCCTGGCTCAG ³	20	48
R125	5'AAGGAGGTGATCCAAGCC ^{3'}	18	51
F156	5'ATTCCACGTGTAGCGGTG ^{3'}	18	52
R157	5'ATCTCACGACACGAGCTG ^{3'}	18	52

Chapitre II : Matériel et méthodes

II.2.8.2.4. Electrophorèse sur gel d'agarose

Un gel d'agarose à 1,5 % a été préparé avec un tampon standard TBE 0,5× (4,5 mM Tris, 4,5 mM d'acide borique et 1mM EDTA, pH 8) contenant 0,5 mg.ml⁻¹ de bromure d'éthidium. Cinq µl de l'échantillon PCR a été mélangé avec 1 µl de tampon de charge sur une feuille de parafilm. Les échantillons et un marqueur de poids moléculaire ont été chargés séparément dans les puits du gel. L'électrophorèse a été effectuée à 100 V dans du tampon TBE 0,5× pendant 40 min. Les produits d'amplification ont été visualisés sous lumière UV, grâce au bromure d'éthidium incorporé au part avant dans le gel. Les photos ont été prises grâce à un Gel doc de type Biorad.

II.2.8.2.5. Clonage

Les produits de PCR ont été clonés dans le vecteur pGEM-T Easy (Promega, Madison, WI, USA), conduisant aux plasmides pGM21-16S, pGM2A26-16S, pGM1B10-16Set pGM1B10-16S (figure 14). La bactérie *E. coli* DH5a (F-supE44 Φ80 δlacZ ΔM15 Δ (lacZYA-argF) U169 endA1 recA1 hsdR17 (rk⁻, mk⁺) dÊOr thi-1-λ gyrA96 relA1) (Invitrogen Life Technologies) a été utilisée comme souche hôte. Tous les clones recombinants d'*E. coli* ont été cultivées dans un bouillon LB avec l'ajout de l'ampicilline (Ampicilline 100 µg/ml), de l'IPTG et X-gal. Électrophorèse de l'ADN, purification de l'ADN, la restriction, la ligature et la transformation ont tous été réalisés selon les méthodes décrites par Sambrook et *al.*, (1989).

Chapitre II : Matériel et méthodes

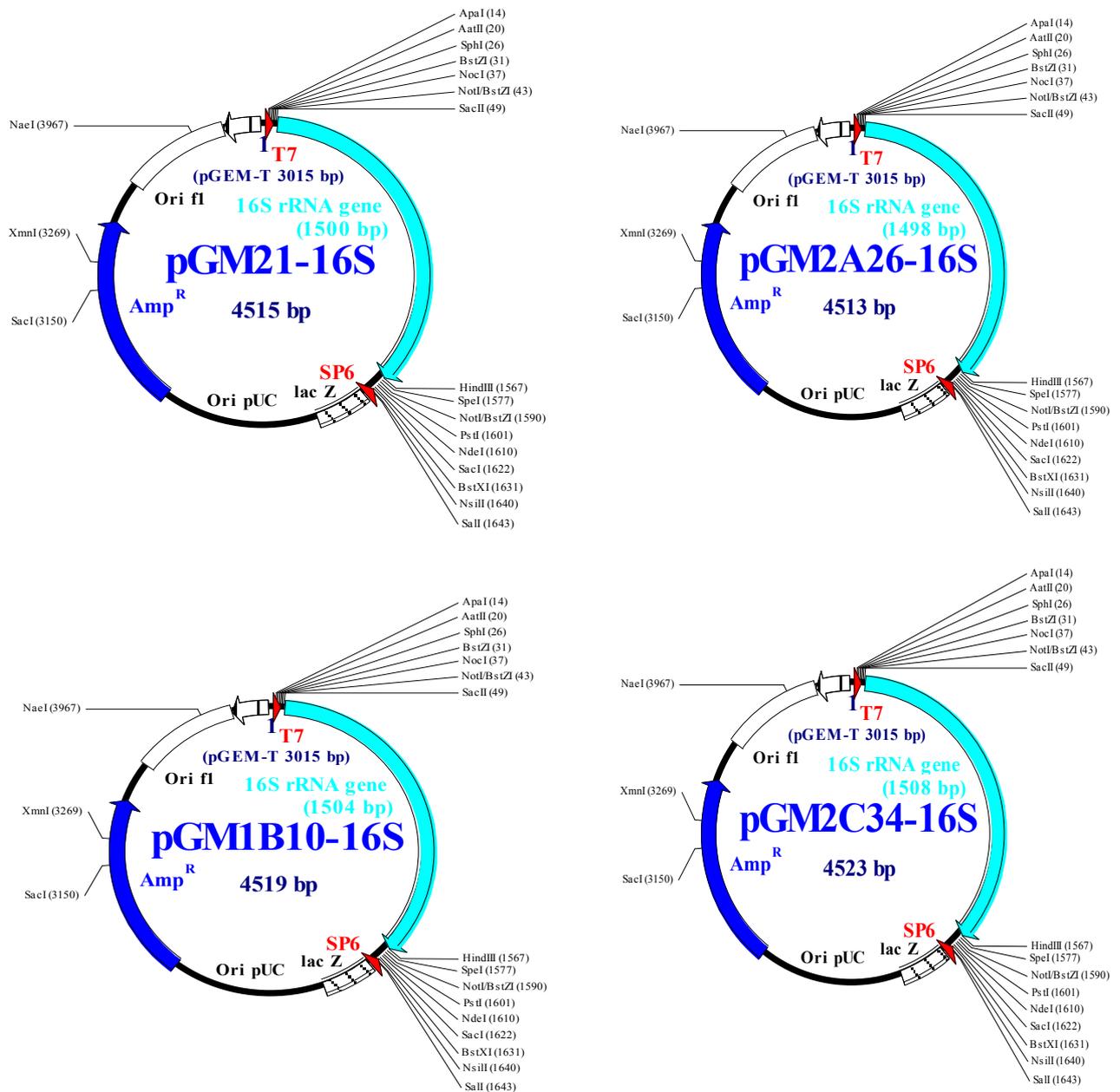


Figure 14. Carte de restriction des plasmides pGM21-16S, pGM2A26-16S pGM1B10-16S et pGM2C34-16S.

II.2.8.2.6. Séquençage

La séquence nucléotidique du gène de l'ARNr 16S a été déterminée sur les deux brins en utilisant le BigDye[®] Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit et le séquenceur d'ADN automatisé ABI Prism[®] 3100-Avant Analyseur génétique (Applied Biosystems).

II.2.8.2.7. Analyses phylogénétiques

Les analyses des séquences 16S rDNA ont été réalisées à l'aide du programme BLAST (www.ncbi.nlm.nih.gov/blast). La phylogénétique moléculaire a été effectuée par

Chapitre II : Matériel et méthodes

le logiciel MEGA 4.0.2 (Tamura et *al.*, 2007). L'algorithme de construction phylogénétique choisi est celui de Neighbor-Joining. L'analyse des séquences est réalisée deux par deux selon le modèle du maximum de vraisemblance. Tous les gaps issus de l'alignement ont été traités comme des caractères (délétion). Enfin, la robustesse des nœuds a pu être testée par un calcul de bootstrap basé sur 1000 répétitions (Felsenstein, 1985).

II.2.9. Essai de lutte biologique

Les graines de pois chiches (*Cicer arietinum* L.) variété FLIP86-10C (très sensibles aux maladies fongiques), fournie par le centre d'ICARDA (International Center for Agricultural Research in the Dry Areas), ont été stérilisées en surface par immersion dans l'éthanol à 70% pendant 1 min, suivie d'une agitation continue dans une solution d'hypochlorite de sodium à 1% pendant 5 min, puis rincés avec de l'eau distillée stérile. Les graines ont été ensemencées dans des pots (à raison de 5 graines par pot), contenant un mélange de sable, sol et tourbe (1:1:1 (v/v/v)). Des suspensions fraîches de *Streptomyces* sp. (Souches 21, 2A26, 1B10 et 2C34) d'environ 1×10^6 UFC.ml⁻¹ dans 1 ml de bouillon de ISP2 avec 1 ml de Tween-20 0,01% et de *F. oxysporum* environ 1×10^5 spores/ml ont été ajoutés au mélange juste avant l'ensemencement. Les graines non inoculées par *Streptomyces* sp. et *F. oxysporum* a servi de témoin négatif et les graines inoculées par *F. oxysporum* a servi de témoin positive. Les cultures sont conduites en chambre de culture conditionnée, avec une température de 24 °C le jour et 19 °C la nuit, une photopériode de 16 h et une humidité relative de 75 %. Les plants ont été fertilisés chaque semaine avec une solution du milieu MS (Murashige et Skoog) (Murashige et Skoog, 1962). L'indice de germination et les paramètres de croissance (taille, poids frais des parties aériennes et longueur, poids frais des racines) ont été déterminés après 30 jours de culture. L'expérience a été menée avec trois répétitions par traitement.

II.2.10. Calcul de l'incidence la maladie

Le calcul de l'incidence et de la réduction de l'incidence de la maladie est réalisé après 4 semaines de culture selon la méthode de Song et *al.*, (2004) et sur la base d'une échelle de notation de symptômes à cinq classes: 0 (plante saine), 1 (feuilles jaunes sans flétrissement de la plante), 2 (feuilles vertes avec flétrissement de la plante), 3 (feuilles jaunes avec flétrissement de la plante) et 4 (plante morte). Sur la base de ces notations,

Chapitre II : Matériel et méthodes

L'incidence de la maladie (IM) et la réduction de l'incidence de la maladie (RIM) ont été calculées selon les équations indiquées ci-dessous.

$$IM (\%) = \left[\frac{(\sum \text{Valeurs} * N_{pi})}{(V_{pe} * N_{tp})} \right] * 100$$

Avec: \sum Valeurs = somme des valeurs de l'échelle de notation des symptômes.

N_{pi} = nombre de plants infectés.

V_{pe} = valeur la plus élevée de l'échelle de notation de symptômes.

N_{tp} = nombre total de plants.

$$RIM (\%) = \left[\frac{(IM_{ti} - IM_{pt})}{(IM_{ti})} \right] * 100$$

Avec IM_{ti} = incidence de la maladie du témoin inoculé et

IM_{pt} = incidence de la maladie des plants traités.

II.3. Identification des *Bacillus* spp et caractérisation des bactériocines

II.3.1. Souches bactériennes et conditions de croissance

Vingt-cinq isolats de *Bacillus* spp. ont été isolés à partir des rhizosphères d'*Ononis angustissima* Lam., *Calobota saharae* Coss. & Dur. et *Astragalus gombo* Coss. & Dur., trois Fabacées endémiques poussent dans les régions de M'sila et Biskra (centre et sud d'Algérie respectivement). Vingt-deux bactéries cibles, ont été utilisées pour les tests d'activité antimicrobienne : Cinq bactéries Gram-positif (*Micrococcus luteus* LB 14110, *Staphylococcus aureus* ATCC 6538, *Listeria ivanovii* BUG 496, *Enterococcus faecalis* ENSAIA 631, et *E. faecalis* JH 2-2), et dix-sept bactéries Gram-négatif (*Escherichia coli* ATCC 8739, *Salmonella enterica* ATCC 43972, *S. typhimurium*, *Pseudomonas savastanoi* pv. *savastanoi*, *P. aeruginosa* ATCC 49189, S56 *A. tumefaciens*, *A. tumefaciens* CIP 497-74, *A. tumefaciens* CIP 111-78, *A. tumefaciens* ATCC 23308T, *A. tumefaciens* CFBP 6625, *A. tumefaciens* NCPPB 925, *A. tumefaciens* RV3, *A. tumefaciens* C58, *A. tumefaciens* O363, *A. rhizogenes* CFBP 2408T, *A. larrymoorei* AF3.44, *A. vitis* CFBP 2678T). L'activité antifongique a été déterminée contre le champignon filamenteux *Fusarium* sp. et la levure *Candida tropicalis* R2 CIP 203.

Chapitre II : Matériel et méthodes

La culture des souches *Bacillus* spp, a été réalisé sur le milieu solide Luria Bertani (LB) modifié dont leur composition (en g.l⁻¹) est : (peptone, 15, extrait de levure, 3, NaCl, 2,5, glucose, 7; K₂HPO₄, 1; KH₂PO₄, 1, et MgSO₄ .7H₂O, 1, agar, 15, pH 7,4), à 30°C pendant 48 h. La production de bac-GM100 et bac-GM17 à partir de *Brevibacillus brevis* GM100 et *Bacillus clausii* GM17 respectivement, a été réalisée à 30 °C, pendant 48 h dans un incubateur avec agitation à 250 tours par minute, en utilisant le milieu Luria-Bertani (LB) modifié.

Pour la détermination des activités antibactériennes, les microorganismes indicateurs ont été cultivés pendant une nuit dans le milieu LB modifié (pH 7,2) à 30 °C pour *A. tumefaciens* souches, *A. rhizogenes*, *P. savastanoi* pv. *Savastanoi*, *P. aeruginosa* ATCC 49189, *E. coli* ATCC 39, *Xanthomonas compestris*, et à 37 °C pour *E. coli* ATCC 8739 et *S. aureus* ATCC 6538. Pour la détermination des activités antifongique, le champignon filamenteux *Fusarium* sp. a été cultivé dans le milieu Potato Dextrose Agar (PDA) pendant 7 jours à 30 °C. Les spores ont été recueillies dans de l'eau distillée stérile, puis concentré pour produire une suspension de 10⁴ spores ml⁻¹. La levure *C. tropicalis* R2 CIP 203 a été cultivée dans le milieu YP10 contenant (en g.l⁻¹): (peptone, 15; extrait de levure, 5; glucose, 10 ; 15 ml de solution adénine, 2 g.l⁻¹) à 30 °C pendant 24 h dans un incubateur avec agitation à 200 tpm. Les deux souches GM100 et GM17 ont été maintenus dans un bouillon de LB modifié contenant 20% (v/v) de glycérol et stockées à -80 °C. Avant toute utilisation expérimentale, les cultures ont été repiquées à deux reprises dans du milieu LB modifié à 30 °C pendant 12 h et le transfert de l'inoculum était de 1% (v/v).

II.3.2. Recherche de la production des bactériocines

La recherche d'éventuelle production de substances inhibitrices par les bactéries isolées a été réalisée selon la méthode de la double couche (Paik et *al.*, 1997). Pour la recherche de l'activité inhibitrice en milieu liquide, la méthode de diffusion en puits a été utilisée (Tagg et MacGiven, 1971). La méthode des dilutions critiques, a été utilisée pour exprimer l'activité de la bactériocine en unité arbitraire par millilitre (UA.ml⁻¹). Le titre des bactériocines GM100 et GM17 exprimé en UA.ml⁻¹ est l'inverse de la plus grande dilution produisant une zone d'inhibition (Saeed et *al.*, 2004).

Chapitre II : Matériel et méthodes

II.3.3. Identification des souches de *Bacillus*

II.3.3.1. Identification morphologique des isolats GM100 et GM17

Les deux isolats GM100 et GM17, ont été examinés pour la réaction de Gram, la morphologie cellulaire, les réactions oxydase et catalase, la motilité, la formation d'endospores et le type de fermentation. Pour confirmer la pureté et l'identité des bactéries recherchées, des examens macroscopiques et microscopiques (coloration de Gram) ainsi que des tests biochimiques d'orientation

II.3.3.2. Identification biochimique des isolats GM100 et GM17

Des tests biochimiques d'orientation et d'identification de la bactériologie conventionnelle en utilisant des galeries Api-système API50 CHB (Biomérieux SA, Marcy-l'Etoile, France) ont été effectuées selon les recommandations du fournisseur pour étudier les caractéristiques physiologiques et biochimiques des deux souches GM100 et GM17. L'incubation est réalisée à 30°C et la lecture est effectuée après 24 h et 48 h d'incubation.

II.3.3.3. Caractérisation moléculaire des isolats GM100 et GM17

L'ADN bactérien des souches GM100 et GM17 a été extrait par la technique de lyse en présence de protéinase K, extraction au phénol/chloroforme et précipitation à l'éthanol (Sambrook et *al.*, 1989). Le gène codant pour l'ARN 16S a été amplifié par PCR à l'aide des amorces universelles dont les séquences suivent: amorce sens, 5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3' et amorce antisens, 5'-AAGGAGGTGATCCAAGCC-3', qui désignent les positions de 8 à 27 et 1541 à 1525, respectivement, de la région conservée de l'opéron de ARNr de *E. coli* (Gurtler et Stanisich, 1996). La réaction d'amplification a été réalisée suivant les conditions standards définies pour la Taq DNA polymérase 35 cycles, (94°C pendant 30s, 65°C pendant 1 min et 72 °C pendant 2 min). Le produit de PCR a été cloné dans le vecteur pGEM-T Easy (Promega, Madison, WI, USA). La souche *E. coli* DH5 α (F⁻supE44 Φ 80 δ lacZ Δ M15 Δ (lacZYAargF) U169 endA1 recA1 hsdR17 (rk⁻,mk⁺) deoRthi-1 λ -gyrA96relA1) (Invitrogen Life Technologies) a été utilisée comme souche hôte. Les mini-préparations d'ADN plasmidique ont été obtenues par lyse alcaline (Sambrook et *al.*, 1989).

Chapitre II : Matériel et méthodes

II.3.3.4. Séquençage de l'ADN et les analyses phylogénétiques des isolats GM100 et GM17

La séquence nucléotidique du gène ARNr 16S a été déterminée sur les deux brins en utilisant le Kit BigDye® Terminator v3.1 Cycle Sequencing et le séquenceur d'ADN automatisé ABI Prism® 3100-Avant Analyseur génétique (Applied Biosystems). L'analyse séquence 16S rDNA a été réalisée à l'aide du programme BLAST (www.ncbi.nlm.nih.gov/blast). Les analyses de la phylogénétique moléculaire ont été effectuées par le logiciel MEGA version 4.1. Les distances et les grappes ont été calculées selon la méthode du Neighbor-joining. L'analyse bootstrap a été utilisée pour évaluer la topologie en arbre, des données Neighbor-joining en effectuant re-échantillonnages 100 (Felsenstein, 1985).

II.3.4. Caractérisation de la nature des agents inhibiteurs produits par des isolats GM100 et GM17

Les bactéries peuvent produire des substances inhibitrices différentes des bactériocines. Pour éliminer l'effet des acides organiques, les surnageant ont été neutralisés à pH 7 par une solution de NaOH 0,1N. Afin d'éliminer le peroxyde d'hydrogène accumulé dans le milieu de culture, les surnageant ont aussi été traités par une catalase (Boehringer, Germany) pendant trois heures à 37°C avant de procéder au test d'inhibition. La nature protéique des surnageant sont mise en évidence par l'étude de l'activité antimicrobienne après traitement par différentes enzymes protéolytiques. Le surnageant des cultures de la souche GM100 et GM17 (culture de 48h à 30°C), sont soumis à l'action de plusieurs enzymes: trypsine, pepsine, papaïne, pronase E et protéinase K. Toutes ces enzymes ont été utilisées à une concentration finale de 1 mg.ml⁻¹. Le mélange (surnageant + enzyme) a été incubé 2 h à 37°C et l'activité antibactérienne contre *A. tumefaciens* C58, *L. ivanovii* BUG 496 et *C. tropicalis* R2 CIP 203 est dosée par la méthode de diffusion en puits (Tagg et McGiven, 1971). Le témoin est constitué d'un extrait de bactériocine n'ayant pas subi de traitement enzymatique. Les détergents utilisés pour tester la sensibilité des surnageant de GM100 et GM17 sont Tween 40, Tween 60, Triton X-100, SDS, l'urée, l'EDTA et PMSF à une concentration finale de 15%. Les surnageant avec les détergents ont été incubé pendant 2 h à 30 °C. Les surnageant des cultures de GM100 et GM17 (30 °C pendant 48) ont été mélangées avec chloroforme, butanol, isopropanol, acétate d'éthyle et méthanol à une concentration final de 60 %. Les différents mélanges, ont été incubés

Chapitre II : Matériel et méthodes

pendant 2 h à une température ambiante. L'activité antibactérienne contre *A. tumefaciens* C58, *L. ivanovii* BUG 496 et *C. tropicalis* R2 CIP 203 a été dosée par la méthode de diffusion en puits (Tagg et McGiven, 1971).

II.3.5. Etapes de purification de Bac-GM100 et de Bac-GM7

Pour la préparation de l'extrait de culture, cinq cent millilitres de milieu de culture LB modifié contenant la souche *Brevibacillus brevis* GM100 ou GM17, obtenu après 48 h d'incubation, ont été centrifugés pendant 30 minutes à 10.000 tpm pour éliminer les cellules microbiennes. Les surnageant contenant les composés extracellulaires actifs ont été retenus comme la préparation des bactériocines bruts pour tous les dosages ultérieurs. Les surnageant actifs obtenus, ont passés ensuite par plusieurs étapes de purification.

II.3.5.1. Précipitation au sulfate d'ammonium, dialyse et traitement thermique de Bac-GM100 et de Bac-GM7

La précipitation des surnageant obtenus de la culture des souches productrices est réalisée à 4 °C pendant une nuit en présence de sulfate d'ammonium $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ à 40-60 % de saturation. Les précipités sont récupérés puis centrifugés à 10000 tpm pendant 30 min à 4°C. Les culots des extraits bruts, obtenus après centrifugation pendant 30 min à 10000 tpm, ont été repris dans un minimum de tampon A de tris-HCl (25 mM, pH 8). Les solutions des bactériocine sont dialysées pendant une nuit dans des sacs à dialyse (Sigma Chemical, St. Louis, MO) dont le seuil de coupure de la masse moléculaire est de 1200 Da contre deux litres de tampon phosphate (10 mM, pH 7). Les surnageant sont incubés à 90 durant 2 h. après refroidissement rapide, les protéines dénaturées et insoluble ont été éliminées par centrifugation à 10000 tpm pendant 30. Les solutions protéiques désignent la fraction I.

II.3.5.2. Purification de Bac-GM100 et de Bac-GM7 par chromatographie Sephadex G-75

La solution résultante de la première étape de purification de chaque bactériocine (bac-GM100 et bac-GM17), est chargée sur une colonne (2,5 ×50 cm) de gel filtration Sephadex G-75 équilibrée avec 20 mmol.l⁻¹ du tampon A (pH 8). L'éluion des protéines est effectuée par le même tampon et avec un débit de 45 ml.h⁻¹. Quarante-six fractions de 5 ml chacune ont été éluées de la colonne et collectées automatiquement grâce au suivi de l'absorption à 280 nm. L'activité antibactérienne des différentes fractions recueillies a été testée contre *Agrobacterium tumefaciens* C58. La fraction active désigne la fraction II.

Chapitre II : Matériel et méthodes

II.3.5.3. Purification de Bac-GM100 et de Bac-GM7 par chromatographie échangeuse d'ions

Le système chromatographique FPLC (Fast Protein Liquid Chromatography) (Pharmacia, Uppsala, Suède) est composé d'un système de contrôle LCC-500, de 2 pompes P500, d'un détecteur UV muni d'un filtre pour la mesure à 280 nm et d'un passeur d'échantillon MV8. La colonne échangeuse d'anions Mono Q Sépharose HP (2,6 x 20 cm, Amersham, Pharmacia, biotech) était thermostatée à l'aide d'un bain-marie.

La fraction active, appelée fraction II, a été injectée dans une colonne Mono Q Sépharose HP fixé sur un système FPLC, préalablement équilibrée avec le tampon A (20 mM tampon Tris-HCl, pH 8). Après lavage de la colonne, aucune activité de bactériocine n'a été détectée dans la solution de lavage. Les protéines sont éluées avec un gradient linéaire de NaCl (500 ml de 0-500 mM, tampon B) à un débit de 40 ml h⁻¹. Les fractions ont été collectées automatiquement par le système et ensuite testées pour l'activité contre la bactérie cible *A. tumefaciens* C58. Les fractions actifs de bac-GM100 et bac-GM17 élués entre 180 et 220 mM NaCl (fraction III) ont été prélevés et conservés à -20°C dans du glycérol 20% (v / v) pour d'autres analyses.

II.3.6. Caractérisation moléculaire des bactériocines GM100 et GM17

II.3.6.1. Dosage de l'extrait protéique par la méthode de Bradford

L'estimation des quantités de Bac-GM100 et Bac-GM17 a été réalisée selon la méthode de dosage de Bradford, (1976). 50 µl d'extrait brut ont été ajoutés à 50 µl d'eau distillée et 2 ml de réactif de bleu de Coomassie. Le réactif de bleu de Coomassie préparé comme suit: 100 mg de poudre de bleu de Coomassie G-250 ont été dissous dans 50 ml d'éthanol absolu et 100 ml d'acide orthophosphorique à 85%. Le mélange résultant a été ajusté avec de l'eau distillée à un volume final de 1000 ml, puis filtré et conservé à froid (4 °C). Après stabilisation de la couleur pendant 5 min, la densité optique du mélange est déterminée à 595 nm à l'aide d'un spectrophotomètre. Les concentrations ont été déterminées par référence à une gamme étalon à base d'albumine sérique bovine BSA, avec des concentrations de 0, 0,5, 1, 1,5, 2, 2,5, 5, et 7,5 mg.l⁻¹, préparée dans les mêmes conditions opératoires que les échantillons.

Chapitre II : Matériel et méthodes

II.3.6.2. Dosage de Bac-GM100 et de Bac-GM7 par électrophorèse SDS PAGE

Après chaque étape de purification, la fraction active a été soumise à une électrophorèse sur gel de sodium dodécyl sulfate-polyacrylamide (SDS-PAGE) en utilisant un gel de concentration 5% et un gel 15% (conditions dénaturantes) selon la méthode de Laemmli, (1970). Après avoir déposé les échantillons dans les puits, en double exemplaires, la migration est assurée dans le tampon Tris (0,25 M)-Glycine (1 M) contenant 0,1 % SDS. L'évaluation des masses moléculaires de la bactériocine séparées est possible par référence à des marqueurs de masses moléculaires (BM201 Low Rang Marker, Bio Basic, Markham, Canada) connues et leurs masses moléculaires en kDa sont comme suit : BSA, 66; ovalbumine, 45; Porcine pepsin, 35; isomérase Triosephosphate, 27; inhibiteur de la trypsine, 20; lysozyme, 14,4; parathyroïdienne (1-84), 9,5; aprotinine, 6,5 et parathyroïdienne (1-34), 4,5, déposés dans les mêmes conditions opératoires. Après électrophorèse, le gel est découpé en deux moitiés. Une moitié est fixée et colorée dans une solution de bleu de Coomassie Brilliant R-250 (Sigma) à 0,25% (m/v). Après coloration, l'excès de colorant est retiré à l'aide d'une solution formée d'un mélange de méthanol, d'acide acétique et d'eau distillée (3:1:6,v/v/v). Les gels sont ensuite rincés abondamment à l'eau. L'autre moitié du gel est utilisée pour visualiser la bande protéique responsable de l'activité antibactérienne selon la méthode de Hammami et *al.*, (2009). Cette partie du gel est lavée dans 10 mM tampon A (pH 7) en agitation douce pendant 4 h, puis, elle est placée dans une boîte de pétri contenant le milieu LB modifié (2,5 % agar). Enfin, 6 ml de gélose molle contenant 10^7 cellules d'*A. tumefaciens* C58 sont coulés par-dessus et incubée à 30°C pendant 16 h. la révélation de l'activité antibactérienne est examinée par la présence d'une zone d'inhibition.

II.3.6.3. Masse moléculaire des bactériocines par Spectrométrie de masse (MALDI-TOF)

Les analyses de la pureté et la masse des bactériocines ont été réalisées par MALDI-TOF-MS et le séquençage des peptides par MS-MS à l'aide d'un appareil ESI-Qq-TOF (Electrospray Ionisation-Quadripole-Time of Flight) (Applied Biosystems).

Chapitre II : Matériel et méthodes

II.3.6.4. Détermination des séquences N-terminaux des bactériocines par la méthode de Dégradation d'Edman

Afin de déterminer les séquences N-terminale et de confirmer que les séquences des deux bactériocine sont purifiés, les échantillons sont soumis à un séquençage d'Edman (Edman, 1950). Une bande de protéine du gel SDS a été transféré sur une membrane de Problott (Applied Biosystems, Foster City, CA) pendant 3 heures à 60V. La membrane est colorée pendant 1 minute par du bleu de Coomassie R-250 0,1% (p/v), dans du méthanol 40%/ acide acétique 0,5%, et décolorée par de l'éthanol 30%. Une dégradation automatique de protéine a été réalisée selon la méthode d'Edman à l'aide d'un séquenceur de protéines (Applied Biosystems protéines séquenceur ABI Procise 492/610A).

II.3.7. Sensibilités des bactériocines Bac-GM100 et Bac-GM17 au pH

La sensibilité des bactériocines Bac-GM100 et Bac-GM17 pures, produites par les souches sélectionnées *Brevibacillus brevis* GM100 et *Bacillus clausii* GM17 respectivement, à la variation du pH, a été évaluée en ajustant le pH d'une solution de 10 ml du bactériocine à 2, 4, 5, 6,7, 8, 9, 10 et 11. Pour chaque traitement de pH, les solutions des bactériocines ont été incubées pendant 1 h à 28°C. Ensuite, l'activité antimicrobienne (en UA.ml⁻¹) a été évaluée par la méthode de diffusion en puits.

II.3.8. Stabilités thermiques de bac-GM100 et de GM17

La sensibilité à différentes températures a été déterminée en exposant les deux bactériocines bac-GM100 et bac-GM17 neutralisés dans 25 ml de Tris-HCl (pH 8) à 70, 80, 90, 100°C pendant 2 h au bain marie et à 121°C pendant 20 min à l'autoclave. Le contrôle ne subisse aucun traitement thermique. L'activité antimicrobienne a été évaluée par la méthode de diffusion en puits.

II.3.9. Effet des surfactants et des solvants organiques sur la stabilité de l'activité biologique de Bac-GM100 et de Bac-GM17

L'effet des surfactants, Tween 40, Tween 60, urée, Triton X-100 et SDS sur l'activité et la stabilité de Bac-GM100 et de Bac-GM17 a été étudié. Ces surfactants ont été ajoutés aux bactériocines à une concentration finale de 15% (v/v) et incubées à 37 °C pendant 48 h. L'analyse d'activité antimicrobienne est ensuite déterminée tout en réalisant d'un témoin de contrôle (sans traitements). L'effet des solvants organiques, sur les

Chapitre II : Matériel et méthodes

bactériocines pures Bac-GM100 et Bac-GM17 a été étudié. Les bactériocines pures ont été mélangés aux solvants organiques : chloroforme, isopropanol, acétate d'éthyle, et méthanol à une concentration finale de 60% (v/v). Après une incubation de 72 h à température ambiante, le solvant organique correspondant a été évaporé sous vide par un Rotavapor, ensuite, l'activité antimicrobienne résiduelle a été déterminée par la méthode de diffusion en puits.

II.3.10. Effets des protéases sur la stabilité des bactériocines GM100 et GM17

Les enzymes utilisées pour tester l'activité et la stabilité des bactériocines pures GM17 et GM100 sont : trypsine, pepsine, papaïne, pronase E et protéinase K. Après une incubation du mélange (1 ml bactériocine + 1 mg.ml⁻¹ d'enzyme) pendant 48 h à 37 °C, l'activité enzymatique est stoppée par un traitement thermique à 100 °C pendant 5 min et l'activité des bactériocines est mesurée.

II.3.11. Spectre d'inhibition de Bac-GM100 et de Bac-GM17

L'étude du spectre d'activité des bactériocines GM100 et GM17 a été réalisée sur une gamme de vingt-deux microorganismes pathogènes (Tableau 1), par la méthode de diffusion en puits selon Tagg et McGiven, (1971).

II.3.12. Mode d'action de Bac-GM100 et Bac-GM17

Chaque bactériocine (Bac-GM100 ou Bac-GM17) partiellement purifiée (500 UA ml⁻¹) a été ajouté à 200 ml de culture *A. tumefaciens* C58 dans le milieu LB et à 200 ml de *C. tropicalis* R2 CIP 203 dans le milieu YP10, au début de la phase exponentielle (10⁷ UFC mL⁻¹). Les deux microorganismes cibles dans les deux milieux en l'absence de bactériocine ont été utilisés comme témoins. Les variations de turbidité des cultures ont été enregistrées à une densité optique (DO) de 600 nm et le nombre de cellules viables (unités formant des colonies UFC mL⁻¹) a été déterminé par la culture des échantillons à 30°C sur LB gélosé pour la bactérie ou sur YP10 pour la levure à différents intervalles de temps.

II.3.13. Phytotoxicité de Bac-GM100 et Bac-GM17 sur la tomate et le melon

La phytotoxicité de Bac-GM100 et Bac-GM17, a été évaluée par la détermination de l'indice de germination à deux périodes: à 72-96 h pour la tomate (*Lycopersicon*

Chapitre II : Matériel et méthodes

esculentum) (variété Maria sensibles au champignons) et à 30-60 h pour le melon Cantaloup (*Cucumis melo*), (variété Charentais, sensible aux maladies phytopathogènes) selon la méthode de Zucchini et *al.*, (1981). Les graines de la tomate et du melon ont été traitées par de l'eau (témoin négatif), de l'hypochlorite de sodium à 10% (p/v) (contrôle positif) et deux doses différentes de Bac-GM100 (50 et 500 UA mL⁻¹) ou bac-GM17 (50 et 500 UA mL⁻¹). Les graines germées, ont été transplantées dans des pots contenant un mélange de tourbe et du sable (1/1) stérile. Les cultures sont conduites en salle climatisée sous éclairage artificiel de 100 $\mu\text{molm}^{-2}\text{s}^{-1}$ (photopériode 16 h), à une température comprise entre 25 °C le jour et 19 °C la nuit. Le taux de germination et les paramètres de croissance des plants (la taille et le poids des parties aériennes et la longueur des racines) ont été déterminés après 30 jours de culture.

II.4. Analyses statistiques

Les données de l'analyse de l'activité antimicrobienne des souches isolées à partir des sols rhizosphériques, la production de l'acide- β -indolacétique (AIA), les essais de lutte biologique et l'incidence de la maladie ont été analysées par le logiciel SAS 9. Les moyens de traitements pour chaque expérience ont été comparés en utilisant le test de Duncan au seuil de probabilité de 5%. Sur les tableaux et les figures, chaque moyenne est affectée d'une lettre et les moyennes suivies d'une même lettre ne sont pas significativement différentes.

II.5. Numéro d'accession de nucléotides

Les séquences partielles du gène ARNr 16S des quatre souches de *Streptomyces* sp. ont été soumises au NCBI GenBank et les numéros d'accès sont: (JQ042814) souche 21, (JQ042815) souche 2A26, (JQ042816) souche 1B10 et (JQ042817) souche 2C34; les données des séquences nucléotidiques ARNr 16S des souches *Brevibacillus brevis* GM100 et *Bacillus clausii* GM17 nouvellement isolées ont été soumises aussi à la base des données NCBI GenBank et le numéro d'accession attribué sont JX524820 et JQ313203 respectivement.

Chapitre III



Résultats et Discussion

Chapitre III : Résultats et discussion

III. 1. Actinomycètes isolées de la rhizosphère d'*Ononis angustissima*, *Astragalus gombo* et *Calobota saharea*

Les premières observations macroscopiques, montrent une grande diversité que ce soit dans la forme ou la couleur des isolats d'actinomycètes isolés à partir de rhizosphère des trois Fabacées endémiques d'Algérie. La figure 15, montre les différentes formes et les couleurs de quelques isolats après une confirmation par observation microscopique (présences des mycéliums aériens et de substrats).



Figure 15. Couleurs et formes des colonies de quelques Actinomycètes isolées à partir de la rhizosphère de *Calobota saharae*, *Astragalus gombo* et *Ononis angustissima*.

Chapitre III : Résultats et discussion

III. 1.1. Densité des actinomycètes dans les sols rhizosphériques

La densité des actinomycètes enregistrée dans les rhizosphères des trois Fabacées (*Ononis angustissima*, *Astragalus gombo* et *Calobota saharea*), qui poussent dans les deux régions (Boussaâda et de Biskra) en Algérie, est présentée par la figure 16.

Dans notre étude, nous avons remarqué que la densité des actinomycètes cultivable dans les sols rhizosphériques des Fabacées testées, diffère d'une manière hautement significative ($p < 0.0001$) d'une espèce végétale à une autre et aussi d'un site à un autre, à part le sol rhizosphérique d'*Astragalus gombo* et *Ononis angustissima* à Biskra où il a été distingué qu'il n'y a pas une différence significative du nombre d'actinomycètes entre les deux régions.

L'analyse des résultats, montre aussi que le nombre des actinomycètes cultivables est beaucoup plus important dans les sols rhizosphériques de *Calobota saharae* dans les deux régions étudiés (Boussaâda et Biskra) avec des valeurs hautement significatives par rapport aux autres Fabacées dans les deux régions testées et une priorité à la région de Biskra (Figure 16).

L'abondance des actinomycètes dans la rhizosphère est influencée par de nombreux facteurs, notamment l'espèce végétale, la nature du sol et les facteurs environnementaux (Marschner et Timonen, 2005; Xu et al., 2009; Aira et al., 2010; Inceoglu et al., 2010; Dias et al., 2012). Les travaux de Marschner et Timonen, (2005); Valé et al., (2005), montrent que la diversité des microorganismes rhizosphériques de différentes espèces végétales peut être due à la variation des sources de carbone exsudées par ces plantes.

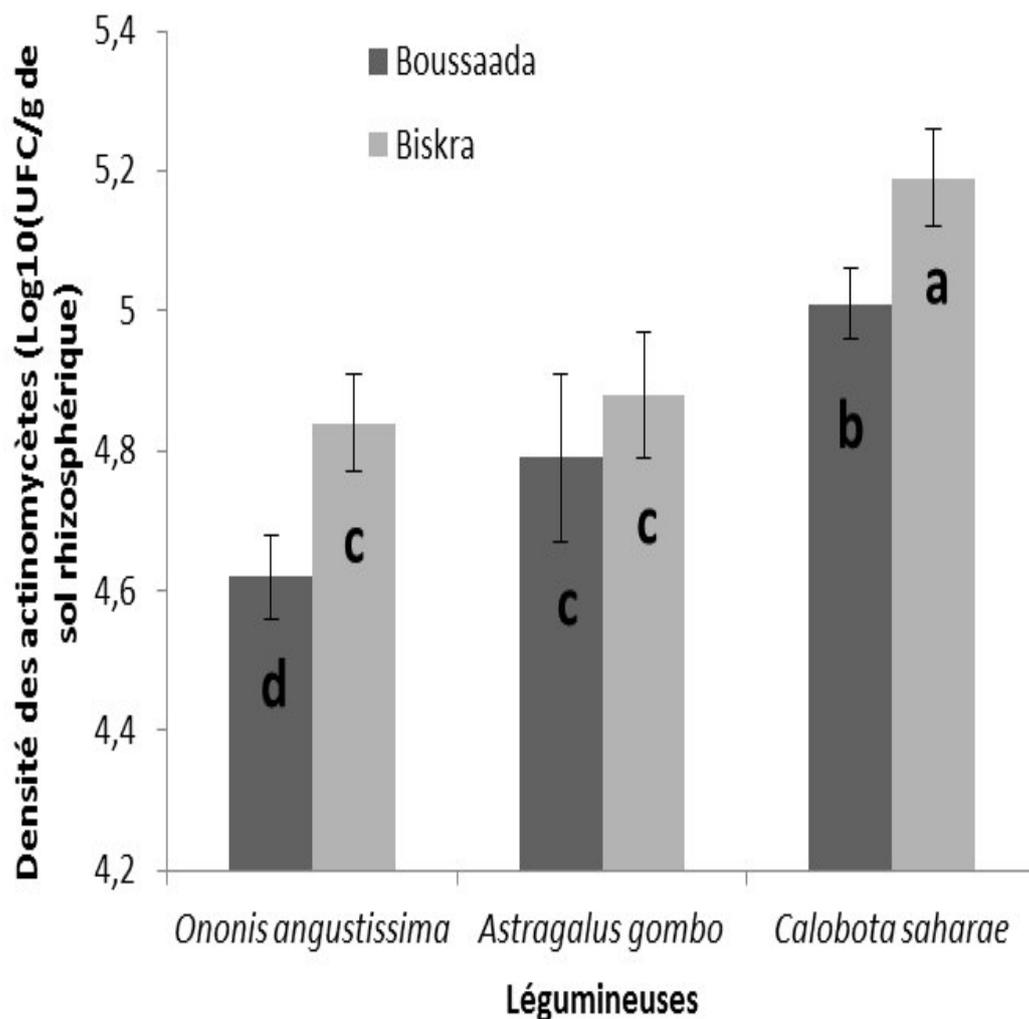


Figure 16. Densité des actinomycètes (Log₁₀ UFC.g⁻¹) de sol rhizosphérique d'*Ononis angustissima*, *Astragalus gombo* et *Calobota saharae*. Les valeurs sont la moyenne de 3 répétitions. Les moyennes suivies de la même lettre ne sont pas significativement différentes au seuil de 5 % selon le test Duncan.

La richesse de la rhizosphère en actinomycètes dans les régions arides a été signalée par plusieurs auteurs. En effet, les travaux de Sabaou *et al.*, (1998), montrent que les sols des oasis du Sahara Algérien, bien que soumis à un climat aride, se sont relativement riches en actinomycètes, parfois rares et qui sont intéressantes pour la production des antibiotiques. Les travaux de Gesheva, *al.*, (2005), indique aussi que la rhizosphère d'agrumes est riche en *Streptomyces* et présente une potentielle source de produits bioactives.

Chapitre III : Résultats et discussion

II. 1.2. Activité antimicrobienne des actinomycètes isolés à partir des Fabacées endémique d'Algérie

Deux cent vingt-deux isolats d'actinomycètes ont été isolés à partir des échantillons des sols rhizosphériques, collectés de trois Fabacées qui poussent dans de deux régions du centre et du Sud d'Algérie (Boussaâda et Biskra respectivement). Ils ont été identifiés par des méthodes morphologiques et testés pour leur activité antagoniste vis-à-vis de divers microorganismes pathogènes par la technique des stries croisées.

Le criblage préliminaire des isolats d'actinomycètes, a montré que parmi les 222 isolats étudiés, 26 isolats (11,71%) à une activité antibactérienne, 75 (33,78%) à une activité antifongique et 64 (28,83%) à un large spectre d'activité à la fois sur les bactéries et les champignons (tableau 4). L'inhibition de la croissance des germes cible révélée par l'apparition d'une zone claire, confirme l'activité des actinomycètes testés. Les résultats montrent aussi, que la rhizosphère d'*Ononis angustissima* est riche en actinomycètes à activité antimicrobienne, avec 17 isolats (38.64%) dans la région de Boussaâda et 16 isolats (40%) dans la région de Biskra.

L'activité antifongique élevée chez les actinomycètes a été observée par plusieurs auteurs dans d'autres études (Kataoka et Futai, 2011; Cuesta et *al.*, 2012; Bubici et *al.*, 2013; Kaur et *al.*, 2013). En effet, Thakur et *al.*, (2007), montrent que parmi 110 souches d'actinomycètes du sol des forêts protégées, 65 (59,09%) ont présentés une activité antibactérienne, 47 (42,75%) une activité antifongique et 33 (30%) un large spectre d'activité à la fois sur les bactéries et les champignons. Par contre, Fialho de Oliveira et *al.*, (2010), ont montré dans une autre étude que les actinomycètes endophytiques isolées à partir de la tomate possèdent une activité antifongique faible (6,5%), une activité antibactérienne élevée (40,3%) et une activité antibactérienne et antifongique en même temps plus élevée (53.2%). Bubici et *al.*, (2013), suggèrent que cette activité antifongique est probablement due à la production des antibiotiques et des enzymes lytiques.

Chapitre III : Résultats et discussion

Tableau 4: Activité antibactérienne, antifongique et antimicrobienne des actinomycètes isolés à partir des rhizosphères d'*Ononis angustissima*, d'*Astragalus gombo* et de *Calobota saharea*.

Rhizosphère	Régions	Isolats	Isolats à activité antibactérienne	Isolats à activité antifongique	Isolats à activité antimicrobienne
<i>Ononis angustissima</i>	Boussaâda	44	5 (11.36%)	12 (27.27%)	17 (38.64%)
<i>Calobota saharae</i>		30	5 (16.67%)	10 (33.33%)	15 (50%)
<i>Astragalus gombo</i>		25	2 (8%)	10 (40%)	2 (8%)
<i>Ononis angustissima</i>	Biskra	40	4 (10%)	17 (42.5%)	16 (40%)
<i>Calobota saharae</i>		48	6 (12.5%)	10 (20.83%)	12 (25%)
<i>Astragalus gombo</i>		35	4 (11.43%)	16 (45.71%)	2 (5.71%)
Totale		222	26 (11.71%)	75 (33.78%)	64 (28.83%)

Les résultats obtenus, montrent qu'il est possible d'identifier des actinomycètes antagonistes aux germes pathogènes issus de la microflore rhizosphérique des Fabacées endémiques d'Algérie. Ainsi, plusieurs isolats d'actinomycètes ont révélé un effet antagoniste avéré contre les germes cibles testés en laboratoire. Cette efficacité laisse entrevoir la possibilité d'utiliser ces microorganismes dans la lutte contre agents phytopathogènes.

Chapitre III : Résultats et discussion

II.1.3. Activité enzymatiques des actinomycètes isolés de la rhizosphère

Un autre criblage a été réalisé pour estimer qualitativement la production de quelques enzymes lytiques et les enzymes qui solubilisent le phosphate par les actinomycètes isolés de la rhizosphère de trois Fabacées endémiques d'Algérie (*Ononis angustissima*, *Astragalus gombo* et *Calobota saharea*).

L'estimation qualitative de la synthèse des chitinases et des protéases, ainsi que les enzymes qui solubilisent de phosphate chez les actinomycètes testés, a été révélée par l'apparition d'un halo claire autour de la colonie. Les résultats, montrent que la majorité des actinomycètes testés synthétisent ou moins une enzyme parmi les trois enzymes (chitinases, protéases et enzymes qui solubilisent le phosphate) tableau 5. Comme le montre le tableau 5, le pourcentage des antagonistes ayant une activité chitinase (50 %) était plus élevée que celle qui solubilisent le phosphate (35 %) et celui à activité protéolytique (30 %).

L'analyse des résultats, a montré aussi que les quatre isolats *Streptomyces* sp. 1B10, 2C34, 2A26 et 21 synthétisent les trois enzymes testées. En effet, les résultats montrent que les quatre isolats ont été fortement productrices de chitinase (halo claire autour de la colonie d'un grand diamètre) sur le milieu de culture à base de la chitine colloïdale, des protéases sur le milieu gélosé contenant de lait écrémé et des enzymes solubilisant du phosphate sur gélose nutritive solide complété avec du phosphate tricalcique.

Ces résultats correspondent aux données de la littérature qui confirment que la richesse des actinomycètes en métabolites secondaires et en enzymes à activité biologique et qui peuvent être une source importante de molécules originales (El-Tarabily et *al.*, 2006; Gopalakrishnan et *al.*, 2011).

Les activités antagonistes des actinomycètes, peut être attribuées à la production des enzymes lytiques. Le contrôle biologique par des agents développant des propriétés mycoparasitiques a été largement rapporté. En effet, les enzymes lytiques produits par les actinomycètes antagonistes sont parmi les facteurs les plus puissants qui dégradent la paroi des cellules fongiques.

Chapitre III : Résultats et discussion

Tableau 5. Activités qualitatives de quelques enzymes des actinomycètes isolés à partir de la rhizosphère des Fabacées étudiées.

Isolats	Chitinases	Solubilisation de phosphate	Protéases
1C01	+	-	-
1C02	-	+	-
1C03	+	-	-
1C04	-	+	-
1A01	+	-	-
1A02	+	+	-
1A03	-	-	+
1A04	+	-	-
1A05	-	+	-
1A06	-	-	+
1A07	+	-	-
1A08	-	-	+
1A10	+	-	+
1D01	-	-	-
1D02	-	+	-
1D03	+	-	-
1D04	+	-	-
1D05	-	+	-
1D06	-	+	-
2D07	+	-	-
1A01	-	-	+
22	-	+	-
23	+	-	-
24	-	-	-
25	+	+	-
26	-	-	-
1A27	-	-	-
1A28	+	-	-
1A29	-	-	-
1A30	+	-	-
2C31	-	-	+
2C32	+	-	-
2C33	+	-	-
1C34	-	-	+
2C35	-	+	-
1B36	-	-	+
1B10	+	+	+
2C34	+	+	+
2A26	+	+	+
21	+	+	+
Pourcentages (%)	50	35	30

+ : présence d'un halo claire autour de la colonie;

- : absence d'un halo claire autour de la colonie.

Chapitre III : Résultats et discussion

Les enzymes extracellulaires hydrolytiques produites par les PGPR, jouent un rôle très important dans la réduction des champignons phytopathogènes. De nombreux actinomycètes, en particulier ceux appartenant au genre *Streptomyces* sont capables de produire des enzymes hydrolytiques extracellulaires (Fialho de Oliveira et al., 2010; Singh et Chhatpar, 2011; Jiang et al., 2012; Karimi et al., 2012; Park et al., 2012; Saratale et al., 2012; Brzezinska et al., 2013; Bubici et al., 2013; Xue et al., 2013; Zacky et Ting, 2013).

Les chitinases, un groupe majeur d'hydrolases produites par des agents utilisés en lutte biologique, sont impliquées dans la lyse de la paroi de champignons pathogènes (Dunne et al., 1996). La production des enzymes chitinases par les *Streptomyces* est importante comme critère de sélection pour activité antifongique. Ces résultats rejoignent ceux trouvés par Singh et Chhatpar, (2011), qui ont rapporté que *Streptomyces* sp. A6 synthétisent les enzymes de chitinase, protéases et glucanase. Xue et al., (2013), ont montré aussi que les quatre souches de *Streptomyces* (*S. cyaneofuscatus* ZY-153, *S. kanamyceticu* B-49, *S. rochei* X-4 et *S. flavotricini* Z-13) produisent les enzymes extracellulaires qui dégradent la paroi cellulaire des champignons (chitinase, β -1,3-glucosidase, cellulase et protéase). Cependant, il a été rapporté que la production des chitinases seul est insuffisante pour la lyse des cellules des hyphes chez plusieurs champignons (Xue et al., 2013; Lin et al., 2014). Aouar et al., (2012), rapportent aussi que les souches appartiennent aux genres *Streptomyces* et *Nocardiosis* isolés de la rhizosphère la région semi-aride de l'Algérie présentent de fortes aptitudes dans lutte biologique contre des maladies végétales et cela est due à la synthèse des chitinases.

Différentes protéases extracellulaires synthétisés par des agents de lutte biologique, ont la capacité de dégrader la paroi des champignons phytopathogènes. Ceci nous laisse suggérer qu'il existerait une relation entre l'inhibition de la croissance des champignons pathogènes et la synthèse des protéases par les quatre *Streptomyces* sp. Le rôle de ces enzymes dans la protection des plantes contre les champignons phytopathogènes a été déjà démontré par plusieurs auteurs dans le cas d'autres agents de lutte biologique, comme les actinomycètes (Gopalakrishnan et al., 2014), les *Streptomyces* (Singh et Chhatpar, 2011; Xue et al., 2013), les *Bacillus* (Yuttavanichakul et al., 2012; Masciarelli et al., 2014) et *Bradyrhizobium japonicum* E109 (Masciarelli et al., 2014), les *Pseudomonas* spp. (Hammami et al., 2013). La production des protéases par les actinomycètes pourrait jouer aussi un autre rôle important qui est la fertilisation des sols, car elles peuvent hydrolysent les protéines et l'urée (Gopalakrishnan et al., 2011).

Chapitre III : Résultats et discussion

De nombreuses études montrent que certaines bactéries sont capables de solubiliser les phosphates (Hamdali et al., 2008a; Hamdali et al., 2008b; Hayat et al., 2010; Azziz et al., 2012; Kumar et al., 2012; Gupta et al., 2013; Kurabachew et Wydra, 2013; Goswami et al., 2014; Son et al., 2014; Zhao et al., 2014). Les enzymes responsables de la solubilisation du phosphate sont les phosphatases (phosphohydrolase), les phytases, les phosphonatases et C-plyases (Behera et al., 2014).

Ces résultats corroborent avec ceux trouvés par Franco-Correa et al., (2010), qui ont montré que les *Streptomyces* solubilisent le phosphate (phosphatase acide et alcaline). Les bactéries qui solubilisent de phosphate peuvent augmenter l'absorption de phosphore par les plantes et augmenter le rendement des cultures (Nautiyal, 1999). À partir de ces résultats, les quatre *Streptomyces* sp. apparaissent comme productrices des enzymes importantes dans la lutte biologique contre les champignons pathogènes et la stimulation de la croissance des plantes.

II.1.4. Activité antimicrobienne des quatre souches de *Streptomyces* sp (2A26, 1B10, 2C34 et 21)

Les quatre souches de *Streptomyces* sp. (2A26, 1B10, 2C34 et 21) ont été sélectionnées et testées pour leur pouvoir d'inhibition de croissance envers diverses bactéries (Gram positif et Gram négatif) et champignons pathogènes par la technique des stries croisées. Les résultats sont présentés au tableau 6. Les quatre souches de *Streptomyces* sp. présentant la capacité de produire des zones claires d'inhibition contre la plus part des bactéries et des champignons pathogènes testés, ont été considérés comme antagonistes.

L'analyse des résultats, montrent que les quatre souches de *Streptomyces* sp., manifestent une aptitude antagoniste consistant en une inhibition de la croissance des champignons cibles plus au moins importante selon les souches de *Streptomyces* sp.. Les inhibitions les plus marquées sont observées avec les souches *Streptomyces* sp. 21 et 1B10 contre *C. albicans* et *F. oxysporum* respectivement (Tableau 6).

Généralement, les résultats des tests de l'activité antimicrobienne ont révélé une importante activité antimicrobienne des quatre isolats testés, en particulier contre les champignons. En effet, les quatre isolats ont montré une forte activité contre la plupart des champignons et des bactéries Gram positif. Par contre, pour les bactéries cibles Gram positif seulement la souche *S. typhi* qui a été inhibée par les deux isolats 2C34 et 21.

Chapitre III : Résultats et discussion

Beaucoup de travaux récents ont montré que la rhizosphère est la partie du sol la plus idéale pour isoler des agents de lutte biologique. En effet, Xue et *al.*, (2013) ont isolé à partir de la rhizosphère de plusieurs plantes des *Streptomyces* (*S. cyaneofuscatus* ZY-153, *S. kanamyceticu* B-49, *S. rochei* X-4 et *S. flavotricini* Z-13) antagonistes à *Verticillium dahliae*. Mohandas et *al.* (2013), ont aussi isolé à partir de la rhizosphère de guava (*Psidium guajava* L. cv Arka Mridula) des *Streptomyces* (*Streptomyces fradiae*, *S. avermitilis*, *S. cinnamomensis*, et *S. canus*) antagonistes à *Fusarium oxysporum* et *Alternaria solani*.

Comme dans d'autres études antérieures réalisés par plusieurs chercheurs, les *Streptomyces* possèdent des propriétés antibactériennes et antifongique (Dimkpa et *al.*, 2008; Gopalakrishnan et *al.*, 2011; Zhao et *al.*, 2011; Li et *al.*, 2012; Brzezinska et *al.*, 2013; Gopalakrishnan et *al.*, 2013; Couillerot et *al.*, 2014; Gopalakrishnan et *al.*, 2014).

L'antagonisme des *Streptomyces* observé dans cette étude est conforme aux rapports précédents (Kavitha et *al.*, 2010; Khamna et *al.*, 2009a, b). En effet, Kavitha et *al.*, (2010), ont montré que *Streptomyces* sp.TK-VL_333 a un large spectre d'activité contre des bactéries, des levures et des champignons filamenteux. Verma et *al.*, (2009), a observé que près de 60% d'actinomycètes ont montré une activité antimicrobienne à large spectre.

Ces résultats confirment que les actinomycètes sont capables de produire une grande variété d'antibiotiques ou d'autres métabolites actives. Ces activités antibactériennes et antifongiques indiquent que la rhizosphère d'*Ononis angustissima* est potentiellement une source utile pour l'isolement des actinomycètes producteurs de produits biologiquement actifs.

Chapitre III : Résultats et discussion

Tableau 6: Activité antimicrobienne des souches de *Streptomyces* sp. 21, 2A26, 1B10 et 2C34. L'effet d'antagonisme, a été mesuré par le diamètre des zones d'inhibitions des microorganismes cibles (mm).

Germes cibles	Diamètre de la zone d'inhibition (mm)*			
	Souches de <i>Streptomyces</i> sp.			
	21	2A26	1B10	2C34
Bactéries Gram⁺				
<i>B. subtilis</i>	20.33 ± 1.53 ^a	13.33 ± 1.15 ^b	21.33 ± 1.53 ^a	10.67 ± 0.58 ^c
<i>S. aureus</i>	19.33 ± 1.15 ^b	15.67 ± 1.15 ^c	11.33 ± 0.58 ^d	21.67 ± 0.58 ^a
Bactéries Gram⁻				
<i>P. aeruginosa</i>	0.00	0.00	0.00	0.00
<i>P. syringae</i>	0.00	0.00	0.00	0.00
<i>E. coli</i>	0.00	0.00	0.00	0.00
<i>K. pneumoniae</i>	0.00	0.00	0.00	0.00
<i>S. typhi</i>	23.67 ± 1.53 ^a	0.00	0.00	21.00 ± 1.00 ^b
<i>Enterobacter</i> spp	0.00	0.00	0.00	0.00
<i>Citrobacter</i> spp	0.00	0.00	0.00	0.00
Champignons				
<i>F. oxysporum</i>	22.33 ± 0.58 ^b	14.67 ± 0.58 ^c	25.67 ± 0.58 ^a	11.00 ± 1.00 ^d
<i>C. albicans</i>	30.33 ± 0.58 ^a	21.00 ± 1.00 ^c	24.00 ± 1.00 ^b	19.00 ± 1.00 ^d
<i>A. flavus</i>	20.00 ± 1.00 ^b	14.67 ± 0.58 ^d	17.33 ± 0.58 ^c	15.00 ± 1.00 ^d
<i>A. niger</i>	24.33 ± 1.15 ^a	10.33 ± 0.58 ^d	21.33 ± 1.15 ^b	14.33 ± 0.58 ^c
<i>Phytophthora</i> spp	20.67 ± 1.53 ^b	23.67 ± 1.53 ^a	17.33 ± 1.15 ^c	15.00 ± 1.00 ^d

*: les valeurs dans le tableau sont les moyennes de trois répétitions indépendantes et bars d'erreur indiquent les déviations standards des moyennes.

Les lettres a, b, c, dc et d, indiquent une différence significative selon le test Duncan (p > 0.05).

Chapitre III : Résultats et discussion

II.1.5. Production de l'acide- β -indolacétique (AIA) par les souches de *Streptomyces*

Les quatre souches de *Streptomyces*, produisent de l'acide- β -indolacétique (AIA). En effet, le développement d'une couleur rose en présence de tryptophane a été observé dans le surnageant chez les chaque cultures. L'analyse des résultats de dosage de la production de l'AIA par les quatre souches, montre que les quatre souches répartissent en deux groupes significativement différents où les productions maximums d'AIA ont été observées chez les souches *Streptomyces* sp. 21 et 2C34 (Figure 17).

De nombreux auteurs ont montré que les rhizobactéries étaient capables de synthétiser de l'AIA lorsqu'ils sont cultivés sur un milieu contenant du tryptophane (Park et *al.*, 2013).

La production de l'AIA par les espèces appartiennent au genre *Streptomyces* a été reportée par plusieurs auteurs (Fialho de Oliveira et *al.*, 2010; Xue et *al.*, 2013; Lin et Xu, 2013). Nos résultats concordent avec ceux rapportés par Xue et *al.*, (2013), qui ont démontré que les souches *Streptomyces cyaneofuscatus* ZY-153, *S. kanamyceticu* B-49, *S. rochei* X-4 et *S. flavotricini* Z-13, produisent de l'acide- β -indolacétique avec des quantités compris entre 9.9 et 22.7 $\mu\text{g.ml}^{-1}$.

Les exsudats racinaires sont la source principale de tryptophane naturel qui aide à la synthèse de l'AIA et autres auxines dans la rhizosphère (Khamna et *al.*, 2009a; Khamna et *al.*, 2010; Xue et *al.*, 2013). La production de AIA par les actinomycètes dans le rhizosphère, augmente le taux de germination, stimule l'élongation des racines, et promouvoir la croissance de la plante (Khamna et *al.*, 2010; Xue et *al.*, 2013).

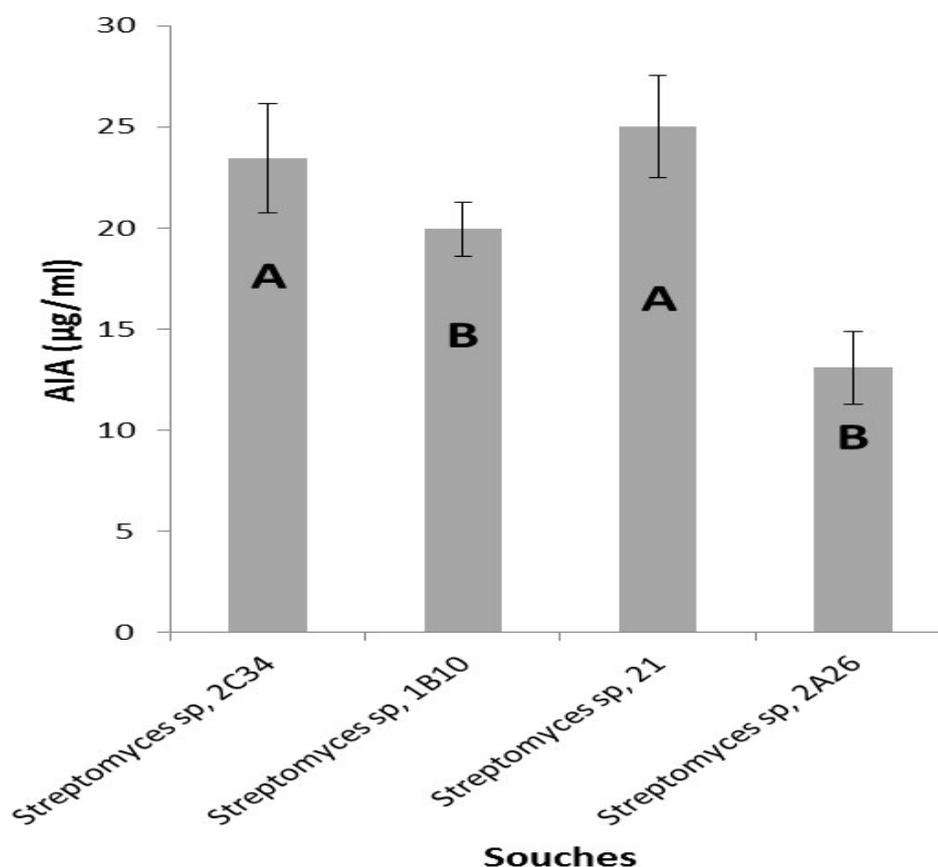


Figure 17. Production de l'acide- β -indolacétique (AIA) par les quatre *Streptomyces* sp. 1B10, 21, 2C34 et 2A26 ($\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$). Les moyennes suivies de la même lettre ne sont pas significativement différentes au seuil de 5 % selon le test Duncan.

II.1.6. Identification et phylogénie moléculaire des isolats d'actinomycètes

L'identification des quatre actinomycètes isolés (1B10, 21, 2C34 et 2A26) à partir de la rhizosphère d'*Ononis angustissima* Lam., a été basée sur les méthodes phénotypiques et génotypiques.

II.1.6.1. Caractérisation phénotypiques

Les caractéristiques morphologiques, culturelles, biochimiques et physiologiques des quatre isolats (1B10, 21, 2C34 et 2A26), ont été étudiées selon les méthodes décrites dans le Manuel de Bergey's de Bactériologie systématique (Locci, 1989; Williams et *al.*, 1989) et International Streptomyète Projet (ISP) (Shirling et Gottlieb, 1966). Les

Chapitre III : Résultats et discussion

différentes observations concernant l'identification préliminaire sont rassemblées dans les tableaux (6, 7, 8 et 9).

II.1.6.1.1. Caractères morphologiques

Les observations microscopiques, montrent que les isolats possèdent un mycélium de substrat formé de longs hyphes fins, ramifiés, non fragmentés. A partir de ces hyphes les souches ont développé un autre mycélium aérien par croissance apicale, moins ramifié que celui du substrat et les cellules sont Gram-positif. Les chaînes de spores, de formes cylindriques, non mobiles et arrangées en structures spirales. Les quatre isolats, sont aérobies, produire de catalase et d'oxydase (tableau 8).

Les quatre souches (1B10, 21, 2C34 et 2A26) donnent des colonies poudreuses de couleur grisâtre et blanchâtre. Cet aspect est particulier pour les souches d'actinomycètes développant un mycélium aérien. L'analyse chimique de leurs paroi cellulaires, montrent qu'ils contiennent l'isomère LL de l'acide diaminopimélique et de la glycine. En générale, ces caractères rapprochent les isolats au genre de *Streptomyces*.

II.1.6.1.2. Caractères cultureux

Les résultats des caractéristiques culturelles des quatre isolats de *Streptomyces* sp. 1B10, 21, 2C34 et 2A26, sont présentés dans le tableau (7). Les résultats, montre que tous les isolats 1B10, 21, 2C34 et 2A26 présentent une bonne croissance et sporulation sur la plus part des milieux de culture utilisés (ISP).

Pour 2C34 et 2A26 les isolats, les premiers signes de croissance consistent en l'apparition après 7 jours d'incubation, des colonies duveteuses ou légèrement poudreuses. Cependant, les souches 1B10 et 21 requièrent au moins 10 jours pour apparaitre poudreuses. Cet aspect est particulier pour les souches actinomycétales développant un mycélium aérien.

Chapitre III : Résultats et discussion

Tableau 7 : Caractéristiques culturelles des quatre isolats de *Streptomyces* sp. 21, 2A26, 1B10 et 2C34.

Caractères	<i>Streptomyces</i> sp. 21	<i>Streptomyces</i> sp. 2A26	<i>Streptomyces</i> sp. 1B10	<i>Streptomyces</i> sp. 2C34
Croissance dans :				
ISP2	bonne	bonne	bonne	bonne
ISP3	modéré	modéré	modéré	bonne
ISP4	bonne	bonne	bonne	bonne
ISP5	bonne	bonne	bonne	bonne
ISP6	modéré	modéré	modéré	modéré
ISP7	bonne	bonne	bonne	modéré
Couleur des mycéliums de substrats dans:				
ISP2	brune	brune	brune	brune
ISP3	jaune	jaune	brune	jaune
ISP4	brune	brune	brune	jaune
ISP5	brune	jaune	brune	jaune
ISP6	jaune	jaune	brune	noire
ISP7	brune	brune	noire	noire
Couleur des mycéliums aériens:				
ISP2	Blanche	Blanche	Gris	Gris
ISP3	Gris	Gris	brune	brune
ISP4	Gris	Blanche	jaune	jaune
ISP5	Blanche	Gris	brun	jaune
ISP6	Blanche	brune	brun	noire
ISP7	gris	brune	noire	noire
Sporulation				
ISP2	bonne	bonne	bonne	bonne
ISP3	moyenne	moyenne	moyenne	moyenne
ISP4	bonne	bonne	bonne	bonne
ISP5	bonne	bonne	bonne	bonne
ISP6	moyenne	moyenne	moyenne	moyenne
ISP7	bonne	bonne	bonne	bonne

Conformément à la série de couleur de mycélium aérien mis en place dans le manuel de Bergey's de bactériologie systématique (Locci, 1989), les isolats peuvent être regroupés dans les séries suivantes: gris (2), blanc (2). Différentes couleurs de mycélium de substrat ont été également observées, les couleurs jaune et brune étant le plus prédominant. Les pigments produits par ces isolats, diffusent dans les milieux ISP2, ISP5 et ISP7 avec des couleurs variés entre jaune et brune.

Chapitre III : Résultats et discussion

Tableau 8 : Caractéristiques phénotypiques des isolats de *Streptomyces* sp. 21, 2A26, 1B10 et 2C34.

Caractéristiques		<i>Streptomyces</i> sp. 21	<i>Streptomyces</i> sp. 2A26	<i>Streptomyces</i> sp. 1B10	<i>Streptomyces</i> sp. 2C34
Paroi	DAP	L-DAP	L-DAP	L-DAP	L-DAP
	glycine	+	+	+	+
Oxydase		+	+	+	+
Catalase		+	+	+	+
Gram+		+	+	+	+
Chaînes de spores		spirales	spirales	spirales	spirales
Production de mélanine		-	-	+	+
Croissance à une température (°C) de :					
4		-	-	-	-
10		-	-	-	-
20		-	+	-	-
25		+	+	+	+
30		+	+	+	+
35		+	+	+	+
45		+	-	+	+
50		-	-	-	-
Croissance à pH de :					
5		-	-	-	-
6		-	-	+	+
7		+	+	+	+
11		+	+	+	+
14		-	-	-	-
NaCl %					
1		+	+	+	+
2		+	+	+	+
4		+	+	+	+
6		+	+	+	+
8		+	-	-	+
10		+	-	-	+
12		-	-	-	-
Résistance aux antibiotiques :					
Chloramphénicol, streptomycine et kanamycine (100 µg.ml ⁻¹)		+	+	+	+
Ampicilline, rifampicine et tétracycline (50 µg.ml ⁻¹)		-	-	-	-

(+) : croissance des isolats ou réaction positive du test

(-) : absence de croissance ou réaction négative du test

Chapitre III : Résultats et discussion

II.1.6.1.3. Caractères physiologiques et biochimiques

Les principaux caractères physiologiques et biochimiques sont décrits sur les Tableau 8, 9 et 10.

Les souches d'actinomycètes testées sont capables de croître à 45 °C à l'exception de la souche 2A26 et résistantes aux substances antibiotiques chloramphénicol, streptomycine et kanamycine (100 µg.ml⁻¹). Les deux souches d'actinomycètes 21 et 2AC26 croître dans un intervalle de pH entre 7 et 11 et les deux autres souches 1B10 et 2C34 à pH entre 6 et 11. Absence de croissance en présence de 6% NaCl pour les souches (2A26 et 1B10) et de 12% NaCl pour les souches 21 et 2C34 (tableau 8).

La production de pigments mélanoides était présente chez les deux isolats 2A26 et 21. Par contre, aucun produit de pigments mélanoides n'a été observé chez les deux autres isolats (1B10 et 2C34) (tableau 8).

Tableau 9: Profile enzymatique des isolats de *Streptomyces* sp. 21, 2A26, 1B10 et 2C34.

Activité enzymatique	<i>Streptomyces</i> sp.			
	21	2A26	1B10	2C34
Phosphatase alcaline	+	+	+	+
Esterase (C4)	-	-	-	+
Esterase lipase (C8)	+	+	+	+
Lipase (C14)	-	-	+	-
Leucine arylamidase	+	+	+	+
Valine arylamidase	+	+	+	+
Cystine arylamidase	-	+	-	-
Trypsine	-	-	-	-
Alpha-Chymotrypsine	-	-	+	+
Phosphatase acide	-	-	-	-
Naphtol phosphohydrolase	-	-	-	-
Alpha-galactosidase (melibiase)	-	+	-	+
Beta-galactosidase (lactase)	-	-	-	-
Beta-glucuronidase (hyaluronidase)	-	-	-	-
Alpha-glucosidase (maltase)	+	+	+	+
Beta-glucosidase (cellulase)	+	+	+	+
N-acetyl-beta-glucosaminidase (chitinase)	+	+	+	+
Alpha-mannosidase	-	-	-	-
Alpha-fucosidase	-	-	+	-

(+) : présence de l'activité enzymatique; (-) : absence de l'activité enzymatique

Chapitre III : Résultats et discussion

Pour les activités enzymatiques tableau (9), les résultats obtenus sur galeries Zym montrent, que tous les isolats ont des activités, Phosphatase alcaline, Esterase lipase (C8), Leucine arylamidase, Valine arylamidase, Alpha-glucosidase (maltase), Beta-glucosidase (cellulase) et N-acetyl-beta-glucosaminidase (chitinase). Par contre, les activités enzymatiques : Trypsine, Phosphatase acide, Naphtol phosphohydrolase, Beta-galactosidase (lactase), Beta-glucuronidase (hyaluronidase) et Alpha-mannosidase ont été absentes chez tous les isolats.

Tableau 10: Assimilation des carbohydrates par les isolats de *Streptomyces* sp. 21, 2A26, 1B10 et 2C34.

Carbohydrates	Souches de <i>Streptomyces</i> sp.			
	21	2A26	1B10	2C34
Aesculine	+	+	-	+
Maltose	+	-	+	+
Gentiobiose	-	-	-	-
Melibiose	-	+	-	-
Melezitose	-	-	-	-
Amidon	-	-	+	-
Glycogène	-	-	-	-
Inuline	-	-	-	+
D-Fucose	+	-	+	+
D-Lyxose	-	-	-	-
D-Arabitol	-	-	-	-
L-Arabitol	-	-	-	-
Gluconate	-	+	-	-
2-Ceto gluconate	-	-	-	-
5-Ceto gluconate	-	-	-	-
Erythritol	-	-	-	-
D-Arabinose	-	-	-	-
L-Arabinose	+	+	-	+
L-Xylose	+	-	+	+
Adonitol	-	-	-	-
Beta-Methyl xyloside	-	-	-	-
L-Sorbose	-	-	-	-
Rhamnose	-	+	+	-
Dulcitol	-	-	-	-
Inositol	-	-	-	-
Sorbitol	-	-	-	-
D-Methyl-D-glucoside	+	-	-	+
Amygdaline	+	-	+	-
Arbutine	-	+	+	+

(+) présence de croissance (-) absence de croissance

Note : Tous les isolats utilisent : salicine, cellobiose, lactose, saccharose, tréhalose, raffinose, D-turanose, D-turanose, D-tagatose, L-fucose, xylitol, glycérol, ribose, D-xylose, galactose, glucose, fructose, mannose, mannitol, L-méthyl-D-mannoside, N-acétyl glucosamine.

Chapitre III : Résultats et discussion

D'autre part, les résultats des tests de source de carbone sont présentés dans le tableau (10) les quatre isolats utilisés dans le système API 50 CH comme source de carbone les carbohydrates suivantes : salicine, cellobiose, lactose, saccharose, tréhalose, raffinose, D-turanose, D-turanose, D-tagatose, L-fucose, xylitol, glycérol, ribose, D-xylose, galactose, glucose, fructose, mannose, mannitol, L-méthyl-D-mannoside, N-acétyl glucosamine. Cependant, l'utilisation des autres sources de carbone est variable. Donc le système API 50 CH, est susceptible d'être employé dans les laboratoires pour une différenciation rapide des souches de la rhizosphère.

L'ensemble de ces caractéristiques morphologiques, culturels, physiologiques et biochimiques permettent de rattacher les isolats 21, 2A26, 1B10 et 2C34 au genre *Streptomyces* (Shirling et Gottlieb 1966; Locci, 1989).

II.1.6.2. Caractérisation génotypiques

Une analyse phylogénétique basée sur les séquences du gène ARNr 16S des quatre isolats des actinomycètes ainsi que celles des séquences de la GenBank de chaque espèce du genre *Streptomyces* a été réalisée.

L'arbre phylogénétique correspondant aux quatre souches de *Streptomyces* a été produit avec le logiciel MEGA4 (Tamura, 2007). La méthode dite du Neighbor-Joining a été utilisée pour inférer les relations évolutives entre les séquences. Pour produire l'arbre consensus représentant l'évolution phylogénétique des séquences, 10 000 permutations ont été inférées (Felsenstein, 1985).

L'analyse de la fraction 16S de l'ADNr des isolats, nous a permis de confirmer les résultats précédents de l'identification phénotypique. En effet, le séquençage du gène codant pour l'ARNr 16S des quatre souches de *Streptomyces* sp. et l'alignement de ces séquences avec celle de 15 autres souches ont permis l'étude phylogénétique de ces souches (Figure 18). Cette analyse moléculaire affilie sans ambiguïté ces souches au genre de *Streptomyces*, confirmant ainsi la caractérisation phénotypique.

Chapitre III : Résultats et discussion

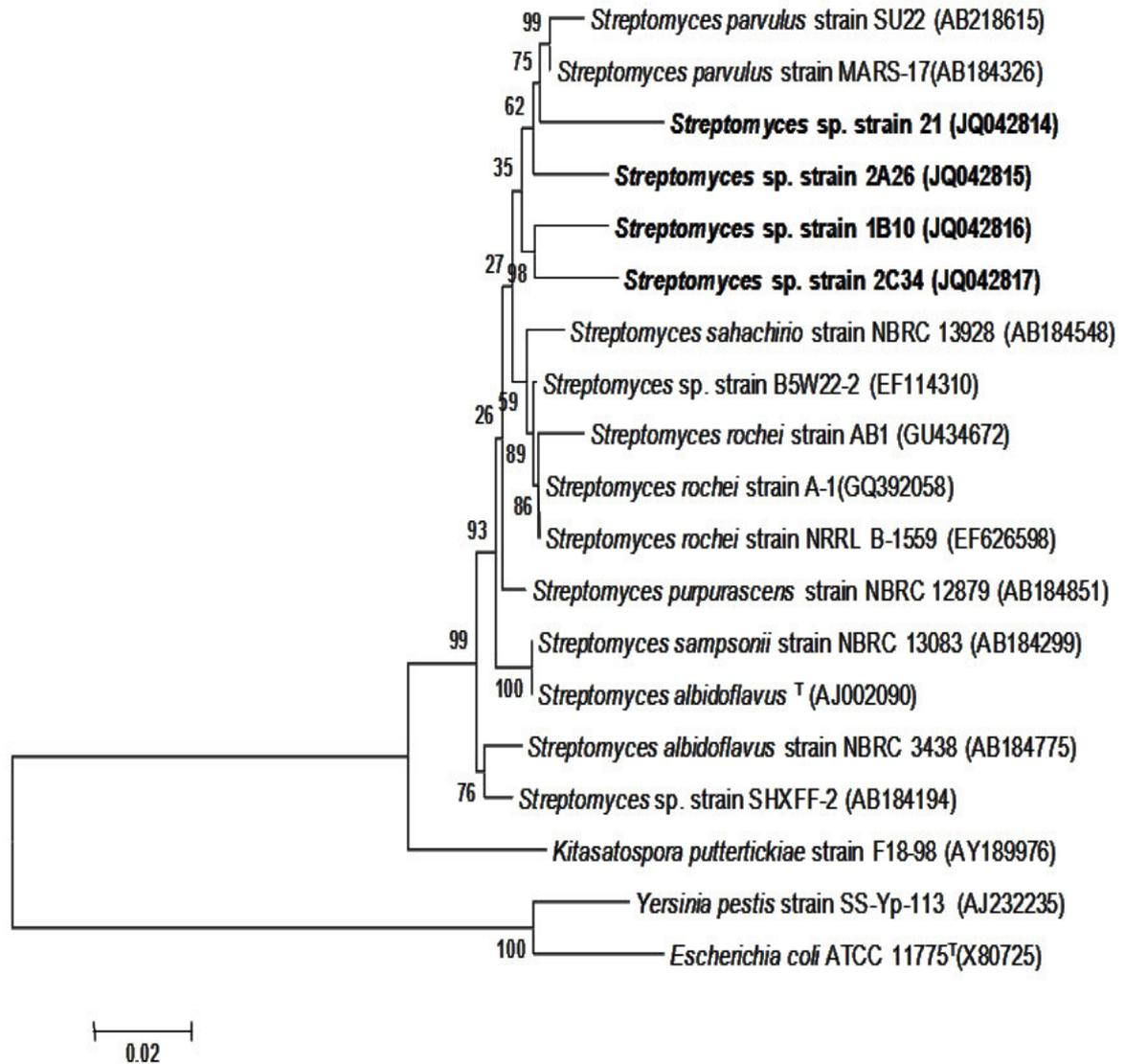


Figure 18. Arbre phylogénétique basé sur l'analyse des séquences du gène codant pour l'ARNr 16S, montrant la relation entre les souches de *Streptomyces* sp. antagonistes et les souches types des espèces les plus proches du genre *Streptomyces*, obtenu par la méthode Neighbor-Joining. Les valeurs du Bootstrap basées sur 1000 analyses sont indiquées au niveau des nœuds de l'arbre. La barre représente la distance 0.02 de substitution des nucléotides. Les souches *Yersinia pestis* et *Escherichia coli* ont été utilisées comme des souches hors groupe. Les nombres entre parenthèses représentent les numéros d'accension dans Genbank.

Chapitre III : Résultats et discussion

II.1.7. Réduction de l'indice de maladie par les *Streptomyces*

L'inoculation des plants de pois chiche par le *F. oxysporum* et les quatre souches de *Streptomyces* sp. a engendré une faible attaque du pathogène. Les résultats montrent que les quatre souches de *Streptomyces* réduisent l'indice de maladie sur le pois chiche avec des pourcentages variables en fonction des souches de *Streptomyces* (Figure 19).

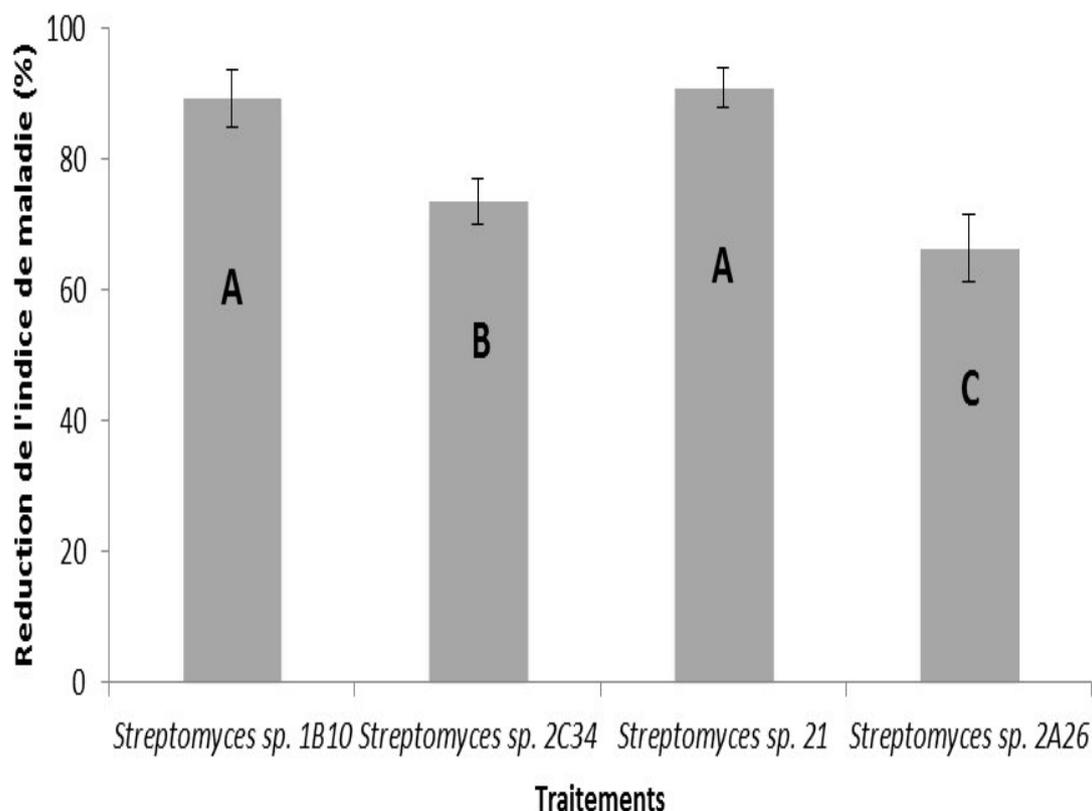


Figure 19. Effet de quatre souches de *Streptomyces* sp. sur la réduction de l'incidence de maladie (%) causée par *Fusarium oxysporum* sur le pois chiche (*Cicer arietinum* L.). Les moyennes (trois répétitions) suivies de la même lettre ne sont pas significativement différentes au seuil de 5 % selon le test Duncan.

L'analyse résultats obtenus, montrent que les souches de *Streptomyces* sp. étudiées se répartissent en trois groupes significativement différents. Les deux souches *Streptomyces* sp. 21 et *Streptomyces* sp. 1B10 sont les plus efficaces dans la protection de pois chiche contre le pathogène et le degré de protection dépasse 90% par rapport au témoin. La souche *Streptomyces* sp. 2C34, vient en deuxième position, protégeant les

Chapitre III : Résultats et discussion

plantes avec un pourcentage 70%. Cependant, la souche *Streptomyces* sp. 2A26 vient en dernière position.

Les effets bénéfiques des *Streptomyces* sur la réduction de maladies fongiques et le développement de plantes a été largement démontré (Singh et Chhatpar, 2011; Gnanamangai et Ponmurugan, 2012; Bubici et *al.*, 2013; Xue et *al.*, 2013). Cao et *al.*, (2005), ont rapporté que la *Streptomyces* isolée à partir de la rhizosphère du bananier peut protéger ce dernier contre la fusariose vasculaire causée par *F. oxysporum* cubense race 4.

Ces résultats se rapprochent de ceux trouvés par Bencheikh et Benali, (2010), qui ont montré que l'inoculation des plants par *Streptomyces* St7c5 pour la lutte contre la fusariose des racines du *Pisum sativum* L., était efficace (5%) comparativement aux plants non inoculés, dont le pourcentage de plants morts a dépassé 25%. L'effet bénéfique de *Streptomyces* a été aussi signalé par Gnanamangai et Ponmurugan, (2012), qui ont montré que l'inoculation des semences de thé par *Streptomyces sannanensis* a réduit l'attaque de la plante par le champignon pathogène *Cercospora theae* Petch. La réduction de l'incidence de maladie est probablement due à la production des antibiotiques (Thakur et *al.*, 2007; Kumar et Kannabiran, 2010), à la production des enzymes extracellulaires lytiques (Bubici et *al.*, 2013; Karimi et *al.*, 2012; Jiang et *al.*, 2012; Brzezinska et *al.*, 2013; Zacky et Ting, 2013; Xue et *al.*, 2013), à l'induction du système de résistance de la plante (Gopalakrishnan et *al.*, 2013) et/ou à la synthèse des composés volatiles (Li et *al.*, 2012).

II.1.8. Effet des *Streptomyces* sp. sur la germination des graines de pois chiche (*Cicer arietinum* L.)

L'efficacité des quatre souches de *Streptomyces* sp. qui induisant une inhibition élevé *in vitro* de la croissance de pathogènes, synthétisant de l'AIA, produisant des enzymes lytiques et solubilisant le phosphate a servi de critère de choix principal des souches à tester *in vivo*.

Les résultats de l'effet des quatre souches de *Streptomyces* sp. sur la germination des graines de pois chiche ont été présentés dans la figure 20. Leurs analyses ont montré que les traitements par les souches de *Streptomyces* sp. stimulent avec des valeurs significative les taux de germination des graines de pois chiche, avec une supériorité de la souches *Streptomyces* sp. 21 par rapport au graines non inoculés (contrôle positive) ou inoculés par le pathogène (Fo).

Chapitre III : Résultats et discussion

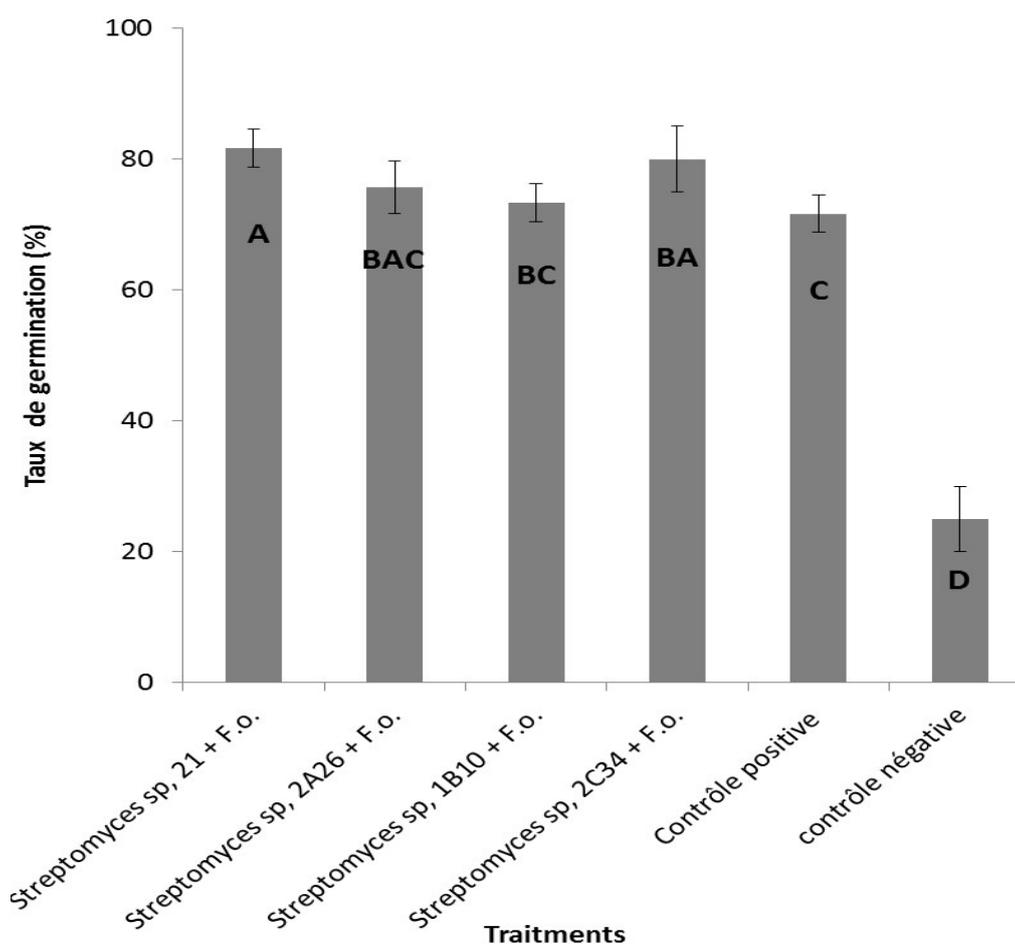


Figure 20. Effet des *Streptomyces* sp. (21, 2A26, 1B10 et 2C34) sur le taux de germination des graines de pois chiche (%) lorsque elles sont confrontées à l'agent pathogène *Fusarium oxysporum* (F.o.). Les valeurs suivies de la même lettre ne sont pas significativement différentes à un seuil de 0,05, selon le test de Duncan; Contrôle positive = plants sans traitement; contrôle négative = plants inoculés par Fo.

Des effets similaires de stimulation de la germination ont déjà été rapportés avec d'autres souches de bactéries et de champignons (Kumar et *al.*, 2011b; Aly et *al.*, 2012; Fatemeh et *al.*, 2014; Miransari et Smith, 2014).

Certaines souches bactériennes, appartenant en particulier au genre des *Streptomyces*, semblent à améliorer la germination des graines dans des conditions contrôlés ou au champ. Ainsi Srinivasan et *al.*, (2009), ont montré que le taux de germination de graines de tournesol, pouvait être significativement augmenté dans des conditions contrôlés grâce à l'inoculation par certaines souches bactériennes comme

Chapitre III : Résultats et discussion

Bacillus sp. 2 (T7) avec 83.7%, *Bacillus* sp. 1 (T4) avec 82.7% *Pseudomonas* sp. (T6) avec 80.7% et *Streptomyces* sp.2 (T5) avec 80.7 %.

De même Maiyappan et *al.*, (2010) ont enregistré une augmentation significative du taux de germination des semences de sorgho (*Sorghum bicolor*) après inoculation par les souches de *Bacillus* spp., *Streptomyces* spp., *Azotobacter* spp. et *Frauteria* spp., avec des taux qui peuvent atteindre jusqu'à 94,7 %. Récemment, Aly et *al.*, (2012), ont montré que les deux souches *Azotobacter vinelandii* MM1 et *Streptomyces* sp. MM10 ou leurs filtrats, peuvent stimuler significativement la germination de graines de blé. Cela pourrait être dû probablement à la capacité des souches à produire des phytohormones (Srinivasan et *al.*, 2009; Maiyappan et *al.*, 2010; Aly et *al.*, 2012).

II.1.9. Effets des *Streptomyces* sp. sur la croissance du pois chiche et sur la protection des plants contre *Fusarium oxysporum*

Les effets de l'inoculation des graines de pois chiche par les quatre *Streptomyces* sp. et l'agent phytopathogène *F. oxysporum* sur les paramètres de croissance (poids frais des parties aériennes et racinaires, taille de la partie aérienne, longueur des racines) ont été déterminés après 30 j de croissance dans la chambre de culture et les résultats sont présentés dans les figures 21, 22, 23 et 24.

L'analyse statistique a révélé un effet hautement significatif du pathogène *F. oxysporum* ($p < 0,0001$). En effet, les résultats montrent que le champignon a réduit de façon hautement significative tous les paramètres de croissance des plants testés (figures 21, 22, 23 et 24). *Fusarium* spp est l'agent responsable du flétrissement vasculaire qui est peut être accompagné de nécroses des racines et du collet (Zehhar et *al.*, 2006 ; Joshi et *al.*, 2012) et la fonte des semis (Leisso et *al.*, 2011). Ainsi, il a été rapporté que dans certains cas, les racines gardent une apparence saine et ne montrent ni pourriture, ni dessèchement (Nene et Reddy, 1987).

Cependant, l'analyse des résultats obtenus de l'effet des *Streptomyces* sp. sur la protection des plants contre *F. oxysporum*, montrent que l'inoculation des graines de pois chiche par les *Streptomyces* sp. (21, B10, 2C34 et 2A26) ont significativement réduits l'attaque de l'agent pathogène qui est traduit par les valeurs élevées des paramètres de croissance, en les comparant à ceux inoculés par l'agent pathogène. En effet, après un mois de culture, tous les paramètres de croissances testés ont été supérieurs et avec des

Chapitre III : Résultats et discussion

valeurs significatives chez les plants co-inoculés par les quatre souches de *Streptomyces* sp. et le pathogène par rapport aux plants inoculés par le pathogène seulement. Les valeurs des paramètres de croissance mesurés chez les jeunes plants en fonction du traitement sont variables suivant l'isolat de *Streptomyces* sp.

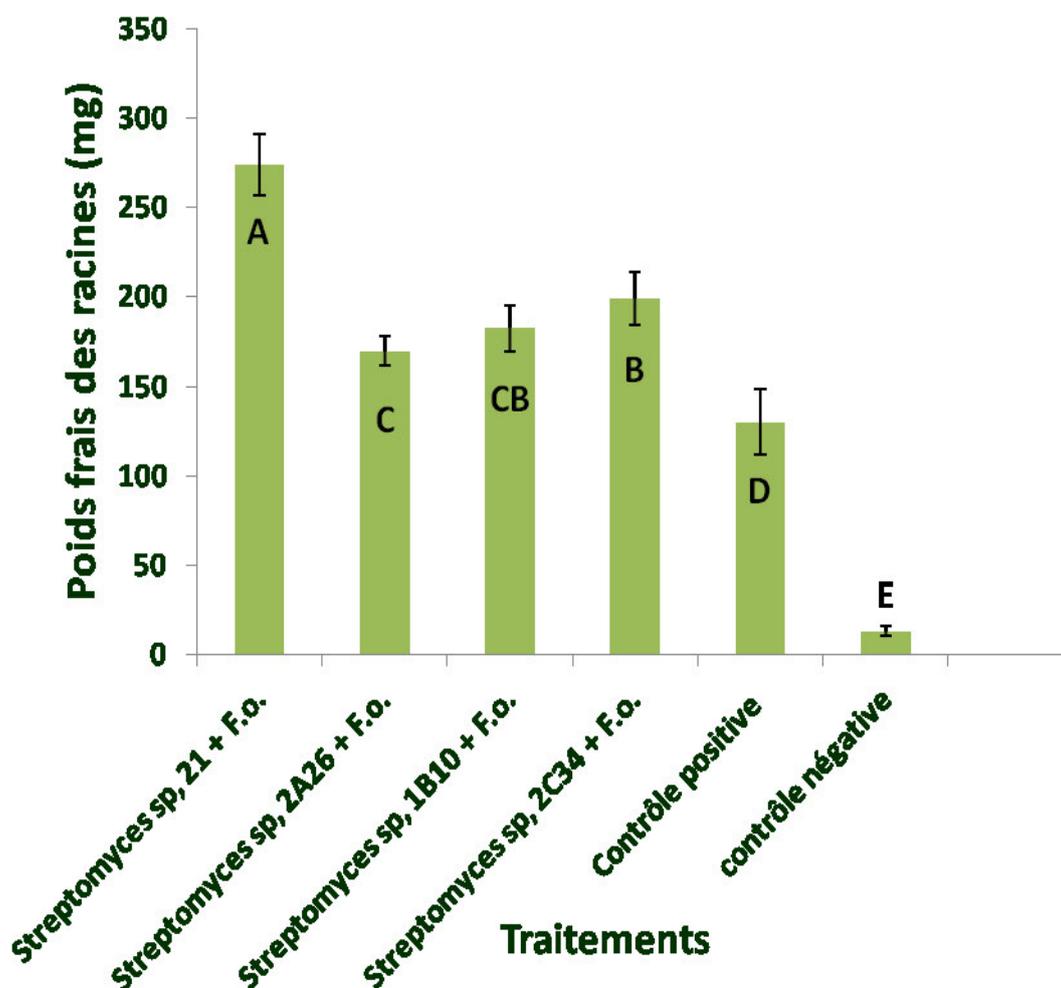


Figure 21. Effet des *Streptomyces* sp. (21, 2A26, 1B10 et 2C34) sur le poids frais (g) des racines des plants de pois chiche lorsque ils sont confrontés à l'agent pathogène *Fusarium oxysporum* (F.o.). Les valeurs suivies de la même lettre ne sont pas significativement différentes à un seuil de 0.05, selon le test de Duncan; contrôle positive = plants sans traitement; contrôle négative = plants inoculés par Fo.

Chapitre III : Résultats et discussion

Quel que soit l'isolat de *Streptomyces* utilisé, la co-inoculation avec les quatre *Streptomyces* sp. et l'agent pathogène *F. oxysporum* a amélioré significativement le poids frais des racines par rapport aux plants non inoculés et aux plants inoculés par l'agent pathogène *F. oxysporum* (figure 21). Cependant, les plants inoculés avec la souche *Streptomyces* sp. 21 a donné le poids frais des racines le plus élevé avec une valeur hautement significative par rapport aux autres traitements et aux plants non inoculés.

Les deux souches de *Streptomyces* 21 et 2C34 stimulent avec des valeurs hautement significative le développement des racines des plantules de pois chiche en poids frais par rapport aux plants non inoculés (contrôle négative) et aux plants inoculés par le pathogène (Fo). En effet, le poids frais des racines peu atteint 273,75 mg chez plants inoculés par le mélange de la souche *Streptomyces* sp. 21 et le pathogène *F. oxysporum*, suivi par la souche *Streptomyces* sp. 2C34 qui améliore le poids des racines à une valeur de 199,25 mg.

En ce qui concerne les effets des souches de *Streptomyces* sp. sur le poids frais des parties aériennes, l'analyse de variance montre qu'il existe une différence hautement significative entre poids de la matière fraîche des parties aériennes des plants co-inoculés par les quatre souches de *Streptomyces* sp. et l'agent phytopathogènes par rapport aux plants qui ont été inoculés seulement par le pathogène *F. oxysporum* (figure 22).

Cependant, les plants co-inoculés par les deux souches 2C34 et 21 et l'agent pathogène Fo, ont améliorés les valeurs de poids frais des parties aériennes par rapport aux plants non inoculés avec des valeurs hautement significatives et une supériorité à la souche 2C34.

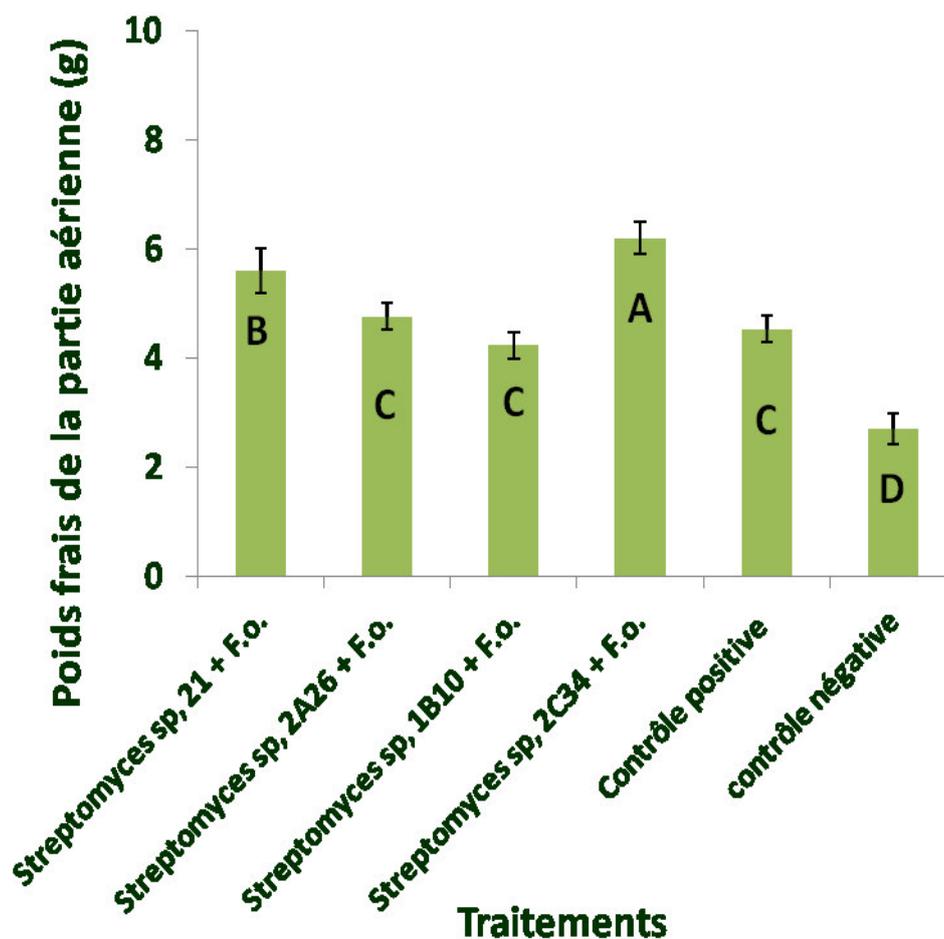


Figure 22. Effet des *Streptomyces* sp. (21, 2A26, 1B10 et 2C34) sur le poids frais (g) de la partie aérienne des plants de pois chiche lorsque ils sont confrontés à l'agent pathogène *Fusarium oxysporum* (F.o.). Les valeurs suivies de la même lettre ne sont pas significativement différentes à un seuil de 0.05, selon le test de Duncan; contrôle positive = plants sans traitement; contrôle négative = plants inoculés par Fo.

La comparaison de la longueur des racines des plants inoculés par le mélange de *Streptomyces* sp. et l'agent pathogène *F. oxysporum* à celui des plants témoins inoculés seulement par l'agent pathogène *F. oxysporum*, montre des différences hautement significatives entre les deux traitements (Figure 23). En effet, pour les plants traités avec les quatre souches de *Streptomyces* sp., le système racinaire se développe normalement et aucun brunissement ou pourriture ne sont observés.

Chapitre III : Résultats et discussion

La longueur des racines des plants de pois chiche traités a été parfois supérieure au témoin non inoculé (souches 21 et 2C34). On peut avancer comme explication que ces souches de *Streptomyces* semblent exercer une action stimulatrice sur la croissance des plantes dans des conditions contrôlées et en l'absence de tout agent pathogène.

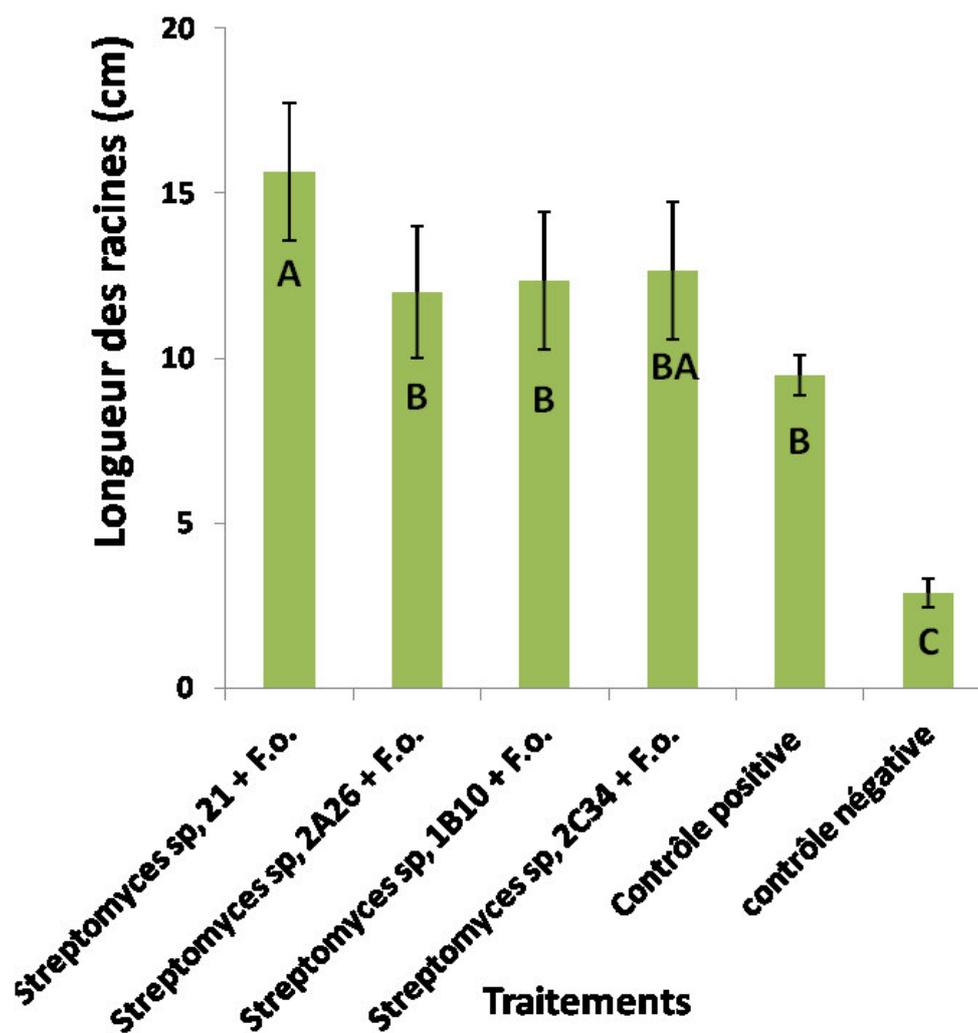


Figure 23. Effet des *Streptomyces* sp. (21, 2A26, 1B10 et 2C34) sur la longueur des racines (cm) des plants de pois chiche lorsque ils sont confrontés à l'agent pathogène *Fusarium oxysporum* (F.o.). Les valeurs suivies de la même lettre ne sont pas significativement différentes à un seuil de 0.05, selon le test de Duncan; contrôle positive = plants sans traitement; contrôle négative = plants inoculés par Fo.

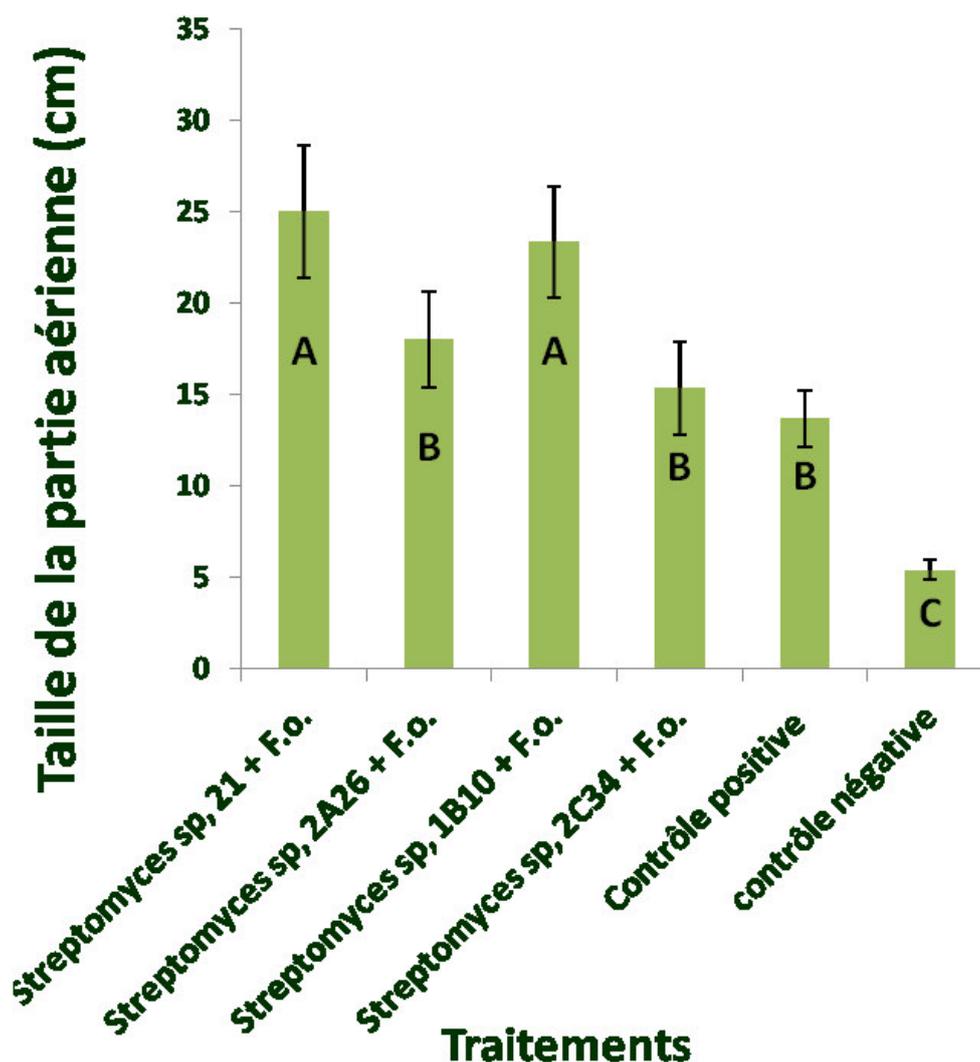


Figure 24. Effet des *Streptomyces* sp. (21, 2A26, 1B10 et 2C34) sur la taille du partie aérienne (cm) des plants de pois chiche (cm) lorsque ils sont confrontés à l'agent pathogène *Fusarium oxysporum* (F.o.). Les valeurs suivies de la même lettre ne sont pas significativement différentes à un seuil de 0.05, selon le test de Duncan; contrôle positive =plants sans traitement; contrôle négative = plants inoculés par Fo.

Les résultats de l'effet des souches de *Streptomyces* sp. sur la taille des parties aériennes de plants de pois chiche sont présentés sur la figure 24. Par rapport aux témoins positifs (graines non inoculés) et négatifs (inoculés par *F. oxysporum*), la co-inoculation des graines par *Streptomyces* sp. 21 et 1B10 et *F. oxysporum* entraîne une augmentation

Chapitre III : Résultats et discussion

hautement significative de la longueur totale des axes aériens (figure 24). Cependant, la co-inoculation des plants par les souches de *Streptomyces* sp. 2A26 et 2C34 avec *F. oxysporum* montrent des valeurs similaires en longueur des parties aériennes avec les plants non inoculés (témoin positive).

Les résultats du test *in vivo* traduisent les effets bénéfiques des différentes souches de *Streptomyces* sp. sur la croissance des plants de pois chiche dans les conditions contrôlées. En effet, l'analyse des résultats de cette étude ont démontré que les souches de *Streptomyces* sp. 21, 2A26, 1B10 et 2C34, peuvent avoir certains effets bénéfiques sur la protection et la stimulation de la croissance des plants pois chiche.

Ces résultats semblent indiquer la protection des plants de pois chiche contre l'agent pathogène est due à une action directe qui pourrait être due à la production des enzymes lytiques. Plusieurs enzymes extracellulaires, comme les protéases, chitinase, cellulase, pectinase, sont impliquées dans le contrôle biologique des pathogènes (Quecine et al., 2008; Sousa et al., 2008; Ziedan et al., 2010; Karimi et al., 2012).

Des effets similaires de stimulation de croissance des plantes ont déjà été rapportés avec d'autres souches de *Streptomyces* (Dimkpa et al., 2008; Baharlouei et al., 2011; Bubici et al., 2013 ; Couillerot et al., 2014). Sadeghi et al., (2009), ont montré que les isolats de *Streptomyces* C et S2 améliorent le poids frais des racines et la partie aérienne et réduire l'incidence de maladie causé par *Rhizoctonia solani*. De même, de Vasconcellos et Cardoso, (2009), rapportent que l'inoculation des semences de *Pinus taeda* par *Streptomyces* sp. A43 a un effet stimulateur sur la croissance des plants dès les premiers jours du cycle végétatif en conditions de serre et qui double la croissance des plants.

La stimulation de croissance des plantes inoculées par les *Streptomyces* peut être due aussi à un effet bénéfique sur la nutrition phosphatée des plantes. Cet effet pourrait résulter de la capacité des trois souches de *Streptomyces* sp. (2C34, 2A26 et 21) de solubiliser la phosphate et à le transférer à la plante. Ces résultats se rapprochent de ceux obtenus par Jog et al., (2014), qui avaient traité des plants de blé par des souches *Streptomyces* spp. isolées à partir de la rhizosphère, capables de solubiliser le phosphate.

La stimulation de la croissance du système racinaire des plants de pois chiche, inoculés par *Streptomyces* sp., pourrait être expliquée par le fait que ces souches peuvent agir par l'intermédiaire d'hormones et/ou les enzymes qui solubilisent le phosphate. En

Chapitre III : Résultats et discussion

effet, Glick, (1995) a démontré que la synthèse des auxines par les rhizobactéries est impliquée dans l'élongation racinaire.

Il a été prouvé que les *Streptomyces* sont capables de produire de l'acide- β -indolacétique (AIA) (Khamna et al., 2010; Lin et Xu, 2013), ce qui pourrait expliquer son effet positif sur la croissance des plants de pois chiche. Plusieurs études ont signalé que certaines bactéries de *Streptomyces* stimulatrices de la croissance des plants sont capables de produire des substances phytohormonales, des enzymes solubilisant le phosphate et des sidérophores ayant des actions antagonistes vis-à-vis des agents phytopathogènes (Bubici et al., 2013; Clermont et al., 2010; Gopalakrishnan et al., 2014; Karimi et al., 2012; Khamna et al., 2009a, 2009b; Jog et al., 2014). Ces résultats suggèrent que les souches *Streptomyces* sp. 21, 1B10, 2C34 et 2A26 sont efficaces en tant qu'agent de lutte biologique.

II.2. Identification morphologique et activité antibactérienne de *Bacillus* spp isolées à partir de la rhizosphère

II.2.1. Caractéristiques morphologiques des isolats de *Bacillus* spp.

Une collection de 25 isolats de *Bacillus* spp a été établie essentiellement à partir d'échantillons de sol rhizosphérique collectés de différentes Fabacées endémiques d'Algérie.

Une identification préliminaire du genre a été effectuée par l'analyse des caractères morphologiques. Cette analyse a permis d'identifier morphologiquement les 25 isolats. Les résultats, montrent que les colonies sont volumineuses, plates et à bord légèrement dentelées.

Les couleurs des colonies sont variables entre blanches, laiteuses et translucides. Ces caractéristiques morphologiques semblables à celles appartenant au genre *Bacillus*. L'aspect morphologique sous microscope optique montre aussi que les 25 sont majoritairement des bacilles, Gram positif, catalase positif, suggérant une appartenance au genre *Bacillus*.

La détection des souches productrices de substances antimicrobiennes parmi les 25 isolats de *Bacillus* spp. a été réalisée par confrontation sur milieu solide et 4 isolats sur les

Chapitre III : Résultats et discussion

25 retenues ont montré une activité inhibitrice sur les deux bactéries cibles (*Staphylococcus aureus* ATCC 6538 et *Escherichia coli* ATCC 8739).

Les isolats GM100 et GM17 ont donné une activité plus élevée par rapport aux autres isolats tableau 9. Ces deux isolats ont été sélectionnés pour les identifiés par les tests microbiologiques, physiologiques, biochimiques et génétiques, ainsi que l'extraction, la purification et la caractérisation des molécules bioactives.

II.2.2. Sélection des isolats actifs

Un nombre de 25 isolats de *Bacillus* spp. a été isolé à partir de la rhizosphère de trois Fabacées (*C. saharae*, *O. angustissima* et *A. gombo*). La détection des souches productrices de substances antimicrobiennes a été réalisée par confrontation sur milieu solide et 2 isolats sur les 25 retenues ont montré une activité inhibitrice sur les deux bactéries cibles (*Staphylococcus aureus* ATCC 6538 et *Escherichia coli* ATCC 8739).

Les isolats GM100 et GM17 ont donné une activité plus élevée par rapport aux autres isolats tableau 11. Ces deux isolats ont été sélectionnés pour les identifiés par les tests microbiologiques, physiologiques, biochimiques et génétiques, ainsi que l'extraction, la purification et la caractérisation des molécules bioactives.

Chapitre III : Résultats et discussion

Tableau 11: Activité antibactérienne des isolats de *Bacillus* spp contre *Staphylococcus aureus* ATCC 6538 et *Escherichia coli* ATCC 8739.

Isolats	Germes cibles	
	<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 6538	<i>Escherichia coli</i> ATCC 8739
GM01	+	-
GM02	+	-
GM17	++	++
GM10	+	-
GM20	-	-
GM22	-	+
GM25	-	-
GM50	+	-
GM60	+	+
GM80	-	-
GM82	+	-
GM83	-	-
GM84	-	-
GM86	-	-
GM89	-	+
GM92	-	+
GM93	-	+
GM94	+	-
GM 92	+	-
GM96	+	+
GM100	++	++
GM110	-	+
GM120	+	-
GM122	-	-
GM130	+	+

+ : Activité antibactérienne moyenne

++ : Forte activité antibactérienne

- : absence d'activité antibactérienne

II.3. Purification et caractérisation biochimique des bactériocines produites par *Brevibacillus brevis* GM100 et *Bacillus clausii* GM17

II.3.1. Identification des isolats GM100 et GM17

Les isolats GM100 et GM17 actifs contre un large spectre de microorganismes cibles ont été isolés à partir de la rhizosphère d'*Ononis angustissima* Lam., cette dernière pousse dans la région aride de Biskra (sud d'Algérie). L'identification des deux bactéries isolées (GM100 et GM17) a été basée sur les méthodes phénotypiques et moléculaires.

Chapitre III : Résultats et discussion

II.3.1.1. Caractéristiques phénotypiques des isolats GM100 et GM17

Les caractères morphologiques et biochimiques de l'isolat GM100, basés sur les méthodes décrites dans *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology* (Claus et Berkeley, 1986), montrent qu'ils ont une forme bacille, aérobies, forment des endospores, Gram positif, catalase positive, oxydase positive et mobiles.

Tableau 12: Utilisation de source de carbone par les isolats GM100 et GM17.

Source de carbone	Réaction		Source de carbone	Réaction	
	GM100	GM17		GM100	GM17
Asculine	-	-	Glycérol	+	+
Salicine	-	-	Erythritol	-	-
Cellobiose	-	+	D-Arabinose	-	+
Maltose	+	+	L-Arabinose	+	-
Lactose	+	+	D-Ribose	+	+
Saccharose	+	+	D-Xylose	-	-
Trehalose	-	-	L-Xylose	-	-
Gentiobiose	+	+	Adonitol	-	-
Melibiose	+	-	Béta-Méthyl xyloside	-	-
Raffinose	-	-	Galactose	+	+
Melezitose	-	-	Glucose	+	+
Amidon	-	+	Fructose	+	+
Glycogène	-	+	Mannose	-	-
Inuline	-	-	L-Sorbose	-	-
D-Turanose	+	-	L-Rhamnose	-	+
D-Tagatose	-	-	Dulcitol	+	+
D-Fucose	-	-	Inositol	-	-
L-Fucose	-	-	Sorbitol	+	+
D-Lyxose	-	-	Mannitol	+	+
D-Arabitol	+	+	L-Méthyl-D-mannoside	-	-
L-Arabitol	+	+	D-Méthyl-D-glucoside	-	-
Xylitol	+	+	N-Acétyl glucosamine	+	+
Gluconate	+	+	Amygdaline	+	+
2-Céto gluconate	-	-	Arbutine	+	+
5-Céto gluconate	-	-			

+ : présence de croissance

- : absence de croissance

Les profils glucidiques des isolats ont été également étudiés en utilisant les galeries API CH 50. Les résultats, montrent que les deux bactéries GM100 et GM17, sont capable d'utiliser une large gamme de glucides comme source de carbone (tableau 12).

Chapitre III : Résultats et discussion

En effet, l'analyse des résultats montrent, que les deux souche utilisent maltose, lactose, saccharose, gentiobiose, arabitol, xylitol, gluconate, glycérol, D-ribose, galactose, glucose, fructose, dulcitol, sorbitol, mannitol, N-acétyl glucosamine, amygdaline et arbutine. Par contre les souces : asculine, salicine, raffinose D-tagatose, fucose, D-lyxose, gluconate, erythritol, xylose, adonitol, Béta-méthyl xyloside, mannose, L-Sorbose, inositol, L-méthyl-D-mannoside et D-méthyl-D-glucoside ne sont plus utilisées par les deux souches.

L'ensemble de ces caractères phénotypiques testés, suggèrent que les deux isolats (GM100 et GM17) appartiennent au genre *Bacillus*.

II.3.1.2. Identification moléculaire des isolats GM100 et GM17

Le séquençage partiel du gène 16S ARNr a été utilisé pour identifier les deux souches GM100 et GM17.

La comparaison de la séquence du gène 16S ARNr obtenu de l'isolat GM100 à celles disponibles dans Genbank indique une grande similarité avec plusieurs souches de *Brevibacillus*.

Ces données confirment ainsi notre hypothèse émise suite à l'identification phénotypique. En effet, la séquence du gène 16S ARNr obtenu a été soumis à une analyse GenBank recherche BLAST, qui a donné une forte homologie, allant jusqu'à 98%, avec plusieurs souches de *Brevibacillus*.

Les souches *Brevibacillus* les plus similaires qui ont été identifiés par l'analyse BLAST étaient la souche *Brevibacillus brevis* NBRC 100 599 (N° d'accèsion AB681205) et la souche *Brevibacillus brevis* DSM 6472 (N° d'accèsion AB112717).

Ces séquences ont été alignés par le logiciel MEGA et un arbre phylogénétique a été construit (Figure 25), et les conclusions en outre confirmé que la souche GM100 (N° d'accèsion JX524820) a été étroitement liée à celles des souches *Brevibacillus*. En résumé, tous les résultats obtenus suggèrent fortement que cet isolat appartienne à l'espèce *Brevibacillus brevis* souche GM100.

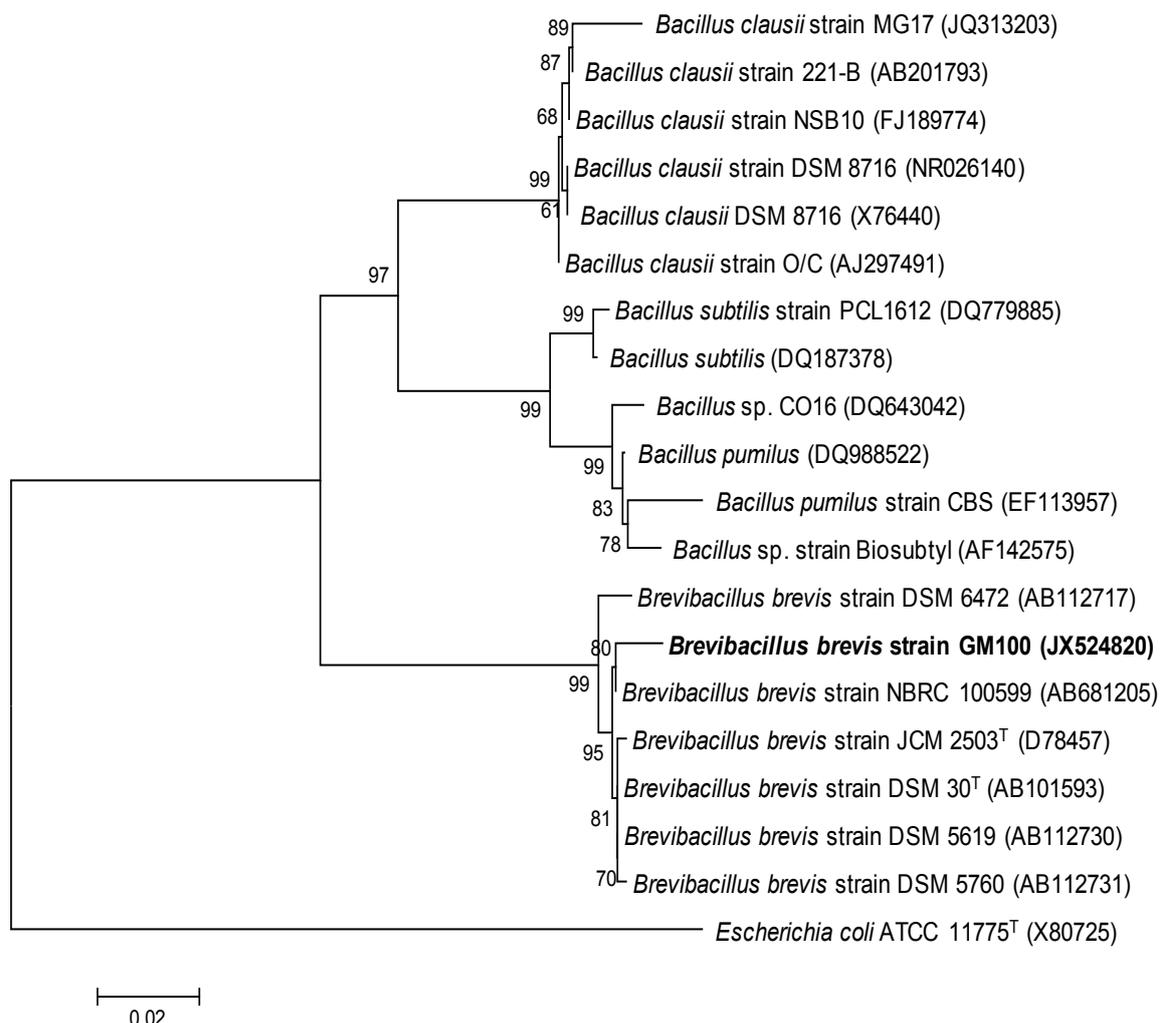


Figure 25. Distribution phylogénétique de l'isolat GM100, en utilisant les séquences du gène 16S ARNr et la méthode «neighbor-joining» et le mode le à deux paramètres avec rééchantillonnage de 1000 répliquas de bootstrap. (Les chiffres entre parenthèses sont les numéros d'accès). La barre indique la distance de 0.02 substitution de position par nucléotide. L'arbre est enraciné avec *E. coli* comme un groupe extérieur.

Pour la souche GM17, la séquence du gène de l'ARNr 16S obtenue a été aussi soumise à la banque de données GenBank et analysée par le programme BLAST. L'analyse des résultats ont donné une forte homologie qui peut attendre jusqu'à 98% avec plusieurs souches du genre *Bacillus*.

Les souches de *Bacillus* proches qui ont été identifiées par l'analyse BLAST étaient *Bacillus clausii* NSB10 (no. FJ189774) et *Bacillus clausii* 221-B (no. AB201793). Ces

Chapitre III : Résultats et discussion

séquences ont été traitées et alignés par le logiciel MEGA. Un arbre phylogénétique a été ensuite construit (Figure 26) et les conclusions en outre confirmé que la souche GM17 (no. JQ313203) a été étroitement liée à celles des souches de *Bacillus*. Cette analyse moléculaire affilie sans ambiguïté cette souche à *Bacillus clausii* GM17, confirmant ainsi la caractérisation phénotypique.

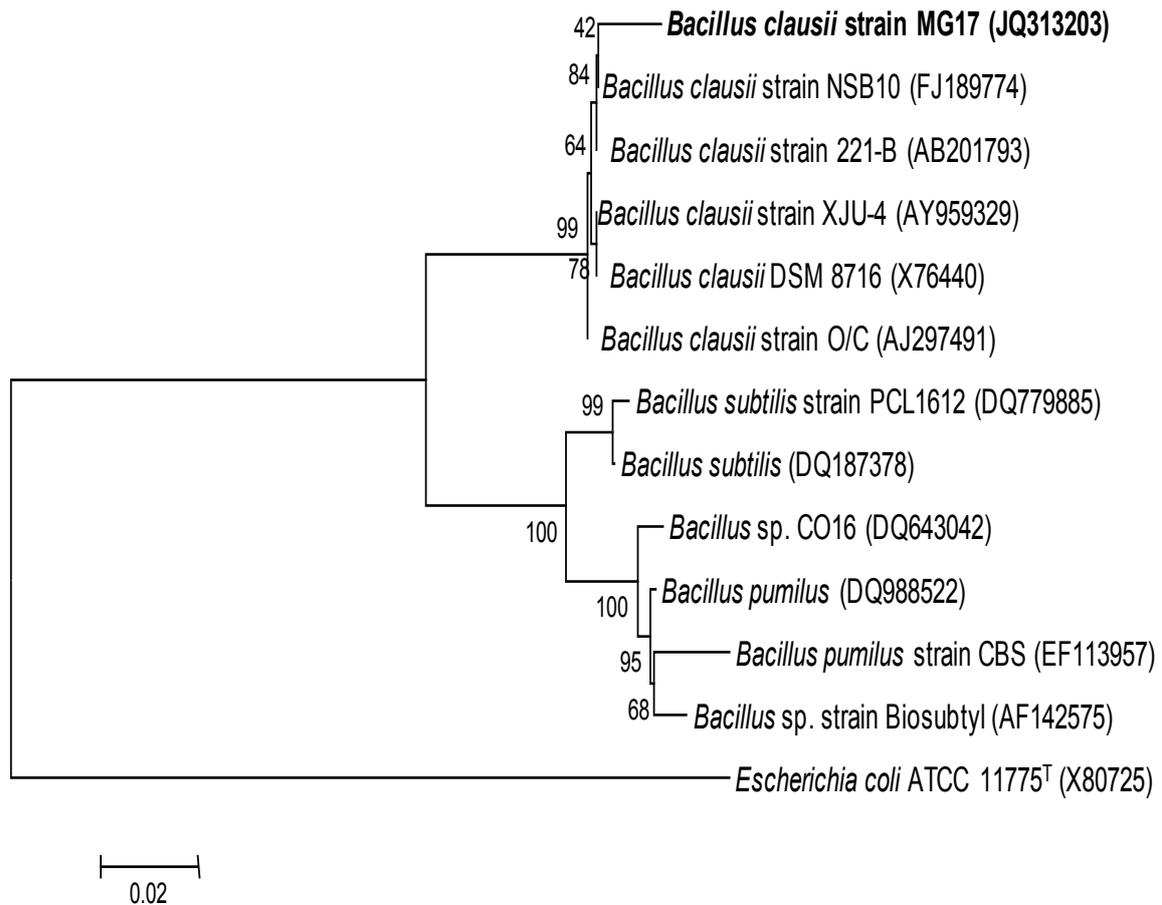


Figure 26. Distribution phylogénétique de l'isolat GM17, en utilisant les séquences du gène 16S ARNr et la méthode «neighbor-joining» et le mode le à deux paramètres avec rééchantillonnage de 1000 répliquas de bootstrap. (Les chiffres entre parenthèses sont les numéros d'accès). La barre indique la distance de 0.02 substitution de position par nucléotide. L'arbre est enraciné avec *E. coli* comme un groupe extérieur.

Chapitre III : Résultats et discussion

II.3.2. Effets des enzymes sur l'activité antimicrobienne des extraits des souches GM100 et GM17

La nature de la substance inhibitrice a été déterminée en vérifiant la sensibilité aux enzymes protéolytiques. Les résultats montrent, que l'activité antimicrobienne contre les deux microorganismes cibles testés, *A. tumefaciens* C58 et *C. tropicalis* R2 CIP 203 des surnageants de la culture des souches GM100 et GM17, n'a pas été affectée par l'addition de catalase tableau 13, ce qui indiquant que l'inhibition de la croissance observée n'est pas due à la production de peroxyde d'hydrogène. Comme les bactériocines sont de nature protéique, les réponses obtenues après l'action des enzymes protéolytiques (trypsine, la pepsine, la papaïne, le pronase E, et la protéinase K) nous permettront d'identifier la nature des substances antibactériennes. Les résultats de l'effet des protéases, indiquent que l'activité antibactérienne de bac-GM100 a disparue complètement après l'action des enzymes protéolytiques. Cependant, une diminution drastique de l'activité antibactérienne a été observée pour l'extrait brut de la souche GM17, ce qui permet de suggérer que l'activité antagoniste est due à une substance de nature protéique.

Tableau 13 : Effet des protéases, détergents, et solvants organiques sur l'activité antimicrobienne résiduelle (%) du surnageant des souches GM100 et GM17.

Traitements	Activité résiduelle (%)	
	Bac-GM100	Bac-GM17
Enzymes		
Catalase	100	100
Trypsine	0	20
Pepsine	0	20
Papaïne	0	20
Pronase E	0	20
Protéinase K	0	20
Solvants		
Chloroforme	100	100
Isopropanol	100	100
Acétate d'éthyle	100	100
Méthanol	100	100
Butanol	100	100
Détergents		
Tween 40	90	90
Tween 60	90	90
Triton X-100	90	90
EDTA	90	90
PMSF	90	90
SDS	75	80
Urée	75	80

Chapitre III : Résultats et discussion

II.3.3. Effets des détergents et des solvants organiques sur l'activité antimicrobienne des extraits des souches GM100 et GM17

Les résultats obtenus de l'effet des détergents des solvants organiques sur l'activité antimicrobienne des extraits des souches GM100 et GM17 sont présentés dans le tableau 13. L'analyse de ces résultats, montrent qu'il y a une diminution de l'activité biologique de l'ordre de 25% en présence de l'agent SDS et de l'urée du surnageant de la culture de GM100 et de 20 % en présence de SDS et de l'urée chez l'extrait de la souche GM17. Cependant, les autres détergents (Tween 40, Tween 60, Triton X-100, EDTA et PMSF) affectent négativement l'activité de Bac-GM100 et Bac-GM17 avec un taux de 10%. Par contre, Le traitement par les solvants organiques (l'acétate d'éthyle, l'isopropanol et le méthanol) à une concentration finale de 60% (v/v), n'a montré aucun effet négatif sur l'activité biologique des surnageant des cultures des souches GM100 et GM17. Ces résultats sont en corrobore avec celles obtenus par plusieurs auteurs (Hernández et *al.*, 2005; Smaoui et *al.*, 2010). En effet, Hernández et *al.*, (2005), montrent que l'exposition de la bactériocine plantaricin TF711 au surfactants cause seulement une faible inactivation de l'activité antimicrobienne de moins de 30% et que la bactériocine garde leur activité après traitement par les solvants organiques. D'autre part, De Kwaadsteniet et *al.*, (2005), montre que la bactériocine ST15 produite par la souche *Enterococcus mundtii* ST15 a gardée leur activité si elle est traitée par Triton X-100, SDS, Tween 20, Tween 80, urée et EDTA.

II.3.4. Etapes de purification et masse moléculaire des bactériocines des souches GM100 et GM17

La purification des bactériocines a été entreprise par de nombreuses méthodes comprenant un protocole de précipitation par les sels d'ammonium et des techniques de chromatographies variées.

II.3.4.1. Etape de purification de la bactériocine GM100

Les procédures de la purification des bactériocines GM100 à partir du surnageant de la culture de la souche *Brevibacillus brevis* GM100, sont résumées dans le tableau 14.

La précipitation par sulfate d'ammonium (40 à 60%) et le traitement par température 90°C durant 2 h (Fraction I) du surnageant de la culture de *Brevibacillus*

Chapitre III : Résultats et discussion

brevis GM100 a entraîné une activité spécifique de 18477 UA.mg⁻¹ avec un facteur de purification de 9 et un rendement de 75% (tableau 14).

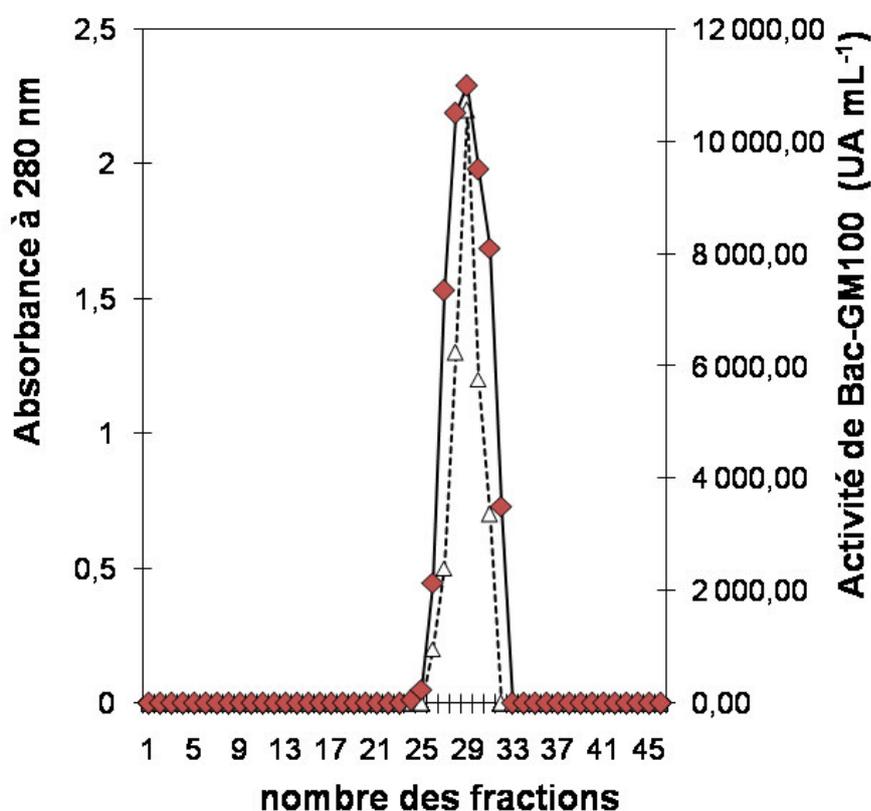


Figure 27. Fractions des éluions de Bac-GM100 par chromatographie échangeuse d'ions avec colonne de FPLC Mono Q Sepharose. (Δ) absorbance à 280 nm, (♦) activité de Bac-GM17 (UA. ml⁻¹).

Après chromatographie Sephadex G-75 (Fraction II), l'activité spécifique augmente à 65708 UA.mg⁻¹ avec un rendement de 39 %, et un facteur pureté de 32. Afin, d'obtenir une protéine hautement pure, les fractions actives éluées ont été réunies et en outre séparés en utilisant une chromatographie échangeuse d'ions avec colonne de FPLC Mono Q Sepharose (Fraction III). Les principaux pics ont été collectés et vérifiées pour l'activité bactériocine (figure 27). Les résultats ont indiqué une augmentation de l'activité spécifique avec une valeur de 84013 UA mg⁻¹ avec un facteur de purification a été 41 fois que la première étape avec un rendement de 23 %.

Chapitre III : Résultats et discussion

Tableau 14 : Rendement des étapes de purification de la bactériocine GM100 de la souche *Brevibacillus brevis* GM100.

Étapes de purification	Activité totale (UA) ^{a,*}	Protéine totale (mg) ^{b,*}	Activité spécifique (UA.mg ⁻¹)	Rendement (%)	Facteur de purification
Extrait brute	5500,00 ± 4.75	2678,17± 422	2053	100	1
Précipitation par Sulfate d'Ammonium	4125,18 ± 3,49	223,26 ± 76	18477	75	9
Traitement thermique (2 h à 90 °C)	3846,52 ± 2,44	62,48 ± 10	58743	61	28
Sephadex G-75	2165,10 ± 1,34	32,95 ± 7	65708	39	32
FPLC Mono Q Sépharose	1269,44 ± 1,11	15,11 ± 3	84013	23	41

^a) Activité antibactérienne par Unité arbitraire (UA) a été effectuée par la méthode Agar Well diffusion en utilisant la souche *A. tumefaciens* C58 comme germe cible.

^b) La concentration de la protéine a été estimée par la méthode de Bradford, (1976).

*) les valeurs représentent la moyenne de trois répétitions, et ± les erreurs standards.

II.3.4.2. Etape de purification de la bactériocine Bac-GM17

Pour la purification de la bactériocine de Bac-GM17, nous avons adopté la même stratégie de purification de la bactériocine Bac-GM100, avec quelques modifications qui concerne la concentration de sulfate d'ammonium et la chromatographie Sephadex G-75. Le tableau 15 résume les différentes étapes de purification.

Chapitre III : Résultats et discussion

Tableau 15 : Rendement des étapes de purification de la bactériocine GM17 de la souche *Bacillus clausii* GM17.

Étapes de purification	Activité totale (UA) ^{a,*} × 10 ³	Protéine totale (mg) ^{b,*}	Activité spécifique (UA.mg ⁻¹)	Rendement (%)	Facteur de purification
Extrait brute	4500.00 ± 3.88	2526.36 ± 315	1781	100	1
Précipitation par Sulfate d'Ammonium	3863.11 ± 2.75	69.32 ± 15	55728	85	31
Traitement thermique (2 h à 90 °C)	3115.36 ± 2.15	42.13 ± 8	73946	69	41
Sephadex G-75	1875.13 ± 1.12	21.01 ± 5	89249	41	50
FPLC Mono Q Sepharose	1146.75 ± 0.98	12.18 ± 2	94150	25	52

^a) Activité antibactérienne par Unité arbitraire (UA) a été effectuée par la méthode Agar Well diffusion en utilisant la souche *A. tumefaciens* C58 comme germe cible.

^b) La concentration de la protéine a été estimée par la méthode de Bradford, (1976).

*) les valeurs représentent la moyenne de trois répétitions, et ± les erreurs standards.

La précipitation par sulfate d'ammonium (30 à 50 %) et le traitement par température 90°C durant 2 h (Fraction I) du surnageant de la culture de GM100 a entraîné une activité spécifique de 73946 UA.mg⁻¹ avec un facteur de purification de 41 et un rendement de 69 % (tableau 15). Après l'étape de purification par chromatographie Sephadex G-50, l'activité spécifique de GM17 est de l'ordre de 89249 UA/mg de protéine avec un facteur de purification qui peut atteindre 50 (Tableau 15). La dernière, étape qui est chromatographie échangeuse d'ions avec colonne de FPLC Mono Q Sepharose (Fraction III) a permis de collecter et vérifier les principaux pics actifs (figure 28) et d'obtenir un facteur de purification de 52 avec une activité spécifique de 94150 UA.mg⁻¹ de protéine et avec un rendement de 25 % (Tableau 15).

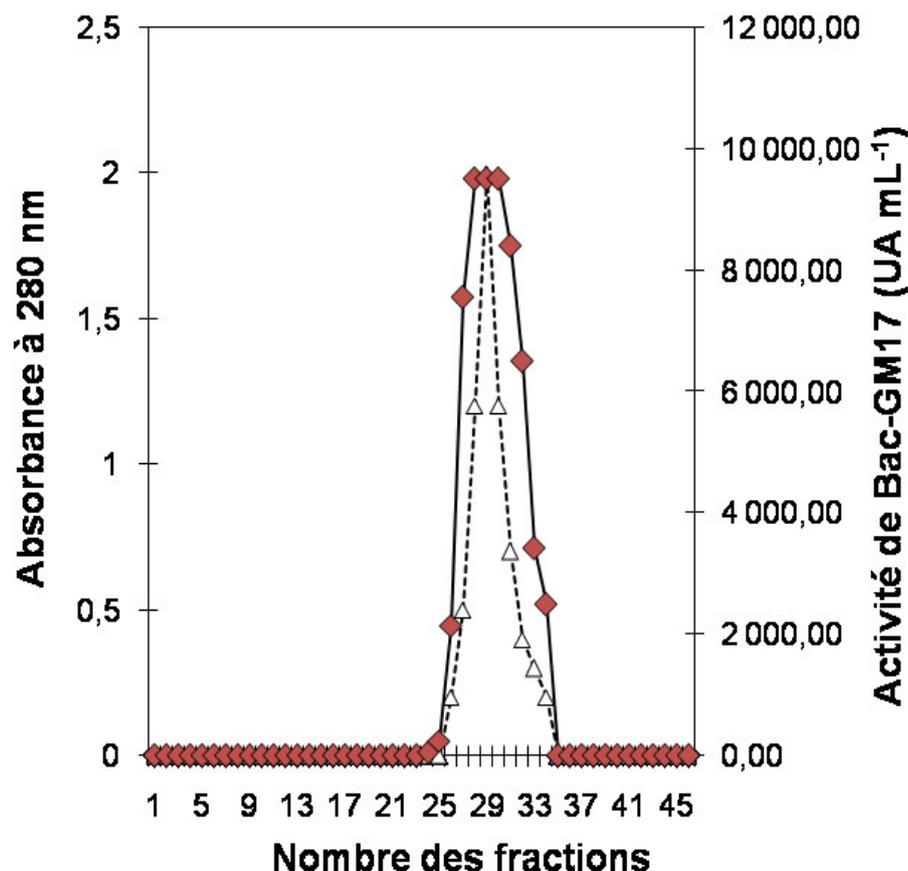


Figure 28. Fractions des éluions de Bac-GM17 par chromatographie échangeuse d'ions avec colonne de FPLC Mono Q Sepharose (Δ) absorbance à 280 nm, (◆) activité de Bac-GM17 (UA. mL⁻¹).

II.3.5. Détermination de la masse moléculaire de Bac-GM100

L'électrophorèse en conditions dénaturantes sur gel de polyacrylamide (12%) en présence de SDS, a permis d'obtenir une seule bande protéique traduisant une bonne pureté de la bactériocine obtenue (Figure 29 A).

Dans un premier temps, les propriétés antimicrobiennes de la fraction ont été évaluées en déposant directement la bande de gel d'électrophorèse correspondant à l'extrait sur une boîte de Pétri contenant un milieu gélosé LB à la surface duquel *A. tumefaciens* C58 a été ensemencé. Après 18 h d'incubation, un halo d'inhibition autour de la bande contenant de la Bac-GM100 a été observé (figure 29 B).

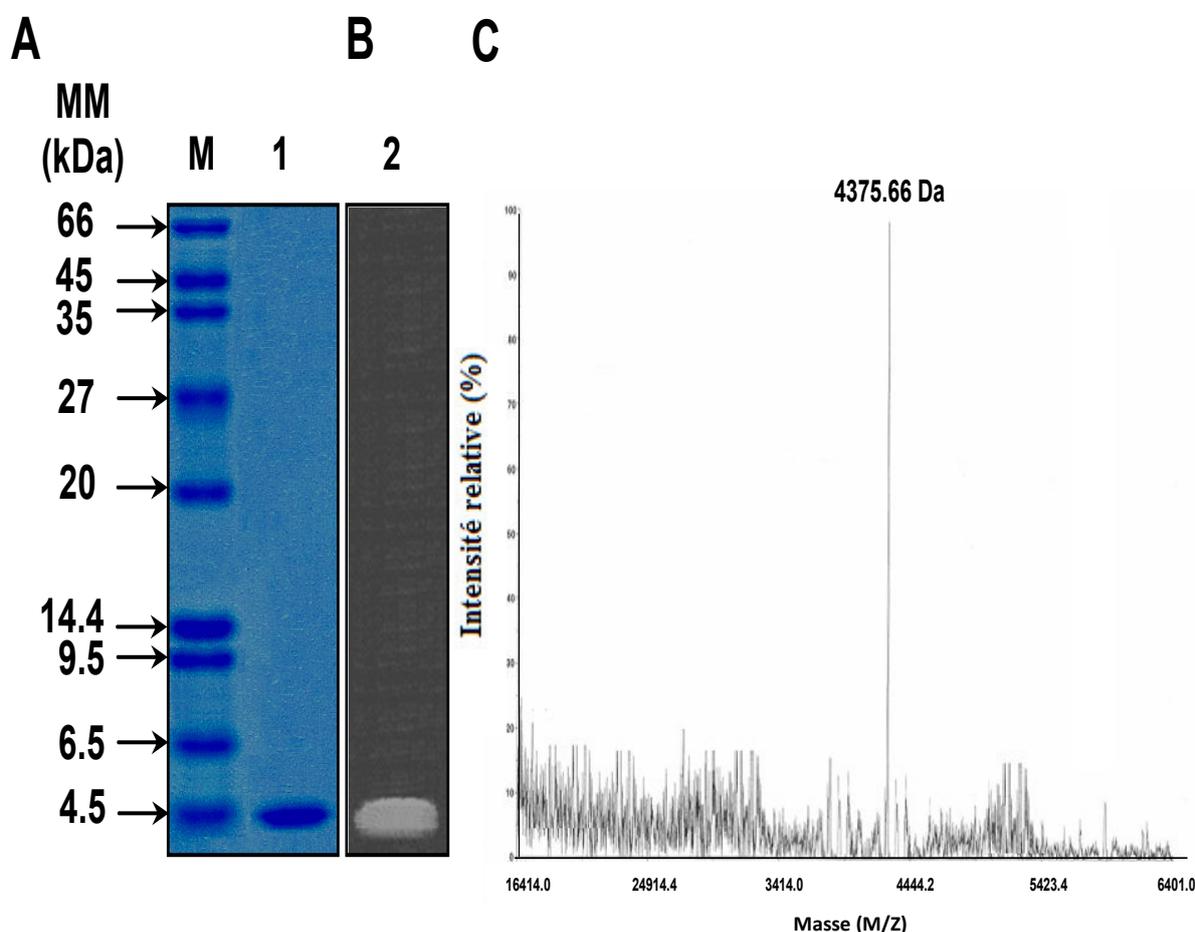


Figure 29. Electrophorèse, zymogramme et masse moléculaire de Bac-GM100 pure. A) : M) : marqueur de taille ; 1) gel SDS-PAGE de Bac-GM17; B) : zymogramme contre *A. tumefaciens* C58; C) : MADI-TOF/MS.

L'analyse des fractions A et B isolés après électrophorèse SDS-PAGE, et la détection directe de l'activité antimicrobienne sur le gel d'électrophorèse indique que la masse moléculaire de la bactériocine est approximativement 4.5 kDa. En effet, cette fraction a montré une activité antimicrobienne contre *A. tumefaciens* C58 (figure 29 B).

Afin de déterminer la masse moléculaire exacte de Bac-GM100, la technique de spectrométrie de masse (MALDI-TOF) a été utilisée. La masse exacte de Bac-GM100 révélée par cette technique est de 4375.66 Da (figure 29 C).

Chapitre III : Résultats et discussion

II.3.6. Détermination de la masse moléculaire de Bac-GM17

L'électrophorèse SDS PAGE, a permis d'obtenir une seule bande protéique d'une masse d'environ de 5 kDa, traduisant une bonne pureté de la bactériocine obtenue (Figure 30 (1)).

Afin de démontrer que la bactériocine GM17 de masse moléculaire 5 kDa possède une activité antimicrobienne antibactérienne, nous avons réalisé un «gel overlay». Le gel a été soumis à une électrophorèse puis découpé en deux parties. Une partie a été colorée au bleu de Coomassie G-250 et une autre a été soumise à un test antimicrobien.

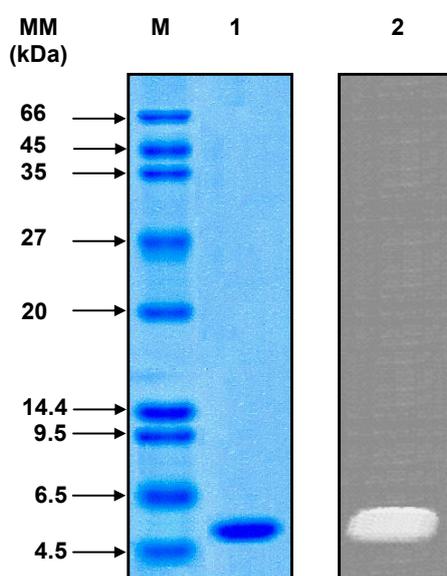


Figure 30. Electrophorèse et zymogramme de Bac-GM17. 1) : gel SDS-PAGE de Bac-GM17; 2) : zymogramme contre *A. tumefaciens* C58; M) : marqueur de taille.

La partie du gel soumise au test antimicrobien sur *Agrobacterium tumefaciens* C58 a révélé un halo d'inhibition correspondant à une masse moléculaire comprise entre 4.5 et 6.5 kDa (Figure 30 (2)). Le peptide de masse moléculaire d'environ 5000 Da présente une activité antimicrobienne dirigée contre *Agrobacterium tumefaciens* C58.

Pour montrer la grande pureté de Bac-GM17 et pour déterminer sa masse moléculaire exacte, la spectrométrie de masse a été réalisée en utilisant un instrument MALDI-TOF. Cette analyse nous a permis de trouver un pic majoritaire avec une masse moléculaire de 5,158.11 Da (Figure 31). La présence d'une bande unique sur gel

Chapitre III : Résultats et discussion

d'électrophorèse ainsi qu'un seul pic majoritaire après spectrométrie de masse montre la grande efficacité du protocole de purification utilisé.

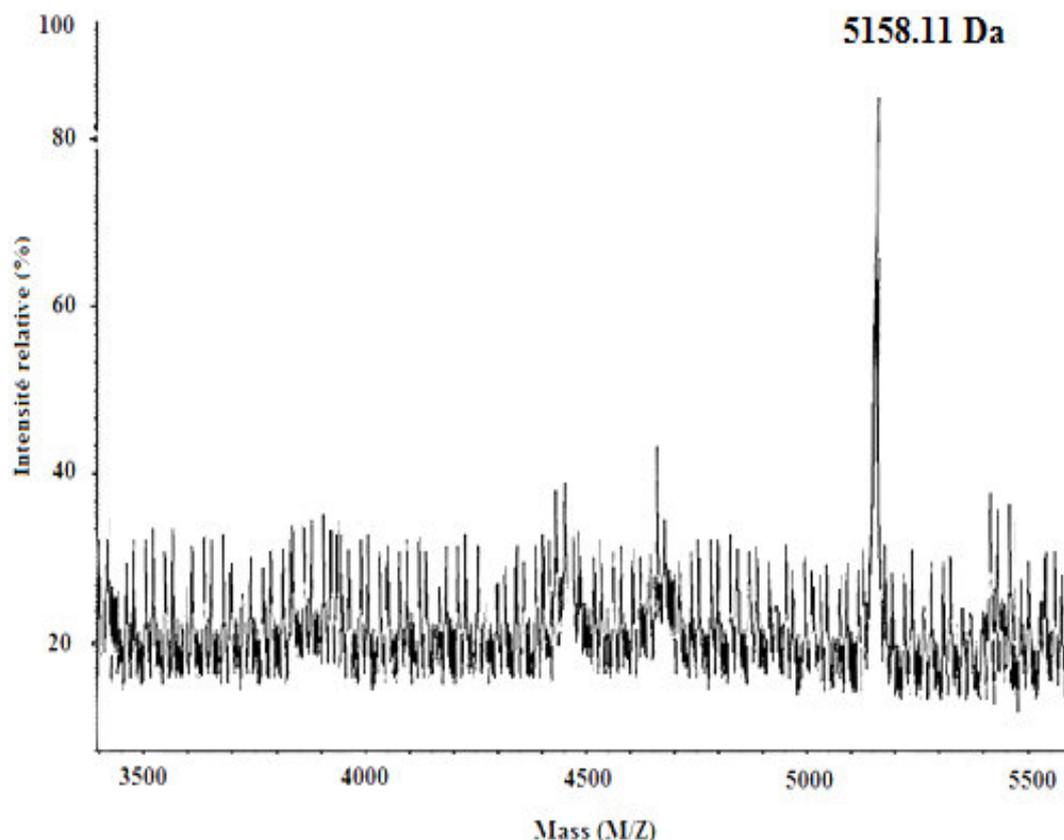


Figure 31. Spectre de masse de la bactériocine Bac-GM17 par la technique MADI-TOF/MS (M/Z).

II.3.7. Séquençage des N-terminaux des bactériocines purifiées Bac-GM100 et Bac-GM17

II.3.7.1. Séquence N-terminale de la bactériocines purifiée Bac-GM100

Les 21 premiers acides aminés de la séquence N-terminale de la Bactériocine Bac-GM100 purifié Bac-GM100 de *Brevibacillus brevis* GM100 ont été déterminés « DWTFANWSCLVCDDCSVNLTY ». Cette séquence a été soumise à une comparaison avec des séquences de protéines dans la base de données GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) en utilisant le programme de recherche tBLASTn et

Chapitre III : Résultats et discussion

BLASTP. Elle a été aussi, soumise à la comparaison par la base de données Swiss-Prot (<http://www.expasy.ch/sprot/>) en utilisant le logiciel de recherche BLASTP. Il a montré 65% d'homologie avec bactériocine thurincin H de *B. thuringiensis* SF361 (no. 2LBZ_A).

II.3.7.2. Séquence N-terminale de la bactériocine purifiée Bac-GM17

La détermination de l'extrémité N-terminale a été aussi, réalisée par la méthode d'Edman automatisée sur microséquenceur en phase gazeuse. Le séquençage indique la présence d'une séquence de 20 acides aminés DWTCCKWSCLVCDDCSVELT. La recherche d'homologies de séquences sur la base des données GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) par les programmes de recherches BLASTP et tBlastn, et sur la base des données Swiss-Prot database (<http://www.expasy.ch/sprot/>) par le programme de recherche BLASTP n'a montré aucune homologie avec les protéines connues. L'absence de similarité avec les portions de séquences publiées de bactériocines des *Bacillaceae*, montre que la bactériocine GM17 de la souche *Bacillus clausii* GM17 est nouvelle.

II.3.8. Spectre d'inhibition de Bac-GM100 et Bac-GM17

Les résultats de l'effet inhibiteur de croissance des bactériocines purifiées GM100 et GM17 sur les germes cibles ont été présentés dans le tableau (16).

L'analyse des résultats obtenus, montre que les deux bactériocines bac-GM100 et bac-GM17 produites par *Brevibacillus brevis* GM100 et *Bacillus clausii* GM17 respectivement, possèdent un spectre d'activité inhibitrice très large sur les germes cibles testés. En effet, l'application de ces deux bactériocines a donné une zone d'inhibition remarquable vis-à-vis les bactéries Gram⁺, les bactéries Gram⁻ et les champignons testés.

Ces résultats se rapprochent de ceux trouvés par plusieurs chercheurs (Atanassova et al., 2003; Heng et al., 2006; Cherif et al., 2008; Pascual et al., 2008; Hammami et al., 2009; Smaoui et al., 2010; Stoyanova et al., 2010; Adebayo et Aderiye, 2011; Hammami et al., 2011; Hammami et al., 2012; Zhao et al., 2013; Ahmad et al., 2014).

Chapitre III : Résultats et discussion

Tableau 16: Activité antimicrobienne des bactériocines Bac-GM100 et Bac-GM17 pures exprimée en zone d'inhibition (mm).

Germes cibles		Diamètre de la zone d'inhibition (mm) ²	
		Bac-GM100	Bac-GM17
Bactéries Gram ⁺	<i>Micrococcus luteus</i> LB 14110	18 ± 1.6	15 ± 1.5
	<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 6538	30 ± 3.0	22 ± 2.0
	<i>Listeria ivanovii</i> BUG 496	31 ± 3.5	33 ± 3.5
	<i>Enterococcus faecalis</i> ENSAIA 6538	33 ± 3.3	25 ± 2.0
	<i>Enterococcus faecalis</i> JH 2-2	25 ± 2.0	ND
Bactéries Gram ⁻	<i>Escherichia coli</i> ATCC 8739	14 ± 1.1	13 ± 1.1
	<i>Salmonella enterica</i> ATCC 8739	36 ± 3.8	ND
	<i>Salmonella typhimurium</i>	20 ± 2.0	20 ± 2.0
	<i>Pseudomonas savastanoi</i> pv. <i>savastanoi</i>	19 ± 1.8	19 ± 1.8
	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 49189	34 ± 3.5	34 ± 3.5
<i>Agrobacterium tumefaciens</i> /biovar 1 complex ¹	S56 (genomovar G1)	24 ± 2.0	25 ± 2.0
	CIP 497-74 (genomovar G2)	23 ± 2.0	24 ± 2.0
	CIP 111-78 (genomovar G3)	25 ± 2.0	21 ± 2.0
	ATCC 23308 ^T (genomovar G4)	30 ± 3.5	32 ± 3.5
	CFBP 6625 (genomovar G5)	23 ± 2.0	21 ± 2.0
	NCPPB 925 (genomovar G6)	20 ± 2.0	22 ± 2.0
	RV3 (genomovar G7)	22 ± 2.0	25 ± 2.0
	C58 (genomovar G8)	35 ± 3.5	31 ± 3.5
	O363 (genomovar G9)	25 ± 2.0	22 ± 2.0
	<i>Agrobacterium rhizogenes</i> CFBP 2408 ^T	15 ± 1.5	18 ± 1.6
	<i>Agrobacterium larrymoorei</i> AF3.44	18 ± 1.6	15 ± 1.5
	<i>Agrobacterium vitis</i> CFBP 2678 ^T	25 ± 2.0	21 ± 2.0
Champignons	<i>Candida tropicalis</i> R2 CIP203	35 ± 6.6	30 ± 3.5
	<i>Fusarium</i> sp.	21 ± 2.0	23 ± 2.0

ATCC: American Type Culture Collection, Manassas, VA, USA.

CIP: Collection de l'Institut de Pasteur, Paris, France.

CFBP: Collection Française des Bactéries Phytopathogènes, INRA, Angers, France.

¹, Le taxon indiqué par biovar 1 d'*Agrobacterium* spp. est un complexe de 9 différentes espèces génomiques ou genomovars (Portier et al., 2006).

², les valeurs dans le tableau sont des moyennes de trois répétitions et les bars d'erreurs indiquent déviations standards; ND : Non Déterminé.

Chapitre III : Résultats et discussion

L'activité antifongique des bactériocines a été démontrée par plusieurs travaux scientifiques. En effet, Adebayo et Aderiye, (2011), indiquent que la bactériocine Brevicin SG1, produite par *Lactobacillus brevis* SG1 cause des modifications morphologiques, une diminution de la masse totale de *Candida albicans* et une inhibition le tube de germination de *Penicillium citrinum*; de même Zhao et al., (2013), ont démontré les peptides flagellin, iturin produites par *Bacillus* sp. BH072 ont une activité antifongique contre *Aspergillus niger*, *Pythium*, and *Botrytis cinerea* ; les travaux de Hammami et al., (2011), montrent aussi que la bactériocine Bac IH7 produit par la souche *Bacillus subtilis* IH7, possède un large spectre d'inhibition contre des bactéries Gram positif, des bactéries Gram- négatif et les champignons pathogènes.

Cette étude a ainsi permis de démontrer que les deux bactériocines Bac-GM100 et Bac-GM17 produites par les souches *Brevibacillus brevis* GM100 et *Bacillus clausii* GM17 respectivement, possède un large spectre d'activité antimicrobienne.

Généralement, la plus part des bactériocines présentent des activités inhibitrices dirigées uniquement contre les espèces proches de la souche productrice. Les bactériocines ayant des activités contre les bactéries à Gram⁻, les bactéries Gram⁺ et les champignons sont très rares. Selon plusieurs travaux scientifiques, les bactériocines à large spectre d'activité sont généralement de masse moléculaire faible comme: enterocin A5-11A (5206 Da) et A5-11B (5218 Da) (Batdorj et al., 2006), thuricin 17 (3162 Da) (Gray et al., 2006) bactériocine L23 (< 7000Da) (Pascual et al., 2008) et Enterocin E-760 (5,362 Da) (Line et al., 2008). De rares bactériocines sont décrites à partir de genre *Bacillus* ayant une masse moléculaire supérieure à 1 kDa et ayant un large spectre d'activité. Dans ce cas, nous pouvons mentionner la bactériocine BacTN635 (4 kDa) produite par *Lactobacillus plantarum* sp.TN635 (Smaoui et al., 2010) et la bactériocine SMXD51 (5383.2 Da) de *Lactobacillus salivarius* SMXD51, inhibe la croissance des bactéries Gram positif et Gram négatif et spécialement *Campylobacter jejuni* (Messaoudi et al., 2012).

Chapitre III : Résultats et discussion

II.3.9. Mode d'action de Bac-GM100

L'ajout de la bactériocine Bac-GM100 ou Bac-GM17 purifiées (à 500 UA. ml⁻¹), ont entraîné un effet bactéricide complet en 6 heures et 5 heures respectivement sur la souche d'*A. tumefaciens* C58 testée (figure 32 et 33). En effet, une diminution rapide du nombre de cellules viables d'*A. tumefaciens* C58 (à partir de 10⁷ UFC. ml⁻¹ à moins de 10² UFC. ml⁻¹) a été observée pour les cellules qui ont été traitée par Bac-GM100 ou Bac-GM17, sur des périodes de 6 h et 5 h respectivement.

Les lectures de densité optique pour ce microorganisme indicateur sont restées constant après une heure de l'ajout de Bac-GM100 ou Bac-GM17 (figure 32 A et 33 A). Pour les échantillons témoins (sans addition Bac-GM100 ou Bac-GM100), les cellules viables d'*A. tumefaciens* C58 atteint 10⁹ UFC ml⁻¹ après 28 h de croissance.

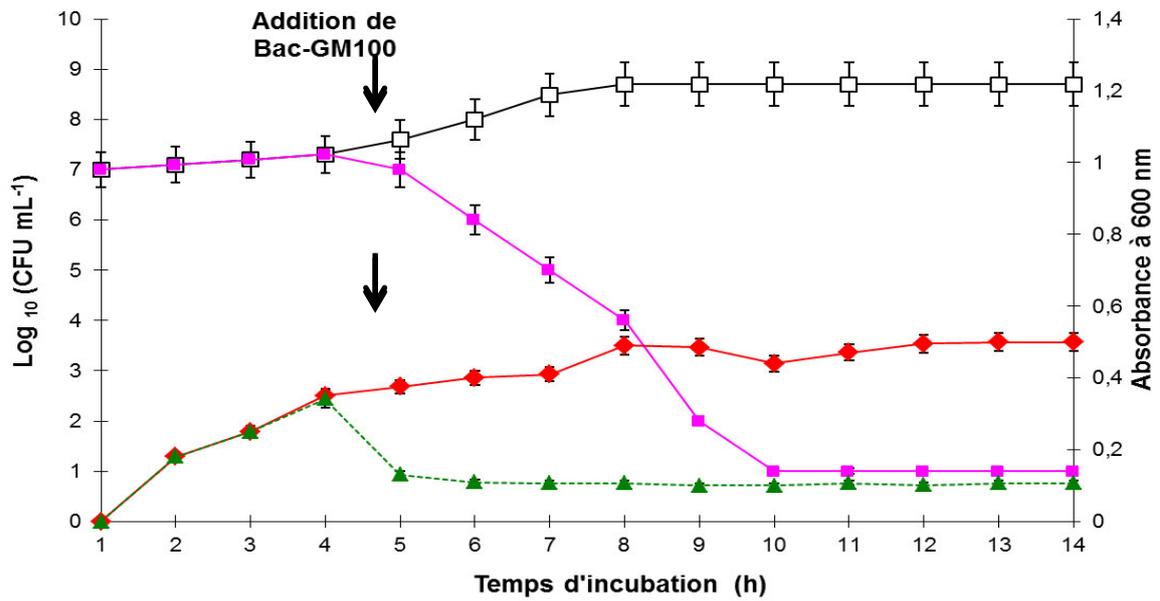
Ces résultats sont en accord avec la littérature qui confirme l'effet bactéricide des bactériocines. En effet, Biscola et *al.*, (2013), ont montré que la bactériocine nisin-like produit par *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* 69 inhibe complètement la croissance de *L. monocytogenes* ScottA après 10 h d'incubation. De même, Chakchouk-Mtibaa et *al.*, (2014), montrent que l'addition la bactériocine BacJ1 à la culture de *S. typhimurium* ATCC14028 réduire le nombre de cellules viables de 10⁸ CFU ml⁻¹ à 10⁵CFU ml⁻¹, durant une période de 10 h.

Les résultats de l'effet de Bac-GM100 sur la croissance de *Candida tropicalis* R2 CIP203, montrent que la densité optique de la culture de cette levure traitée avec Bac-GM100 ou Bac-GM17, est similaire à celle du témoin (sans Bac-GM100 ou Bac-GM17). En effet, le nombre cellules viables de *Candida tropicalis* R2 CIP203, en présence de Bac-GM100 ou Bac-GM17 n'a pas été diminué qu'après 42 h de culture (figure 32 B et 33 B). Ces résultats, montrent que les deux bactériocines Bac-GM100 et Bac-GM17 exerce un effet fongistatique contre *Candida tropicalis* R2 CIP203.

Ces résultats sont en corrobore à ceux obtenues par plusieurs auteurs (Papagianni et Papamichael, 2011; Smaoui et *al.*, 2010).

Chapitre III : Résultats et discussion

A



B

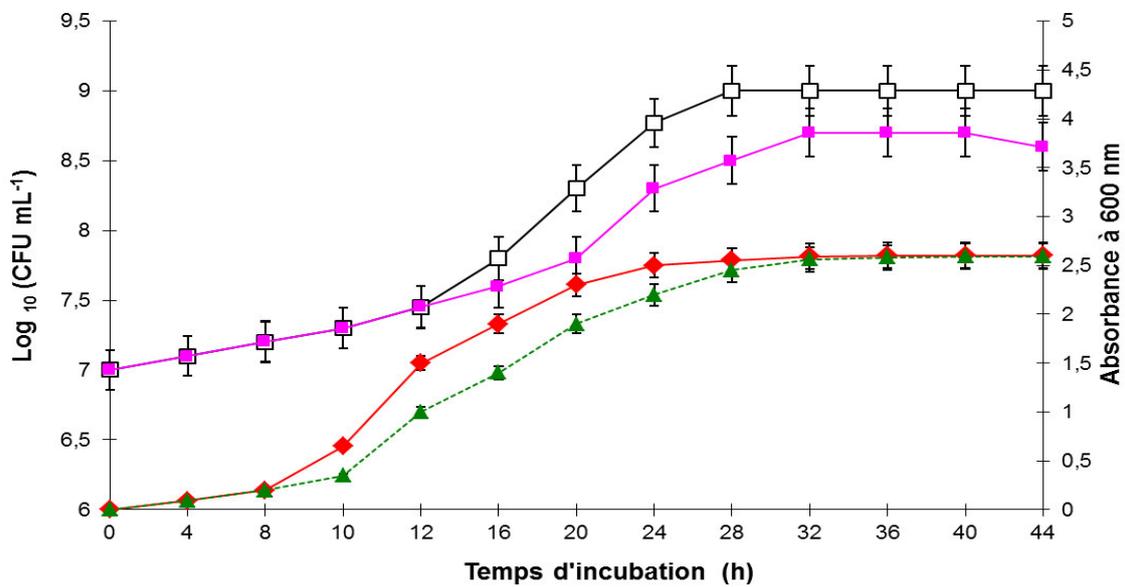


Figure 32. Effet de la bactériocine Bac-GM100 sur la croissance d'*Agrobacterium tumefaciens* C58 (A) et *Candida tropicalis* R2 CIP203 (B): Densité optique à 600 nm en absence (♦) et en présence (▲) de Bac-GM100. CFU/ml en absence (□) et en présence (■).

Chapitre III : Résultats et discussion

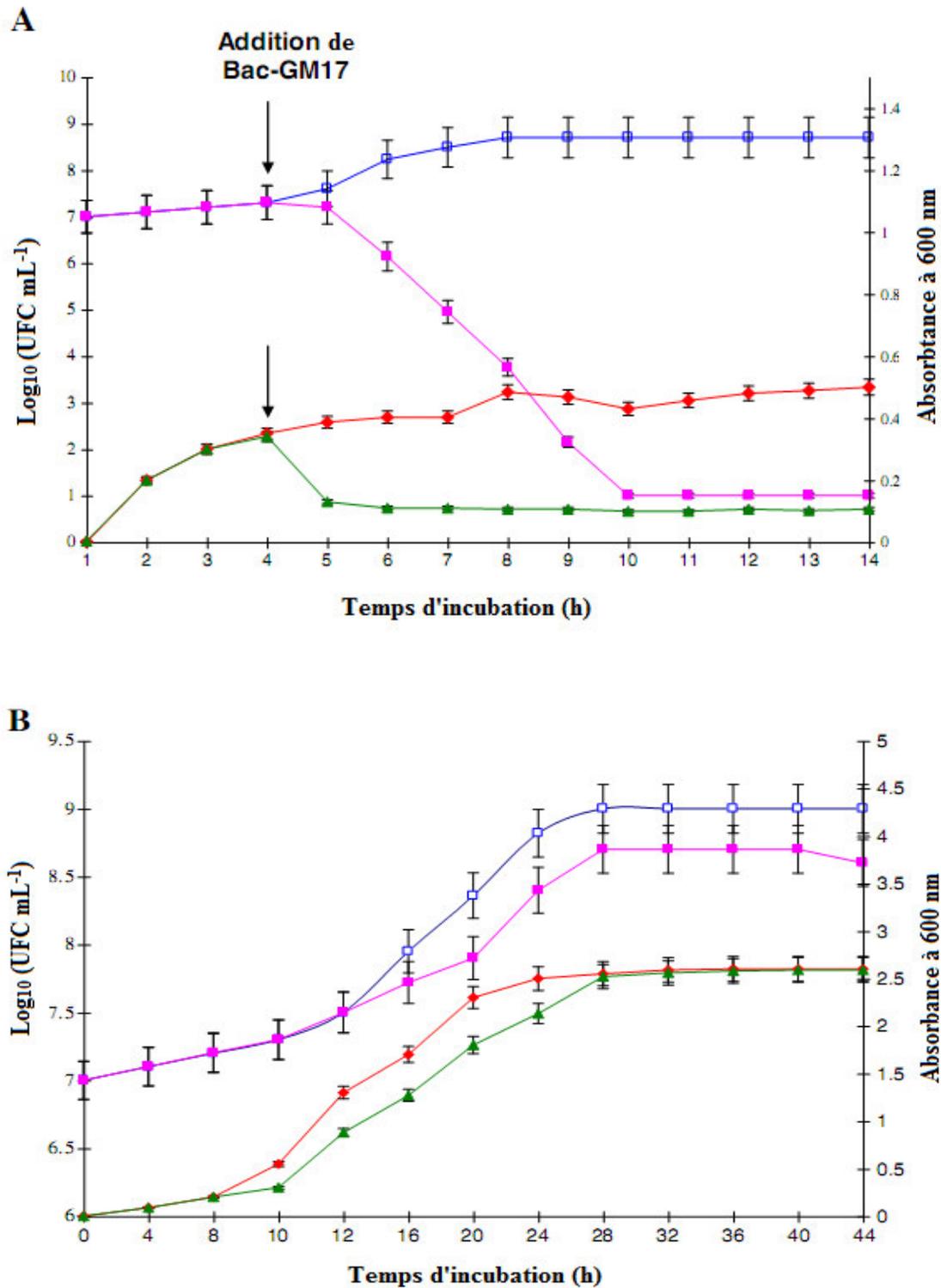


Figure 33. Effet de la bactériocine Bac-GM17 sur la croissance d'*Agrobacterium tumefaciens* C58 (A) et *Candida tropicalis* R2 CIP203 (B): Densité optique à 600 nm en absence (♦) et en présence (▲) de Bac-GM100. CFU/ml en absence (□) et en présence (■).

Les effets fongistatique et bactéricides des bactériocines ont été démontré par plusieurs chercheurs comme par exemple, la bactériocine BacTN635 produite par

Chapitre III : Résultats et discussion

Lactobacillus plantarum sp.TN635 exerce une action bactéricide contre *Listeria ivanovii* BUG496 et fongistatique contre *C. tropicalis* R2CIP203 (Smaoui et al., 2010) et la bactériocine Bac IH7 purifiée présente un mode d'action bactéricide contre *Agrobacterium tumefaciens* C58 et un mode d'action fongistatique contre *Candida tropicalis* R2 CIP203 (Hammami et al., 2011). Probablement, ces deux bactériocines agissent sur la membrane cytoplasmique des cellules cibles en formant des pores hydrophiles qui provoquent un efflux de métabolites cellulaires importants et mort cellulaire.

II.3.10. Propriétés biochimiques des bactériocines purifiées Bac-GM100 et Bac-GM17

II.3.10.1. Effet des traitements thermiques sur l'activité antimicrobienne de Bac-GM100 et de Bac-GM17

L'effet du traitement thermique des bactériocines pures Bac-GM100 et Bac-GM17 sur l'activité antimicrobienne a été examiné en traitant les deux bactériocines par différentes températures et les résultats sont présentés dans le tableau 17. Aucune diminution significative de l'activité antimicrobienne n'a été observée pour un traitement à 100 °C pendant 2 h ou 120 °C pendant 20 min.

La résistance aux températures élevées a été observée aussi chez d'autres bactériocines comme l'acidocin D20079 produite par *L. acidophilus* DSM20079 qui n'a diminué que de 50 % après 30 min à 121 °C (Deraz et al., 2005), l'entomocin 110 produite par *Bacillus thuringiensis* subsp. *Entomocidus* HD110, qui a conservée 53 % de son activité après 20 min d'incubation à 121°C (Cherif et al., 2008) et Weissellin A produite par *Weissella paramesenteroides* DX qui garde leur activité après une exposition à 121 °C pendant 60 min (Papagianni et Papamichael, 2011), ainsi que, la bactériocine pediocin ACCEL produite par la souche *Pediococcus pentosaceus* ACCEL qui est stable à une température 121 °C pendant 15 min (Wu et al., 2004).

La stabilité à des températures élevées, est une caractéristique majeure des bactériocines de faible poids moléculaire (Oscariz et Pisabarro, 2001). Deraz et al., (2005); Pei et al., (2013), suggèrent que la présence de liaisons disulfure intramoléculaires, stabilisent les structures secondaires en réduisant le nombre de structures dépliées possibles. Cette stabilité est une des caractéristiques communes des bactériocines classe IIa (Papagianni et Papamichael, 2011).

Chapitre III : Résultats et discussion

Tableau 17 : Effet des traitements thermiques, détergents, solvants organiques et protéases sur l'activité antimicrobienne résiduelle (%) des bactériocines Bac-GM100 et Bac-GM17 produite par *B. brevis* GM100 et *B. clausii* GM17 respectivement.

Traitements	Activité résiduelle (%) de	
	Bac-GM100	Bac-GM17
Enzymes		
Trypsine	0	20
Pepsine	0	20
Papaïne	0	20
Pronase E	0	20
Protéinase K	0	20
Température (°C)		
70 pendant 2h	95	90
80 pendant 2h	95	90
90 pendant 2h	95	90
100 pendant 2h	95	90
120 pendant 20min	90	90
4 pendant 72h	100	100
-20 pendant 72h	100	100
Détergents pendant 48 h		
Tween 40	0	0
Tween60	0	0
Triton X-100	90	85
SDS	90	90
Urée	90	90
Solvants organiques pendant 72 h		
Chloroforme	95	75
Butanol	60	90
Isopropanol	95	90
Acétate d'éthyle	60	90
Méthanol	95	75

Par contre, plusieurs autres rapports scientifiques montrent que les bactériocines, perdent leur stabilité durant les étapes de purification sous les effets des hautes températures (Kamoun et *al.*, 2005; Hammami et *al.*, 2012). En effet, la bactériocine bacthuricin F4 conserve seulement 20 % de son activité après incubation à 90 °C pendant 30 min (Kamoun et *al.*, 2005).

Les deux bactériocines Bac-GM100 et Bac-GM17 ont été soumises à une congélation à -20 °C et décongelées pendant 72 h à 4 °C. Les activités résiduelles sont présentées dans le tableau 17. Les résultats montrent, que les bactériocine Bac-GM100 et Bac-GM17, gardent ces propriétés antagonistes contre tous les microorganismes indicateurs testés. En général, le stockage réfrigéré n'a pas produit des changements dans

Chapitre III : Résultats et discussion

l'activité antimicrobienne des bactériocines Bac-GM100 et Bac-GM17. La résistance des bactériocines aux traitements de congélation/décongélation a été aussi observée chez d'autres bactériocines comme les bactériocines-likes produites par *Enterococcus faecium*, *Lactococcus lactis*, *Enterococcus hirae* et *Enterococcus canis* (Ponce et al., 2008), la bactériocine PSY2 produite par *Lactococcus lactis* PSY2 (Sarika et al., 2012), la nisin Z produite par *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* KT2W2L (Hwanhlem et al., 2013) et la paracin C produite par *Lactobacillus paracasei* CICC 20241 (Pei et al., 2013).

Les deux bactériocines Bac-GM100 et Bac-GM17, produites par les *Brevibacillus brevis* GM100 et *Bacillus clausii* GM17 respectivement, sont hautement thermostables et résistent aux conditions de stockage. Ces propriétés très intéressantes de cette bactériocine font que ces travaux présentent un intérêt certain pour des applications biotechnologiques.

II.3.10.2. Effet des détergents, des solvants organiques et des protéases sur la stabilité de Bac-GM100 et de Bac-GM 17 pures

L'exposition des bactériocines bac-GM100 et bac-GM17 aux différents détergents durant 48 h, montre que seulement le Tween 40 et Tween 60 éliminent l'activité antimicrobienne des deux bactériocines (tableau 17). Par contre, les traitements par Triton X-100, SDS et l'urée n'ont montré aucun effet significatif sur l'activité des bactériocines. Todorov et Dicks, (2006), qui montrent que les bactériocines produites par les souches *Lactobacillus plantarum* (ST194BZ, ST414BZ et ST664BZ), résistent aux traitements avec SDS, Tween20, urée et EDTA. Ces résultats indiquent que les bactériocines pures Bac-GM100 et Bac-GM17 pourraient difficilement être utilisées dans une formulation avec les détergents Tween 40 et Tween 60 car elles ne seraient plus actives.

La nature protéique des bactériocines a été confirmée par la perte totale ou partielle de son activité à la suite d'un traitement aux protéases. Les résultats, montrent que l'activité de la bactériocine de Bac-GM100 été perdue totalement après incubation avec la trypsine, pepsine, papaïne, pronase E et protéinase K. cependant, la bactériocine Bac-GM17 montre une très faible susceptibilité aux protéases (tableau 17). Pour s'assurer que c'est bien l'activité de la protéase qui inactivait les bactériocines, et également pour s'assurer qu'il n'y avait pas d'effet de dilution de la bactériocine par la solution de protéase, les protéases ont été inactivées à la chaleur (100 °C, 1 heure) avant l'incubation. Aucune inactivation des bactériocines n'a été obtenue avec les protéases dénaturées. Pour s'assurer de l'activité des

Chapitre III : Résultats et discussion

bactériocines, celles-ci ont également été testées sans traitement. Les bactériocines étaient actives lorsque testées sans traitement.

II.3.10.3. Effet de pH sur l'activité des bactériocines Bac-GM100 et Bac-GM17

L'activité antibactérienne des bactériocines Bac-GM100 et Bac-GM17 varie en fonction du pH initial du milieu (Figure 34). Elles augmentent parallèlement à l'augmentation du pH pour atteindre 100% avec à pH 7. Au-delà de cette valeur, une diminution régulière est constatée jusqu'à un pH de 12.

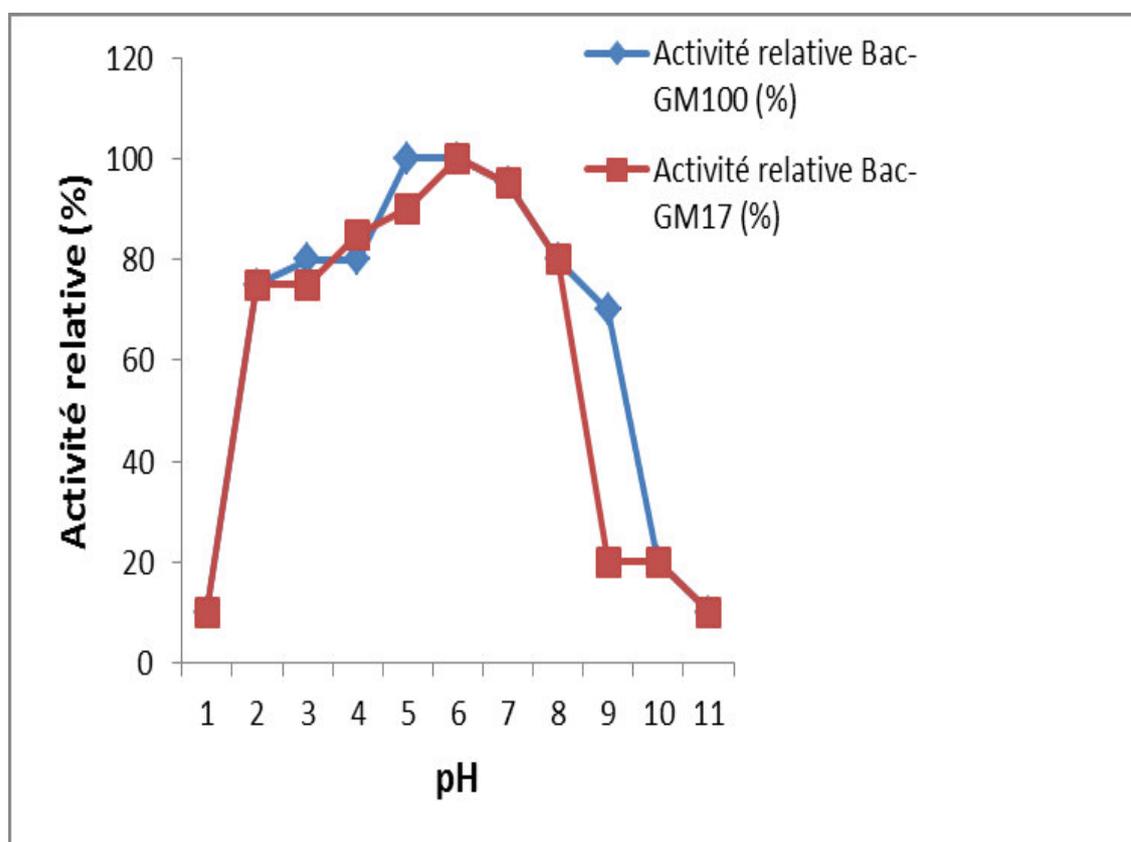


Figure 34. Effet du pH sur l'activité antibactérienne relative (%) des bactériocines Bac-GM100 et Bac-GM17 sur le germe cible *A. tumefaciens* C58.

Chapitre III : Résultats et discussion

Ces résultats démontrent que les deux bactériocines résistent à des conditions acides et alcalines. Ces propriétés sont similaires à celles de la bactériocine J46 produite par *Lactococcus lactis* Subsp. *cremoris* J46 qui est stable à pH (3–9) (Huot et *al.*, 1996), la weissellin A de la souche *Weissella paramesenteroides* DX (pH 2 à 10) (Papagianni et Papamichael, 2011) et de la nisin Z produite par *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* KT2W2L (Hwanhlem et *al.*, 2013).

Dans d'autres recherches comme les études de Saeed et *al.*, (2006), montrent que la Staphylococcin Bac 188 produite par *Staphylococcus aureus* AB188 est stable dans un large intervalle de pH (2–14). Cependant, Wu et *al.*, (2004) ont démontré aussi, que la bactériocine pediocin ACCEL est stable à un pH de 2-6. L'activité des bactériocines Bac-GM100 et Bac-GM17 dans un large intervalle de pH, suggèrent une potentielle utilisation dans l'industrie alimentaire et comme des agents de lutte biologique contre les microorganismes pathogènes. Généralement, les bactériocines ont une grande tolérance aux variations de pH et aux traitements thermiques (Dortu et Thonart, 2009).

II.3.11. Phytotoxicité de Bac-GM100 et Bac-GM17 sur la tomate et le melon

La germination des semences de tomate (*Lycopersicon esculuntum* L.) et de melon (*Cucumis melo* L.) a été réalisée avec deux concentrations différentes (50 et 500 UA.ml⁻¹) des deux bactériocines Bac-GM100 et Bac-GM17, et les taux de germination, ainsi que les valeurs des paramètres de la vigueur des plants ont été comparés à ceux obtenus pour les semences traitées avec de l'eau (témoin négatif) et ceux traités par l'hypochlorite de sodium 10% (p/v) (témoin positif).

Les résultats de l'effet de Bac-GM100 et Bac-GM17 sur les taux de germination de la tomate (*Lycopersicon esculuntum* L.) et le melon (*Cucumis melo* L.) sont présentés dans les figures 35 et 36 respectivement.

Chapitre III : Résultats et discussion

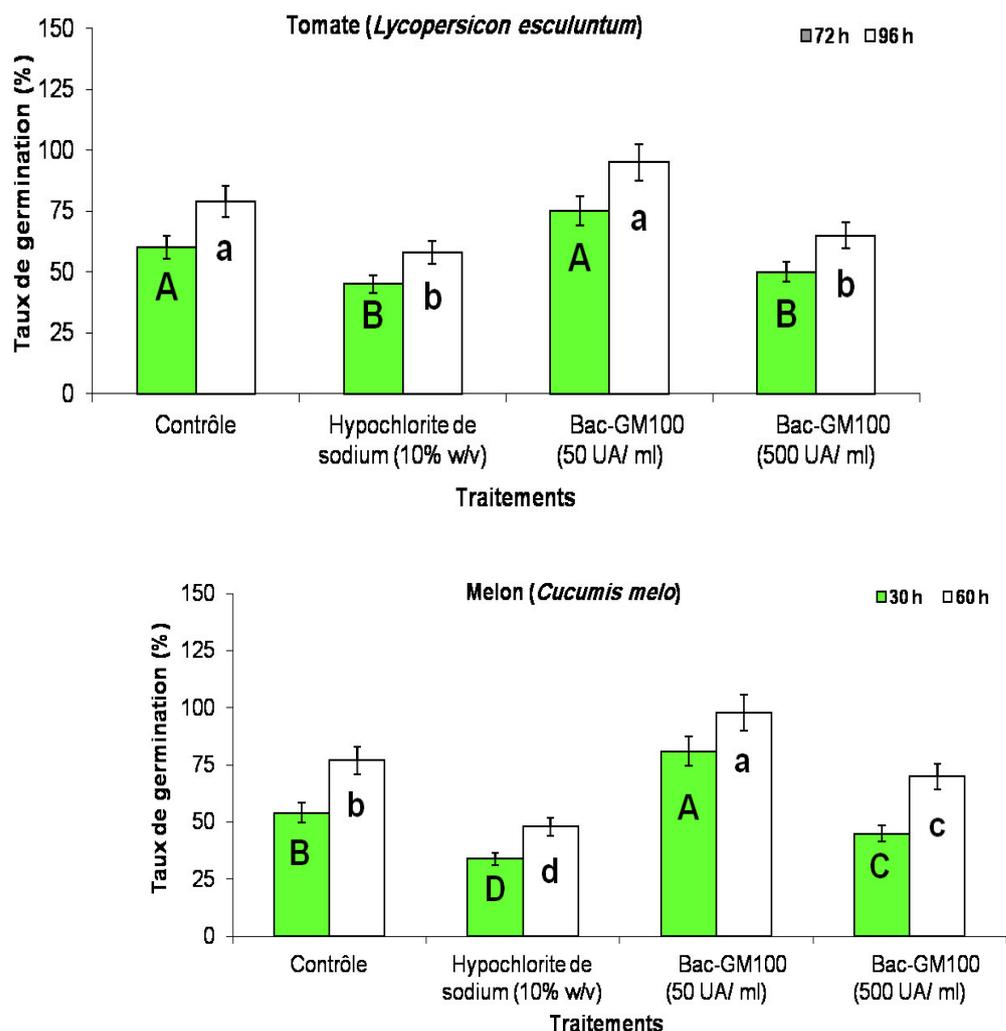


Figure 35: Taux de germination chez la tomate et le melon dans l'eau distillée (contrôle), l'hypochlorite de sodium (10%), et dans deux concentrations de Bac-GM100.

Le test Duncan ($p=0.05$) indique que les histogrammes avec des différentes lettres sont significativement différentes. Chaque valeur est la moyenne de trois expérimentations indépendante. Les bars d'erreurs indiquent les déviations standards.

L'analyse des résultats, montrent que la germination a été fortement inhibée chez les deux espèces étudiées lors d'un traitement par l'hypochlorite de sodium, par Bac-GM100 (500 UA.ml^{-1}) ou par Bac-GM17 (500 UA.ml^{-1}). Cependant, Bac-GM100 et Bac-GM17 (50 UA.ml^{-1}) n'ont montré aucun effet inhibiteur sur la germination des graines. En effet, les deux cultures montrent un taux de la germination similaires aux semences traitées avec de l'eau (témoin négatif) figure 35 et 36.

Chapitre III : Résultats et discussion

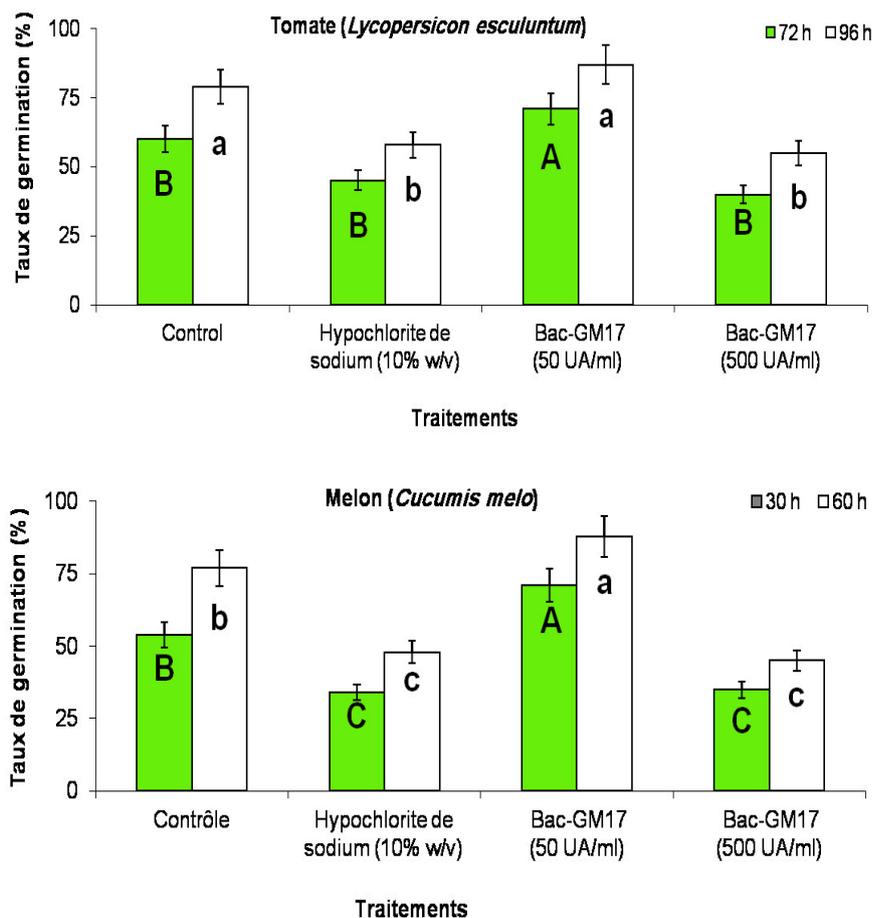


Figure 36: Taux de germination chez la tomate et le melon dans l'eau distillée (contrôle), l'hypochlorite de sodium (10%), et dans deux concentrations de Bac-GM17.

L'analyse de résultats des effets de Bac-GM100 et Bac-GM17 (50 UA.ml^{-1}) sur la vigueur des plants (poids frais et taille de la partie aérienne, longueur des racines), indiquent que les paramètres de croissance étudiés chez les deux plants testés (tomate et melon) ont été significativement plus élevés par rapport à ceux obtenus par les autres traitements (figure 37 et 38). Par contre, les traitements par Bac-GM100 (500 UA.ml^{-1}) et par Bac-GM100 (500 UA.ml^{-1}) ont montré des effets négatifs sur la vigueur chez les deux plants. En effet, l'analyse des résultats montrent une réduction significative de la longueur des racines, la hauteur et le poids frais des parties aériennes (Figure 37 et 38). Ces derniers résultats sont proches à ceux obtenus par un traitement à l'hypochlorite de sodium, où les paramètres de vigueur chez plants ont été aussi fortement affectés.

Chapitre III : Résultats et discussion

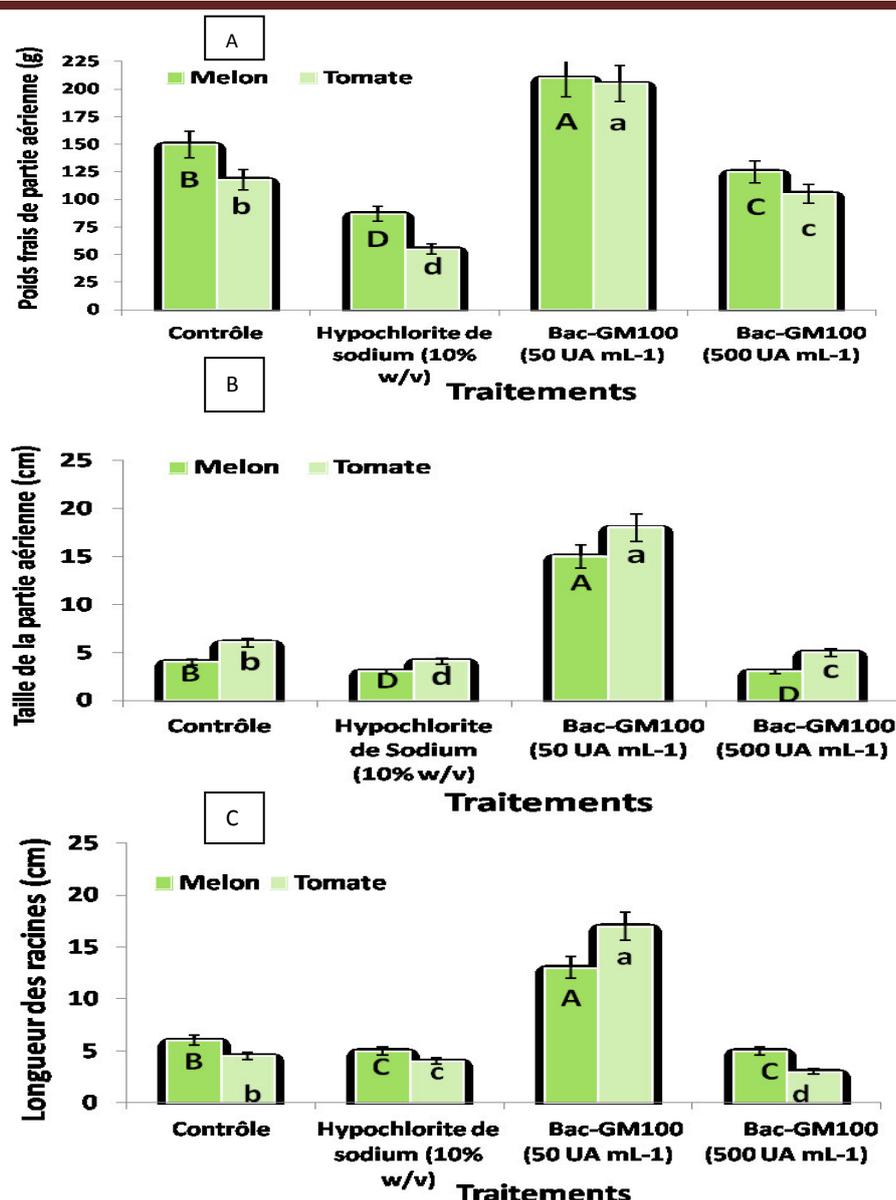


Figure 37. Effet de la bactériocine GM100 pure (50 UA.ml⁻¹ et 500 UA.ml⁻¹), hypochlorite de sodium (10%) sur les paramètres de croissance ((A) poids frais et (B) taille de la partie aérienne, (C) longueur des racines) de la tomate et du melon.

Nombreuse études ont démontré l'effet bénéfique des bactériocines sur la germination et la vigueur des plantes (Hammami et *al.*, 2009, 2011, 2012). En effet, Hammami et *al.*, (2012), montrent que l'application de la bactériocine Bac 14B (500 UA.ml⁻¹) produite par la souche *Bacillus subtilis* 14B sur les semences de tomate et de melon stimule la germination et améliore les paramètres de croissances. Hammami et *al.*, (2011), montrent également que le traitement des semences de tomate et melon par la bactériocine Bac IH7 (800 UA.ml⁻¹) améliore le taux de germination et les paramètres de croissance chez les plants.

Chapitre III : Résultats et discussion

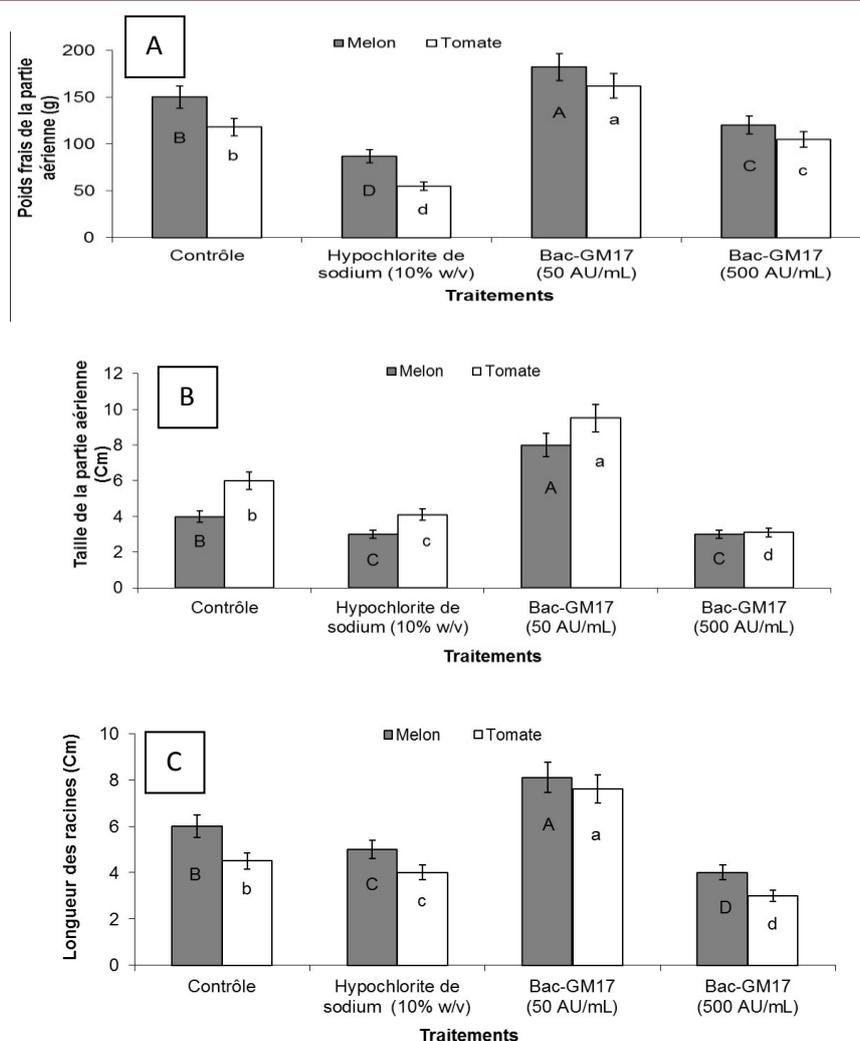


Figure 38. Effet de la bactériocine GM100 pure (50 UA.ml^{-1} et 500 UA.ml^{-1}), hypochlorite de sodium (10%) sur les paramètres de croissance ((A) poids frais et (B) taille de la partie aérienne, (C) longueur des racines) de la tomate et du melon.

La bactériocine Bac IH7 a également montré des propriétés désinfectantes efficaces contre les maladies de fonte des semis au stade de pré-germination et de la pourriture des racines causée par *Alternaria solani*, ainsi que les maladies de flétrissement et d'autres agents pathogènes, transmises par les semences. Il a été aussi rapporté, que l'utilisation de fongicides améliore la germination, la levée et la croissance des plantes et réduire la fonte des semis. En outre, il a été signalé que la germination accélérée améliore la résistance au stress et la croissance des plantes (Pattan et al., 2001). Le pouvoir germinative peut jouer un rôle important dans la levée rapide et uniforme des semis et la réduction de l'indice de maladie, en améliorant ainsi le rendement (Gupta et al., 1999). Ces résultats, pourrait expliquer l'utilité de la solution de Bac-GM100 et Bac-GM 17 comme des désinfectants des semences.

Conclusion
&
perspectives

Conclusion et Perspectives

Conclusion et perspectives

Il est clair que les agents pathogènes et les stress environnementaux peuvent avoir des impacts négatifs sur la santé et la croissance des plantes. Cependant, ces impacts peuvent être réduits ou éradiqués par l'utilisation des microorganismes bénéfiques, notamment les bactéries de la rhizosphère. Une meilleure compréhension des communautés microbiennes de la rhizosphère est nécessaire pour optimiser les technologies microbiennes du sol au profit de la croissance et la santé des plantes. Les objectifs de cette étude étaient de sélectionner des rhizobactéries PGPR à partir des rhizosphères de quelques Fabacées endémiques d'Algérie, d'identifier et de caractériser les molécules bioactives.

Globalement, cette étude nous a permis de mettre en évidence la richesse des rhizosphères des Fabacées endémiques en microorganismes bioactifs.

Cette étude a affirmée l'effet nettement antagoniste des plusieurs isolats d'actinomycètes et de *Bacillus* spp isolés à partir des rhizosphères des trois Fabacées *Ononis angustissima*, *Astragalus gombo* et *Calobota saharae* de deux régions d'Algérie (Boussaada et Biskra), contre les germes cibles testés en laboratoire.

Dans la première partie de la thèse, la présente étude, a confirmée l'abondance des actinomycètes dans la rhizosphère des Fabacées endémiques d'Algérie. La densité des actinomycètes dans la rhizosphère, semble être liée à l'espèce végétale et les sites d'isolement. Les différences de dénombrement en actinomycètes observées entre ces trois Fabacées dans deux sites peuvent s'expliquer par l'effet des exsudats racinaires des plantes mais aussi par les caractéristiques des sites étudiés.

Les actinomycètes antagonistes, ont été analysés pour leurs caractéristiques PGPR : activités chitinase, protéase, productions de l'acide indole acétique (AIA), ainsi que la solubilisation du phosphate. Les résultats, démontrent que les quatre souches de *Streptomyces* sp. présentent ces quatre caractères de PGPR. Ces *Streptomyces* sp., (2A26, 1B10, 2C34 et 21) ont été préférentiellement sélectionnées comme des agents de lutte biologique.

Les quatre meilleures souches d'actinomycètes antagonistes aux pathogènes et de caractéristiques PGPR, ont été objet d'une identification en faisant appel à la

Conclusion et Perspectives

caractérisation morphologique, biochimique et moléculaire. Les résultats obtenus affirment que les quatre souches identifiées appartiennent au genre *Streptomyces*.

Le criblage *in vivo* des *Streptomyces* sp. pour leur effet PGPR sur le pois chiche (*Cicer arietinum* L.) a été réalisé sous conditions contrôlées. Les résultats obtenus, apportent des données nouvelles sur l'effet bénéfique que peut avoir l'inoculation des graines par des *Streptomyces* sp. (Souches 21, 2A26, 1B10 et 2C34) sur la croissance de semis de pois chiche. En effet, cette étude a démontré que les quatre souches de *Streptomyces* sp. 21, 2A26, 1B10 et 2C34 pourrait inhiber efficacement la croissance de la plus part des bactéries et des champignons pathogènes testés *in vitro* et de protéger les plants contre les maladies de pois chiche causées par *Fusarium oxysporum* *in vivo* sous conditions contrôlées.

Les bactéries *Streptomyces* sp. ont permis de réduire les symptômes dus au champignon pathogène *Fusarium oxysporum*. Ces résultats concordent avec ceux de la littérature.

Nos résultats apportent des données nouvelles sur l'effet bénéfique que peut avoir l'inoculation des graines avec des souches de *Streptomyces* sur la croissance du pois chiche. Les quatre souches de *Streptomyces* sp. 21, 2A26, 1B10 et 2C34 utilisées, ont pu promouvoir la croissance des plants. Leur rôle de promouvoir la croissance des plants est probablement dû à l'aptitude de solubiliser le phosphate et de produire l'AIA par les souches de *Streptomyces* sp.

Ces résultats appuient l'ensemble de nos hypothèses et indiquent que la rhizosphère de Fabacées endémiques d'Algérie est riche en actinomycètes à activité antimicrobienne et que leur application comme agent de lutte biologique peut conduire à une réduction de la maladie fongique causée par *Fusarium oxysporum* et même promouvoir la croissance du pois chiche.

Dans la deuxième partie de cette thèse, les *Bacillus* bactériocinogénés, isolats GM100 et GM17 de la rhizosphère d'*Ononis angustissima* Lam. actifs contre un large spectre de microorganismes cibles ont été identifiés par des méthodes phénotypiques et moléculaires. Les résultats obtenus, confirment que la souche GM100 et la souche GM17 font partie respectivement de *Brevibacillus brevis* et de *Bacillus clausii*.

La purification des deux bactériocine Bac-GM100 et Bac-GM17 à partir des souches bactériocinogénés, a été réalisée en trois étapes: une précipitation par sulfate d'ammonium, une filtration sur gel sur colonne Séphadex G-75 pour finir avec une Chromatographie échangeuse d'ions. Ces différentes étapes de purifications ont permis

Conclusion et Perspectives

l'obtention de deux bactériocines Bac-GM100 et Bac-GM17 avec des facteurs de pureté d'environ 41 et 52 respectivement par rapport à ses formes existantes dans les surnageants bruts. Les rendements de purification sont de 25 % et 23% pour Bac-GM100 et Bac-GM17 respectivement. L'activité spécifique de Bac-GM100 purifiée est de l'ordre de 94150 UA.mg^{-1} de protéines et Bac-GM17 est de 84013 UA.mg^{-1} . Les masses des bactériocines pures ont été estimées par SDS-PAGE à environ 5 kDa pour Bac-GM100 et à 4,5 kDa pour Bac-GM17. La masse moléculaire exacte des bactériocines (Bac-GM100 et Bac-Gm17) déterminée par spectroscopie de masse est respectivement 4375,66 Da et 5158,11 Da.

L'analyse des effets de la catalase et des enzymes protéolytiques sur l'activité biologique provenant du surnageant de culture des souches étudiées nous a permis de déduire qu'il s'agit des biomolécules de nature protéique, vraisemblablement des bactériocine désignées Bac-GM100 et Bac-GM17.

Les deux souches *Brevibacillus brevis* GM100 et *Bacillus clausii* GM17 isolées à partir de la rhizosphère d'*Ononis angustissima* produisent deux bactériocines Bac-GM100 et Bac-GM17 thermostables et actives à une large gamme de pH. En effet, les deux bactériocines gardent presque 90% de ses capacités inhibitrices après un traitement de 2 h à 100°C ou 20 min à 120 °C. Les deux bactériocines, présentent une activité à un intervalle de pH compris entre 3 et 9 pour Bac-GM17 et à un large intervalle de pH entre 3 et 10 pour Bac-GM100 avec un optimum à pH 7.

Le séquençage des parties N-terminaux des bactériocines purifiées Bac-GM100 et Bac-GM17 a donné deux séquences de 21 et de 20 acides aminés respectivement. La séquence N-terminale de Bac-GM100, a montré 65% d'homologie avec bactériocine thurincin H de *Bacillus thuringiensis* SF361 (no. 2LBZ_A). Cependant, l'absence de similarité avec les portions de séquences publiées de bactériocines des *Bacillaceae*, montre que la bactériocine GM17 de la souche *Bacillus clausii* GM17 est nouvelle.

Les deux bactériocines Bac-GM100 et Bac-GM17, pourraient être exploitées comme des agents de conservation des graines et de biocontrôle chez plantes cultivées pour inhiber de nombreux microorganismes pathogènes et minimiser le problème des pesticides chimiques.

Conclusion et Perspectives

Comme perspective, il est intéressant de continuer l'étude sur les quatre souches de *Streptomyces* sp. et les deux bactériocines purifiées à partir de *Brevibacillus brevis* et *Bacillus clausii* dans le but de :

- Evaluer l'activité antagoniste des *Streptomyces* contre d'autres microorganismes phytopathogènes, ainsi que d'optimiser leur performance en tant qu'agent de lutte biologique, en étudiant l'effet de la combinaison de ces quatre *Streptomyces* et l'effet de l'ajout des additifs sur leur activité antagoniste.
- Purifier et caractériser les substances antifongiques et stimulatrices de croissance des plants isolées des *Streptomyces* sp. sont à envisager.
- Vérifier la présence d'autres mécanismes responsables de l'antagonisme contre les pathogènes et la stimulation de la croissance des plantes.
- Tester l'efficacité des souches de *Streptomyces* sp. sur d'autres végétaux et en conditions non contrôlés dans les serres et aux champs.
- Confirmer le mode d'action des bactériocines, séquencer les gènes codants les précurseurs des bactériocines Bac-GM100 et Bac-GM17 et étudier les structures 3-D des protéines.
- De plus, il serait intéressant d'élargir le spectre d'activité en testant les deux bactériocines Bac-GM100 et Bac-GM17 contre d'autres pathogènes.

Références

Références

- Ababutain I.M., Abdul Aziz Z.K., and AL-Meshhen N.A., (2012) Lincomycin antibiotic biosynthesis produced by *Streptomyces* sp. isolated from SAUDI ARABIA soil II - extraction, separation and purification of lincomycin, *Can. J. Pure. Appl. Sci.*, **6**: 1905–1911.
- Adebayo C.O., and Aderiye B.I., (2011) Suspected mode of antimycotic action of brevicin SG1 against *Candida albicans* and *Penicillium citrinum*, *Food Control*, **22**: 1814–1820.
- Adesemoye A.O., Torbert H.A., and Kloepper J.W., (2008) Enhanced plant nutrient use efficiency with PGPR and AMF in an integrated nutrient management system, *Can. J. Microbiol.*, **54**: 876–886.
- Aguilar-Galvez A., Dubois-Dauphin R., Destain J., Campos D., and Thonart P., (2012) Les entérocoques: avantages et inconvénients en biotechnologie (synthèse bibliographique), *Biotechnol. Agron. Soc. Environ.*, **16**: 67–76.
- Ahemad M., and Khan M.S., (2012) Biotoxic impact of fungicides on plant growth promoting activities of phosphate-solubilizing *Klebsiella* sp. isolated from mustard (*Brassica campestris*) rhizosphere, *J. Pest. Sci. (Springer)*, **85**: 29–36.
- Ahemad M., and Kibret M., (2014) Mechanisms and applications of plant growth promoting rhizobacteria: Current perspective, *J. King Saud Univ. – Sci.*, **26**: 1–20.
- Ahmad M., Zahir Z.A., Asghar H.N., and Asghar M., (2011) Inducing salt tolerance in mung bean through coinoculation with rhizobia and plant-growth-promoting rhizobacteria containing 1-aminocyclopropane-1-carboxylate deaminase, *Can. J. Microbiol.*, **57**: 578–589.
- Ahmad V., Iqbal A.N.M.Z., Haseeb M., and Khan M.S., (2014) Antimicrobial potential of bacteriocin producing *Lysinibacillus jx416856* against foodborne bacterial and fungal pathogens, isolated from fruits and vegetable waste, *Anaerobe*, **27**: 87–95.
- Ahmed E., and Holmström S.J.M., (2014) Siderophores in environmental research: roles and applications, *Microb. Biotech.*, **7**: 196–208.
- Aktypis A., and Kalantzopoulos G., (2003) Purification and characterization of thermophilin ST-1, a novel bacteriocin produced by *Streptococcus thermophilus* ACA-DC 0001, *Lait*, **83**: 365–378.
- Aira M., Gómez-Brandón M., Lazcano C., Bååth E., and Domínguez J., (2010) Plant genotype strongly modifies the structure and growth of maize rhizosphere microbial communities, *Soil Biol. Biochem.*, **42**: 2276–2281.
- Alexandre Y., Le Blay G., Boisramé-Gastrin S., Le Gall F., Héry-Arnaud G., Gouriou S., Vallet S., and Le Berre R., (2014) Probiotics: A new way to fight bacterial pulmonary infections?, *Méd. Malad. Infect.*, **44**: 9–17.
- Alizadeh H., Behboudi K., Ahmadzadeh M., Javan-Nikkhah M., Zamioudis C., Pieterse C.M.J., and Bakker P.A.H.M., (2013) Induced systemic resistance in cucumber and *Arabidopsis thaliana* by the combination of *Trichoderma harzianum* Tr6 and *Pseudomonas* sp. Ps14, *Biological Control*, **65**: 14–23.

Références

- Aly M.M., El Sayed H.E.A., and Jastaniah S.D., (2012) Synergistic Effect between *Azotobacter vinelandii* and *Streptomyces* sp. Isolated From Saline Soil on Seed Germination and Growth of Wheat Plant, *J. Amer. Sci.*, **8**: 667–676.
- Amado I.R., Fuciños C., Fajardo P., Guerra N.P., and Pastrana L., (2012) Evaluation of two bacteriocin-producing probiotic lactic acid bacteria as inoculants for controlling *Listeria monocytogenes* in grass and maize silages, *Anim. Feed Sci. Technol.*, **175**: 137–149.
- Anibou M., Chait A., Ziyad A., Taourirt M., Ouhdouch Y., and Benherref A., (2008) Actinomycetes from Moroccan habitats: isolation and screening for cytotoxic activities, *World J. Microbiol. Biotech.*, **24**: 2019–2025.
- Anita B., and Samiyappan R., (2012) Induction of systemic resistance in rice by *Pseudomonas fluorescens* against rice root knot nematode *Meloidogyne graminicola*, *J. Biopesticides*, **5**: 53–59.
- Anzai K., Nakashima T., Kuwahara N., Suzuki R., Ohfuku Y., Takeshita S., and Ando K., (2008) Actinomycete bacteria isolated from the sediments at coastal and offshore area of Nagasaki prefecture, Japan: Diversity and biological activity, *J. Biosc. Bioengin.*, **106**: 215–217.
- Aouar L., Lerat S., Ouffroukh A., Boulahrouf A., and Beaulieu C., (2012) Taxonomic identification of rhizospheric actinobacteria isolated from Algerian semi-arid soil exhibiting antagonistic activities against plant fungal pathogens, *Can. J. Plant Pathol.* **34**: 165–176.
- Aouiche A., Sabaou N., Meklat A., Zitouni A., Mathieu F., and Lebrihi A., (2012) Activité antimicrobienne de *Streptomyces* sp. PAL111 d'origine saharienne contre divers microorganismes cliniques et toxigènes résistants aux antibiotiques, *J. Mycol. Méd.*, **22**: 42–51.
- Arif K., Archana G., and Desai A.J., (2012) Engineering heterologous iron siderophore complex utilization in rhizobia: Effect on growth of peanut and pigeon pea plants, *Appl. Soil Ecol.*, **53**: 65–73.
- Arshad M., Saleem M., and Hussain S., (2007) Perspectives of bacterial ACC deaminase in phytoremediation, *Trends Biotech.*, **25**: 356–362.
- Asuming-Brempong S., Gantner S., Adiku S.G.K., Archer G., Edusei V., and Tiedje J.M., (2008) Changes in the biodiversity of microbial populations in tropical soils under different fallow treatments, *Soil Biol. Biochem.*, **40**: 2811–2818.
- Atanassova M., Choiset Y., Dalgalarondo M., Chobert J.M., Dousset X., Ivanova I., and Haertle T., (2003) Isolation and partial biochemical characterization of a proteinaceous anti-bacteria and anti-yeast compound produced by *Lactobacillus paracasei* subsp. *paracasei* strain M3, *Int. J. Food Microbiol.*, **87**: 63–73.
- Atta H.M., Haroun B.M., and Khalifa M.A., (2011) Physico-chemical characteristics of vernamycin-A antibiotic biosynthesis by *Streptomyces* SP-AZ-SH-29, *J. Saudi Chem. Soc.*, **15**: 247–255.
- Avis T.J., Hamelin R.C., and Bélanger R.R., (2001) Approaches to molecular characterization of fungal biocontrol agents: some case studies, *Can. J. Plant Pathol.*, **23**: 8–12.

Références

- Azziz G., Bajsa N., Haghjou T., Taulé C., Valverde Á., Igual J.M., and Arias A., (2012) Abundance, diversity and prospecting of culturable phosphate solubilizing bacteria on soils under crop–pasture rotations in a no-tillage regime in Uruguay, *Appl. Soil Ecology*, **61**: 320–326.
- Badji B., Riba A., Mathieu F., Lebrihi A., and Sabaou N., (2005) Activité antifongique d'une souche d'*Actinomadura* d'origine saharienne sur divers champignons pathogènes et toxigènes, *J. Mycol. Med.*, **15**: 211–219.
- Baharlouei A., Sharifi-Sirchi G. R., and Shahidi Bonjar G. H., (2011) Biological control of *Sclerotinia sclerotiorum* (oilseed rape isolate) by an effective antagonist *Streptomyces*, *Afr. J. Biotech.*, **10**: 5785–5794.
- Bais H.P., Weir T.L., Perry L.G., Gilroy S., and Vivanco J.M., (2006) The Role of Root Exudates in Rhizosphere Interactions with Plants and Other Organisms, *Annu. Rev. Plant Biol.*, **57**: 233–66.
- Bakker P.A.H.M., Berendsen R.L., Doornbos R.F., Wiermans P.C.A., and Pieterse C.M.J., (2013) The rhizosphere revisited: root microbiomics, *Front. Plant Sci.*, **4**: 1–7.
- Bal H.B., Nayak L., Das S., and Adhya T.K., (2013) Isolation of ACC de aminase producing PGPR from rice rhizosphere and evaluating their plant growth promoting activity under salt stress, *Plant Soil*, **366**: 93–105.
- Baltz R.H., (2008) Renaissance in antibacterial discovery from actinomycetes, *Curr. Opinion in Pharm.*, **8**: 557–563.
- Barnawal D., Bharti N., Maji D., Chanotiya C.S., and Kalra A., (2012) 1-Aminocyclopropane-1-carboxylic acid (ACC) deaminase-containing rhizobacteria protect *Ocimum sanctum* plants during waterlogging stress via reduced ethylene generation, *Plant Physiol. Biochem.*, **58**: 227–235.
- Batdorj B., Dalgalarondo M., Choiset Y., Pedroche J., Métro F., Prévost H., Chobert J.M., Haertlé T., (2006) Purification and characterization of two bacteriocins produced by lactic acid bacteria isolated from Mongolian airag, *J. Appl. Microbiol.*, **101**: 837–848.
- Beauchamp C.J., (1993) Mode d'action des rhizobactéries favorisant la croissance des plantes et potentiel de leur utilisation comme agent de lutte biologique, *Phytoprotection*, **74**: 19-27.
- Becker B., Lechevalier M.P., Gordon R.E., and Lechevalier H.A., (1964) Rapid differentiation between *Nocardia* and *Streptomyces* by paper chromatography of Whole cell hydrolysates, *J. Appl. Microbiol.*, **12**: 421–423.
- Behera B.C., Singdevsachan S.K., Mishra R.R., Dutta S.K., and Thatoi H.N., (2014) Diversity, mechanism and biotechnology of phosphate solubilizing microorganism in mangrove—A review, *Biocatal. Agricul. Biotechnol.*, **3**: 97–110.
- Bélanger R. R., Dufour N., Caron J., and Benhamou N., (1995) Chronological events associated with the antagonistic properties of *Trichoderma harzianum* against *Botrytis cinerea*: indirect evidence for sequential role of antibiosis and parasitism. *Biocontrol Sci. Technol.*, **5**: 41–53.
- Bélanger R.R., Labbé C., Lefebvre F., and Teichmann B., (2012) Mode of action of biocontrol agents: all that glitters is not gold, *Can. J. Plant Pathol.*, **34**: 469–478.

Références

- Bencheikh M., and Benali S., (2010) The talc formulation of *Streptomyces* antagonist against *Mycosphaerella* foot rot in pea (*Pisum sativum* L.) seedlings, *Archives Phytopathol. Plant Protec.*, **43**: 438–445.
- Benhamou N., et Rey P., (2012a) Stimulateurs des défenses naturelles des plantes : une nouvelle stratégie phytosanitaire dans un contexte d'écoproduction durable. I. Principes de la résistance induite, *Phytoprotection*, **92**: 1–23.
- Benhamou N. et Rey P., (2012b) Stimulateurs des défenses naturelles des plantes : une nouvelle stratégie phytosanitaire dans un contexte d'écoproduction durable. II. Intérêt des SDN en protection des cultures, *Phytoprotection*, **92**: 24–35.
- Benítez T., Rincón M.A., Limón M.C., and Codón C.A., (2004) Biocontrol mechanisms of *Trichoderma* strains. *International microbiology* **7**: 249–260.
- Benizri E., Dedourge O., Dibattista-Leboeuf C., Piutti S., Nguyen C., and Guckert A., (2002) Effect of maize rhizodeposits on soil microbial community structure, *Appl. Soil Ecol.*, **21**: 261–265.
- Berendsen R.L., Pieterse C.M.J., and Bakker P.A.H.M., (2012) The rhizosphere microbiome and plant health, *Trends in Plant Sci.*, **17**:478-486.
- Bhattacharyya P.N., and Jha D.K., (2012) Plant growth-promoting rhizobacteria (PGPR): Emergence in agriculture, *World J Microbiol Biotechnol*, **28**:1327–1350.
- Biscola V., Todorov S.D., Capuano V.S., Abriouel H., Gálvez A., and Franco B.D., (2013) Isolation and characterization of a nisin-like bacteriocin produced by a *Lactococcus lactis* strain isolated from charqui, a Brazilian fermented, salted and dried meat product, *Meat Sci.*, **93**: 607–613.
- Blagodatskaya E., Littschwager J., Lauerer M., and Kuzyakov Y., (2014) Plant traits regulating N capture define microbial competition in the rhizosphere, *Eur. J. Soil Biol.*, **61**: 41–48.
- Blanc-Lapierre A., Bouvier G., Garrigou A., Canal-Raffin M., Raherison C., Brochard P., Baldi I., (2012) Effets chroniques des pesticides sur le système nerveux central : état des connaissances épidémiologiques, *Rev. Épidém. Santé Publique*, **60**: 389-400.
- Bloemberg G.V., and Lugtenberg B.J., (2001) Molecular basis of plant growth promotion and biocontrol by rhizobacteria, *Curr. Opin. Plant Biol.*, **4**: 343–50.
- Bonnemain J.-L., et Chollet J.-F., (2003) L'arsenal phytosanitaire face aux ennemis des plantes. Considérations générales, *C. R. Biol.*, **326**: 1–7.
- Borges S., Barbosa J., Silva J., and Teixeira P., (2014) Characterization of a Bacteriocin of *Pediococcus pentosaceus* SB83 and Its Potential for Vaginal Application, *Anti-Infective Agents*, **12**: 68–74.
- Boughalleb N., et El Mahjoub M., (2005) Effet de la solarisation sur *Phytophthora nicotianae* Breda de Haan var. *parasitica* (Dastur) G.M. Waterhouse responsable d'un syndrome associant nécroses racinaires et flétrissement sur piment (*Capsicum annum* L.) en Tunisie, *Tropicultura*, **23**: 169–176.
- Bouizgarne B., (2013) Bacteria for Plant Growth Promotion and Disease Management Chapter 2 p: 15-47, in, D.K. Maheshwari (ed.), *Bacteriain Agrobiology : Disease Management*, Springer-Verlag Berlin Heidelberg.

Références

- Bradford M.M., (1976) A rapid and sensitive method for quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding, *Anal Biochem.*, **72**: 248–254.
- Brimecombe M.J., De Leij F.A., and Lynch J.M., (2001) The effect of root exudates on rhizosphere microbial populations. In: Pinto R., Varanini Z., Nannipierei P., eds. The rhizosphere. New York: Marcel Dekker, 95–141.
- Broydé H., et Doré T., (2013) Effets des pratiques agricoles sur la contamination des denrées par les mycotoxines issues de *Fusarium* et *Aspergillus* spp., *Cah. Agric.*, **22**: 182–194.
- Brunel B., (2006) La microbiologie des sols pp. 115-144: un champ prometteur pour l'agro-écologie. In : Pour une gestion intégrée et durable de la production agricole en France. Paris : Club Demeter.
- Brzezinska M.k., Jankiewicz U., and Walczak M., (2013) Biodegradation of chitinous substances and chitinase production by the soil actinomycete *Streptomyces rimosus*, *Int. Biodeter. Biodegr.*, **84**: 104–110.
- Bubici G., Marsico A.D., D'Amico M., Amenduni M., and Cirulli M., (2013) Evaluation of *Streptomyces* spp. for the biological control of corky root of tomato and Verticillium wilt of eggplant, *Appl. Soil Ecology*, **72**: 128–134.
- Buyer J.S., Teasdale J.R., Roberts D.P., Zasada I.A., and Maul J.E., (2010) Factors affecting soil microbial community structure in tomato cropping systems, *Soil Biol. Biochem.*, **42**: 831-841.
- Cao H., Li X., and Dong X., (1998) Generation of broad-spectrum disease resistance by over expression of an essential regulatory gene in systemic acquired resistance, *Proc. Natl Acad. Sci. USA*, **95**: 6531–6536.
- Cao L., Qiu Z., You J., Tan H., and Zhou S., (2005) Isolation and characterization of endophytic streptomycete antagonists of Fusarium wilt pathogen from surface-sterilized banana roots, *FEMS Microbiol. Lett.*, **247**: 147–152.
- Carsolio C., Benhamou N., Haran S., Cortés C., Gutiérrez A., Chet I., and Herrera-Estrella A., (1999) Role of the Trichoderma harzianum Endochitinase Gene, ech42, in Mycoparasitism, *Appl. Environ. Microbiol.*, **65**: 929–935.
- Cenatiempo Y., Berjeaud J.M., Biet F., Fremaux C., Hechard Y., et Robichon D., (1996) Bactériocines de bactéries lactiques : données récentes sur leur structure, leur mode d'action et leurs déterminants génétiques, *Lait*, **76**: 169–177.
- Cerkauskas R.F., and Ferguson G., (2014) Management of powdery mildew (*Podosphaera xanthii*) on greenhouse cucumber in Ontario, *Can. J. Plant Pathol.*, **36**: 22–37.
- Chakchouk-Mtibaa A., Elleuch L., Smaoui S., Najah S., Sellem I., Mejdoub H., Abdelkafi S., and Mellouli L., (2014) Characterization of the bacteriocin BacJ1 and its effectiveness for the inactivation of *Salmonella typhimurium* during turkey escalope storage, *Food Chem.*, **152**: 566–572.
- Chao Z., Guo-bin L., Sha X., and Lie X., (2013) Effect of Different Vegetation Types on the Rhizosphere Soil Microbial Community Structure in the Loess Plateau of China, *J. Integra. Agricul.*, **12**: 2103–2113.
- Cherif A., Rezgui W., Raddadi N., Daffonchio D., and Boudabous A., (2008) Characterization and partial purification of entomocin110, a newly identified

Références

- bacteriocin from *Bacillus thuringiensis* subsp. *Entomocidus* HD110, *Microbiol. Res.*, **163**: 684–692.
- Chowdappa P., Kumar S.P.M., Lakshmi M.J., and Upreti K.K., (2013) Growth stimulation and induction of systemic resistance in tomato against early and late blight by *Bacillus subtilis* OTPB1 or *Trichoderma harzianum* OTPB3, *Biological Control*, **65**: 109–117.
- Claus D., and Berkeley R.C.W., (1986) Genus *Bacillus* Chon1872, p:1105–1139, In: Sneath P.H.A.Mair., N.S., Sharpe M.E., and Holt J.G. (ed.), *Bergey's manual of systematic bacteriology*, vol.2. The Williams & Wilkins Co., Baltimore, Md.
- Clermont N., Legault G., Lerat S., and Beaulieu C., (2010) Effect of biopolymers on geldanamycin production and biocontrol ability of *Streptomyces melanosporofaciens* strain EF-76, *Can. J. Plant Pathol.*, **32**: 481–489.
- Colares G.B., and Melo V.M.M. (2013) Relating microbial community structure and environmental variables in mangrove sediments in side *Rhizophora mangle* L. habitats, *Appl. Soil Ecology*, **64**: 171–177.
- Compant S., Duffy B., Nowak J., Clément C., and Ait Barka E., (2005) Use of Plant Growth-Promoting Bacteria for Biocontrol of Plant Diseases: Principles, Mechanisms of Action, and Future Prospects, *Appl. Environ. Microbiol.*, **71**: 4951–4959.
- Corr S.C., Li Y., Riedel C.U., O'Toole P.W., Hill C., and Gahan C.G.M. (2007) Bacteriocin production as a mechanism for the antiinfective activity of *Lactobacillus salivarius* UCC118, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **104**: 7617–7621.
- Couillerot O., Loqman S., Toribio A., Hubert J., Gandner L., Nuzillard J.-M., Ouhdouch Y., Clément C., Ait Barka E., and Renault J.-H., (2014) Purification of antibiotics from the biocontrol agent *Streptomyces anulatus* S37 by centrifugal partition chromatography, *J. Chromatography B*, **944**: 30–34.
- Cregut M., Piutti S., Vong P.-C., Slezack-Deschaumes S., Crovisier I., and Benizri E., (2009) Density, structure, and diversity of the cultivable arylsulfatase-producing bacterial community in the rhizosphere of field-grown rape and barley, *Soil Biol. Biochem.*, **41**: 704–710.
- Cruz A.F., Hamel C., Yang C., Matsubara T., Gan Y., Singh A.K., Kuwada K., and Ishii T., (2012) Phytochemicals to suppress Fusarium head blight in wheat–chickpea rotation, *Phytochemistry*, **78**: 72–80.
- Cuesta G., García-de-la-Fuente R., Abad M., and Fornes F., (2012) Isolation and identification of actinomycetes from a compost-amended soil with potential as biocontrol agents, *J. Environ. Manag.*, **95**: 280–284.
- Cui Y., Zhang C., Wang Y., Shi J., Zhang L., Ding Z., Qu X., and Cui H., (2012) Class Iia Bacteriocins: Diversity and New Developments, *Int. J. Mol. Sci.*, **13**: 16668–16707.
- Deegan L.H., Cotter P.D., Hill C., and Ross P., (2006) Bacteriocins: biological tools for bio-preservation and shelf-life extension, *Int. Dairy J.*, **16**: 1058–1071.
- De Kwaadsteniet M., Todorov S.D., Knoetze H., and Dicks L.M.T., (2005) Characterization of a 3944 Da bacteriocin, produced by *Enterococcus mundtii* ST15, with activity against Gram-positive and Gram-negative bacteria, *Int. J. Food Microbiol.*, **105**: 433–444.

Références

- Delaunay S., Rondags E., et Germain P., (2003) Production d'antibiotiques par biotechnologies, *Tech. de l'ingé.*, J 6 008: 1–12.
- de Lima Procópio R.E., da Silva I.R., Martins M.K., de Azevedo J.L., and de Araújo J.M., (2012) Antibiotics produced by *Streptomyces*, *BRAZ. J. infect. dis.*, **16**: 466–471.
- Deravel J., Krier F., and Jacques P., (2014) Les biopesticides, compléments et alternatives aux produits phytosanitaires chimiques (synthèse bibliographique), *Base*, **18**: 220–232.
- Deraz S.F., Karlsson E.N., Hedströma M., Andersson M.M., and Mattiasson B., (2005) Purification and characterization of acidocin D20079, a bacteriocin produced by *Lactobacillus acidophilus* DSM20079, *J. Biotechnol.*, **117**: 343–354.
- de Vasconcellos R.L.F., and Cardoso E.J.B.N., (2009) Rhizospheric streptomycetes as potential biocontrol agents of *Fusarium* and *Armillaria* pine rot and as PGPR for *Pinus taeda*, *BioControl*, **54**: 807–816.
- Dias A.C.F., Hoogwout E.F., Silva M.C.P., Salles J.F., Overbeek L.S., van Elsas J.D., (2012) Potato cultivar type affects the structure of ammonia oxidizer communities in field soil under potato beyond the rhizosphere, *Soil Biol. Biochem.*, **50**: 85–95.
- Dias A.C.F., Dini-Andreote F., Hannula S.E., Andreote F.D., Pereira e Silva M.C., Salles J.F., de Boer W., van Veen J., and Elsas J.D., (2013) Different Selective Effects on Rhizosphere Bacteria Exerted by Genetically Modified versus Conventional Potato Lines, *PLoS ONE*, **8**: 1–12.
- Dimkpa C.O., Svatoš A., Dabrowska P., Schmidt A., Boland W., and Kothe E., (2008) Involvement of siderophores in the reduction of metal-induced inhibition of auxin synthesis in *Streptomyces* spp., *Chemosphere*, **74**: 19–25.
- Dobson A., Cotter P.D., Ross R.P., and Hill C. (2011) Bacteriocin Production: a Probiotic Trait ?, *Appl. and Environ. Microbiol.*, **78**: 1–6.
- Dortu C., et Thonart P. (2009) Les bactériocines des bactéries lactiques: caractéristiques et intérêts pour la bioconservation des produits alimentaires, *Biotechnol. Agron. Soc. Environ.*, **13**: 143–154.
- Doumbou C.L., Salove M.K.H., Crawford D.L., and Beaulieu C., (2002) Actinomycetes, promising tools to control plant diseases and to promote plant growth, *Phytoprotection*, **82**: 85–102.
- Drider D., Fimland G., Héchard Y., McMullen L.M., and Prévost H., (2006) The continuing story of class IIa bacteriocin, *Microbiol. Mol. Biol. Rev.*, **70**: 564–582.
- Dunne C., Delany I., Fenton A., and O'Gara F., (1996) Mechanisms involved in biocontrol by microbial inoculants, *Agronomie*, **16**: 721–729.
- Durand-Tardif M., et Pelletier G., (2003) Apport de la biologie moléculaire et cellulaire et de la génétique à la protection des plantes, *C.R. Biol.*, **326**: 23–35.
- Durand-Tardif M., et Candresse T., (2004) Apport de la génétique à la protection des plantes, *Biofutur*, **242**: 16–23.
- Edman P., Högfeldt E., Sillén L.G., and Kinell P., (1950) Method for determination of the amino acid sequence in peptides, *Acta Chem. Scand.*, **4**: 283–293.

Références

- Eijsink V.G., Skeie M., Middelhoven P.H., Ebrurberg M.B., and Nes I.F., (1998) Comparative studies of class IIa bacteriocins of lactic acid bacteria, *Appl. Environ. Microbiol.*, **64**: 3275–3281.
- Elmhirst J.F., Haselhan C., and Punja Z.K., (2011) Evaluation of biological control agents for control of botrytis blight of geranium and powdery mildew of rose, *Can. J. Plant Pathol.*, **33**: 499–505.
- El-Tarabily K.A., Hardy G.E.St.J, Sivasithamparam K., Hussain A.M., and Kurtboke D.I., (1997) The potential for the biological cavity-spot disease of carrots, caused by *Pythium coloratum*, by streptomycete and non streptomycete actinomycetes, *New Phytol.*, **137**: 495–507.
- El-Tarabily K.A., and Sivasithamparam K. (2006) Non-streptomycete actinomycetes as biocontrol agents of soil-borne fungal plant pathogens and as plant growth promoters, *Soil Biol. Biochem.*, **38**: 1505–1520.
- Fatemeh A., Masoud T., Pejman A., and Aidin H., (2014) Effect of plant growth promoting rhizobacteria (PGPRs) and stratification on germination traits of *Crataegus pseudoheterophylla* Pojark. Seeds, *Scientia Horticulturae*, 172: 61–67.
- Felsenstein J., (1985) Confidence limits on phylogenies: an approach using the bootstrap, *Evolution*, 39:783–791.
- Fialho de Oliveira M., Germano da Silva M., and Van Der Sand S.T., (2010) Anti-phytopathogen potential of endophytic actinobacteria isolated from tomato plants (*Lycopersicon esculentum*) in southern Brazil, and characterization of *Streptomyces* sp.R18(6), a potential biocontrol agent, *Res. Microbiol.*, **161**: 565–572.
- Fierer N., Schimel J.P., and Holden P.A., (2003) Variations in microbial community composition through two soil depth profiles. *Soil Biol. Biochem.*, **35**: 165-176.
- Fimland G., Johnsen L., Axelsson L., Brurberg M.B., Nes I.F., Eijsink V.G.H., and Nissen-Meyer J., (2000) A C-terminal disulfide bridge in pediocin-like bacteriocins renders bacteriocin activity less temperature dependent and is a major determinant of the antimicrobial spectrum, *J. Bacteriol.*, **182**: 2643–2648.
- Franco-Correa M., Quintana A., Duque C., Suarez C., Rodríguez M.X., and Bareab J.-M., (2010) Evaluation of actinomycete strains for key traits related with plant growth promotion and mycorrhiza helping activities, *Appl. Soil Ecology*, **45**: 209–217.
- Gadelhak G.G., El-Tarabily K.A., and Al-Kaabi F.K., (2005) Insect Control Using Chitinolytic Soil Actinomycetes as Biocontrol Agents, *Int. J. Agri. Biol.*, **7**: 627–633.
- Gálvez A., Abriouel H., López R.L., and Ben Omar N., (2007) Bacteriocin-based strategies for food biopreservation, *Int. J. of Food Microbiol.*, **120**: 51–70.
- Gao G., Yin D., Chen S., Xia F., Yang J., Li Q., and Wang W., (2012) Effect of biocontrol agent *Pseudomonas fluorescens* 2P24 on soil fungal community in cucumber rhizosphere using T-RFLP and DGGE, *Plos One*, **7(2)**: e31806.
- Garde S., Ávila M., Arias R., Gaya P., and Nuñez M., (2011) Outgrowth inhibition of *Clostridium beijerinckii* spores by a bacteriocin-producing lactic culture in ovine milk cheese, *Int. J. Food Microbiol.*, **150**: 59–65.

Références

- Gesheva V., Ivanova V., and Gesheva R., (2005) Effects of nutrients on the production of AK-111-81 macrolide antibiotic by *Streptomyces hygroscopicus*. ***Microbiol. Res.***, **160**: 243–248.
- Gillor O., Giladi I., and Riley M.A., (2009) Persistence of colicinogenic *Escherichia coli* in the mouse gastrointestinal tract, ***BMC Microbiol.*** **9**:165.
- Glick B.R., (1995) The enhancement of plant growth by free-living bacteria, ***Can. J. Microbiol.***, **41**: 109–117.
- Glick B.R., (2012) Plant Growth-Promoting Bacteria: Mechanisms and Applications, ***Scientifica***, **2012**: 1–15.
- Gnanamangai B.M., and Ponmurugan P., (2012) Evaluation of various fungicides and microbial based biocontrol agents against bird's eye spot disease of tea plants, ***Crop Protection***, **32**:111–118.
- Gonçalves C.X., Tiecher A., Chaves F.C., Nora L., Zhengguo L., Latché A., Pech J.-C., and Rombaldi C.V., (2013) Putative role of cytokinin in differential ethylene response of two lines of antisense ACC oxidase cantaloupe melons, ***Posthar. Biol. Technol.***, **86**: 511–519.
- Gopalakrishnan S., Pande S., Sharma M., Humayun P., Kiran B.K., Sandeep D., Vidya M.S., Deepthi K., and Rupela O., (2011) Evaluation of actinomycete isolates obtained from herbal vermicompost for the biological control of Fusarium wilt of chickpea, ***Crop Protec.***, **30**:1070–1078.
- Gopalakrishnan S., Humayun P., Vadlamudi S., Vijayabharathi R., Bhimineni R.K., and Rupela O., (2012) Plant growth-promoting traits of *Streptomyces* with biocontrol potential isolated from herbal vermicompost, ***Biocontrol Scie. Technol.***, **22**: 1199–1210.
- Gopalakrishnan S., Srinivas V., Vidya M. S., and Rathore A., (2013) Plant growth-promoting activities of *Streptomyces* spp. in sorghum and rice, ***SpringerPlus***, **2**: 2–8.
- Gopalakrishnan S., Vadlamudi S., Bandikinda P., Sathya A., Vijayabharathi R., Rupela O., Kudapa H., Katta K., and Varshney R.K., (2014) Evaluation of *Streptomyces* strains isolated from herbal vermicompost for their plant growth-promotion traits in rice, ***Microbiol.Res.***, **169**: 40–48.
- Goswami D., Dhandhukia P., Patel P., and Thakker J.N., (2014) Screening of PGPR from saline desert of Kutch: Growth promotion in *Arachis hypogea* by *Bacillus licheniformis*, ***Microbiol. Res.***, **169**: 66–75.
- Grangette C., (2007) Probiotiques et régulation de la réponse immune allergique et inflammatoire, ***Cahiers Nutr. Diétét.***, **42**: 76–85.
- Gray E.J., Di Falco M., Souleimanov A., and Smith D.L., (2006) Proteomic analysis of the bacteriocin thuricin 17 produced by *Bacillus thuringiensis* NEB17, ***FEMS Microbiol. Lett.***, **255**: 27–32.
- Gu J., and Codd R., (2012) Copper(II)-based metal affinity chromatography for the isolation of the anticancer agent bleomycin from *Streptomyces verticillus* culture, ***J. Inorg. Bioch.***, **115**: 198–203.
- Guéguen L., et Pascal G., (2010) Le point sur la valeur nutritionnelle et sanitaire des aliments issus de l'agriculture biologique, ***Cahiers Nutr. Diétét.***, **45**: 130-143.

Références

- Guettouche M.S., et Guendouz M., (2007) Modélisation et évaluation de l'érosion éolienne potentielle des sols cultivables dans le Hodna (Nord-Est algérien), *Sécheresse*, **18**: 254–62.
- Guinane C.M., Cotter P.D., Hill C., and Ross P., (2005) A review: microbial solutions to microbial problems; lactococcal bacteriocins for the control of undesirable biota of food, *J. Appl. Microbiol.*, **98**: 1316–1325.
- Guo Z.-Y., Kong C.-H., Wang J.-G., and Wang Y.-F., (2011) Rhizosphere isoflavones (daidzein and genistein) levels and their relation to the microbial community structure of mono-cropped soybean soil in field and controlled conditions, *Soil Biol. Biochem.*, **43**: 2257–2264.
- Gupta S.K., Mathew K.A., Shyam K.R., and Sharma A., (1999) Fungicidal management of root rot (*Rhizoctonia solani*) of French bean, *Plant Dis. Res.*, **14**: 20–24.
- Gupta G., Panwar J., and Jha P.N., (2013) Natural occurrence of *Pseudomonas aeruginosa*, a dominant cultivable diazotrophic endophytic bacterium colonizing *Pennisetum glaucum* (L.) R. Br., *Appl. Soil Ecology*, **64**: 252–261.
- Gurtler V., and Stanisich V.A., (1996) New approaches to typing and identification of bacteria using the 16S–23S rDNA spacer region, *Microbiol.*, **142**: 3–16.
- Hafeez F.Y., Naeem F.I., Naeem R., Zaidi A.H., and Malik K.A., (2005) Symbiotic effectiveness and bacteriocin production by *Rhizobium le guminosarum* bv. viciae isolated from agriculture soils in Faisalabad, *Environ. Exper. Botany*, **54**: 142–147.
- Hamdali H., Bouizgarne B., Hafidi M., Lebrihi A., Virolle M.J., and Ouhdouch Y., (2008a) Screening for rock phosphate solubilizing Actinomycetes from Moroccan phosphate mines, *Appl. Soil Ecology*, **38**: 12–19.
- Hamdali H., Hafidi M., Virolle M., and Ouhdouch Y., (2008b) Growth promotion and protection against damping-off of wheat by two rock phosphate solubilizing actinomycetes in a P-deficient soil under greenhouse conditions, *Appl. Soil Ecolog.*, **40**: 510–517.
- Hammami I., Rhouma A., Jaouadi B., Rebai A., and Xavier N., (2009) Optimising, characterization and purification of a bacteriocin from *Bacillus subtilis* strain 14B for biological control of *Agrobacterium* spp. strains, *Lett. Appl. Microbiol.*, **48**: 253–260.
- Hammami I., Triki M.A., and Rebai A., (2011) Purification and characterization of the novel bacteriocin BAC IH7 with antifungal and antibacterial properties, *J. Plant Pathol.*, **93**: 443–454.
- Hammami I., Jaouadi B., Ben Bacha A., Rebai A., Bejar S., Nesme X., and Rhouma A., (2012) *Bacillus subtilis* broad-spectrum bacteriocin Bac 14B: Purification, amino acid sequence and physico-chemical characterization, *Biotech. Bioprocess Engineer.*, **17**: 41–49.
- Hammami I., Ben Hsouna A., Hamdi N., Gdoura R., and Triki M.A., (2013) Isolation and characterization of rhizosphere bacteria for the biocontrol of the damping-off disease of tomatoes in Tunisia, *C. R. Biol.*, **336**: 557–564.
- Harzallah D., Sadallah S., and Larous L., (2004) Characterization of *Pseudomonas* pathogens isolated from rosaceous fruit trees in East Algeria, *Commun. Agric. Appl. Biol Sci.*, **69**: 443–447.

Références

- Hayat R., Ali S., Amara U., Khalid R., and Ahmed I., (2010) Soil beneficial bacteria and their role in plant growth promotion: a review, *Ann. Microbiol.*, **60**: 579–598.
- Heng N.C.K., Swe P.M., Ting Y.T., Dufour M., Baird H.J., Ragland N.L., Burtenshaw G.A., Jack R.W., and Tagg J.R., (2006) The large antimicrobial proteins (bacteriocins) of streptococci. *Int. Congress Series*, **1289**: 351–354.
- Hernández D., Cardell E., and Zárata V., (2005) Antimicrobial activity of lactic acid bacteria isolated from Tenerife cheese: initial characterization of plantaricin TF711, a bacteriocin-like substance produced by *Lactobacillus plantarum* TF711, *J. Appl. Microbiol.*, **99**: 77–84.
- Hibar K., Daami-Remadi M., Khiareddine H., et El Mahjoub M., (2005) Effet inhibiteur in vitro et in vivo du *Trichoderma harzianum* sur *Fusarium oxysporum* f. sp. *radicis-lycopersici*, *Biotechnol. Agron. Soc. Environ.*, **9**: 163–171.
- Hiouani F., et Bensaid R., (2009) Effet de la salinité sur la rétention en eau des sols gypseux de la région de Ain Benoui (BISKRA), *Courrier du Savoir – N°09*: 85–89.
- Hol W.H.G., Bezemer T.M., and Biere A., (2013) Getting the ecology into interactions between plants and the plant growth-promoting bacterium *Pseudomonas fluorescens*, *Front. Plant Sci.*, **4**: 1–9.
- Hrynkiewicz K., and Baum C., (2011) The Potential of Rhizosphere Microorganisms to Promote the Plant Growth in Disturbed Soils, Chapter 2, p. 35-64., in Malik A., and Grohmann E., (eds.), *Environmental Protection Strategies for Sustainable Development, Strategies for Sustainability*, Springer Science+Business Media.
- Huot E., Meghrous J., Barrena-Gonzalez C., and Petitdemange H., (1996) Bacteriocin J46, a New Bacteriocin Produced by *Lactococcus lactis* Subsp. *cremoris* J46: Isolation and Characterization of the Protein and Its Gene, *Anaerobe*, **2**: 137-145.
- Hwang K.-S., Kima H.U., Charusanti P., Palsson B.Ø., and Lee S.Y., (2014) Systems biology and biotechnology of *Streptomyces* species for the production of secondary metabolites, *Biotech. Adv.*, **32**: 255–268.
- Hwanhlem N., Biscola V., El-Ghaish S., Jaffrés E., Dousset X., Haertlé T., H-Kittikun A., and Chobert J.-M., (2013) Bacteriocin-Producing Lactic Acid Bacteria Isolated from Mangrove Forests in Southern Thailand as Potential Bio-Control Agents: Purification and Characterization of Bacteriocin Produced by *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* KT2W2L, *Probiotics Antimicro. Prot.*, **5**: 264–278.
- Ibekwe A.M., Poss J.A., Grattan S.R., Grieve C.M., and Suarez D., (2010) Bacterial diversity in cucumber (*Cucumis sativus*) rhizosphere in response to salinity, soil pH, and boron, *Soil Biol. & Biochem.*, **42**: 567–575.
- Inceoglu Ö., Salles J.F., van Overbeek L., and van Elsas J.D., (2010) Effects of plant genotype and growth stage on the betaproteobacterial communities associated with different potato cultivars in two fields, *Appl. and Environ. Microbiol.*, **11**: 3675–3684.
- Jayasinghe B.A.T.D., and Parkinson D., (2008) Actinomycetes as antagonists of litter decomposer fungi, *Appl. Soil Ecol.*, **38**: 109–118.
- Jhaveri K., Taldone T., Modi S., and Chiosis G., (2012) Advances in the clinical development of heat shock protein 90 (Hsp90) inhibitors in cancers, *Bioch. Biophys. Acta*, **823**: 742–755.

Références

- Jiang X. , Chen D., Hong S., Wang W., Chen S., and Zou S., (2012) Identification, characterization and functional analysis of a GH-18 chitinase from *Streptomyces roseolus*, *Carbohydr. Polym.*, **87**: 2409–2415.
- Joe M.M., and Sivakumar P.K., (2010) Seed priming with co-flocs of *Azospirillum* and *Pseudomonas* for effective management of rice blast, *Arch. Phytopath. Plant Protec.*, **43**: 1551–1563.
- Jog R., Pandya M., Nareshkumar G., and Rajkumar, S., (2014) Mechanism of phosphate solubilization and antifungal activity of *Streptomyces* spp. isolated from wheat roots and rhizosphere and their application in improving plant growth, *Microbiol.*, **160**: 778–788.
- Joseph B., Dhas B., Hena V., and Raj J., (2013) Bacteriocin from *Bacillus subtilis* as a novel drug against diabetic foot ulcer bacterial pathogens, *Asian Pacific J. of Trop. Biomed.*, **3**: 942–946.
- Joshi N.S., Rao K.S., and Subramanian R.B., (2012) Anatomical and biochemical aspects of interaction between roots of chick pea and *Fusarium oxysporum* f. sp. *ciceris* race 2, *Arch. Phytopath. Plant Protec.*, **45**: 1773–1789.
- Jourdan E., Ongena M., and Thonart P., (2008) Caractéristiques moléculaires de l'immunité des plantes induite par les rhizobactéries non pathogènes, *Biotechnol. Agron. Soc. Environ.*, **12**: 437–449.
- Jung W.J., Mabood F., Souleimanov A., and Smith D.L., (2011) Induction of defense-related enzymes in soybean leaves by class IId bacteriocins (thuricin 17 and bacthuricin F4) purified from *Bacillus* strains, *Microbiol. Res.*, **167**: 14–19.
- Kamoun F., Mejdoub H., Aouissaoui H., Reinbolt J., Hammami A., Jaoua S. (2005) Purification, amino acid sequence and characterization of Bacthuricin F4, a new bacteriocin produced by *Bacillus thuringiensis*, *J. Appl. Microbiol.*, **98**: 881–888.
- Kanyinda J.-N.M., Pierart C., Destain J., Noki P., et Thonart P., (2014) «Impact du séchage sur la viabilité de *Pseudomonas fluorescens* (synthèse bibliographique)», *Base [En ligne]*, **18**: 134-141. URL: <http://popups.ulg.ac.be/1780-4507/index.php?id=10882>.
- Karimi E., Sadeghi A., Dehaji P.A., Dalvand Y., Omidvari M., and Nezhad M.K., (2012) Biocontrol activity of salt tolerant *Streptomyces* isolates against phytopathogens causing root rot of sugar beet, *Biocontrol Sci. Technol.*, **22**: 333–349.
- Karnwal A., (2011) Mycolytic effect of fluorescent *Pseudomonas* in biocontrolling of fungal phytopathogenic *Curvularia lunata*, *Fusarium oxysporum*, *Alternaria padwickii* and *Rhizoctonia solani*, *Arch. Phytopathol. Plant Protec.*, **44**: 1128–1134.
- Karthikeyan B., Abdul Jaleel C., Lakshmanan G.M.A., and Deiveekasundaram M., (2008) Studies on rhizosphere microbial diversity of some commercially important medicinal plants, *Colloi. Surf. B: Biointerf.*, **62**: 143–145.
- Kataoka R., and Futai K., (2011) Endophytic actinomycetes from *Pinus thunbergii* and their antifungal activity against *Cylindrocladium* sp., *Arch. Phytopathol. Plant Protec.*, **44**: 1852–1861.
- Kaur T., Sharma D., Kaura A., and Manhasa R.K., (2013) Antagonistic and plant growth promoting activities of endophytic and soil actinomycetes, *Archives Of Phytopathology And Plant Protection*, **46**: 1756–1768.

Références

- Kavitha A., Prabhakar P., Vijayalakshmi M., and Venkateswarlu Y., (2010) Purification and biological evaluation of the metabolites produced by *Streptomyces* sp.TK-VL_333, *Res. Microbiol.*, **161**: 335–345.
- Kekuda T.R.P., Shobha K.S., and Onkarappa R., (2010) Potent insecticidal activity of two *Streptomyces* species isolated from the soils of the Western ghats of Agumbe, Karnataka, *J. of Nat. Pharm.*, **1**: 30–32.
- Kennedy A.C., (1999) The rhizosphere and spermosphere. *In*: Principles and Applications of Soil Microbiology, Eds. Sylvia D.M., Furhmann J.J., Hartel P.G., and Zuberer D.A., pp. 402–403. Prentice Hall, Inc.: New Jersey, USA.
- Khamna S., Yokota A., and Lumyong S., (2009a) Actinobacteria isolated from medicinal plant rhizosphere soils: diversity and screening of antifungal compounds, indole-3-acetic acid and siderophore production, *World. J. Microbiol. Biotech.*, **25**: 649–655.
- Khamna S., Yokota A., Peberdy J.F., and Lumyong S., (2009b) Antifungal activity of *Streptomyces* spp. isolated from rhizosphere of Thai medicinal plants, *Int. J. Integr. Biol.*, **6**: 143–147.
- Khamna S., Yokota A., Peberdy J.F., and Lumyong S., (2010) Indole-3-acetic acid production by *Streptomyces* sp. isolated from some Thai medicinal plant rhizosphere soils, *Eur. Asia. J. BioSci.*, **4**: 23–32.
- Khan A.A., Jilani G., Akhtar M.S., Naqvi S.M.S., and Rasheed M., (2009) Phosphorus Solubilizing Bacteria: Occurrence, Mechanisms and their Role in Crop Production, *J. Agric. Biol. Sci.*, **1**: 48–58.
- Khan H., Flint S., and Yu P.-L., (2010) Enterocins in food preservation, *Inter. J. Food Microbiol.*, **141**: 1–10.
- Kim H., Park J., Choi S., Choi K., Lee G., Ban S., Lee C., and Kim C., (2003) Isolation and Characterization of *Bacillus* Strains for Biological Control, *J. Microbiol.*, **41**: 196-201.
- Kim C., Kecskés M.L., Deaker R.J., Gilchrist K., New P.B., Kennedy I.R., Kim S., and Sa T., (2005) Wheat root colonization and nitrogenase activity by *Azospirillum* isolates from crop plants in Korea, *Can. J. Microbiol.*, **51**: 948–956.
- Kitouni M., Boudemagh A., Oulmi L., Reghiousa S., Boughachiche F., Zerizer H., Hamdiken H., Couble A., Mouniee D., Boulahrouf A., and Boiron P., (2005) Isolation of actinomycetes producing bioactive substances from water, soil and tree bark samples of the north–east of Algeria, *J. Mycol. Méd.*, **15**: 45–51.
- Klaenhammer T.R., (1988) Bacteriocins of lactic acid bacteria, *Biochim.*, **70**: 337–349.
- Klaenhammer T.R., (1993) Genetics of bacteriocins produced by lactic acid bacteria, *FEMS Microbiol. Rev.*, **12**: 39-85.
- Klarzynski O., and Fritig B., (2001) Stimulation des défenses naturelles des plantes, *Sciences de la vie*, **324**: 953–963.
- Kleerebezem M., Quadri L.E., Kuipers O.P., and de Vos W.M., (1997) Quorum sensing by peptide pheromones and two-component signal-transduction systems in Gram-positive bacteria, *Mol. Microbiol.*, **24**: 895–904.
- Kochar M., Upadhyay A., and Srivastava S., (2011) Indole-3-acetic acid biosynthesis in the biocontrol strain *Pseudomonas fluorescens* Psd and plant growth regulation by hormone over expression, *Res. in Microbiol.*, **162**: 426–435.

Références

- Koranda M., Schneckner J., Kaiser C., Fuchslueger L., Kitzler B., Stange C.F., Sessitsch A., Zechmeister-Boltenstern S., Richter A., (2011) Microbial processes and community composition in the rhizosphere of European beech –The influence of plant C exudates, *Soil Biol. & Biochem.*, **43**: 551–558.
- Kouakou P., Ghalfi H., Destain J., Duboisdauphin R., Evrard P., and Thonart P., (2008) Enhancing the antilisterial effects of *Lactobacillus curvatus* CWBI-B28 in pork meat and cocultures by limiting bacteriocin degradation, *Meat Sci.*, **80**: 640–648.
- Kumar S., and Kannabiran K., (2010) Antifungal activity of *Streptomyces* spp. VITSVK5 against drug resistant *Aspergillus* clinical isolates from pulmonary tuberculosis patients, *J. Mycol. Méd.*, **20**:101–107.
- Kumar A., Prakash A., and Johri B.N., (2011a) *Bacillus* as PGPR in Crop Ecosystem Chapter 2, p: 37-59. Maheshwari D.K., (ed.), *Bacteria in Agrobiolgy: Crop Ecosystems*, DOI10.1007/978-3-642-18357-7_2, # Springer-Verlag Berlin Heidelberg.
- Kumar H., Dubey R.C., and Maheshwari D.K., (2011b) Effect of plant growth promoting rhizobia on seed germination, growth promotion and suppression of Fusarium wilt of fenugreek (*Trigonella foenum-graecum* L.), *Crop Protection*, **30**: 1396–1403.
- Kumar P., Dubey R.C., and Maheshwari D.K., (2012) *Bacillus* strains isolated from rhizosphere showed plant growth promoting and antagonistic activity against phytopathogens, *Microbiological Research*, **167**: 493–499.
- Kurabachew H., and Wydra K., (2013) Characterization of plant growth promoting rhizobacteria and their potential as bioprotectant against tomato bacterial wilt caused by *Ralstonia solanacearum*, *BiologicalControl*, **67**: 75–83.
- Ladygina N., and Hedlund K., (2010) Plant species influence microbial diversity and carbon allocation in the rhizosphere, *Soil Biol. Biochem.*, **42**: 162–168.
- Laemmli U.K., (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4, *Nature (London)*, **227**: 680–685.
- Landi L., Valori F., Ascher J., Renella G., Falchini L., and Nannipieri P., (2006) Root exudate effects on the bacterial communities, CO₂ evolution, nitrogen transformations and ATP content of rhizosphere and bulk soils, *Soil Biol. Biochemi.*, **38**: 509–516.
- Lauber C.L., Strickland M.S., Bradford M.A., and Fierer N., (2008) The influence of soil properties on the structure of bacterial and fungal communities across land-use types, *Soil Biol. Biochem.*, **40**: 2407-2415.
- Lauber C.L., Hamady M., Knight R., and Fierer N., (2009) Pyrosequencing-Based Assessment of Soil pH as a Predictor of soil bacterial community structure at the continental scale:, *Appl. Environ. Microbiol.*, **75**: 5111-5120.
- Lazarovits G., (2001) Management of soil-borne plant pathogens with organic soil amendments: a disease control strategy salvaged from the past, *Can. J. Plant Pathol.*, **23**: 1–7.
- Lechevalier M.P., and Lechevalier H.A., (1970) Chemical composition as a criterion in the classification of aerobic actinomycetes, *Int. J. Syst. Bacteriol.*, **34**: 435–444.

Références

- Lee H.B., Kim C.-J., Ki J.-S., Hong K.-S., and Cho K.Y. (2003) A bleaching herbicidal activity of methoxyhygromycin (MHM) produced by an actinomycete strain *Streptomyces* sp. 8E-12, *Lett. Appl. Microbiol.*, **36**: 387–391.
- Leggett M., Leland J., Kellar K., and Epp B., (2011) Formulation of microbial biocontrol agents – an industrial perspective, *Can. J. Plant Pathol.*, **33**: 101–107.
- Leisso R., Miller Z., Jacobsen B., and Burrows M., (2011) Pathogenicity of *Fusarium* spp. to chickpea seed and seedlings (*Cicer arietinum* L.), *Can. J. Plant Pathol.*, **33**: 400–409.
- Leroux P., (2003) Modes d'action des produits phytosanitaires sur les organismes pathogènes des plantes, *C. R. Biologies*, **326**: 9–21.
- Li J., Jin Z., and Gu Q., (2011a) Effect of plant species on the function and structure of the bacterial community in the rhizosphere of lead–zinc mine tailings in Zhejiang, China, *Can. J. Microbiol.*, **57**:569–577.
- Li Q., Jiang Y., Ning P., Zheng L., Huang J., Li G., Jiang D., and Hsiang T., (2011b) Suppression of *Magnaporthe oryzae* by culture filtrates of *Streptomyces globisporus* JK-1. *Biological Control*, **58**:139–148.
- Li Q., Ning P., Zheng L., Huang J., Li G., and Hsiang T., (2012) Effects of volatile substances of *Streptomyces globisporus* JK-1 on control of *Botrytis cinerea* on tomato fruit, *Biological Control*, **61**:113–120.
- Li X., Rui J., Mao Y., Yannarell A., and Mackie R., (2014) Dynamics of the bacterial community structure in the rhizosphere of a maize cultivar, *Soil Biol. Biochem.*, **68**: 392–401.
- Lin L., and Xu X., (2013) Indole-3-Acetic Acid Production by Endophytic *Streptomyces* sp. En-1 Isolated from Medicinal Plants, *Curr. Microbiol.*, **67**: 209–217.
- Lin Y., Du D., Si C., Zhao Q., Li Z., and Li P., (2014) Potential biocontrol *Bacillus* sp. strains isolated by an improved method from vinegar waste compost exhibit antibiosis against fungal pathogens and promote growth of cucumbers, *Biological Control*, **71**: 7–15.
- Line J.E., Svetoch E.A., Eruslanov B.V., Perelygin V.V., Mitsevich E.V., Mitsevich I.P., Levchuk V.P., Svetoch O.E., Seal B.S., Siragusa G.R., and Stern N.J., (2008) Isolation and Purification of Enterocin E-760 with Broad Antimicrobial Activity against Gram-Positive and Gram-Negative Bacteria, *Antimicrob. Agents Chemother.*, **52**: 1094–1100.
- Liu W., Yang C., Shi S., and Shu W., (2014) Effects of plant growth-promoting bacteria isolated from copper tailings on plants in sterilized and non-sterilized tailings, *Chemosphere*, **97**: 47–53.
- Locci R., (1989) *Streptomyces* and related genera. In *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*, vol. 4, pp. 2451–2508, Edited by Williams S.T., Sharpe M.E., and Holt J.G., Baltimore: Williams & Wilkins.
- Lopez P., Hornung A., Welzel K., Unsin C., Wohlleben W., Webera T., Pelzer S., (2010) Isolation of the lysolipin gene cluster of *Streptomyces tendae* Tü 4042, *Gene*, **461**: 5–14.
- Lorito M., and Woo S.L., (1998) Advances in understanding the antifungal mechanism of *Trichoderma* and new applications for biological control. In: Duffy B., Rosenberger

Références

- U., and Défago G., (eds.), *Molecular Approaches in Biological Control*, **Vol. 21 (9)**, pp. 73-80. IOBC wprs Bulletin/Bulletin OILB srop.
- Lucas R., Grande M.A., Abriouel H., Maqueda M., Ben Omar N., Valdivia E., Martinez-Canamero M., and Galvez A., (2006) Application of the broad-spectrum bacteriocin enterocin AS-48 to inhibit *Bacillus coagulans* in canned fruit and vegetable foods, *Food Chem. Toxicol.*, **44**:1774–1781.
- Macagnan D., Romeiro R.D.A., Pomella A.M.V., and deSouza J.T., (2008) Production of lytic enzymes and siderophores, and inhibition of germination of basidiospores of *Moniliophthora* (ex *Crinipellis*) pernicioso by phylloplane actinomycetes, *Biol. Control*, **47**: 309–14.
- Maiyappan S., Amalraj E.L.D., Santhosh A., and Peter A.J., (2010) Isolation, Evaluation and Formulation of Selected Microbial Consortia for Sustainable Agriculture, *J Biofertil. Biopestici.*, **2**:109.
- Malathi S., and Mohan S., (2013) Induction of defence-related enzymes in onion by combined application of fungal and bacterial biocontrol agents against *Fusarium oxysporum* f. sp. cepae, *Arch. of Phytopathol. Plant Protec.*, **46**: 243–252.
- Marschner P., Yang C.-H., Lieberei R., and Crowley D.E., (2001) Soil and plant specific effects on bacterial community composition in the rhizosphere, *Soil Biology & Biochem.*, **33**: 1437–1445.
- Marschner P., and Timonen S., (2005) Interactions between plant species and mycorrhizal colonization on the bacterial community composition in the rhizosphere, *Appl. Soil Ecology*, **28**: 23–36.
- Marschner P., Solaiman Z., and Rengel Z. (2007) Brassica genotypes differ in growth, phosphorus uptake and rhizosphere properties under P-limiting conditions, *Soil Biol. Biochem.*, **39**: 87–98.
- Martinez F.A.C., Balciunas E.M., Converti A., Cotter P.D., and de Souza Oliveira R.P. (2013) Bacteriocin production by *Bifidobacterium* spp. A review, *Biotech. Advances*, **31**: 482–488.
- Masciarelli O., Llanes A., and Luna V., (2014) A new PGPR co-inoculated with *Bradyrhizobium japonicum* enhances soybean nodulation, *Microbiol. Res.*, **169**: 609–615.
- McAuliffe O., and Hill C., (2001) Lantibiotics: structure, biosynthesis and mode of action. *FEMS Microbiol. Rev.*, **25**: 285-308.
- McGahan D.G., Southard R.J., and Zasoski R.J., (2014) Rhizosphere effects on soil solution composition and mineral stability, *Geoderma*, **226–227**: 340–347.
- McKenzie R.H., and Roberts T.L., (1990) Soil and fertilizer phosphorus update Alberta Soil, Sci. Workshop Proc Coast Terrace Inn Edmonton, AB 84 104 Feb. 20–22.
- Mehta P., Walia A., Chauhan A., Kulshrestha S., and Shirkot C. K., (2013) Phosphate solubilisation and plant growth promoting potential by stress tolerant *Bacillus* sp. isolated from rhizosphere of apple orchards in trans Himalayan region of Himachal Pradesh, *Annals Appl. Biol.*, **163**: 430–443.
- Meijerink M., van Hemert S., Taverne N., Wels M., de Vos P., Bron P.A., Savelkoul H.F., van Bilsen J., Kleerebezem M., and Wells J.M., (2010) Identification of Genetic Loci

Références

- in *Lactobacillus plantarum* That Modulate the Immune Response of Dendritic Cells Using Comparative Genome Hybridization, *PLoS One*, **5**:1–12.
- Messaadia N., and Harzallah D., (2011) Regulatory effects of carbon sources on tabtoxin production (A β -lactam Phytotoxin of *Pseudomonas syringae* pv. *tabaci*). *World Acad. Sci., Engineer. Technol.*, **73**: 904–908.
- Messaoudi S., Kergourlay G., Dalgalarondo M., Choiset Y., Ferchichi M., Prévost H., Pilet M.-F., Chobert J.-M., Manai M., and Dousset X., (2012) Purification and characterization of a new bacteriocin active against *Campylobacter* produced by *Lactobacillus salivarius* SMXD51, *Food Microbiol.*, **32**: 129–134.
- Messaoudi S., Manai M., Kergourlay G., Prévost H., Connil N., Chobert J.-M., and Dousset X., (2013) *Lactobacillus salivarius*: Bacteriocin and probiotic activity, *Food Microbiol.*, **36**: 296–304.
- Meynard J.-M., Doré T., and Lucas P., (2003) Agronomic approach: cropping systems and plant diseases, *C.R. Biol.*, **326**: 37–46.
- Miransari M., and Smith D.L., (2014) Plant hormones and seed germination, *Environ. Exper. Botany*, **99**: 110–121.
- Mohandas S., Poovarasan S., Panneerselvam P., Saritha B., Upreti K.K., Kamal R., and Sita T., (2013) Guava (*Psidium guajava* L.) rhizosphere *Glomus mosseae* spores harbor actinomycetes with growth promoting and antifungal attributes, *Scientia Horticulturae*, **150**: 371–376.
- Morovský M., Pristaš P., Czikková S., and Javorský P., (1998) A bacteriocin-mediated antagonism by *Enterococcus faecium* BC25 against ruminal *Streptococcus bovis*, *Microbiol. Res.*, **153**: 277-281.
- Morrone D., Chambers J., Lowry L., Kim G., Anterola A., Bender K., Peters R.J., (2009) Gibberellin biosynthesis in bacteria: Separate ent-copalyl diphosphate and ent-kaurene synthases in *Bradyrhizobium japonicum*, *FEBS Lett.*, **583**: 475–480.
- Mukherjee M., Mukherjee P.K., and Kale S. P., (2007) cAMP signalling is involved in growth, germination, mycoparasitism and secondary metabolism in *Trichoderma virens*, *Microbiol.*, **153**: 1734–1742.
- Multigner L., (2005) Effets retardés des pesticides sur la santé humaine, *Environ. Ris. Santé*, **4**: 187-194.
- Murashige T., and Skoog F., (1962) A revised medium for rapid growth and bioassay with tobacco tissue culture, *Physiol. Plant*, **15**: 473–492.
- Murty D., Kirschbaum M.F.U., McMurtrie R.E., and McGilvray A., (2002) Does conversion of forest to agricultural land change soil carbon and nitrogen?, *Glob. Change Biol.*, **8**: 105–123.
- Nadeem S.M., Zahir Z.A., Naveed M., and Arshad M., (2007) Preliminary investigations on inducing salt tolerance in maize through inoculation with rhizobacteria containing ACC deaminase activity. *Can. J. Microbiol.*, **53**:1141-1149.
- Nadeem S.M., Zahir Z.A., Naveed M., and Arshad M., (2009) Rhizobacteria containing ACC-deaminase confer salt tolerance in maize grown on salt-affected fields, *Rev. Can. Microbiol.*, **55**: 1302-1309.

Références

- Nagpure A., Choudhary B., Kumar S., and Gupta R.K., (2014) Isolation and characterization of chitinolytic *Streptomyces* sp. MT7 and its antagonism towards wood-rotting fungi, *Ann. Microbiol.*, **64**: 531–541.
- Naik P.R., and 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.
- Nautiyal C.S., (1999) An efficient microbiological growth medium for screening phosphate solubilizing microorganisms, *FEMS Microbiol. Lett.*, **170**: 265–270.
- Ndong J.-R., Blanchet P., et Multigner L., (2009) Pesticides et cancer de la prostate: données épidémiologiques, *Bull Cancer*, **96**: 171–180.
- Nelson D.R., and Mele P.M., (2007) Subtle changes in rhizosphere microbial community structure in response to increased boron and sodium chloride concentrations, *Soil Biol. & Biochem.*, **39**: 340–351.
- Nene Y.L., and Reddy M.V., (1987) Chickpea diseases and their control, P: 233-270. In: The Chickpea. (Eds.): Saxena M.C., and Singh K.B., CAB International, Oxon, United Kingdom.
- Nihorimbere V., Ongena M., Smargiassi M., and Thonart P., (2011) Beneficial effect of the rhizosphere microbial community for plant growth and health Biotechnol. *Agron. Soc. Environ.*, **15**: 327–337.
- Noguez A.M., Arita H.T., Escalante A.E., Forney L.J., Garcia-Oliva F., and Souza V., (2005) Microbial macroecology: highly structured prokaryotic soil assemblages in a tropical deciduous forest, *Global. Ecol. Biogeog.*, **14**: 241–248.
- Ongena M., Jourdan E., Schäfer M., Kech C., Budzikiewicz H., Luxen A., and Thonart P., (2005) Isolation of an N-alkylated benzylamine derivative from *Pseudomonas putida* BTP1 as elicitor of induced systemic resistance in bean, *Mol. Plant-Microbe Interact.*, **18**: 562-569.
- Oscariz J.C., and Pisabarro A.G., (2001) Classification and mode of action of membrane active bacteriocins produced by gram-positive bacteria, *Inter.J. Microbiol.*, **4**: 13–19.
- O’ Shea E.F., Cotter P.D., Ross R P., and Hill C., (2013) Strategies to improve the bacteriocin protection provided by lactic acid bacteria *Curr. Opin. Biotech.*, **24**:130–134.
- Oves M., Zaidi A., Khan M.S., and Ahemad M., (2009) Variation in plant growth promoting activities of phosphate-solubilizing microbes and factors affecting their colonization and solubilizing efficiency in different agro-ecosystems pp. 247–263, in: Khan M.S., and Zaidi A., (Eds.), Phosphate Solubilizing Microbes for Crop Improvement, Nova Science Publishers, Inc., New York, USA.
- Ozenda P., (2004) Flore et végétation du Sahara, CNRS 3^e éditions, p. 662.
- Pageau D., Lafond J., Lajeunesse J., et Savard M.E., (2008) Impact du précédent cultural et de la fertilisation azotée sur la teneur en désoxynivalénol chez l’orge, *Can. J. Plant Pathol.*, **30**: 397–403.
- Paik H.D., Bae S.S., Park S.H.,and Pan J.G., (1997) Identification and partial characterization of tochicin, a bacteriocin produced by *Bacillus thuringiensis* subsp tochiensis. *J. Ind. Microb. B.*, **19**: 294-298.

Références

- Panda A.K., Bisht S.S., De Mondal S, Kumar N.S., Gurusubramanian G., Panigrahi A.K., (2014) *Brevibacillus* as a biological tool: a short review, *Antonie van Leeuwenhoek*, **105**: 623–639.
- Papagianni M., and Papamichael E.M., (2011) Purification, amino acid sequence and characterization of the class IIa bacteriocin weissellin A, produced by *Weissella paramesenteroides* DX, *Biores. Technol.*, **102**: 6730–6734.
- Park J.K., Kim J.-D., Park Y.I., and Kim S.-K., (2012) Purification and characterization of a 1,3- β -D-glucanase from *Streptomyces torulosus* PCPOK 0324, *Carboh. Polymers*, **87**: 1641–1648.
- Park K., Park J.-W., Lee S.-W., and Balaraju K., (2013) Disease suppression and growth promotion in cucumbers induced by integrating PGPR agent *Bacillus subtilis* strain B4 and chemical elicitor ASM, *Crop Protec.*, **54**: 199–205.
- Pascual L.M., Daniele M.B., Giordano W., Pájaro M.C., and Barberis I.L., (2008) Purification and Partial Characterization of Novel Bacteriocin L23 Produced by *Lactobacillus fermentum* L23, *Curr. Microbiol.*, **56**: 397–402.
- Patil H.J., Srivastava A.K., Singh D.P., Chaudhari B.L., and Arora D.K., (2011) Actinomycetes mediated biochemical responses in tomato (*Solanumly copersicum*) enhances bioprotection against *Rhizoctonia solani*, *Crop Protec.*, **30**: 1269–1273.
- Pattan H.D., Gothkar A.K., Joshi P., Chivasa A., and Nyamudeza P., (2001) On-farm seed priming; using participatory methods to revive and refine a key technology, *Agricul. Systems.*, **69**: 151–164.
- Paulitz T.C., and Bélanger R.R., (2001) Biological control in greenhouse systems, *Annu. Rev. Phytopathol.*, **39**:103–133.
- Pei J., Yuan Y., and Yue T., (2013) Primary characterization of bacteriocin paracin C – A novel bacteriocin produced by *Lactobacillus paracasei*, *Food Control*, **34**: 168–176.
- Penaud A., et Michi H., (2009) *Coniothyrium minitans*, un agent de lutte biologique au service de la protection intégrée, *OCL*, **16**: 158–163.
- Peng G., Lahlali R., Hwang S.-F., Pageau D., Hynes R.K., McDonald M.R., Gossen B.D., and Strelkov S.E., (2014) Crop rotation, cultivar resistance, and fungicides/biofungicides for managing clubroot (*Plasmodiophora brassicae*) on canola, *Can. J. of Plan. Pathol.*, **36**: 99–112.
- Pérez-Montaña F., Alías-Villegas C., Bellogín R.A., del Cerro P., Espuny M.R., Jiménez-Guerrero I., López-Baena F.J., Ollero F.J., and Cubo T.,(2014) Plant growth promotion in cereal and leguminous agricultural important plants: From microorganism capacities to crop production, *Microbiol. Res.*, **169**: 325–336.
- Ponce A.G., Moreiraa M.R., del Vallea C.E., and Roura S.I., (2008) Preliminary characterization of bacteriocin-like substances from lactic acid bacteria isolated from organic leafy vegetables, *LWT - Food Sci. Tech.*, **41**: 432–441.
- Poritsanos N., Selin c., Fernando W.G.D., Nakkeeran S., and de Kievit T.R., (2006) A *gacS* deficiency does not affect *Pseudomonas chlororaphis* PA23 fitness when growing on canola, in aged batch culture or as a biofilm, *Can. J. Microbiol.*, **52**: 1177–1188.

Références

- Portier P., Fischer-Le Saux M., Mougél C., Lerondelle C., Chapulliot D., Thioulouse J., and Nesme X., (2006) Identification of genomic species in *Agrobacterium* biovar 1 by AFLP genomic markers, *Appl. and Environ. Microbiol.*, **72**: 7123–7131.
- Prapagdee B., Kuekulvong C., and Mongkolsuk S., (2008) Antifungal Potential of Extracellular Metabolites Produced by *Streptomyces hygrosopicus* against Phytopathogenic Fungi, *Int. J. Biol. Sci.*, **4**: 330–337.
- Prescott C. E., and Grayston S. J., (2013) Tree species influence on microbial communities in litter and soil: current knowledge and research needs, *For. Ecol. Manag.*, **309**: 19–27.
- Quecine M.C., Araujo W.L., Marcon J., Gai C.S., Azevedo J.L., and Pizzirani-Kleiner A.A., (2008) Chitinolytic activity of endophytic *Streptomyces* and potential for biocontrol, *Lett. Appl. Microbiol.*, **47**: 486–491.
- Quezel P., et Santa S., (1963) Nouvelle flore de l'Algérie et des régions désertiques méridionales, Tome 2. 7^e édition. Paris: CNRS éditions, p.1170.
- Rajendhran J., and Gunasekaran P., (2008) Strategies for accessing soil metagenome for desired applications, *Biotechnol. Adv.*, **26**: 576-90.
- Raynaud X., (2010) Soil properties are key determinants for the development of exudate gradients in a rhizosphere simulation model, *Soil Biol. & Biochem.*, **42**: 210–219.
- Rea M.C., Alemayehu D., Ross R.P., and Hill, C., (2013) Gut solutions to a gut problem: bacteriocins, probiotics and bacteriophage for control of *Clostridium difficile* infection, *J. Med. Microbiol.*, **62**: 1369–1378.
- Reid G., et Burton J., (2002) Utilisation de lactobacilles pour prévenir l'infection par des bactéries pathogènes, *Microbes and Infection*, **4**: 319–324.
- Ren Z., Yan L., Zhang N., Guo Y., Yang C., Lou Z., and Rao Z., (2013) The newly emerged SARS-Like coronavirus HCoV-EMC also has an “Achilles’ heel”: current effective inhibitor targeting a 3C-like protease, *Protein Cell*, **4**: 248–250.
- Renwick A., Campbell R., and Coe S., (1991) Assessment of *in vivo* screening systems for potential biocontrol agents of *Gaeumannomyces graminis*., *Plant Pathol.*, **40**: 523–532.
- Reyes M.E.Q., Rohrbach K.G., and Paull R.E., (2004) Microbial antagonists control postharvest black rot of pineapple fruit, *Posthar. Biol. Tech.*, **33**: 193–203.
- Richard J., (1996) Utilisation de bactériocines pour la production d'aliments plus sûrs: mythe ou réalité?, *Lait*, **76**: 179–189.
- Richard C., Cañon R., Naghmouchi K., Bertrand D., Prévost H., and Drider D., (2006) Evidence on correlation between number of disulfide bridge and toxicity of class IIa bacteriocins. *Food Microbiol.*, **23**: 175–183.
- Richardson A.E., Barea J.-M., McNeill A.M., and Prigent-Combaret C., (2009) Acquisition of phosphorus and nitrogen in the rhizosphere and plant growth promotion by microorganisms, *Plant Soil*, **321**:305–339.
- Riley M.A., and Wertz J.E., (2002) Bacteriocins: evolution, ecology, and application, *Annu. Rev. Microbiol.*, **56**:117–137.
- Sabaou N., Boudjella H., Bennadji A., Mostefaoui A., Zitouni A., Lamari A., Bennadji H., Lefèbvre G., and Germain P., (1998) Les sols du Sahara algérien, Source d'actinomycètes rares producteurs d'antibiotiques, *Sécheresse*, **9**: 147–53.

Références

- Sadeghi A., Hesan A., Askari H., Qomi D.N., Farsi M., and Hervan E.M., (2009) Biocontrol of *Rhizoctonia solani* damping-off of sugar beet with native *Streptomyces* strains under field conditions, *Biocontrol Sci. Technol.*, **19**: 985–991.
- Saeed S., Ahmad S., and Rasool S.A., (2004) Antimicrobial spectrum, production and mode of action of staphylococcin 188 produced by *Staphylococcus aureus* 188, *Pakis. J. Pharmac. Sci.*, **17**: 1-8.
- Saeed S., Rasool S.A., Ahmed S., Khanum T., BashirKhan M., Abbasi A., and AbidAli S., (2006) New insight in staphylococcin research: bacteriocin and/or bacteriocin-like inhibitory substance (s) produced by *S. aureus* AB188, *World J. Microbiol. Biotechnol.*, **22**: 713–722.
- Sala O.E., Chapin III F.S., Armesto J.J., Berlow R., Bloomfield J., Dirzo R., Huber-Sanwald E., Huenneke L.F., Jackson R.B., Kinzig A., Leemans R., Lodge D., Mooney H.A., Oesterheld M., Poff N.L., Sykes M.T., Walker B.H., Walker M., Wall D.H., (2000) Global biodiversity scenarios for the year 2100, *Science*, **287**:1770–1774.
- Sambrook J., Fritsch E., and Maniatis T., (1989) *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, Seconded. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY, USA, pp. 23–38.
- Sanaullah M., Blagodatskaya E., Chabbi A., Rumpel C., and Kuzyakov Y., (2011) Drought effects on microbial biomass and enzyme activities in the rhizosphere of grasses depend on plant community composition, *Appl. Soil Ecology*, **48**: 38–44.
- Sandra B., Joana B., Joana S., and Paula T., (2014) Characterization of a Bacteriocin of *Pediococcus pentosaceus* SB83 and Its Potential for Vaginal Application, *Anti-Infective Agents*, **12**: 68–74.
- Saraf M., Rajkumar S., and Saha T., (2011) Perspectives of PGPR in Agri-Ecosystems, p: 361-385, Chapter13 in: Maheshwari D.K. (ed.), *Bacteria in Agrobiolgy: Crop Ecosystems*, Springer-Verlag Berlin Heidelberg.
- Saratale G.D., Saratale R.G., and Oh S.E., (2012) Production and characterization of multiple cellulolytic enzymes by isolated *Streptomyces* sp. MDS, *Biomass and Bioenergy*, **47**: 302–315.
- Saravanakumar D., Vijayakumar C., Kumar N., and Samiyappan R., (2007) PGPR-induced defense responses in the tea plant against blister blight disease, *Crop Protec.*, **26**: 556–565.
- Sarika A.R., Lipton A.P., Aishwarya M.S., and Dhivya R.S., (2012) Isolation of a Bacteriocin-Producing *Lactococcus lactis* and Application of Its Bacteriocin to Manage Spoilage Bacteria in High-Value Marine Fish Under Different Storage Temperatures, *Appl. Biochem. Biotechnol.*, **167**:1280–1289.
- Sastrahidayat I.R., Djauhari S., Prasetya B., and Saleh N., (2011) Biocontrol of damping-off disease (*Sclerotium rolfsii* SACC.) using Actinmycetes and vam fungi on soybean and impact to crop production and microorganism diversity in rhizospher zone, *Inter. J. Acad. Res.*, **3**: 114–119.
- Saurav K., and Kannabiran K., (2012) Cytotoxicity and antioxidant activity of 5-(2,4-dimethylbenzyl) pyrrolidin-2-one extracted from marine *Streptomyces* VITSVK5 spp, *Saudi J. Biol. Sci.*, **19**: 81–86.

Références

- Schiavon M., Perrin-Ganier C., et Portal J.-M., (1995) La pollution de l'eau par les produits phytosanitaires : état et origine, *Agronomie*, **15**: 157–170.
- Selosse M.-A., Baudoin E., and Vandenkoornhuysse P., (2004) Symbiotic microorganisms, a key for ecological success and protection of plants, *C. R. Biol.*, **32**: 7639–648.
- Settanni L., and Corsetti A., (2008) Application of bacteriocins in vegetable food biopreservation, *Int. J. Food Microbiol.*, **12**: 1123–138.
- Shaharoon B., Naveed M., Arshad M., and Zahir Z.A., (2008) Fertilizer-dependent efficiency of pseudomonads for improving growth, yield and nutrient use efficiency of wheat (*Triticum aestivum* L.), *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **79**: 147–155.
- Shahzad S.M., Arif M.S., Riaz M., Iqbal Z., and Ashraf M., (2013) PGPR with varied ACC-deaminase activity induced different growth and yield response in maize (*Zea mays* L.) under fertilized conditions, *Eur. J. of Soil Biol.*, **57**: 27–34.
- Sharma A., and Johri B.N., (2003) Growth promoting influence of siderophore-producing *Pseudomonas* strains GRP3A and PRS₉ in maize (*Zea mays* L.) under iron limiting conditions, *Microbiol. Res.*, **158**: 243–248.
- Shin S., Mackintosh C.A., Lewis J., Heinen S.J., Radmer L., Dill-Macky R., Baldrige G.D., Zeyen R.J., and Muehlbauer G.J., (2008) Transgenic wheat expressing a barley class II chitinase gene has enhanced resistance against *Fusarium graminearum*, *J. Exp. Bot.*, **59**: 2371–2378.
- Shirling E.B., and Gottlieb D., (1966) Methods for characterization of *Streptomyces* species, *Int. J. Syst. Bacteriol.*, **16**: 313–40.
- Singh B.K., Munro S., Potts J.M., and Millard P., (2007) Influence of grass species and soil type on rhizosphere microbial community structure in grassland soils, *Appl. Soil Ecol.*, **36**: 147–155.
- Singh A.K., and Chhatpar H.S., (2011) Combined use of *Streptomyces* sp. A6 and chemical fungicides against fusarium wilt of *Cajanus cajan* may reduce the dosage of fungicides required in the field, *Crop Protec.*, **30**: 770–775.
- Smaoui S., Elleuch L., Bejar W., Karray-Rebai I., Ayadi I., Jaouadi B., Mathieu F., Chouayekh H., Bejar S., and Mellouli L., (2010) Inhibition of Fungi and Gram-Negative Bacteria by Bacteriocin BacTN635 Produced by *Lactobacillus plantarum* sp. TN635, *Appl. Biochem. Biotechnol.*, **162**: 1132–1146.
- Son J.-S., Sumayo M., Hwang Y.-J., Kim B.-S., and Ghim S.-Y., (2014) Screening of plant growth-promoting rhizobacteria as elicitor of systemic resistance against gray leaf spot disease in pepper, *Appl. Soil Ecology*, **73**: 1–8.
- Song W., Zhou L., Yang C., Cao X., Zhang L., and Liu X., (2004) Tomato Fusarium wilt and its chemical control strategies in a hydroponic system, *Crop Protec.*, **23**: 243–247.
- Sousa C.S., Soares A.C.F., and Garrido M.S., (2008) Characterization of streptomycetes with potential to promote plant growth and biocontrol, *Sci. Agric. (Piracicaba, Braz.)*, **65**: 50–55.
- Srinivasan K., Krishnaraja M., and Mathivanana N., (2009) Plant growth promotion and the control of sunflower necrosis virus disease by the application of biocontrol agents in sunflower, *Arch. Phytopathol. Plant Protec.*, **42**: 160–172.

Références

- Stoyanova L.G., Ustyugova E.A., Sultimova T.D., Bilanenko E.N., Fedorova G.B., Khatrukha G.S., and Netrusov A.I., (2010) New Antifungal Bacteriocin-Synthesizing Strains of *Lactococcus lactis* ssp. *lactis* as the Perspective Biopreservatives for Protection of Raw Smoked Sausages , *Amer. J. Agric. Biol. Sci.*, **5**: 477–485.
- Strompfová V., and Lauková L., (2007) *In vitro* study on bacteriocin production of *Enterococci* associated with chickens, *Anaerobe*, **13**: 228–237.
- Sul W.J., Asuming-Brempong S., Wang Q., Turlousse D.M., Penton C.R., Deng Y., Rodrigues J.L.M., Adiku S.G.K., Jones J.W., Zhou J., Cole J.R., and Tiedje J.M., (2013) Tropical agricultural land management influences on soil microbial communities through its effect on soil organic carbon, *Soil Biol. Biochem.*, **65**: 33–38.
- Tagg J.R., and McGiven A.R., (1971) Assay system for bacteriocins, *Appl. Microbiol.*, **921**: 943.
- Tamura K., Dudley J., Nei M., and Kumar S., (2007) MEGA4: Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) software version 4.0., *Mol. Biol. Evol.*, **24**: 1596–1599.
- Tao G., Tian S., Cai M., and Xie G., (2008) Phosphate solubilizing and mineralizing abilities of bacteria isolated from soils. *Pedosphere*, **18**: 515–523.
- Taqarort N., Bouzerda L., Boubaker H., Ait Ben Aoumar A., et Boudyach E., (2008) Lutte biologique contre la pourriture verte des agrumes en post-récolte par l'utilisation de levures antagonistes, *Acta Bot. Gallica*, **155**: 235–244.
- Tarlera S., Jangid K., Ivester A.H., Whitman W.B., and Williams M.A., (2008) Microbial community succession and bacterial diversity in soils during 77,000 years of ecosystem development. *FEMS Microbiol. Ecol.*, **64**: 129-140.
- Tesfaye M., M.D. Denton, D.A. Samac, and Vance C.P. (2005) Transgenic alfalfa secretes a fungal endochitinase protein to the rhizosphere, *Plant Soil*, **269**: 233–243.
- Thakore Y., (2006) The biopesticide market for global agriculture use, *Ind. Biotechnol.*, **2**: 194–208.
- Thakur D., Yadav A., Gogoi B.K., and Bora T.C., (2007) Isolation and screening of *Streptomyces* in soil of protected forest areas from the states of Assam and Tripura, India, for antimicrobial metabolites, *J. Mycol. Méd.*, **17**: 242–249.
- Tian Y., Zhang X., Liu J., Chen Q., and Gao L., (2009) Microbial properties of rhizosphere soils as affected by rotation, grafting, and soil sterilization in intensive vegetable production systems, *Scientia Horticulturae*, **123**: 139–147.
- Tian J., Dippold M., Pausch J., Blagodatskaya E., Fan M., Li X., and Kuzyakov Y., (2013) Microbial response to rhizodeposition depending on water regimes in paddy soils, *Soil Biol. Biochem.*, **65**: 195–203.
- Tian X., and Zheng Y., (2013) Evaluation of biological control agents for Fusarium wilt in *Hiemalis begonia*, *Can. J. Plant Pathology*, **35**: 363–370.
- Todorov S.D., and Dicks L.M.T., (2006) Screening for bacteriocin-producing lactic acid bacteria from boza, a traditional cereal beverage from Bulgaria Comparison of the bacteriocins, *Process Biochem.*, **41**: 11–19.

Références

- Toussaint V., Valois D., Dodier M., Faucher E., Déry C., Brzezinski R., Ruest L., and Beaulieu C., (1997) Characterization of actinomycetes antagonistic to *Phytophthora fragariae* var. *rubi*, the causal agent of raspberry root rot, *Phytoprotec.*, **78**: 43–51.
- Tsahouridou P.C., and Thanassouloupoulos C.C., (2001) *Trichoderma koningii* as a potential parasite of sclerotia of *Sclerotium rolfsii*, *Cryptog. Mycol.*, **22**: 289–295.
- Tsahouridou P.C., and Thanassouloupoulos C.C., (2002) Proliferation of *Trichoderma koningii* in the tomato rhizosphere and the suppression of damping-off by *Sclerotium rolfsii*, *Soil Biol. Biochem.*, **34**: 767–776.
- Twomey D., Ryan M., Meaney B., and Hill C., (2002) Lantibiotics produced by lactic acid bacteria: structure, function and applications, *Antonie van Leeuwenhoek*, **82**: 165–185.
- Valanarasu M., Kannan P., Ezhilvendan S., Ganesan G., Ignacimuthu S., and Agastian P., (2010) Antifungal and antifeedant activities of extracellular product of *Streptomyces* spp. ERI-04 isolated from Western Ghats of Tamil Nadu, *J. Mycol. Méd.*, **20**: 290–297.
- Valé M., Nguyen C., Dambrine E., and Dupouey J.L., (2005) Microbial activity in the rhizosphere soil of six herbaceous species cultivated in a greenhouse is correlated with shoot biomass and root C concentrations, *Soil Biol. Biochem.*, **37**: 2329–2333.
- van Hemert S., Meijerink M., Molenaar D., Bron P.A., deVos P., Kleerebezem M., Wells J.M., and Marco M.L., (2010) Identification of *Lactobacillus plantarum* genes modulating the cytokine response of human peripheral blood mononuclear cells, *BMC Microbiol.*, **10**:1–13.
- Verdaguer B., Bonniecuelle M.H., Balardelle C., Romestant M., et Lacaze P., (2005) Génie génétique appliqué à l'amélioration des espèces, fourragères, *Fourrages*, **183**: 347–364.
- Verma V.C., Gond S.K., Kumar A., Mishra A., Kharwar R.N., Gange A.C., (2009) Endophytic actinomycetes from *Azadirachta indica* A. Juss.: isolation, diversity, and anti-microbial activity, *Microb. Ecol.*, **57**: 749–756.
- Vian J.F., Peigné J., Chaussod R., et Roger-Estrade J., (2009) Effets du mode de travail du sol sur les microorganismes à l'échelle du profil cultural, *Étude et Gestion des Sols*, **16**: 355–364.
- Viterbo A., O.Ramot, Chernin L., and Chet I., (2002) Significance of lytic enzymes from *Trichoderma* spp. in the biocontrol of fungal plant pathogens, *Antonie van Leeuwenhoek*, **81**: 549–556.
- Wijaya A., Neudeker C., Holzappel W. and Franz C., (2006) Influence of bacteriocin-producing *Enterococcus faecalis* BFE 1071 on *Lactobacillus* spp. in the rat gastrointestinal tract, In: *Proceedings of Food Micro., University of Bologna, Bologna, Italy*, 124 p.
- Williams S.T., and Cross T., (1971) *Actinomycetes*. In: *Methods in Microbiology*, Booth, C. (Eds.). Academic press, London, 4: 295–334.
- Williams S.T., Goodfellow M., and Alderson G., (1989) Genus *Streptomyces* Waksman and Henrici 1943, 339AL. In: Williams S.T., Sharpe M.E., and Holt J.G., (eds) *Bergey's manual of determinative bacteriology*, volume 4. Williams and Wilkins, Baltimore, pp 2453–2492.

Références

- Wu C.-W., Yin L.-J., and Jiang S.-T., (2004) Purification and Characterization of Bacteriocin from *Pediococcus pentosaceus* ACCEL, *J. Agric. Food Chem.*, **52**: 1146–1151.
- Xu Y., Wang G., Jin J., Liu J., Zhang Q., and Liu X., (2009) Bacterial communities in soybean rhizosphere in response to soil type, soybean genotype, and their growth stage, *Soil Biol. Biochem.*, **41**: 919–925.
- Xue L., Xue Q., Chen Q., Lin C., Shen G., and Zhao J., (2013) Isolation and evaluation of rhizosphere actinomycetes with potential application for biocontrol of *Verticillium* wilt of cotton, *Crop Protection*, **43**: 231–240.
- Yang S.-C., Lin C.-H., Sung C.T., and Fang J.-Y., (2014) Antibacterial activities of bacteriocins: application in foods and pharmaceuticals, *Front. Microbiol.*, **5**: 1–10.
- Yim W., Seshadri S., Kim K., Lee G., and Sa T., (2013) Ethylene emission and PR protein synthesis in ACC deaminase producing *Methylobacterium* spp. inoculated tomato plants (*Lycopersicon esculentum* Mill.) challenged with *Ralstonia solanacearum* under greenhouse conditions, *Plant Physiol. Biochem.*, **67**: 95–104.
- Yuttavanichakul W., Lawongsa P., Wongkaew S., Teaumroong N., Boonkerd N., Nomura N., and Tittabutr P., (2012) Improvement of peanut rhizobial inoculant by incorporation of plant growth promoting rhizobacteria (PGPR) as biocontrol against the seed borne fungus, *Aspergillus niger*, *Biological Control*, **63**: 87–97.
- Zacky F.A., and Ting A.S.Y., (2013) Investigating the bioactivity of cells and cell-free extracts of *Streptomyces griseus* towards *Fusarium oxysporum* f.sp. *ubense* race 4, *Biol. Control*, **66**: 204–208.
- Zahrán H.H., (2001) Rhizobia from wild legumes: diversity, taxonomy, ecology, nitrogen fixation and biotechnology, *J. Biotechnol.*, **9**: 143–53.
- Zaidi A., Khan M.S., Ahemad M., and Oves M., (2009) Plant growth promotion by phosphate solubilizing bacteria, *Acta Microbiol. Immunol. Hung.*, **56**: 263–284.
- Zehhar G., Ouazzani Touhami A., Badoc A., et Douira A., (2006) Effet des *Fusarium* des eaux de rizière sur la germination et la croissance des plantules de riz, *Bull. Soc. Pharm. Bordeaux*, **145**: 7–18.
- Zhang C., Liu G., Xue S., and Song Z., (2011) Rhizosphere soil microbial activity under different vegetation types on the Loess Plateau, China, *Geoderma*, **161**: 115–125.
- Zhang W., Wu X., Liu G., Chen T., Zhang G., Dong Z., Yang X., and Hu P., (2013) Pyrosequencing Reveals Bacterial Diversity in the Rhizosphere of Three *Phragmites australis* Ecotypes, *Geomicrobiol. J.*, **30**: 593–599.
- Zhao K., Penttinen P., Guan T., Xiao J., Chen Q., Xu J., Lindström K., Zhang L., Zhang X., and Strobel G.A., (2011) The Diversity and Anti-Microbial Activity of Endophytic Actinomycetes Isolated from Medicinal Plants in Panxi Plateau, China, *Curr. Microbiol.*, **62**: 182–190.
- Zhao J., Xue Q.-h., Niu G.-g., Xue L., Shen G.-h., and Du J.-z., (2013) Extracellular enzyme production and fungal mycelia degradation of antagonistic *Streptomyces* induced by fungal mycelia preparation of cucurbit plant pathogens, *Ann. Microbiol.*, **63**: 809–812.

Références

- Zhao K., Penttinen P., Zhang X., Ao X., Liu M., Yu X., and Chen Q., (2014) Maize rhizosphere in Sichuan, China, hosts plant growth promoting *Burkholderia cepacia* with phosphate solubilizing and antifungal abilities, ***Microbiol. Res.***, **169**: 76–82.
- Zheng M., Shi J., Shi J., Wang Q., and Li Y., (2013) Antimicrobial effects of volatiles produced by two antagonistic *Bacillus* strains on the anthracnose pathogen in postharvest mangos, ***Biological Control***, **65**: 200–206.
- Zhou X.G., Wu F.Z., and Xiang W.S., (2014) Syringic acid inhibited cucumber seedling growth and changed rhizosphere microbial communities, ***Plant soil Environ.***, **60**: 158–164.
- Ziedan E.H., Farrag E.S., El-Mohamedy R.S., and Abd Alla M.A., (2010) *Streptomyces alni* as a biocontrol agent to root-rot of grapevine and increasing their efficiency by biofertilisers inocula, ***Archives of Phytopath. Plant Protec.***, **43**: 634–646.
- Zitouni A., Lamari L., Boudjella H., Badji B., Sabaou N., Gaouar A., Mathieu F., Lebrihi A., and Labeda D.P., (2004) *Saccharothrix algeriensis* sp.nov., isolated from Saharan soil, ***Int J Syst Evol Microbiol.***, **54**: 1377–1381.
- Zitouni A., Boudjella H., Lamari L., Badji B., Mathieu F., Lebrihi A., and Sabaou N., (2005) *Nocardioopsis* and *Saccharothrix* genera in Saharan soils in Algeria : isolation, biological activities and partial characterization of antibiotics, ***Res. Microbiol.***, **15**: 6984–993.
- Zucconi F., Forte M., and Monac A., and Beritodi M., (1981) Biological evaluation of compost maturity, ***Biocycle***, **22**: 27–29.

Purification and Biochemical Characterization of a Highly Thermostable Bacteriocin Isolated from *Brevibacillus brevis* Strain GM100

Mouloud GHADBANE,^{1,2,†} Daoud HARZALLAH,¹ Atef Ibn LARIBI,³
Bassem JAOUADI,⁴ and Hani BELHADJ¹

¹Laboratory of Applied Microbiology, Department of Microbiology, Faculty of Natural and Life Sciences, University Ferhat Abbas, Setif 19000, Algeria

²Laboratory of Plant Biotechnology, Department of Natural and Life Sciences, Faculty of Sciences, University of M'sila, PO Box 166, Chebilila, M'sila 28000, Algeria

³Postharvest Technology Center, Valencian Institute for Agricultural Research, 46113 Moncada, Valence, Spain

⁴Laboratory of Microorganisms and Biomolecules, Centre of Biotechnology of Sfax, University of Sfax, Road of Sidi Mansour Km 6, P.O. Box 1177, Sfax 3018, Tunisia

Received September 5, 2012; Accepted October 11, 2012; Online Publication, January 7, 2013

[doi:10.1271/bbb.120681]

A bacteriocin-producing (11,000 AU mL⁻¹) strain was isolated from the rhizosphere of healthy Algerian plants *Ononis angustissima* Lam., and identified as *Brevibacillus brevis* strain GM100. The bacteriocin, called Bac-GM100, was purified to homogeneity from the culture supernatant, and, based on MALDI-TOF/MS analysis, was a monomer protein with a molecular mass of 4375.66 Da. The 21 N-terminal residues of Bac-GM100 displayed 65% homology with thurincin H from *Bacillus thuringiensis*. Bac-GM100 was extremely heat-stable (20 min at 120 °C), and was stable within a pH range of 3–10. It proved sensitive to various proteases, which demonstrated its protein nature. It was also found to display a bactericidal mode of action against gram-negative (*Salmonella enteric* ATCC 43972, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 49189, and *Agrobacterium tumefaciens* C58) and gram-positive (*Enterococcus faecalis* ENSAIA 631 and *Staphylococcus aureus* ATCC 6538) bacteria, and a fungistatic mode of action against the pathogenic fungus *Candida tropicalis* R2 CIP 203.

Key words: *Brevibacillus brevis*; bacteriocin; purification; thermostability; bactericidal and fungistatic mode of action

The rapid rise and spread of multi-resistant microbial pathogens has forced a consideration of alternative methods of combating infection. Biological control of infectious diseases, a new emerging biological tool, offers a powerful alternative to conventional synthetic chemicals in human and animal health management as well as in agricultural and food biotechnology.¹⁾ However, microbes produce an extraordinary array of microbial defense systems. These include broad-spectrum classical antibiotics, metabolic by-products (organic acids), lytic agents (lysozymes), numerous proteinaceous exotoxins, and bacteriocins.^{2,3)} In the microbial world, antimicrobial peptides are an important part of the defense system of bacteria, and they are referred to

as bacteriocins. Traditional medicinal antibiotics are also produced by some bacteria, but these and bacteriocins should be considered different antimicrobial compounds. An important criterion of being a bacteriocin is that bacteriocins are ribosomally synthesized, while antibiotics are made by multi-enzyme complexes. Most bacteriocins kill a narrow spectrum of bacteria as compared to antibiotics. Moreover, most bacteriocins are more potent against their target bacteria, while higher concentrations of antibiotics are needed to kill the target bacteria.⁴⁾ Bacteriocins are produced by both gram-positive and gram-negative bacteria, and the bacteriocins of gram-positive bacteria appear to show a broader range of susceptible organisms.⁵⁾ In fact, the use of bacteria as biocontrol agents has been extensively studied in the last few decades, and a wide array of bioactive metabolites, including bacteriocins, antibiotics, antifungals, antivirals, insecticides, herbicides, and anticancer agents, has been reported in the literature.^{6,7)} The efficiency of these biological agents has been demonstrated in several fields.^{8,9)}

Although gram-positive *Bacillus* species are often considered promising biocontrol agents as effective as gram-negative bacteria, they have received much less attention and are studied for their compounds production with potential uses in many fields.¹⁰⁾ Above all, those produced by gram-positive bacteria have attracted much more interest, particularly for their promising agricultural potential, as they can open new opportunities for the alleviation of various pathogenic conditions. In particular, *Bacillus* strains are known to be thermo-tolerant and spore-forming species that show rapid growth in liquid culture and are widely distributed in soils. Various *Bacillus* species produce bacteriocins. These include bacteriocin-like inhibitory substances (BLISs)¹¹⁾ produced by *B. cereus* ATCC 4579, coagulins¹²⁾ produced by *B. coagulans*, and bacthuricin F4,¹³⁾ entomocin 110,¹⁴⁾ thuricin 17 (T17)¹⁵⁾ produced by *B. thuringiensis*. However, and despite their promising

[†] To whom correspondence should be addressed. Fax: +213-36-90-38-79; E-mail: mouloud.ghadbane@yahoo.fr

Abbreviations: AU, activity unit; BSA, bovine serum albumin; CFUs, colony forming units; FPLC, fast protein liquid chromatography; IPTG, isopropyl-thio- β -D-galactopyranoside; LB medium, Luria-Bertani medium; MALDI-TOF/MS, matrix assisted laser desorption ionization-time of flight/mass spectrometry; O.D, optical density; SDS-PAGE, sodium dodecyl sulphate-polyacrylamide gel electrophoresis

properties as potential antibacterial agents, only a few *Bacillus* bacteriocins have been characterized to date. In addition, *B. subtilis* is known to produce many antimicrobial peptide substances, such as bacilysin¹⁶⁾ and subtilisin A.¹⁷⁾ Iturine A, a mixture of homologous cyclic peptides (A₁ through A₈), was also obtained from *B. subtilis*.¹⁸⁾ It has been found that iturine, secreting *B. subtilis* NB22, can be used as an agent to control soil-borne tomato diseases.¹⁹⁾ Furthermore, *Brevibacillus brevis* strains are considered probiotic agents both for human and for animal use.²⁰⁾ Several molecular methods are available for the exact identification of a given bacterial strain and, 16S rDNA gene sequencing is the first tool for this purpose.²¹⁾

During a search program for bioactive antibacterial and antifungal compounds from *Bacillus* with anti-*Agrobacterium* spp. activity, a new bacterium, GM100, was selected, and characterized by means of phenotypic and 16S rDNA gene sequencing. This paper describes the selection and identification of this bacterium. The purification and the biochemical characterization of a bacteriocin-like substance, Bac-GM100, from the supernatant culture of this new strain are reported. The paper also further explores the inhibitory spectrum and mode of action of Bac-GM100, and assesses its activity against gram-positive and gram-negative bacteria as well as fungi.

Materials and Methods

Enzymes and chemicals. Bovine serum albumin (BSA), trypsin, pepsin, papain, pronase E, and proteinase K were purchased from Sigma Chemical (St. Louis, MO). Sephadex G-75 and Mono Q FPLC were from Pharmacia (Pharmacia, Uppsala, Sweden). A protein assay kit was from Bio-Rad Laboratories (Hercules, CA). All other chemicals and reagents used were of analytical grade or the best grade commercially available, unless otherwise stated.

Bacterial strains and growth conditions. Strain GM100, exhibiting pronounced antagonistic activities, was isolated from the rhizosphere of healthy plants *Ononis angustissima* Lam. grown in the region of Biskra (in southern of Algeria) at a nursery. Five gram-positive bacteria (*Micrococcus luteus* LB 14110, *Staphylococcus aureus* ATCC 6538, *Listeria ivanovii* BUG 496, *Enterococcus faecalis* ENSAIA 631, and *E. faecalis* JH 2-2), and 17 gram-negative bacteria (*Escherichia coli* ATCC 8739, *Salmonella enterica* ATCC 43972, *S. typhimurium*, *Pseudomonas savastanoi* pv. *savastanoi*, *P. aeruginosa* ATCC 49189, *A. tumefaciens* S56, *A. tumefaciens* CIP 497-74, *A. tumefaciens* CIP 111-78, *A. tumefaciens* ATCC 23308^T, *A. tumefaciens* CFBP 6625, *A. tumefaciens* NCPPB 925, *A. tumefaciens* RV3, *A. tumefaciens* C58, *A. tumefaciens* O363, *A. rhizogenes* CFBP 2408^T, *A. larrymoorei* AF3.44, and *A. vitis* CFBP 2678^T) were used as indicator microorganisms in the antibacterial activity assays. Antifungal activity was determined against the *Fusarium* sp. and *Candida tropicalis* R2 CIP 203.

Bac-GM100 from *Brevibacillus brevis* strain GM100 was produced at 30 °C for 48 h in an orbital incubator with shaking at 250 rpm, using a modified Luria-Bertani (LB) medium (in g L⁻¹): peptone, 15; yeast extract, 3; and NaCl, 2.5 (pH 7.4), supplemented with (in g L⁻¹): glucose, 7; K₂HPO₄, 1; KH₂PO₄, 1; and MgSO₄·7H₂O, 1). To measure antibacterial activities, indicator microorganisms were grown overnight in LB medium (pH 7.2) under aerobic conditions at 30 °C for the *A. tumefaciens* strains, *A. rhizogenes*, *P. savastanoi* pv. *Savastanoi*, *P. aeruginosa* ATCC 49189, *E. coli* ATCC 39, and *Xanthomonas compestris*, and aerobically at 37 °C for *E. coli* ATCC 8739 and *S. aureus* ATCC 6538. To determine antifungal activities, *Fusarium* sp. was grown in Potato Dextrose Agar (PDA) for 7 d at 30 °C. Spores were collected in sterile distilled water and then concentrated to produce a suspension of approximately 10⁴ spores mL⁻¹. *C. tropicalis* R2 CIP 203 was grown in YP10 medium containing (in g L⁻¹):

peptone, 15; yeast extract, 5; and glucose, 10; supplemented with 15 mL of adenine solution (2 g L⁻¹) at 30 °C for 24 h in an orbital incubator with shaking at 200 rpm. Strain GM100 was maintained as frozen stock at -80 °C in LB broth containing 20% (v/v) glycerol. Before experimental use, the cultures were propagated twice in LB medium at 30 °C for 12 h. The transfer inoculum was 1% (v/v).

Identification of the *Bacillus* strain. The strain was examined for gram reaction, cell shape, oxidase and catalase reactions, motility, endospore formation, and oxygen relationships. An API 50 CH strip (bioMérieux, Marcy-l'Etoile, France) was used to investigate the physiological and biochemical characteristics of strain GM100 in accordance with the instructions of the manufacturer. The 16S rRNA gene was amplified by polymerase chain reaction (PCR) using two universal primers: forward, 5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3', and reverse, 5'-AAGGAGGTGATCCAAGCC-3', designed on the basis of positions 8 to 27 and 1,541 to 1,525 respectively. These are conserved zones within the rRNA operon of *E. coli*.²¹⁾ The Genomic DNA of strain GM100 was used as template for PCR amplification (35 cycles, 94 °C for 30 s denaturation, 60 °C for 1 min primer annealing, and 72 °C for 1.5 min extension). The amplified approximately 1.5-kb PCR product was cloned in pGEM-T Easy vector (Promega, Madison, WI), to obtain pGM100-16S plasmid (this study). *E. coli* DH5 α (F⁻supE44 Φ 80 δ lacZ Δ M15 Δ (lacZYA-argF) U169 endA1 recA1 hsdR17 (r_k⁻, m_k⁺) deoR thi-1 λ ⁻ gyrA96 relA1) (Invitrogen Life Technologies) was used as host strain. All recombinant clones of *E. coli* were grown in LB broth medium with the addition of ampicillin, isopropyl-thio- β -D-galactopyranoside (IPTG), and X-gal for screening. DNA electrophoresis, DNA purification, restriction, ligation, and transformation were all performed by a method previously described by Sambrook *et al.*²²⁾

DNA sequencing and phylogenetic analysis. The nucleotide sequence of the 16S rRNA gene was determined on both strands using a BigDye[®] Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit and an automated DNA sequencer ABI Prism[®] 3100-Avant Genetic Analyser (Applied Biosystems). 16S rDNA sequence analysis was performed by means of the BLAST program (www.ncbi.nlm.nih.gov/blast). Phylogenetic and molecular evolutionary analyses were conducted by means of molecular evolutionary genetics analysis (MEGA) software version 4.1. Distances and clustering were calculated by the neighbor-joining method. Bootstrap analysis was used to evaluate the tree topology of the neighbor-joining data by performing 100 re-samplings.²³⁾

Biological assay of antimicrobial activities. The ability of *Brevibacillus brevis* strain GM100 to produce diffusible metabolites was assessed by Agar Well Diffusion Assay.²⁴⁾ The diameters of the inhibition zones were measured. The bacteriocin samples to be spotted were serially diluted two-fold, and the reciprocal of the highest dilution showing inhibition was considered as one arbitrary activity unit (AU). Uninoculated culture broth was used as negative control.

Bac-GM100 purification procedure. Five hundred mL of modified LB culture medium, obtained after 48 h of cultivation, was centrifuged for 30 min at 10,000 \times g to remove microbial cells. The supernatant containing extracellular active compounds was retained as crude bacteriocin preparation for subsequent assays. The crude extract was precipitated with ammonium sulphate at a concentration from 40–60%. The pellet obtained after centrifugation for 30 min at 10,000 \times g was dissolved in a minimum of 25 mm Tris-HCl at pH 8 (buffer A) and dialyzed overnight against repeated changes of the same buffer using benzoylated membranes with a molecular weight cut-off of 1200 Da (Sigma Chemical, St. Louis, MO). The clear supernatant was incubated for 2 h at 90 °C. After rapid cooling, insoluble denatured proteins were removed by centrifugation for 30 min at 10,000 \times g. The protein solution, designated fraction I, was loaded on a 2.5 \times 50 cm Sephadex G-75 column equilibrated with buffer A. Elution of the protein was done with the same buffer at rate of 45 mL h⁻¹. The protein concentration was monitored at 280 nm. Fractions were tested for bacteriocin activity. The active fraction, designated fraction II, was collected and injected into a Mono Q column (2.6 \times 20 cm) attached to an FPLC system previously equilibrated with buffer A. After washing of the column, no bacteriocin activity was detected in the washing

solution. The adsorbed material was eluted with a linear NaCl gradient (500 mL of 0–500 mm in buffer A) at a rate of 40 mL h⁻¹. Fractions were collected automatically by the system and assayed for antagonistic activity using *A. tumefaciens* C58 as indicator bacterium. Fractions containing active Bac-GM100 that eluted between 180 and 220 mm NaCl (fraction III) were collected and stored at -20 °C in glycerol 20% (v/v) solution for further analysis.

Molecular mass determination, mass spectrometry, and amino acid sequencing. The active fraction eluted after each purification step was pooled and subjected to sodium dodecyl sulphate-polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) using 5% stacking gel and 15% resolving gel, as reported by Laemmli.²⁵ The protein concentration was measured as described by Bradford.²⁶ Protein bands were visualized by Coomassie Brilliant Blue R-250 staining. Unstained #BM201 Low Range Protein Marker (Bio Basic, Markham, Canada) was used as standard (in kDa): BSA, 66; ovalbumin, 45; porcine pepsin, 35; triosephosphate isomerase, 27; trypsin inhibitor, 20; lysozyme, 14.4; parathyroid (1–84), 9.5; aprotinin, 6.5; and parathyroid (1–34), 4.5. Zymogram analysis was performed as previously described.²⁷ The molecular mass of the purified Bac-GM100 was determined by MALDI-TOF/MS using a Voyager DE-RP instrument (Applied Biosystems, Framingham, MA). To determine the N-terminal sequence, the protein band from the SDS gel was transferred to a Problott membrane (Applied Biosystems, Foster City, CA). Automated Edman protein degradation was performed with a protein sequencer (Protein sequencer ABI Procise 492/610A, Applied Biosystems).

Effects of pH and temperature on the Bac-GM100 bacteriocin. The pure bacteriocin Bac-GM100 (500 AU mL⁻¹) was resuspended in various buffer solutions at 50 mm, ranging from pH 2 to 11 (citrate for pH 2–6; phosphate for pH 7; Tris-HCl for pH 8–9, and glycine-NaOH for pH 9–11), and incubated for 48 h at 4 °C. The antimicrobial activity of Bac-GM100 was expressed in terms of AU mL⁻¹, and was compared with the untreated controls. The thermal stability of Bac-GM100 was monitored at various temperatures. Accordingly, Bac-GM100 was resuspended in 25 mm Tris-HCl buffer at pH 8, subjected to boiling temperatures (70, 80, 90, and 100 °C for 2 h), and autoclaved (120 °C, 20 min) prior to activity assay.

Antimicrobial activity and sensitivity to proteases, detergents, and organic solvents. In order to determine the biological nature of the antimicrobial activity produced by the strain GM100, 1 mL of cell-free supernatant was incubated for 3 h at 37 °C in the presence of 1 mg mL⁻¹ of catalase (Boehringer, Germany). The untreated bacteriocin-containing cell-free supernatant served as control. Sensitivity to proteolytic enzymes of antimicrobial compounds was investigated by the addition of trypsin, pepsin, papain, pronase E, and proteinase K at a final concentration of 1 mg mL⁻¹ to the culture supernatants of strain GM100 (30 °C, 48 h). The samples were incubated for 2 h at 37 °C, and immediately afterwards, residual activity was determined as described above. The detergents used were Tween 40, Tween 60, Triton X-100, SDS, and urea at final concentrations of 15% (w/v), and ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA) and phenylmethanesulfonyl fluoride (PMSF), which were added to the culture supernatants of strain GM100 (30 °C, 48 h) at a final concentration of 15% (v/v) and the reaction was incubated at 30 °C for 2 h. The culture supernatants of the strain GM100 (30 °C, 48 h) were mixed with various organic solvents of different Log *p* values (chloroform, butanol, isopropanol, ethyl acetate, and methanol) at a final concentration of 60% (v/v). After incubation for 1 h at room temperature, the organic solvent was evaporated in a vacuum concentrator, and residual antimicrobial activity was determined.

Stability of the purified Bac-GM100 bacteriocin. The effect of detergent on bacteriocin activity and stability was investigated. This involved the incubation of pure Bac-GM100 in the presence of a broad range of detergents, (Tween 40, Tween 60, Triton X-100, SDS, and urea) at a final concentration of 15%. In this case, bacteriocin Bac-GM100, which was resuspended in buffer A without any denaturing agents, was used as control. Each sample and each control was incubated at 37 °C for 48 h. Activity was assayed using *A. tumefaciens* C58. The purified Bac-GM100 (50 AU mL⁻¹) was also mixed with

various organic solvents with different Log *p* values (chloroform, butanol, isopropanol, ethyl acetate, and methanol) at a final concentration of 60% (v/v). After incubation for 72 h at room temperature, the organic solvent was evaporated in a vacuum concentrator and residual antimicrobial activity was determined. The antimicrobial activity of Bac-GM100, which was resuspended in buffer A without added solvents, was used as control. To determine the sensitivity of a number of enzymes on active Bac-GM100, a variety of proteolytic enzymes were added at a final concentration of 1 mg mL⁻¹. All the enzymes were dissolved in buffers, as recommended by the provider company. The proteases used were trypsin, pepsin, papain, pronase E, and proteinase K. Following 48 h of incubation at 37 °C, enzyme activity was stopped by heating at 100 °C for 5 min, and the remaining bacteriocin activity was measured in AU mL⁻¹. Untreated bacteriocin plus buffers, buffers alone, and the enzyme solutions were used as controls.

Inhibitory spectrum and mode of action of Bac-GM100. The inhibitory spectrum was checked by Agar Well Diffusion Assay.²⁴ Pure bacteriocin, Bac-GM100 (500 AU mL⁻¹), was added to 200 mL of LB culture of *A. tumefaciens* C58 and 200 mL of YP10 of *C. tropicalis* R2 CIP 203 at the early exponential phase (10⁷ CFU mL⁻¹). The two indicator microorganisms growing in LB (*A. tumefaciens* C58) and YP10 (*C. tropicalis* R2 CIP 203) medium in the absence of bacteriocin were used as controls. Changes in the turbidity of the cultures were recorded at an optical density (O.D) of 600 nm, and the number of viable cells (Colony forming units CFU mL⁻¹) was determined by plating the samples on LB or YP10 agar at various time intervals.

Phytotoxicity effect of Bac-GM100 on tomato and muskmelon. Phytotoxicity was assessed by determination of the germination index at 2 times, 72–96 h for tomato (*Lycopersicon esculentum*) and 30–60 h for muskmelon (*Cucumis melo*) by the standard method of Zucchini *et al.*²⁸ Tomato and muskmelon seeds were treated with water (negative control), sodium hypochlorite 10% (w/v) (positive control), and two different doses of Bac-GM100 (50 and 500 AU mL⁻¹). The post-germinated seeds were transplanted in a sterile potting mix as described below. Traditional seed vigor biomarkers were determined based on the total number of seedlings that emerged fully, shoot height, shoot weight, and root length.

Statistical analysis. The trial was established according to a randomized plots experimental design with three replicates, including 30 plants in each replicate. The data were subjected to analysis of variance using the Statistical Package for the Social Sciences (SPSS V.11; SPSS, Chicago, IL). Mean values among treatments were compared by Duncan's multiple range test at the 5% (*p* = 0.05) level of significance.

Nucleotide accession number. The 16S rRNA nucleotide sequence data for newly isolated *Brevibacillus brevis* strain GM100 was submitted to the NCBI GenBank database, and was assigned accession no. JX524820.

Results and Discussion

Identification and molecular phylogeny of the microorganism

Identification of the newly isolated bacterium (GM100) was based on both phenotypic and molecular methods. Morphological, biochemical, and physiological characteristics, by the methods described in Bergey's *Manual of Systematic Bacteriology*,²⁹ indicated that the isolated strain appeared in a bacillus form, aerobic, endospore-forming, gram-positive, catalase-positive, oxidase-positive, and motile. The carbohydrate profile of the isolate was also investigated using API 50 CH strips. The results indicated that while the microorganism could utilize D-glucose, D-fructose, maltose, glycerol, D-mannitol, and D-ribose, could not utilize

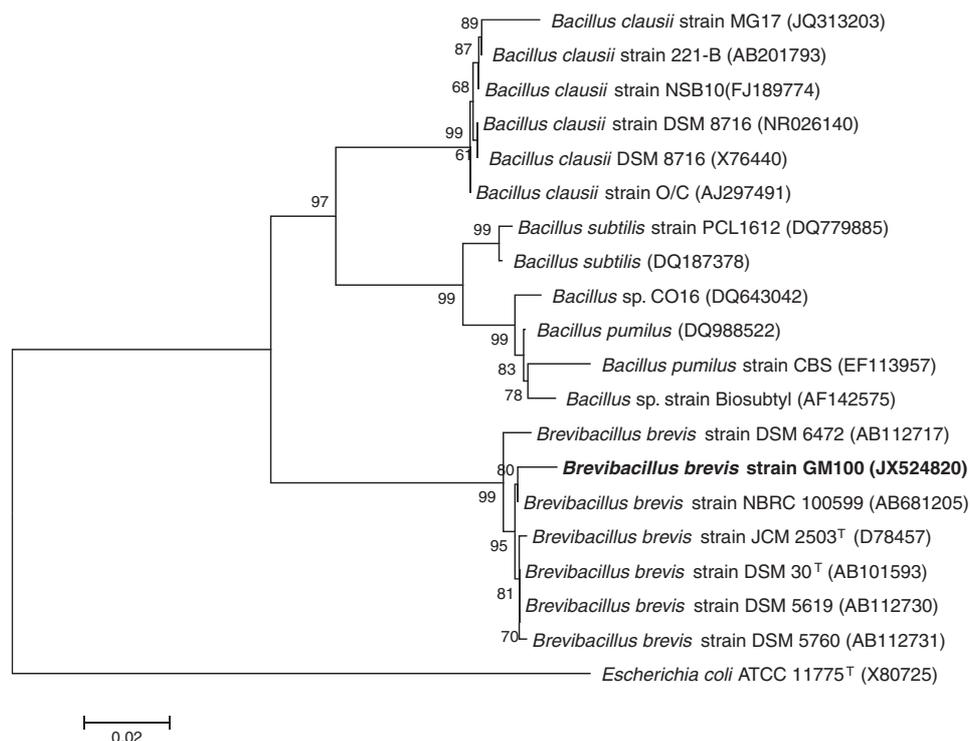


Fig. 1. Phylogenetic Tree Based on 16S rRNA Gene Sequences Showing the Position of Strain GM100 within the Radiation of the Genus *Bacillus*. The sequence of *E. coli* ATCC 11775^T (X80725) was chosen arbitrarily as outgroup. Bar, 0.02 nt substitutions per base. Numbers at nodes (>50%) indicate support for the internal branches within the tree obtained by bootstrap analysis (percentages of 100 bootstraps). NCBI accession numbers are presented in parentheses.

D-mannose, D-tagatose, L-arabinose, *myo*-inositol, raffinose, erythritol, or adonitol. All the data obtained with regard to the physiological and biochemical properties of the isolate, therefore, strongly confirmed that strain GM100 belonged to the *Bacillus* genus.

The 16S rRNA gene sequence obtained was submitted to GenBank BLAST search analysis, which yielded a strong homology, of up to 98%, with those of several cultivated strains of *Brevibacillus*. The most similar *Brevibacillus* strains identified by the BLAST analysis were *Brevibacillus brevis* strain NBRC 100599 (accession no. AB681205) and *Brevibacillus brevis* strain DSM 6472 (accession no. AB112717). These sequences were imported into the MEGA software and aligned. A phylogenetic tree was constructed (Fig. 1), and the findings further confirmed that strain GM100 (accession no. JX524820) was closely related to those of the *Brevibacillus* strains. In summary, all the results obtained strongly suggested that this isolate ought to be identified as *Brevibacillus brevis* strain GM100.

Effects of proteases, detergents, and organic solvents on antimicrobial activity

Enzymatic tests showed that the antimicrobial activity against three tested indicator microorganisms, *A. tumefaciens* C58, *L. ivanovii* BUG 496, and *C. tropicalis* R2 CIP 203, of the supernatant culture of the strain GM100 was not affected by the addition of catalase, indicating that the growth inhibition observed was not due to hydrogen peroxide production. In contrast, treatment with the proteolytic enzymes (trypsin, pepsin, papain, pronase E, and proteinase K) caused complete inactivation of the antimicrobial compounds, which thus identified them as proteinaceous substances. Exposure

to detergents caused about 25% inactivation of the antimicrobial activity for the SDS and urea agents, and about 10% for the other surfactants tested (Tween 40, Tween 60, Triton X-100, EDTA, and PMSF). As for treatment with the organic solvents (ethyl acetate, methanol, and isopropanol), no significant alteration of antimicrobial activity produced by the strain GM100 was observed.

Bac-GM100 purification and molecular weight determination

Contaminating proteins in the cell-free supernatant were removed, and then the Bac-GM100 in the supernatant was concentrated by ammonium sulphate precipitation (40–60%, w/v) and heat treated for 2 h at 90 °C (fraction I), followed by Sephadex G-75 column chromatography (fraction II). In order to obtain a highly purified protein, fraction II was subjected to ion exchange chromatography. At this step, one major absorbance symmetrical peak, fraction III, was eluted at a 200-mm salt gradient. The purification process is summarized in Table 1. Bacteriocin purity was estimated to be about 41-fold greater than that of the crude extract. The presence of the inhibition zone determined after 24 h of incubation under appropriate conditions revealed that the purified bacteriocin Bac-GM100 exhibited a broad inhibitory spectrum against all the pathogenic indicator strains of the gram-positive and gram-negative bacteria tested (Table 2). The yield of the purified bacteriocin preparation was about 23% based on total activity, and the specific activity was 84,013 AU mg⁻¹. Electrophoresis under denaturing conditions (SDS-PAGE) revealed a single monomeric protein band at a molecular mass estimated to be 4.5 kDa (Fig. 2A). At

Table 1. Flow Sheet for the Purification of Bacteriocin Bac-GM100 from *Brevibacillus brevis* Strain GM100

Purification step	Total activity (AU) ^{a,*} × 10 ³	Total protein (mg) ^{b,*}	Specific activity (AU mg ⁻¹)	Yield (%)	Purification (factor)
Crude extract	5,500.00 ± 4.75	2,678.17 ± 422	2,053	100	1
(NH ₄) ₂ SO ₄ Fractionation (40–60%)	4,125.18 ± 3.49	223.26 ± 76	18,477	75	9
Heat treatment (2 h at 90 °C)	3,846.52 ± 2.44	62.48 ± 10	58,743	61	28
Sephadex G-75	2,165.10 ± 1.34	32.95 ± 7	65,708	39	32
Mono Q Sepharose FPLC	1,269.44 ± 1.11	15.11 ± 3	84,013	23	41

^aAntibacterial activity in arbitrary units (AU) was assayed by Agar Well Diffusion Assay using *A. tumefaciens* C58 as indicator strain.

^bAmounts of protein were estimated by the Bradford method.²⁶⁾

*Values represent means of three replicates, and ± standard errors are reported.

Table 2. Antagonistic Spectrum of Bac-GM100

Indicator strains	Diameter of inhibition zone (mm) ^b		
Gram-positive bacteria	<i>Micrococcus luteus</i> LB 14110	18 ± 1.6	
	<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 6538	30 ± 3.0	
	<i>Listeria ivanovii</i> BUG 496	31 ± 3.5	
	<i>Enterococcus faecalis</i> ENSAIA 631	33 ± 3.3	
	<i>Enterococcus faecalis</i> JH 2-2	25 ± 2.0	
Gram-negative bacteria	<i>Escherichia coli</i> ATCC 8739	14 ± 1.1	
	<i>Salmonella enterica</i> ATCC 43972	36 ± 3.8	
	<i>Salmonella typhimurium</i>	20 ± 2.0	
	<i>Pseudomonas savastanoi</i> pv. <i>savastanoi</i>	19 ± 1.8	
	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 49189	34 ± 3.5	
	<i>Agrobacterium tumefaciens</i> /Biovar 1 complex ^a	S56 (genomovar G1)	24 ± 2.0
		CIP 497-74 (genomovar G2)	23 ± 2.0
CIP 111-78 (genomovar G3)		25 ± 2.0	
ATCC 23308 ^T (genomovar G4)		30 ± 3.5	
CFBP 6625 (genomovar G5)		23 ± 2.0	
NCPB 925 (genomovar G6)		20 ± 2.0	
RV3 (genomovar G7)		22 ± 2.0	
C58 (genomovar G8)		35 ± 3.5	
O363 (genomovar G9)		25 ± 2.0	
<i>Agrobacterium rhizogenes</i> CFBP 2408 ^T		15 ± 1.5	
<i>Agrobacterium larrymoorei</i> AF3.44		18 ± 1.6	
<i>Agrobacterium vitis</i> CFBP 2678 ^T	25 ± 2.0		
Fungi	<i>Candida tropicalis</i> R2 CIP 203	35 ± 3.6	
	<i>Fusarium</i> sp.	21 ± 2.0	

The inhibitory level was estimated by measuring the diameter of the inhibition zone of the indicator strain.

ATCC, American Type Culture Collection (Manassas, VA)

CIP, Collection of the Pasteur Institute (France)

CFBP, French Collection of Bacterial Phytopathogenes, INRA (Angers, France)

^aThe taxon *Agrobacterium tumefaciens* assimilated to the biovar 1 of *Agrobacterium* spp. is a complex of at least nine different genomic species or genomovars.⁴⁷⁾

^bValues represent means of three replicates, and ± standard errors are reported.

4.5 kDa, the antibacterial activity of this single band protein was confirmed by overlaying it on indicator strain *A. tumefaciens* C58, which revealed a growth inhibitory zone at the position viewed in the stained gel (Fig. 2B). Mass spectrometry analysis indicated that Bac-GM100 had a molecular mass of 4,375.66 Da (Fig. 2C). The purified Bac-GM100 bacteriocin exhibited single symmetrical elution peaks corresponding to a protein of nearly 4.5 kDa according to gel filtration chromatography (Fig. 2D).

N-Terminal sequence of purified Bac-GM100

The first 21 N-terminal amino acid residues of the blotted purified antimicrobial peptide Bac-GM100 from *Brevibacillus brevis* strain GM100 were determined to be DWTFANWSCLVCDDCSVNLTY. This sequence was subjected to comparison with protein sequences in the GenBank non-redundant nucleotide database (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) using the BLASTP and tBlastn search programs. It was further subjected to comparison through the Swiss-Prot database (<http://www.expasy.ch/sprot/>) using BLASTP search software. It was found that this bacteriocin contained a unique sequence, suggests that it is of a novel compound. It showed 65% homology with bacteriocin thurincin H from *B. thuringiensis* SF361 (accession no. 2LBZ_A).

Biochemical properties of purified bacteriocin

In order to determine the thermostability of Bac-GM100, inhibitory activity was examined following exposure to a variety of temperatures. No activity loss was detected following 2 h of exposure to a temperature range of up to 100 °C or 20 min of treatment at 120 °C for autoclaving. Moreover, low temperature storage (–20 and 4 °C for 72 h), did not appear to alter the activity of the purified protein. Bac-GM100 retained its biological activity within pH 3–10, but activity was drastically reduced at pH 12. In contrast, bacthuristicin F4 from *B. thuringiensis* preserved only 20% of its activity after incubation at 90 °C for 30 min.¹³⁾ There are reports in the literature that many bacteriocins lose their heat stability

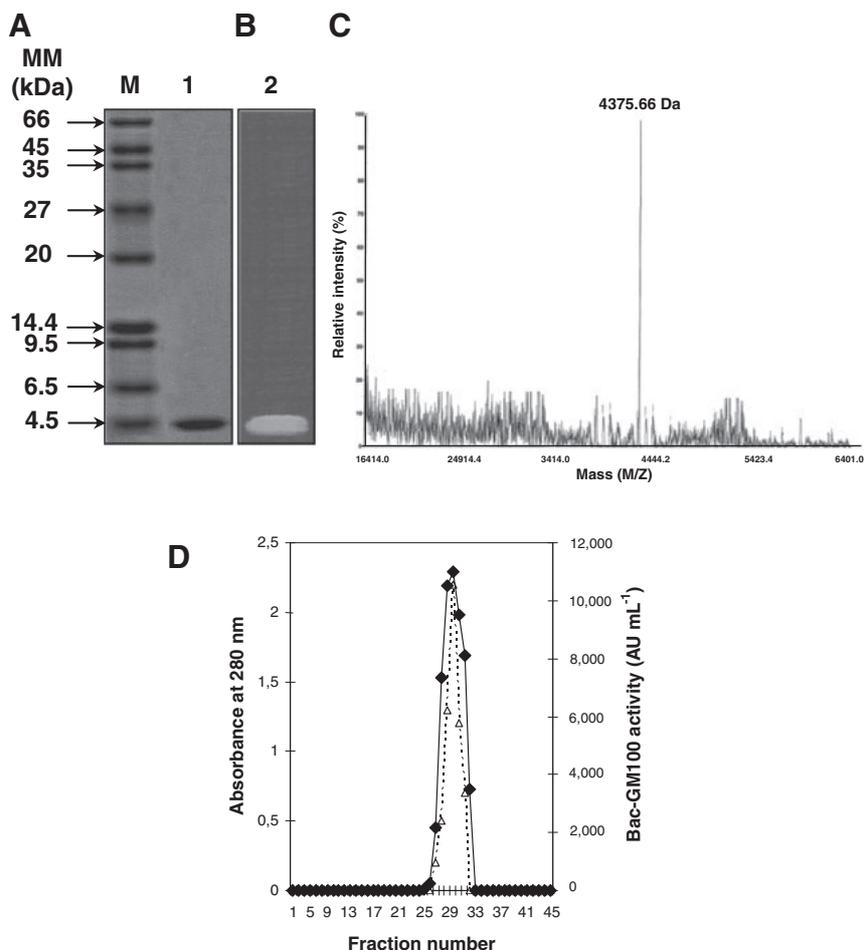


Fig. 2. Chromatography on Sephadex G-75, Electrophoretic, Zymograms, and Mass Spectrometry Analyses of the Purified Bac-GM100.

Lane M, Low Range Protein Marker (Bio Basic, Markham, Canada). Lane 1, purified Bac-GM100 (30 mg of protein) (A). Lane 2, portion of the renaturated SDS-PAGE, overlaid on *A. tumefaciens* C58 as indicator strain (B). MALDI-TOF spectrum of 30 pmol purified Bac-GM100. The mass spectrum showed a series of multiply protonated molecular ions. The molecular mass of Bac-GM100 was found to be 4,375.66 Da (C). Elution and activity of the bacteriocin (D).

upon purification.¹³⁾ In contrast, purified Bac-GM100 retained its full heat stability, as has been reported for bacteriocin Bac 14B from *B. subtilis* strain 14B.³⁰⁾

Exposure to various detergents showed that only Tween 40 and Tween 60 eliminated the bacteriocin activity of Bac-GM100. Treatment with Triton X-100, SDS, and urea were, however, found to have no effect on the bacteriocin activity of Bac-GM100. Moreover, treatment with organic solvents (isopropanol, chloroform, and ethyl acetate) was found to have no significant alteration effect on the activity of Bac-GM100. Methanol and butanol, on the other hand, slightly affected the bacteriocin activity of Bac-GM100. When treated with various hydrolytic enzymes, purified bacteriocin Bac-GM100 was to undergo significant decreases in inhibitory action after treatment with proteases, showing that the bacteriocin has a proteinaceous nature. This bacteriocin activity was similar to that of bacthuricin F4 from *B. thuringiensis*¹³⁾ and Bac 14B from *B. subtilis* strain 14B.^{27,30)}

Inhibitory spectrum and mode of action of purified Bac-GM100

The addition the purified Bac-GM100 at 500 AU mL⁻¹ to cells of *A. tumefaciens* C58 (4 h old) and *C. tropicalis* R2 CIP 203 (8 h old) in the early

logarithmic growth phase resulted in a rapid decrease in the number of *A. tumefaciens* C58 viable cells (from 10⁷ CFU mL⁻¹ to less than 10² CFU mL⁻¹) over a period of 5 h (Fig. 3A). The optical density readings for this indicator microorganism remained constant after the addition of Bac-GM100. Our results indicate that the bacteriocin studied has a bactericidal effect against the *A. tumefaciens* C58 strain. As for *C. tropicalis* R2 CIP 203, the optical density readings were very similar in presence and the absence of Bac-GM100 (Fig. 3B), but, we noticed a decrease in the number of viable cells grown in the presence of bacteriocin GM100 at 42 h of growth. These data indicate that Bac-GM100 acts with a fungistatic effect against *C. tropicalis* R2 CIP 203 (Fig. 3B).

Bac-GM100 can be considered the second antimicrobial protein to show a spectrum of action that is particularly inhibitory against *Agrobacterium* spp. strains, which are responsible for the induction of neoplastic diseases, after bacteriocin Bac 14B from *B. subtilis* strain 14B, which shows a broad inhibitory spectrum of antagonistic activities against pathogenic indicator strains of gram-positive and negative bacteria.²⁷⁾ Purified bacteriocin Bac-GM100 exhibited a wide spectrum of inhibitory action. In fact, it inhibited both gram-positive and negative bacteria. The general mode

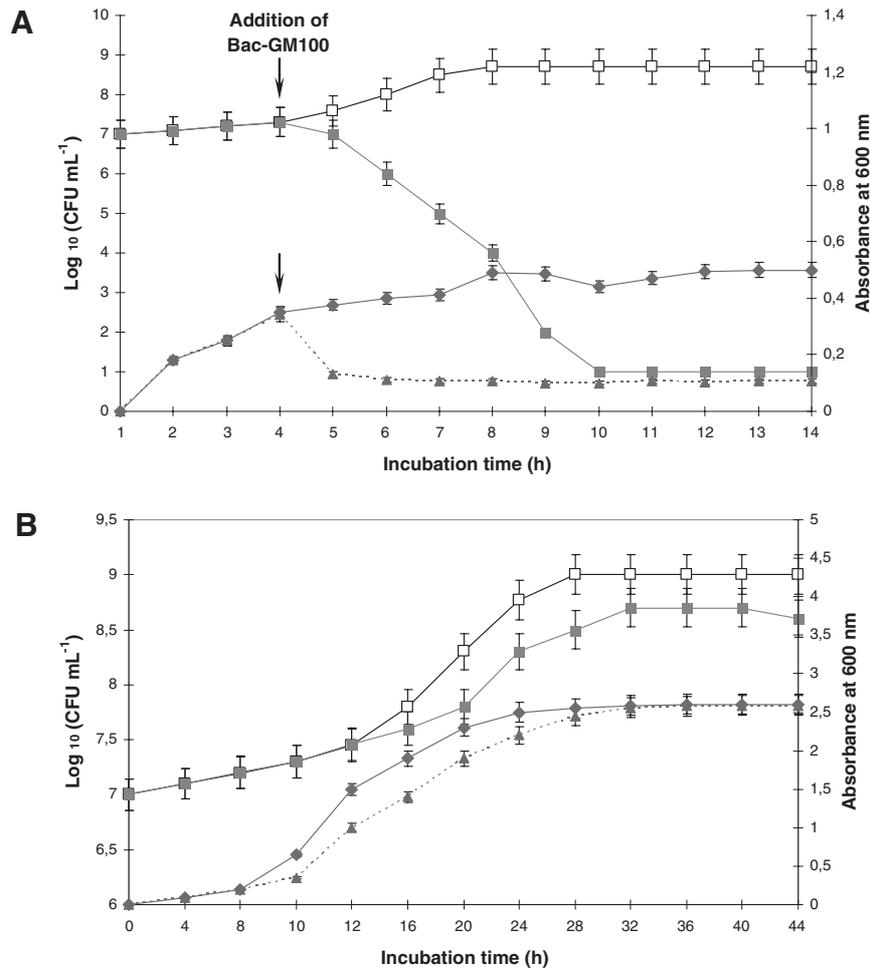


Fig. 3. Effect of Bac-GM100 on the Growth of *A. tumefaciens* C58.

Optical density at 600 nm in absence (□) and the presence (■) of Bac-GM100. Viable cell counts (CFU mL⁻¹) in absence (◆) and the presence (▲) of Bac-GM100 (A). Effect of Bac-GM100 on the growth of *C. tropicalis* R2 CIP 203. Optical density at 600 nm in the absence (◆) and the presence (▲) of Bac-GM100. Viable cell counts (CFU mL⁻¹) in the absence (□) and presence (■) of Bac-GM100 (B).

of action of bacteriocin has been reported to be bactericidal due to the pore-forming action of the cell membrane.^{31,32} Several large (>10 kDa) streptococcal antimicrobial proteins have a narrow spectrum of action.³³ The inhibitory spectrum of, for instance, dysgalactin (21 kDa) is fairly narrow, and is limited to strains of *Lancefield serogroups* A, C, and G. The range of organisms inhibited by SA-M57 (17 kDa), on the other hand, is unusual, consisting mainly of non-streptococcal gram-positive species, including *Micrococcus luteus*, *Lactococcus lactis*, and six species of *Listeria*, *B. megaterium*, and *S. simulans*. Stellalysin is another 29-kDa bacteriocin, with an inhibitory spectrum that includes *S. pyogenes*, *S. gordonii*, and *S. mutans*.³⁴ The present investigation of Bac-GM100 also indicated that it has a bactericidal effect on the indicator, *A. tumefaciens* C58, and functions as a fungistatic against *C. tropicalis* R2 CIP 203. Some bacteriocins, such as thoenicin, that have very limited spectra among tested lactic bacteria in spite of a small MW (7.13 kDa), are reported to be bactericidal on one strain and bacteriostatic on others.³⁵ However, a few bacteriocins have been reported to be active against gram-negative bacteria, and particularly against fungi.³⁶ Most of the bacteriocins described as antifungal agents from *Lactobacillus* are organic compounds or diketopiperazine derivatives of molecular masses lower than 1 kDa.³⁷ In

particular, Nisin (3.35 kDa) is a natural, toxicologically safe, antibacterial food preservative. It is regarded as natural because it is a polypeptide produced by certain strains of the food-grade lactic acid bacterium *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* during fermentation. It exhibits antimicrobial activity towards a wide range of gram-positive bacteria, and is particularly effective against spores. It shows little or no activity against gram-negative bacteria, yeasts, or moulds.³⁸ Cerein MRX1 (3.13 kDa), produced by *B. cereus* strains, shows a bactericidal mode of action against bacteria of concern in the food industry, such as species of *Bacillus* (including *B. cereus*, *B. coagulans*, *B. subtilis*, *B. pumilus*, and others) and *L. innocua*.³⁹ Brevicin AF01, produced by *B. brevis* AF01, isolated from a wheat field shows a bactericidal mode of action against several MRSA strains.⁴⁰ Thuricin 17 (3.16 kDa) is produced by the plant growth-promoting rhizobacterium strain *B. thuringiensis* NEB17, isolated from soybean root nodules in Quebec, Canada. It is active against *B. thuringiensis*, *B. cereus* strains, and related *Bacilli*, as well as gram-negative strain *E. coli* MM294 (pBS42),^{15,41} whereas, thurincin H (3.14 kDa), produced by *B. thuringiensis*, acts on *Bacillus*, *Listeria*, and *Carnobacterium*, but does not kill gram-negative bacteria.⁴² Bacteriocin ST15 (3.94 kDa) is a peptide produced by *E. mundtii* that exhibits a broad spectrum of antimicro-

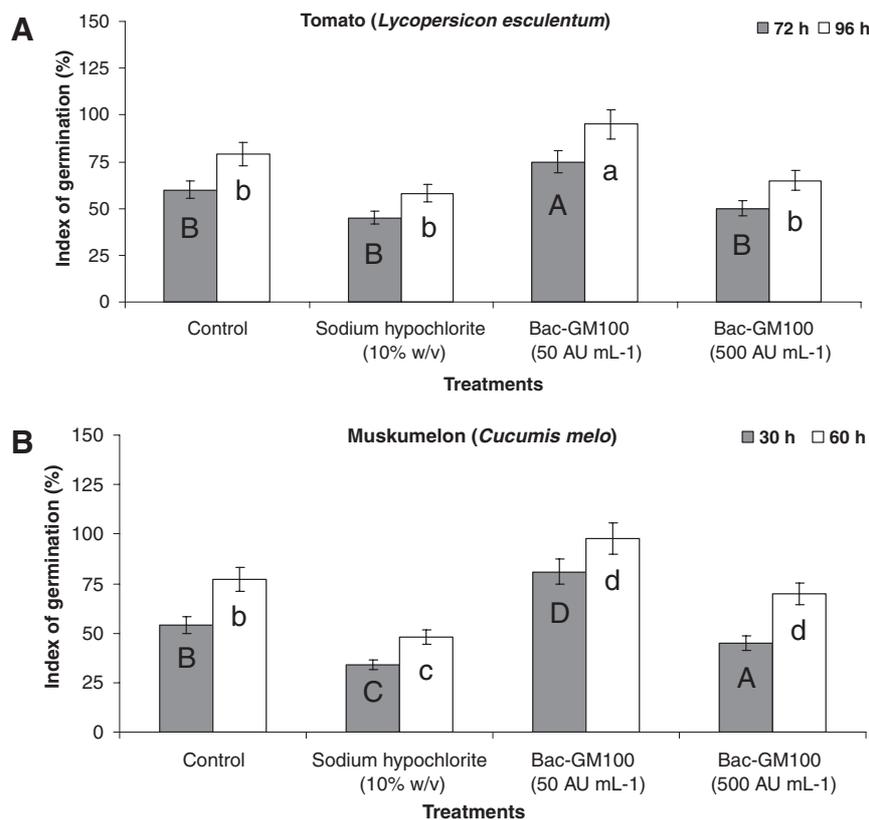


Fig. 4. Germination Indices of Tomato (*Lycopersicon esculentum*) (A) and Muskmelon (*Cucumis melo*) (B) Determined in Distilled Water (Control), Sodium Hypochlorite (10% w/v), and Bac-GM100 at Various Concentrations.

Duncan's test ($p = 0.05$) indicated that the histograms with different letters (a, A, b, B, c, C, d, D) are significantly different. Values are means of three independent experiments, and error bars indicate the standard deviation.

bial activity against gram-positive and negative bacteria.⁴³ Sakacin C2 (5.5 kDa) displayed broad antimicrobial activity not only against a larger range of LAB but also against many gram-positive and negative bacteria. The inhibitory spectra of known bacteriocins from *L. sakei* are quite narrow. For example, the inhibition spectrum of sakacin G appeared to be limited to *L. sakei* and *Pediococcus cerevisiae* of the tested strains, as far as LABs are concerned. Among three kinds of bacteriocins (sakacins P, 5X, and 5T) produced by *L. sakei* 5, only sakacin 5X inhibited many gram-positive beer-spoilage organisms, such as *L. brevis*, and *E. faecalis*, but their inhibitory activity towards gram-negative bacteria has not been determined yet, while sakacin P and sakacin 5T inhibited only of the two out of 13 LAB strains.⁴⁴ These behaviors clearly indicate that there is no relationship between the molecular size of bacteriocins and their spectra.

Phytotoxicity effect of Bac-GM100 on plant species

Seed germination of tomato and muskmelon was performed with two different concentrations of Bac-GM100 (50 and 500 AU mL⁻¹), and the germination ratios were compared to those obtained for seeds treated with water (negative control) and those treated with 10% (w/v) sodium hypochlorite (positive control). The results indicated that seed germination was strongly inhibited for the two species studied when treated with sodium hypochlorite and Bac-GM100 (500 AU mL⁻¹). Bac-GM100 (50 AU mL⁻¹) did not show any inhibitory effect on seed germination, and the two crops repre-

sented similar ratios of germination as compared to the control subjected to water treatment (Fig. 4). Application of Bac-GM100 (50 AU mL⁻¹) was observed to improve the germinative energy of the seeds and to entail no inhibitory effect on seed germination as compared to the control subjected to water treatment. The indices of germination at the half-period were 36 and 25 h for tomato (Fig. 4A) and muskmelon (Fig. 4B) respectively, significantly higher than for the negative controls (Fig. 4). The germinative energy yields obtained for treatment with Bac-GM100 (500 AU mL⁻¹) and sodium hypochlorite, on the other hand, were found to be lower than the optimum (ratio < 50%). The initial vigor response was measured using traditional agronomic parameters, germination percentage, root length, and shoot weight and height. The results indicated that the vigor response with respect to Bac-GM100 (50 AU mL⁻¹) was higher than those obtained for the other treatments (Fig. 5). Nevertheless, Bac-GM100 (500 AU mL⁻¹) has a negative effect on the vigor response of the seeds, bringing about a significant reduction in root length (Fig. 5A) as well as shoot height (Fig. 5B) and weight (Fig. 5C). These results are comparable to those obtained for sodium hypochlorite treatment, where the seed vigor biomarkers were drastically affected (data not shown).

The findings of the current study also indicate that the tomato and muskmelon seedlings treated with Bac-GM100 (50 AU mL⁻¹) showed higher and average germination rates as compared to the Bac-GM100 solution (500 AU mL⁻¹) and the control seedlings

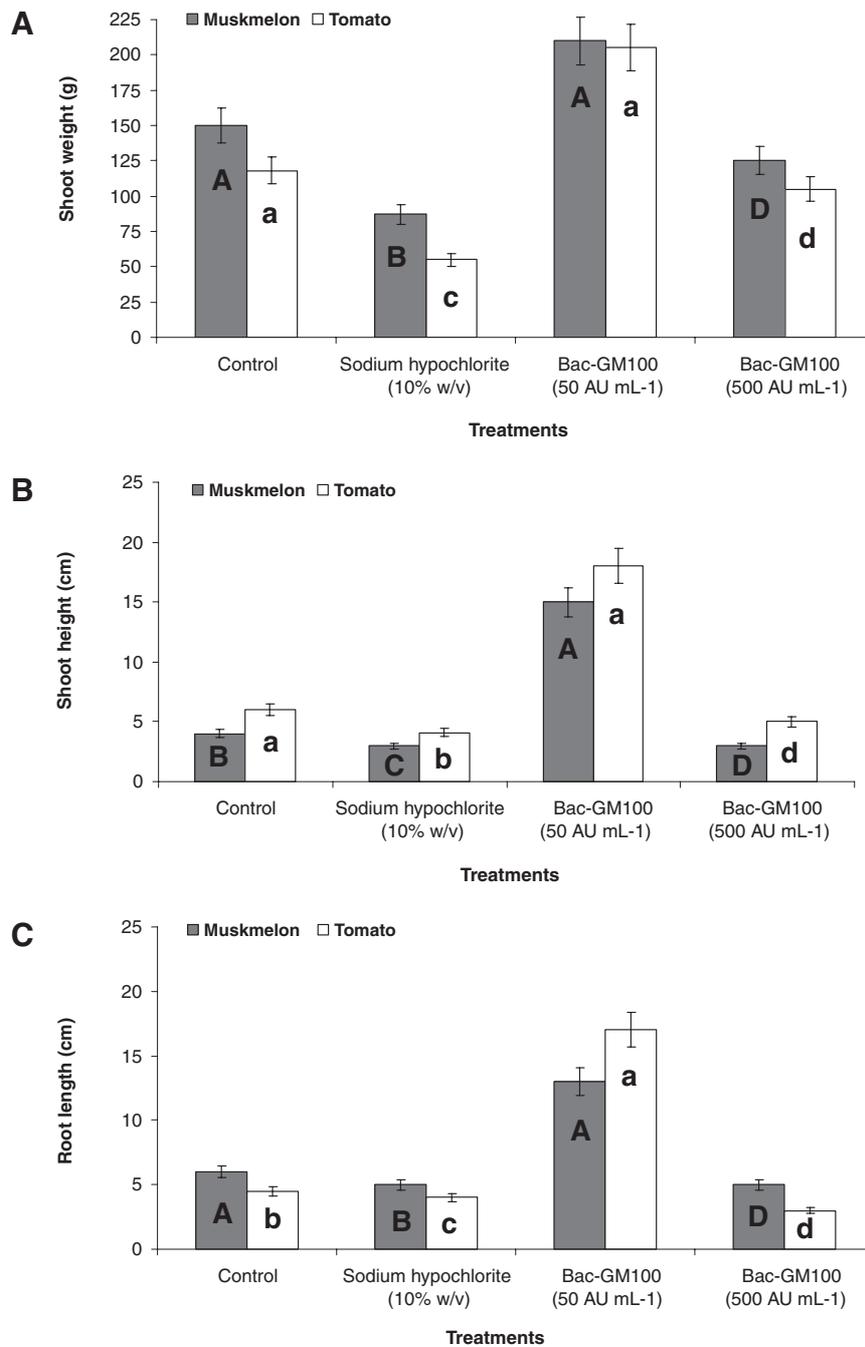


Fig. 5. Effects of the Germination with Distilled Water (Control), Sodium Hypochlorite (10% w/v), and Bac-GM100 at Concentrations of 50 and 500 AU mL⁻¹ on Shoot Weight (A), Shoot Height (B), and Root Length (C) at 2 Months after Transplantation of Tomato and Muskmelon Plants. Duncan's test ($p = 0.05$) indicated that the histograms with different letters (a, A, b, B, c, C, d, D) are significantly different. Values are means of three independent experiments, and error bars indicate the standard deviation.

respectively. Germinative energy can play an important role in the achievement of quick uniform seedling emergence and the reduction of damping-off incidence, thus improving yield.⁴⁵ It has been reported that the use of fungicides is effective in enhancing germination, emergence, and growth and in reducing damping-off. In addition, accelerated germination has been reported to help improve stress resistance and enhance overall plant growth and productivity.⁴⁶ This might account for the usefulness of the Bac-GM100 solution for seed disinfection.

Acknowledgments

This work was funded by the Algerian Ministry of Higher Education and Scientific Research. We wish to express our gratitude to Dr. Bouazza Lyas, Dr. Boufennara Souhil (University of Mentouri, Constantine, Algeria), and Dr. Abdelhamid Beji (Max-Planck-Institut, Munich, Germany) for constructive discussion and valuable help during this study. Special thanks are due also to Professor Anouar Smaoui, of the English Department of the Sfax Faculty of Science for carefully proofreading and polishing the language of the present paper.

References

- 1) Ojiambo PS and Scherm H, *Phytopathology*, **96**, 1168–1174 (2006).
- 2) Harzallah D, Sadallah S, and Larous L, *Commun. Agric. Appl. Biol. Sci.*, **69**, 443–447 (2004).
- 3) Messaadia N and Harzallah D, *World Acad. Sci. Eng. Technol.*, **73**, 904–908 (2011).
- 4) Zhang Y, Zhang L, Du M, Yi H, Guo C, Tuo Y, Han X, Li J, and Yang L, *Microbiol. Res.*, **167**, 27–31 (2011).
- 5) Riley MA and Wertz JE, *Ann. Rev. Microbiol.*, **56**, 117–137 (2002).
- 6) Gillor O and Ghazaryan L, *Recent Pat. Antiinfect. Drug Discov.*, **2**, 115–122 (2007).
- 7) Lucas R, Grande MA, Abriouel H, Maqueda M, Ben Omar N, Valdivia E, Martinez-Canamero M, and Galvez A, *Food Chem. Toxicol.*, **44**, 1774–1781 (2006).
- 8) Weller DM, *Ann. Rev. Phytopathol.*, **26**, 379–407 (1988).
- 9) Weller DM, Raaijmakers JM, Gardener BB, and Thomashow LS, *Ann. Rev. Phytopathol.*, **40**, 309–348 (2002).
- 10) Kim H, Park J, Choi S, Choi K, Lee G, Ban S, Lee C, and Kim C, *J. Appl. Microbiol.*, **41**, 196–201 (2003).
- 11) Risoen PA, Ronning P, Hegna IK, and Kolsto AB, *J. Appl. Microbiol.*, **96**, 648–655 (2004).
- 12) Le Marrec C, Hyronimus B, Bressollier P, Verneuil B, and Urdaci MC, *Appl. Environ. Microbiol.*, **66**, 5213–5220 (2000).
- 13) Kamoun F, Mejdoub H, Aouissaoui H, Reinbolt J, Hammami A, and Jaoua S, *J. Appl. Microbiol.*, **98**, 881–888 (2005).
- 14) Cherif A, Rezgui W, Raddadi N, Daffonchio D, and Boudabous A, *Microbiol. Res.*, **163**, 684–692 (2008).
- 15) Jung WJ, Mabood F, Souleimanov A, and Smith DL, *Microbiol. Res.*, **167**, 14–19 (2011).
- 16) Walker JE and Abraham EP, *Biochem. J.*, **118**, 557–561 (1970).
- 17) Shelburne CE, An FY, Dholpe V, Ramamoorthy A, Lopatin DE, and Lantz MS, *J. Antimicrob. Chemother.*, **59**, 297–300 (2007).
- 18) Peypoux F, Guinand M, Michel G, Delcambe L, Das BC, and Lederer E, *Biochemistry*, **17**, 3992–3996 (1978).
- 19) Phae C, Shoda M, Kita N, Nakano M, and Ushiyama K, *Ann. Phytopatol. Soc. Jpn.*, **58**, 329–339 (1992).
- 20) Sanders ME, Morelli L, and Tompkins TA, *Comp. Rev. Food Sci. Food Safety*, **2**, 101–110 (2003).
- 21) Gurtler V and Stanisch VA, *Microbiology*, **142** (Pt 1), 3–16 (1996).
- 22) Sambrook J, Fritsch E, and Maniatis T, “Molecular Cloning, a Laboratory Manual” 2nd edn., Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor (1989).
- 23) Felsenstein J, *Evolution*, **39**, 783–791 (1985).
- 24) Tagg JR and McGiven AR, *Appl. Microbiol.*, **21**, 943–944 (1971).
- 25) Laemmli UK, *Nature*, **227**, 680–685 (1970).
- 26) Bradford MM, *Anal. Biochem.*, **72**, 248–254 (1976).
- 27) Hammami I, Rhouma A, Jaouadi B, Rebai A, and Xavier N, *Lett. Appl. Microbiol.*, **48**, 253–260 (2009).
- 28) Zucconi F, Forte M, Monac A, and Beritodi M, *Biocycle*, **22**, 27–29 (1981).
- 29) Yabuuchi E, *Kansenshogaku Zasshi*, **75**, 653–655 (2001).
- 30) Hammami I, Jaouadi B, Ben Bacha A, Rebai A, Bejar S, Nesme X, and Rhouma A, *Biotechnol. Bioproc. Eng.*, **17**, 41–49 (2012).
- 31) Zhou W, Liu GR, Li PL, Dai YQ, and Zhou K, *Wei Sheng Wu Xue Bao*, **47**, 260–264 (2007).
- 32) Deraz SF, Karlsson EN, Khalil AA, and Mattiasson B, *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.*, **34**, 373–379 (2007).
- 33) Heng NCK, Swe PM, Ting YT, Dufour M, Baird HJ, Ragland NL, Burtenshaw GA, Jack RW, and Tagg JR, *Int. Congr. Ser.*, **1289**, 351–354 (2006).
- 34) Swe PM, Heng NC, Ting YT, Baird HJ, Carne A, Tauch A, Tagg JR, and Jack RW, *Microbiology*, **153**, 3218–3227 (2007).
- 35) van der Merwe IR, Bauer R, Britz TJ, and Dicks LM, *Int. J. Food Microbiol.*, **92**, 153–160 (2004).
- 36) Atanassova M, Choiset Y, Dalgalarondo M, Chobert JM, Dousset X, Ivanova I, and Haertle T, *Int. J. Food Microbiol.*, **87**, 63–73 (2003).
- 37) Lavermicocca P, Valerio F, Evidente A, Lazzaroni S, Corsetti A, and Gobetti M, *Appl. Environ. Microbiol.*, **66**, 4084–4090 (2000).
- 38) Delves-Broughton J, *Food Technol.*, **4**, 100–117 (1990).
- 39) Sebei S, Zendo T, Boudabous A, Nakayama J, and Sonomoto K, *J. Appl. Microbiol.*, **103**, 1621–1631 (2007).
- 40) Faheem F, Saeed S, and Rasool SA, *J. Bot.*, **39**, 1293–1302 (2007).
- 41) Lee KD, Gray EJ, Mabood F, Jung WJ, Charles T, Clark SR, Ly A, Souleimanov A, Zhou X, and Smith DL, *Planta*, **229**, 747–755 (2009).
- 42) Gray EJ, Lee KD, Souleimanov AM, di Falco MR, Zhou X, Ly A, Charles TC, Driscoll BT, and Smith DL, *J. Appl. Microbiol.*, **100**, 545–554 (2006).
- 43) de Kwaadsteniet M, Todorov SD, Knoetze H, and Dicks LMT, *Int. J. Food Microbiol.*, **105**, 433–444 (2005).
- 44) Yurong G, Dapeng L, Yan S, and Xiaoyan L, *Food Control*, **22**, 657–661 (2011).
- 45) Gupta SK, Mathew KA, Shyam KR, and Sharma A, *Plant Dis. Res.*, **14**, 20–24 (1999).
- 46) Pattan HD, Gothkar AK, Joshi P, Chivasa A, and Nyamudeza P, *Agric. Syst.*, **69**, 151–164 (2001).
- 47) Portier P, Fischer-Le Saux M, Mougel C, Lerondelle C, Chapulliot D, Thioulouse J, and Nesme X, *Appl. Environ. Microbiol.*, **72**, 7123–7131 (2006).

Microflore rhizosphérique de quelques Fabacées (légumineuses) endémiques dans les régions de Boussaâda et de Biskra (Algérie)

Présentée par GHADBANE Mouloud Directeur de thèse Prof. HARZALLAH Daoud

Résumé

L'activité antimicrobienne, l'effet phytostimulateur et les modes d'action des rhizobactéries isolées à partir de trois Fabacées endémiques d'Algérie (*Ononis angustissima*, *Astragalus gombo* et *Calobota saharae*) ont été évalués. L'identification phénotypique et génotypique des isolats à fortes activité antimicrobienne, a mis en évidence les souches *Brevibacillus brevis* GM100, *Bacillus clausii* GM17, *Streptomyces* sp. 21, 2A26, 1B10 et 2C34. La sensibilité des extraits purifiés à activité antimicrobienne des souches de *B. brevis* GM100, *B. clausii* GM17 aux différentes protéases démontrent leurs natures protéiques. En plus, les analyses par MALDI-TOF/MS, ont démontré que les deux bactériocines Bac-GM100 et Bac-GM17, sont des protéines monomériques de poids moléculaires de 4375,66 Da et 5158,11 Da, respectivement. Ces deux bactériocines sont thermostables, actives dans un pH de 3 à 10 et présentent un large spectre d'activité antimicrobienne. Les quatre *Streptomyces* sp., solubilisent le phosphate, et produisent les enzymes extracellulaires qui dégradent la paroi des cellules fongiques (chitinase et protéase), ainsi qu'une production marquée de l'acide- β -indolacétique (AIA). Les résultats du test *in vivo*, ont révélés que les quatre souches de *Streptomyces* stimulent de manière significative la croissance et réduisent l'indice de maladie causée par *Fusarium oxysporium* chez les pois chiches (*Cicer arietinum* L.). Ces résultats indiquent que les souches de *Streptomyces* sp, *Brevibacillus brevis* GM100 et *Bacillus clausii* GM17 isolées à partir de rhizosphère d'*O. angustissima* pourrait être une source intéressante de substances bioactives à fort potentiels en lutte biologique.

Mots clés: *Brevibacillus brevis*, *Bacillus clausii*, *Streptomyces* sp., Bactériocine, lutte biologique

مكروفلورا المنطقة الجذرية لبعض البقوليات متوطنة في منطقتي بوسعادة و بسكرة (الجزائر)
قدمت من طرف غضبان مولود
المشرف الأستاذ حرز الله داود

ملخص

اختبرت الإمكانات العديدة ضد الجراثيم، القدرة على التحفيز لنمو النباتات و طريقة التأثير لمجموعة من بكتيريا المنطقة الجذرية لثلاث بقوليات متوطنة في الجزائر (*Ononis angustissima*, *Astragalus gombo* و *Calobota saharae*). أظهر الكشف المظهري و الوراثي للعزلات النشطة أنها عبارة عن السلالات *Brevibacillus brevis* GM100, *Bacillus clausii* GM17 و أربع سلالات لـ *Streptomyces* sp. 21, 2A26, 1B10 و 2C34. أن تأثر المستخلصين المنقيين من وسط زرع السلالتين المنتجة للبكتيريوسين *Brevibacillus brevis* GM100 و *Bacillus clausii* GM17 بمختلف الانزيمات المحللة للبروتينات يثبت طبيعتهما البروتينية. بالإضافة الى ذلك بينت التحاليل بواسطة MALDI-TOF/MS ان هذين البكتيريوسين عبارة عن مونوميرين بروتينيين بوزن جزيئي يقدر بـ 4375.66 دالتون و 5158.11 دالتون بالنسبة الى Bac-GM100 و Bac-GM17 على التوالي. أظهر هذين البكتيريوسين ثبات لدرجة الحرارة المرتفعة، نشاط في مجال درجة حموضة من 3 الى 10 و مدى واسع للتضاد الجرثومي. للسلالات الأربع لـ *Streptomyces* sp. القدرة على تحليل الفوسفات، إنتاج الانزيمات كيتيناز و بروتياز المحطمة للجدار الخلوي للفطر و كذا إنتاج هرمون حمض اندول الخليك بكمية معتبرة. كشفت نتائج الاختبار في الوسط الحي لسلالات الأربعة *Streptomyces* sp. أنها تحفز النمو وتحد بشكل كبير من مؤشر الأمراض الناجمة عن *Fusarium oxysporium* للحمص (*Cicer arietinum* L.). تشير هذه النتائج ان السلالات *Brevibacillus brevis* GM100, *Streptomyces* sp. و *Bacillus clausii* GM17 المعزولة من المنطقة الجذرية لـ *Ononis angustissima* يمكن ان تكون مصدر هام للمواد النشطة بيولوجيا ذات قدرات عالية للمكافحة البيولوجية.

الكلمات المفتاحية: *Brevibacillus brevis*, *Bacillus clausii*, *Streptomyces* sp., بكتيريوسين،
المكافحة البيولوجية.