



الجمهورية الجزائرية الديمقراطية الشعبية
République Algérienne Démocratique et Populaire
وزارة التعليم العالي والبحث العلمي

Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique

جامعة محمد البشير الإبراهيمي برج بو عريريج

Université Mohamed El Bachir El Ibrahimi B.B.A.

كلية علوم الطبيعة والحياة وعلوم الأرض والكون

Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie et des Sciences de la Terre et de l'Univers

قسم العلوم البيولوجية

Département des Sciences Biologiques



Mémoire

En vue de l'obtention du Diplôme de Master

Domaine : Sciences de la Nature et de la Vie

Filière : Sciences Biologiques

Spécialité : Microbiologie Appliquée

Thème

**Les bactéries rhizosphériques : Méthodes
d'isolement, d'identification et d'étude de leurs
activités enzymatiques**

Présentées par : Naidji Mériem

Benguedouad Ilhem

Devant le jury :

Président : M^{me}. ABED Hanane M.C.B. Université de Bordj Bou Arreridj

Encadrant : M^{me}. ZERROUG Amina M.A.A. Université de Bordj Bou Arreridj

Examineur : M^r. MERIBAI Abdelmalek M.C.B. Université de Bordj Bou Arreridj

Année universitaire : 2019/2020

Remerciements

Nous tenons à remercier en premier lieu (notre dieu) qui nous a donné la santé, la volonté, le courage et la patience tout au long de nos études.

Tout d'abord, ce travail ne serait pas aussi riche et n'aurait pas pu voir le jour sans l'aide et l'encadrement de

Mme Zerroug Amina,

On la remercie pour la qualité de son encadrement exceptionnel, pour sa patience, sa rigueur et sa disponibilité durant notre préparation de ce mémoire.

On tient à présenter nos sincères remerciements à tous les membres du jury :

Mme Abed Hanane De nous avoir fait l'honneur de présider le jury.

Mr. Meribai Abdelmalek d'avoir pris le temps d'examiner

Nous remercions également toute l'équipe du laboratoire, particulièrement Mr. Khalil, Mme. Wahiba, Mme. Wassima pour leur disponibilité, leur aide et leur patience.

Enfin, nos profonds remerciements s'adressent à toutes les personnes ayant contribué de près ou de loin à la réalisation de ce modeste travail.

Dédicaces

Je remercie, tout d'abord, Dieu le tout puissant, pour avoir guidé mes pas vers un avenir inchaallah prometteur, où le travail, la persévérance et la quête du savoir seront ma devise.

Je dédie ce travail à mes chers parents :

A ma chère maman ... Que j'adore beaucoup

Et à mon cher papa... Que j'aime tant,

Sans vous, je ne serai jamais arrivée là où j'en suis.

A mon grand-père : **Brahim** ainsi que toute la famille Benguedouad et Bensadi.

A mon adorable frère : **Oussama** et mes charmantes

Sœur : **Chaima, Maroua et Saida.**

A mon très chère encadrant : Mme **Zerroug Amina**

A Mes très chères amies : **Saadia, Samah, Mériem, Karima, Imane,**

Wardiya et Zahra.

A ceux qui sont proches de mon cœur : surtout **Salsabile.**

Merci d'être toujours là pour moi.

Ilhem

Dédicaces

C'est avec une immense joie que je dédie ce modeste travail à :

« *Mes Parents* » le mot de remerciement ne suffit pas pour exprimer ce que vous m'avez donné ; vous êtes la source de mon bonheur, ma lumière et mon énergie, vous êtes simplement mon monde.

A la mémoire de *mes grands-pères* , *ma grand-mère* et mon frère *Tayeb*, reposez en paix au paradis.

Je dédie ce travail à *ma chère grand-mère* que j'aime beaucoup, mes sœurs, mes frères qui ont fait de moi ce que je suis. Et a mes filles cousines : *Lydia, Lyna, Meriem*.

A mon très chère encadrant : Mme. Zerroug Amina

A mon binôme : *Ilhem*, sans oublier son frère, que je remercie pour son aide au cours de l'échantillonnage.

A tous mes professeurs merci pour vos efforts, vos formations et vos conseils.

Au Pr. *Ghoul M.* et Dr. *Sadrati Nouari* je vous remercie pour vos conseils, votre soutien.

A mes collègues de spécialité.

Une pensée toute particulière pour mes proches amies : *Hafsa, Nadia, Samra, Kaouther, Ouedjdane, Chaima, Fatima, Khadija, Hadjer* pour leur aide et leur amitié, à vous tous qui avez contribué de quelques façons que ce soit, de loin ou de près, à la réalisation de ce mémoire.

The only way to do great work is to love what you do.

« Steve Jobs »

Mérim

Table des matières

المخلص

Résumé

Abstract

Liste des abréviations

Liste des figures

Liste des tableaux

Introduction.....01

Chapitre I : Généralité sur la rhizosphère et les rhizobactéries

I.1 Le sol03

I.2 La rhizosphère.....03

I.2.1 Étymologie.....03

I.2.2 Définition.....03

I.2.3 Les activités rhizosphériques.....04

I.2.4. La microflore rhizosphérique05

I.3 Les rhizobactéries.....05

I.3.1 Rhizobactéries Promotrices de la Croissance des Plantes (RPCP).....05

I.3.1.1 Mécanismes d'action des rhizobactéries promotrices de la croissance des plantes.....06

I.3.1.2 Diversité taxonomique des RPCP.....07

I.3.1.2.1 Bacteroidetes.....07

I.3.1.2.2 Actinobacteria.....07

I.3.1.2.3 Firmicutes.....08

I.3.1.2.4 Proteobacteria.....08

Chapitre II : Les enzymes bactériennes : des outils biologiques pour l'industrie.

II.1 Généralité.....09

II.2 Classification des enzymes.....09

II.3 Les enzymes les plus importantes en industrie.....10

II.3.1 Les protéases.....10

II.3.1.1 Définition.....10

II.3.1.2 Classification, nomenclature10

II.3.1.3 Source microbienne des protéases.....10

II.3.1.4 Application industrielles des protéases.....10

II.3.2 L'alpha-amylases.....	11
II.3.2.1 Définition.....	11
II.3.2.2 Classification, nomenclature	11
II.3.2.3 L'alpha amylase d'origine microbienne.....	11
II.3.2.4 Applications des alpha amylases.....	11
II.3.3 Cellulase.....	12
II.3.3.1 Définition.....	12
II.3.3.2 Nomenclature des cellulases et	12
II.3.3.3 Source microbienne des cellulases.....	12
II.3.3.4 L'application des cellulases.....	13
II.3.4 Les enzymes lipolytiques.....	13
II.3.4.1 Classification des enzymes lipolytiques.....	13
II.3.4.2 Lipases.....	14
II.3.4.2.1 Définition.....	14
II.3.4.2.2 Source des lipases.....	14
II.3.4.3 Les estérases.....	14
II.3.4.3.1 Définition.....	14
II.3.4.3.2 Source des estérases.....	15
II.3.4.4. Applications industrielles des enzymes lipolytiques.....	15

Chapitre III : Méthodes d'isolement, d'identification et d'étude des activités enzymatiques des bactéries rhizosphériques.

III.1 Isolement des bactéries rhizosphériques.....	16
III.1.1 Préparation des dilutions.....	16
III.1.2 Mise en culture.....	16
III.2 Purification et conservation des isolats.....	16
III.3 Identification des isolats.....	16
III.3.1 Identification morphologique et culturale.....	16
III.3.1.1 Examen macroscopique.....	16
III.3.1.2 Examen microscopique.....	17
III.3.1.2.1 Examen microscopique à l'état frais.....	17
III.3.1.2.2 Coloration de Gram.....	17
III.3.2 Tests biochimiques.....	18
III.3.2.1 Etude des enzymes respiratoires.....	18

III.3.2.1.1 Recherche de catalase.....	18
III.3.2.1.2 Recherche de l'oxydase.....	18
III.3.2.1.3 Recherche du nitrate réductase.....	18
III.3.2.2 Etude du métabolisme glucidique.....	19
III.3.2.2.1 Etude des différents sucres.....	19
III.3.2.2.2 Voie d'attaque des glucides.....	20
III.3.2.2.3 Détermination de la voie de fermentation.....	20
III.3.2.2.4 Enzymes intervenant dans la dégradation des sucres.....	20
III.3.3 Etude du métabolisme des protides	21
III.3.3.1 Recherche des décarboxylases.....	21
III.3.3.2 Recherche de tryptophanase.....	21
III.3.3.3 Recherche de désulfhydrases.....	21
III.3.4 Utilisation du citrate comme seule source de carbone.....	21
III.3.5 Les galeries Api.....	22
III.3.6 Détermination de l'activité enzymatique.....	22
III.4 Identification moléculaire.....	22
III.4.1 Extraction de l'ADN.....	22
III.4.2 Dosage de l'ADN.....	22
III.4.3 Amplification par PCR.....	23
III.4.4 Electrophorèse sur gel d'agarose.....	23
III.4.5 Séquençage.....	23
III.4.6 Analyse phylogénétique.....	24
III.5 Etude de l'activité enzymatique.....	24
III.5.1 Activité amylolytique.....	24
III.5.2 Activité protéolytique.....	24
III.5.3 Activité cellulolytique.....	25
III.5.4 Activité lipolytique.....	25
III.5.5 Détermination de l'indice enzymatique.....	25
Conclusion.....	26
Références bibliographiques.....	27
Annexe	

الملخص

في هذا العمل، نحن مهتمون بالبكتيريا المحيطة بالجذور. هذا الأخير يظهر القدرة على استعمار الجذور بشكل مكثف. تنتمي البكتيريا غير التكافلية التي تتوافق مع هذا التعريف إلى الأجناس والأنواع المختلفة التي تنتمي إليها، وأكثرها دراسة هي *Pseudomonas sp.* و *Bacillus sp.* و *Azospirillum sp.* و *Agrobacterium sp.*

ترتبط التأثيرات المفيدة لبكتيريا المحيطة بالجذور بموقعها الاستراتيجي في واجهة جذر- التربة. في الواقع، الجذور والسطح الخارجي لها هم مقر التبادل المكثف بين النبات والبيئة المحيطة.

لطالما كانت الإنزيمات جزءًا من حياتنا اليومية. يوجد في جميع الخلايا وهو ضروري لبقاء جميع الأنواع الحية. في الواقع، الإنزيمات قادرة على تحطيم وتحويل المركبات المختلفة الموجودة في بيئة الكائنات الحية تُفضل الإنزيمات الميكروبية على المصادر النباتية والحيوانية بسبب إنتاجها الاقتصادي واتساقها وسهولة تعديلها وتحسينها. إنه أكثر استقرارًا نسبيًا من الإنزيمات المشتقة من النباتات أو الحيوانات. بالإضافة إلى ذلك، فإنها توفر مجموعة متنوعة من الأنشطة التحفيزية ومعظم الإنزيمات المستخدمة حاليًا في الصناعة من أصل بكتيري. يتزايد الطلب الصناعي العالمي على الإنزيمات ذات الأصل الميكروبية عامًا بعد عام من أجل تحسين بعض عمليات التصنيع مثل المنسوجات والأدوات المكتبية ومكافحة التلوث وصناعة الأغذية، إلخ. البكتيريا المحيطة بالجذور هي إحدى المجموعات المنتجة لهذه الإنزيمات المثيرة للاهتمام.

الكلمات المفتاحية : الجذور، البكتيريا المحيطة بالجذور ، الإنزيم الجرثومي.

Résumé

Dans ce travail, nous nous sommes intéressées aux bactéries rhizosphériques. Ces dernières, présentent l'aptitude de coloniser les racines de façon intense. Les bactéries non symbiotiques répondant à cette définition appartiennent aux différents genres et espèces dont les plus étudiés sont : *Pseudomonas* sp. *Bacillus* sp. et *Azospirillum* sp., *Agrobacterium* sp., Les effets bénéfiques des rhizobactéries sont liés à leur position stratégique à l'interface racine - sol. En effet, la rhizosphère et le rhizoplan sont le siège d'échanges intenses entre la plante et le milieu environnant.

Les enzymes ont toujours fait partie de notre vie quotidienne. Elles sont présentes dans toutes les cellules et sont indispensables pour la survie de toutes les espèces vivantes. En effet, les enzymes sont capables de dégrader et de transformer différents composés se trouvant dans l'environnement du vivant. Les enzymes microbiennes sont préférées par rapport aux sources végétales et animales en raison de leur production économique, de leur consistance, de la facilité de leur modification, et leur optimisation. Ils sont relativement plus stables que les enzymes issus des végétaux ou animaux. De plus, ils offrent une plus grande diversité d'activités catalytiques, et la plupart des enzymes utilisées actuellement dans l'industrie sont d'origine microbienne. La demande mondiale au niveau industriel pour les enzymes d'origine microbienne croît d'une année à l'autre et ce afin d'améliorer certains procédés de fabrications tels que l'industrie du textile, la papeterie, la dépollution, l'industrie alimentaire, etc. Les bactéries rhizosphériques représentent l'un des groupes producteurs de ces enzymes d'intérêt.

Mots clés: Rhizosphère, Rhizobactéries, Enzyme microbienne.

Abstract

In this work, we are interested in rhizospheric bacteria. The latter have the ability to colonize the roots intensely. The non-symbiotic bacteria meeting this definition belong to different genera and species, the most studied of which are: *Pseudomonas* sp., *Bacillus* sp. And *Azospirillum* sp., *Agrobacterium* sp., the beneficial effects of rhizobacteria are linked to their strategic position at the root- soil interface. Indeed, the rhizosphere and the rhizoplane are the seat of intense exchanges between the plant and the surrounding environment.

Enzymes have always been part of our daily life. They are present in all cells and are essential for the survival of all living species. Indeed, enzymes are able to degrade and transform various compounds found in the environment of living beings. Microbial enzymes are preferred over plant and animal sources because of their economical production, consistency, ease of modification, and optimization. They are relatively more stable than enzymes derived from plants or animals. In addition, they offer a greater diversity of catalytic activities, and most of the enzymes currently used in industry are of microbial origin. Global industrial demand for enzymes of microbial origin is growing from one year to the next in order to improve certain manufacturing processes such as the textile industry, stationery, pollution control, the food industry, etc. One of the producer groups of these interesting enzymes is rhizospheric bacteria.

Key words: Rhizosphere, Rhizobacteria, Microbial enzyme.

Liste des abréviations

ADH : L'arginine dihydrolase

Api : Appareillage et Procédé d'Identification

BLAST: Basic Local Alignment Search Tool

CMC : Carboxyméthylcellulose

DAPG : diacétyle phloroglicinol

dNTP : désoxy Nucléotide Tri-Phosphate

DO : Densité optique

EC : Enzyme commission

EMBL: European Molecular Biology Laboratory

GC : Coefficient de Chargaff

H₂O₂ : Eau oxygénée

HCN : Cyanure d'hydrogène

I.U.B : International Union of Biochemistry

IAA : Acide indole-3-acétique

ISR : Induction de résistance systémique

LDC : Lysine décarboxylase

LPS : Lipolysaccharides

N₂ : Azote

NCBI : National Center Biology Information

NO₂⁻ : Nitrite

NO₃⁻ : Nitrate

O₂: Dioxygène

ODC : Ornithine décarboxylase

ONPG : Ortho-nitrophényl-galacto-pyranoside

PCA: Plate Count Agar

PCR : Polymerase Chain Reaction

PGPR : Plant growth promoting rhizobacteria

PHB : Poly-β-hydroxybutyrate

PNPG : Paranitrophényl-galacto-pyranoside

RFCP : Rhizobactéries favorisant la croissance des plantes

RM : Rouge de méthyle

RPCP : Rhizobactéries promotrices de la croissance des plantes

rpm : Rotation par minute

SAP : Shrimp phosphatase alcaline

TE : Tris-EDTA

TSI : Tri Sugar Iron

Tween 20 : Polysorbate 20

Tween 80 : Polysorbate 80

UV : Ultraviolette

V : Variable

V/V : Volume/Volume

VP : Voges Proskauer

Liste des figures

Figure 01 : Représentation schématique des zones de la rhizosphère.....	04
--	----

Liste des tableaux

Tableau I : Nombre des microorganismes du sol sur une profondeur de 0 à 15 cm	05
Tableau II : Le système de classification des familles des enzymes lipolytiques établie par Arpigny et Jaeger, 1999.....	14

Introduction

« Ce qui est naturel, c'est le microbe. Le reste, la santé, l'intégrité, la pureté, si vous voulez, c'est un effet de la volonté et d'une volonté qui ne doit jamais s'arrêter. L'honnête homme, celui qui n'infecte presque personne, c'est celui qui à le moins de distraction possible ».

Albert Camus

Introduction

Sur terre, les microorganismes ont colonisé à peu près tous les écosystèmes, la rhizosphère, qui est la partie du sol entourant les racines vivantes, est un milieu extrêmement complexe où s'opèrent de multiples interactions entre la plante, le sol et les organismes telluriques, son volume est variable selon le développement racinaire : il représente entre 0,1 et 1% du sol global des écosystèmes forestiers et près de 100% des premiers centimètres des sols. La rhizosphère présente des propriétés structurales (porosité-agrégation) et des caractéristiques physico-chimiques singulières (pH, minéraux, potentiel hydrique). Quant à la composante biologique, des études montrent une densité et une activité microbienne à proximité des racines particulièrement intenses, en comparaison au sol non rhizosphérique (**Lynch et Whipps, 1990**). Cette microflore se compose majoritairement de bactéries, de champignons, de protozoaires et d'algues unicellulaires (**Subba Rao, 1999**).

Les rhizobactéries entre autres les, *Rhizobium*, *Bradyrhizobium*, *Azorhizobium*, *Arthrobacter*, *Azotobacter*, *Azospirillum*, *Bacillus*, *Enterobacter*, *Pseudomonas*, *Serratia*, *Streptomyces* ont l'aptitude de coloniser les racines (**Saharan et al., 2011**). Leurs effets bénéfiques sont liés à leur position stratégique à l'interface sol-racine. En effet, le rhizoplane et la rhizosphère sont le siège d'échanges intenses entre la plante et le milieu environnant (**Rawat et Mushtaq, 2015**). L'ensemble des effets bénéfiques des rhizobactéries s'est élargi dans les dernières années, en effet, ces bactéries peuvent exercer leurs actions bénéfiques de plusieurs mécanismes (**Glick, 2001**), elles sont requises dans le processus de la décomposition et le recyclage des nutriments dans la rhizosphère (**Germida et al., 1998**). Par ailleurs, elles jouent un rôle notable dans l'amélioration et la stabilisation de la structure du sol.

La vie dépend d'une série bien-orchestrée de réactions chimiques basées sur des catalyseurs que nous appelons maintenant des enzymes, pour accélérer considérablement les taux de ces réactions chimiques. La puissance catalytique des enzymes facilite les processus vitaux dans pratiquement toutes les formes de vie des virus aux humains (**Copeland, 2004**). A l'aide d'enzymes, certains organismes peuvent dégrader des composés se trouvant dans leur environnement, et ce caractère peut être utilisé par certaines industries dans différents domaines. À l'heure actuelle, on connaît près de 4 000 enzymes, et parmi celles-ci, environ 200 types d'origine microbienne sont utilisés commercialement. Cependant, seulement une vingtaine d'enzymes sont produites sur une échelle véritablement industrielle.

De très nombreuses activités enzymatiques peuvent être décelées dans le sol, notamment les hydrolases, les oxydoréductases, les transférases, les lyases, etc... (**Petit et Jobin, 2005**). Les rhizobactéries sont parmi les microorganismes qui ont montré un véritable potentiel de production de ces enzymes, c'est pour cette raison que nous nous sommes

intéressés à ces bactéries et à leur production d'enzymes extracellulaires, et notre travail s'est divisé en trois grand chapitres, le premier a été consacré à des généralités sur la rhizosphère et les rhizobactéries, le deuxième aux différentes enzymes d'intérêt industriels, et le troisièmes aux méthodes d'étude des bactéries rhizosphériques impliquant leur isolement, identification et les techniques de criblage de leur production d'enzymes extracellulaires.

Chapitre I.
Généralité sur la rhizosphère et les
rhizobactéries

I.1. Le sol

Le sol est défini comme étant une entité naturelle vivante et dynamique sur la surface de la terre, il est composé de solides (organique et minérale), liquides et gazes, présentant au moins l'un des deux caractères suivants :

- Composé de couches qui se différencient par leurs matières premières suite à des ajouts, des pertes ou des transformations de matière et d'énergie.
- Capacité à supporter les plantes enracinées dans un environnement naturel (**Osman, 2013**).

Le sol constitue le support de vie d'une très grande variété d'organismes vivants en interactions continues (plantes, vers, nématodes, acariens, protozoaires, algues, champignons, eubactéries, archaea, etc.) (**Scow, 2004**).

I.2. La rhizosphère

I.2.1. Étymologie

Le mot rhizosphère a été introduit en 1904 par Lorenz Hiltner (**Hartmann et al., 2008**). Il est composé de deux mots :

- **Rhizo** : Vient du grec Rhiza signifiant racine (**Lombi et al., 2001**)
- **Sphère** : Qui vient du latin Sphaera ou du grec ancien Sfaira (signifiant balle)

- Il définit le champ d'influence du système racinaire (**Bowen et Roriva, 1991**).

I.2.2 Définition

Lorenz Hiltner a défini, en 1904, la rhizosphère comme étant « la partie du sol qui entoure immédiatement les racines de la plante » (**Prescott et al., 2007**). Elle constitue ainsi un lieu d'échange entre le végétal et le minéral ; c'est un milieu complexe aux multiples interactions (**Lynch, 1990**).

Aujourd'hui, ce terme de rhizosphère correspond à une définition plus générale : « c'est le volume de sol soumis à l'influence de l'activité racinaire » (**Darrah, 1993**). Ce volume de sol varie avec la nature des plantes, la densité du système racinaire, ses propriétés de surface et les propriétés physicochimiques du sol (**Abhilash et Singh, 2009**).

IL existe trois composantes distinctes reconnues dans la rhizosphère (**figure 1**) :

1. La rhizosphère, qui est la zone du sol influencée par les racines grâce à la libération de substrats qui affectent l'activité microbienne.

2. **La rhizoplane**, qui est la surface de la racine, y compris les particules du sol adhérant fortement.

3. **La racine elle-même (endorhizosphère)**, est une partie du système racinaire, parce que certains micro-organismes endophytes sont capables de coloniser les tissus racinaires internes (**Bowen et Rovira, 1991**). Un grand nombre d'organismes microscopiques tel que les bactéries et les algues coexistent dans la rhizosphère, cependant, les bactéries sont le groupe le plus abondant dans cette partie de l'environnement de la plante, et il est fort probable qu'ils influencent grandement la physiologie de la plante.

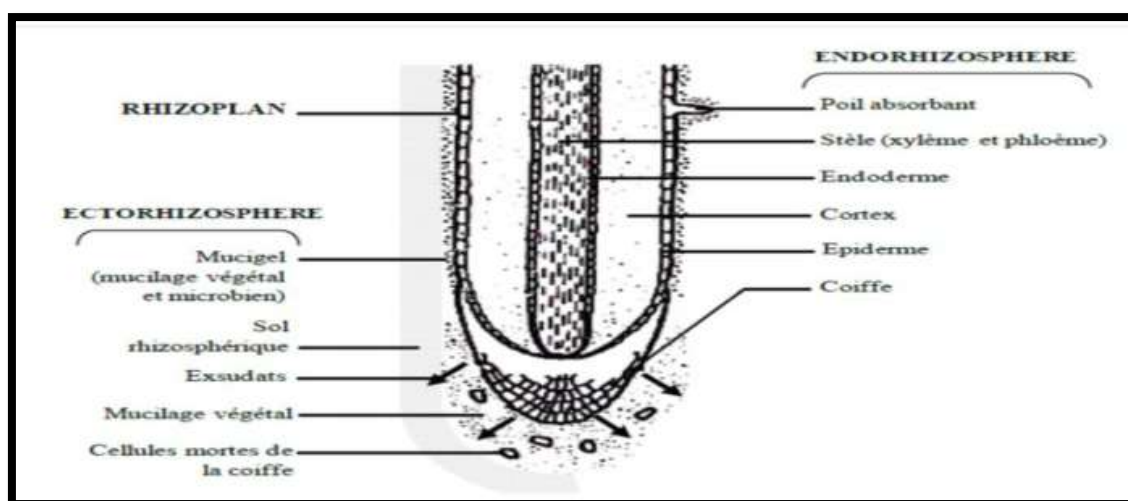


Figure 1 : Représentation schématique des différentes zones de la rhizosphère (**Lepinay, 2013**).

I.2.3. Les activités rhizosphériques

Des phénomènes écologiques particuliers se produisent au niveau de la rhizosphère. En effet, les racines libèrent beaucoup de matières organiques sous forme de mucilage, d'exsudats et plus de 40% des produits de photosynthèse passent au niveau du système racinaire (**Soufiane, 1989**). L'exsudation ; ce terme est souvent employé abusivement comme synonyme de rhizodéposition. Elle désigne en fait la diffusion passive hors des cellules de composés solubles de faible poids moléculaire, par exemple des sucres ou des acides aminés, qui sont rapidement métabolisés par les microorganismes (**Davet, 1996; Aouar, 2012**). Les exsudats racinaires représentent un élément clé dans les échanges entre la plante et les rhizobactéries, dont la densité et la diversité est en liaison directe avec la nature et la quantité des exsudats racinaires, cette influence se manifeste par une modification de la croissance de la plante (**Lemanceau, 1992**).

I.2.4. La microflore rhizosphérique

La microflore du sol est complexe et variée. Elle comprend, les bactéries, les champignons, les protozoaires, etc. cependant, les bactéries et les champignons sont les organismes les plus dominants (**Tableau 01**) (**Hoorman et Islam, 2010**). La distribution de ces micro-organismes dans le sol est hétérogène et dépend des facteurs nutritionnels et des facteurs physico-chimiques (**Prescott et al., 2003**).

Tableau I : Nombre des microorganismes du sol sur une profondeur de 0 à 15 cm

Microorganismes	Nombre (g/sol)	Biomasse (g/m²)
Bactéries	10 ⁸ -10 ⁹	40-500
Champignons	10 ⁵ -10 ⁶	100-1500
Algues	10 ⁴ -10 ⁵	1-50
Protozoaires	10 ³ -10 ⁴	Variée

I.3. Les rhizobactéries

Les bactéries de la rhizosphère, dites rhizobactéries, sont capables de coloniser l'intérieur ou l'extérieur de la racine de nombreuses espèces de plantes et peuvent être divisé entre celles qui forment une relation symbiotique avec la plante et celles qui ne le font pas. (**Kloepper et al., 1989**).

Elles sont généralement très compétitives capables de coloniser le système racinaire riche en éléments nutritifs (**Peter et al., 2015**) et sont des hétérotrophes typiques nécessitant des composés organiques comme source d'énergie, leurs besoins sont entièrement comblés à l'intérieur même de la rhizosphère (**Campbell et Greaves, 1990**). Quand elles émettent des substances favorisant la croissance des plantes tout au long de leur cycle de développement (**Kloepper, 1993**), elles sont souvent mentionnées comme des rhizobactéries promotrices de la croissance des plantes, connues sous le terme RPCP (**Beauchamp, 1993**), ou bien (PGPR : Plant Growth Promoting Rhizobacteria) (**Kloepper et al., 1989; Zahir et al., 2004**).

I.3.1. Les Rhizobactéries promotrices de la Croissance des Plantes (RPCP)

Une partie des bactéries présentes dans la rhizosphère peuvent être impliquées dans l'amélioration de la croissance des plantes par divers mécanismes. L'effet stimulateur de ces espèces bactériennes est connu depuis des décennies et elles ont été introduites dans le sol, sur les semences ou dans les racines afin d'améliorer la croissance des plantes et de les protéger vis-à-vis des maladies (**Raaijmakers et al., 2002**). Le genre *Rhizobium*, un exemple parmi les

microorganismes favorisant la croissance, et est le groupe le plus largement connu. Il a été commercialisé avec succès avec de nombreuses applications dans l'agriculture pour le développement de la symbiose avec les plantes.

Le terme rhizobactéries promotrices de la croissance des plantes (RPCP) a été initialement utilisé pour décrire uniquement le groupe microbien impliqué dans la lutte biologique (**Kloepper et al., 1980**). Ce terme a ensuite été élargi pour englober toutes les bactéries bénéfiques associées aux plantes (**Bashan et Holguin, 1998**).

Les RPCP forment un groupe hétérogène de bactéries qui peuvent être trouvées dans la rhizosphère, à la surface des racines et en association avec les racines, qui peuvent améliorer, la qualité de croissance de la plante. Elles sont majoritairement composées d'espèces du genre *Bacillus*, *Streptomyces*, *Burkholderia*, et *Pseudomonas* et sont considérés comme inoffensifs pour la plante hôte, la densité de leurs population est souvent très élevés (10^8 bactéries/g des racines) (**Weller, 1988; Lugtenberg et al., 2001**).

La plupart des souches bactériennes exploitées comme agent de contrôle biologique (biocontrol RPCP) appartiennent aux genres *Agrobacterium*, *Bacillus* et *Pseudomonas* (**Haas et Défago, 2005**). Beaucoup de recherches se sont concentrées sur ces deux derniers types de bactéries parce qu'ils sont des colonisateurs communs de la rhizosphère et possèdent une grande activité dans le contrôle biologique de maladies causées par les microorganismes du sol. Ils ont aussi la capacité de produire de nombreux antibiotiques et sont faciles à cultiver ou à manipuler en laboratoire. De plus, les *Bacillus* offrent un avantage par rapport aux autres bactéries en raison de leur capacité à former des endospores résistantes aux conditions défavorables du milieu (**Raaijmakers et al., 2009 ; Cavaglieri et al., 2005**).

I.3.1.1. Mécanismes d'action des rhizobactéries promotrices de la croissance des plantes

Les effets bénéfiques des rhizobactéries sur la croissance végétale résultent de différents mécanismes exercés par les RPCP dont les modes d'action sont directs ou indirects, bien que la différence entre les deux ne soit pas toujours évidente. Les mécanismes indirects sont, en général, ceux qui se produisent en dehors de la plante, tandis que les mécanismes directs sont ceux qui se produisent à l'intérieur de la plante et affectent directement leur métabolisme. Ces mécanismes pouvant être actifs simultanément ou séquentiellement à différentes étapes de la croissance des plantes, ces mécanismes sont :

- 1- La solubilisation des phosphates, la fixation de l'azote et les minéraux nutritifs, rendant ces aliments disponibles pour la plante.
- 2- La production de phytohormones telles que l'acide d'indole-3-acetic (IAA).

3- La répression des microorganismes pathogènes du sol (par la production du cyanure d'hydrogène, de sidérophores, d'antibiotiques, et/ou de la concurrence pour les nutriments **(Gupta et al., 2000)**).

De plus, les RPCP peuvent contribuer à l'amélioration de la résistance de la plante aux stress biotiques et abiotiques (la salinité, la sécheresse et à la toxicité des métaux lourds). Sur la base de leurs activités, **(Somers et al., 2004)** ont classé les RPCP comme bio fertilisants (augmentant la disponibilité des éléments nutritifs aux plantes), phytostimulateurs (améliorant la croissance des plantes, habituellement par la production de phytohormones), rhizoremédiateurs (dégradants les polluants organiques) et biopesticides (lutte contre les maladies, principalement par la production de métabolites antibiotiques et antifongiques).

I.3.1.2. Diversité taxonomique des RPCP

Au cours des dernières années, le nombre de RPCP identifiées a augmenté d'une façon significative, principalement puisque le rôle de la rhizosphère comme écosystème a gagné de l'importance dans le fonctionnement de la biosphère et que les mécanismes d'action des RPCP ont été suffisamment étudiés. Ces microorganismes cultivables, présentant une diversité de genres et d'espèces, appartiennent majoritairement aux quatre phyla suivants : Proteobacteries, Firmicutes, Actinobacteries et Bacteroidetes **(Hugenholtz, 2002)**.

I.3.1.2.1 Bacteroidetes

Le phylum "Bacteroidetes" comportait trois grandes classes de bactéries, "Bacteroidia", "Flavobacteriia" et "Sphingobacteriia" **(Garrity et al., 2005)**, qui sont largement répandues dans l'environnement, notamment dans le sol, dans les sédiments, l'eau de mer, etc. **(Bergey's, 2010b)**.

I.3.1.2.2. Actinobacteria

Le genre *Frankia* est un fixateur symbiotique d'azote, cette capacité est une caractéristique du genre. Ces bactéries sont associées à des plantes actinorhiziennes pionnières de la colonisation des sols pauvres ou perturbés. D'autres Actinobacteria sont également des promoteurs de croissance des plantes mais ne participent pas à la symbiose. Ils appartiennent aux genres *Arthrobacter*, *Micrococcus* **(Gray et Smith, 2005)** et *Curtobacterium* **(Barriuso et al., 2005)**.

I.3.1.2.3. Firmicutes

Parmi les bactéries telluriques à Gram positif, les *Bacillus* sont le type le plus commun et le plus prédominant, ils représentent 95% de la flore isolée. Ce sont des bactéries aérobies ou aéro-anaérobies facultatives formant des endospores (**Bergey's, 2010b**).

I.3.1.2.4. Proteobacteria

- **Alpha-proteobacteria**

Les PGPR appartenant à cette classe sont les Rhizobia d'abord classés selon leur capacité à fixer l'azote et à noduler les plantes. Ces souches peuvent se comporter comme RPCP quand elles colonisent les racines des plantes non légumineuses dans une relation non spécifique. En effet, le genre *Rhizobium* contient également des souches RPCP qui plus tard ont été considérées comme de nouveaux genres tels que *Bradvrhizobium*, *Sinorhizobium* et *Mesorhizobium* (**Sawada et al., 2003**). Le genre *Gluconacetobacter* de la famille des Acetobacteraceae composé de bactéries endophytes obligatoires colonise les racines, les tiges et les feuilles de la canne à sucre (**Tejera et al., 2003**). Les espèces du genre *Azospirillum* décrites dans la famille de Rhodospirillaceae sont également considérées comme promoteurs de la croissance des plantes. Les souches appartenant à ce genre se produisent sous forme de cellules libres dans le sol ou associées aux racines, tiges, feuilles et graines principalement des céréales et des graminées fourragères (**Baldani et al., 2005**).

- **Beta-proteobacteria**

Dans la famille Burkholderiaceae, le genre *Burkholderia* forme un groupe monophylétique qui contient diverses espèces ayant des propriétés physiologiques et écologiques variées, elles sont isolées à partir des sols et des plantes. Quelques souches ont la capacité de fixer de façon symbiotique l'azote. *Ralstonia* est un genre également attribué à la famille des Burkholderiaceae. Il est, comme le genre *Burkholderia*, omniprésent (**Moulin et al., 2001**).

- **Gamma-proteobacteria**

Dans la famille des Pseudomonadaceae, le genre *Azotobacter* est composé de bactéries qui favorisent la croissance des plantes principalement à cause de sa capacité de fixer l'azote et ne pas noduler les plantes (**Sturz et Christie, 2003**).

Chapitre II.

Les enzymes bactériennes : Des outils biologiques pour l'industrie

II.1. Généralités

Les enzymes sont des macromolécules protéiques de haute masse moléculaire (de 10 à 1000 kilodaltons), qui catalysent les réactions chimiques en augmentant leurs vitesses d'au moins 10^6 fois, par rapport à la réaction en leur absence (**Granner, 2008**). Elles sont présentes dans les cellules de tous les organismes vivants où elles jouent un rôle essentiel dans plusieurs procédés métaboliques. Autre fonction importante, les enzymes sont responsables de la dégradation des molécules complexes en molécules plus facilement assimilables (**Meunier, 1999**). Les enzymes microbiennes sont préférées par rapport aux sources végétales et animales en raison de leur production économique, de leur consistance, de la facilité de leur modification, et leur optimisation. Ils sont relativement plus stables que les enzymes issus de végétaux ou d'animaux. De plus, ils offrent une plus grande diversité d'activités catalytiques, et la plupart des enzymes utilisées actuellement dans l'industrie sont d'origine microbienne (**Barredo, 2005**). Environ 200 enzymes sont commercialisées dans le marché. Parmi ces enzymes, 130 sont utilisées dans des procédés industriels, dont moins de 30 représentent plus de 90 %. Il existe un grand nombre d'enzymes spécifiques qui jouent un rôle important dans les processus physiologiques, ainsi que dans plusieurs processus industriels à savoir ; l'industrie agroalimentaire, l'industrie pharmaceutique, les industries de nettoyage (**Gassara, 2012**). Les enzymes bactériennes sont les plus utilisées du fait que les bactéries peuvent croître plus rapidement que les espèces fongiques et ont donc un potentiel dans les applications industrielles (**Gopinath et al., 2015**).

II.2. Classification des enzymes

Selon la commission des enzymes (EC) de l'I.U.B. (International Union of Biochemistry) (**Bergmeyer et Gawekn, 1979**), les enzymes se répartissent en six classes : (**Rao et al., 1998; Assamoi et al., 2009**) :

1. **Oxydoréductases** : Réactions de transfert d'électrons (ou d'atome d'hydrogène).
2. **Transférases** : Transfert de radicaux fonctionnels
3. **Hydrolases** : Réactions d'hydrolyse.
4. **Lyases** : Addition de doubles liaisons à une molécule et enlèvement de groupements chimiques sans hydrolyse.
5. **Isomérases** : Réactions d'isomérisation.
6. **Ligases** : Formation de liens chimiques couplés avec la rupture d'ATP.

II.3. Les enzymes les plus importantes en industrie

II.3.1. Les protéases

II.3.1.1. Définition

Les protéases ou peptidases sont des enzymes protéolytiques qui catalysent l'hydrolyse de liaisons peptidiques. Dans certains cas, les enzymes sont hautement spécifiques et hydrolysent une unique liaison peptidique d'une protéine donnée. Dans d'autres cas, les peptidases hydrolysent plusieurs liaisons peptidiques qui présentent une séquence ou conformation déterminée (**Hartely, 1960**). Les protéases sont nombreuses, représentant environ 2% de tous les produits géniques (**Rawlings et Barrett, 1994**) et environ 10% des enzymes réunies dans la liste « EC ».

II.3.1.2. Classification, nomenclature

Selon la nomenclature de l'Union Internationale de Biochimie et Biologie moléculaire, les protéases sont classées dans le sous-groupe 4 du groupe 3 des hydrolases. Cependant elles ne se soumettent pas facilement à ce système de classification à cause de la complexité de leur structure et leurs mécanismes d'action. Récemment, les protéases sont classées sur la base de trois critères majeurs : le type de réaction à catalyser, la nature chimique du site catalytique et l'évolution du site de référence (**Rao et al., 1998**).

II.3.1.3. Source microbienne des protéases

Les protéases peuvent être produites par les bactéries, les moisissures et les levures. Les protéases d'origine bactériennes sont essentiellement de la subtilase, produites par *Bacillus subtilis* et quelques genres apparentés. Celle-ci est très stable et résistante à l'action des détergents. Par ailleurs, elle est naturellement excrétée dans le milieu, ce qui facilite sa purification (**Boudehane et Mezioud, 2017**). Les bactéries psychotropes du lait et en particulier, *Pseudomonas fluorescens* et *P. putida* produisent des métalloprotéases thermorésistantes utilisées en particulier pour la coagulation du lait et pour l'affinage des fromages (**Dendouga, 2006**). Pour les moisissures, il s'agit essentiellement de *Aspergillus oryzae* (**García-Gómez et al., 2009**). Certaines levures peuvent également produire protéase : *Aureobasidium pullulans* (**Chi et al., 2007**).

II.3.1.4. Applications industrielles des protéases

Les protéases microbiennes sont préférées à celles des autres sources car elles possèdent presque toutes les caractéristiques désirées pour leurs applications industrielles. Elles représentent 40% des enzymes du marché mondial (**Belmessikh, 2011**). Elles sont

généralement utilisées comme additifs dans les détergents de blanchisserie, dans la transformation des produits alimentaires et le caillage du lait pour la production du fromage (Hupé, 2008). Dans l'industrie pharmaceutique et médicale, elles sont utilisées dans le développement des agents thérapeutiques efficaces, par exemple des collagénases provenant de *Clostridium* sp. Ou des subtilisines qui sont utilisées en combinaison avec des antibiotiques dans le traitement des brûlures, des plaies et des ulcères dermiques (Belmessikh, 2011).

II.3.2. L'alpha-amylase

II.3.2.1. Définition

L' α -amylase [α -(1,4)-D-glucane glucanohydrolase] comme toutes les enzymes est une macromolécule appartenant à la classe des protéines globulaires (Nouadri, 2011), de type endoglucanase de la classe des hydrolases, dont la masse moléculaire est comprise entre 50 et 60 kDa, qui agissent sur les liaisons osidiques (1,4) (Benabdellah, 2014), de l'amylose, de l'amylopectine, de l'amidon et du glycogène à l'exclusion des liaisons terminales de ces chaînes. Elle provoque la libération du glucose, du maltose et surtout de l' α -dextrines (Benaouida, 2008).

II.3.2.2. Classification, nomenclature

Nom codifié : EC 3.2.1.1

Nom commun : Alpha -amylase

Autres nom (s) : Glycogénase, α -amylase ; endoamylase ; Taka-amylase A, maxilase.

Nom systématique : 1,4 – alpha -D-glucane-4-glucano hydrolase (Schamburg et Slzmann, 1991).

II.3.2.3. L'alpha amylase d'origine microbienne

Parmi les bactéries amylolytiques on trouve, *Bacillus* qui est largement utilisé pour sa production d'alpha amylase thermostable afin de répondre aux besoins industriels. *B. subtilis*, *B. stearothermophilus*, *B. licheniformis* et *B. amyloliquefaciens* sont connus pour être de bons producteurs d'une amylase et ceux-ci ont été largement utilisés à des fins commerciales (Bousseboua, 2002). Les champignons appartenant au genre *Aspergillus* ont été les plus couramment employées pour la production d'alpha-amylase (Bouix et Leveau, 1999).

II.3.2.4. Applications des alpha amyloses

Les α -amyloses microbiennes sont parmi les enzymes les plus utilisées dans les procédés industriels : agro-alimentaires (La sucrerie pour la préparation des sirops sucrés à

base d'amidon de maïs et de sirops de chocolats), dans les applications médicales afin d'augmenter le taux des α -amylases dans le sang (**maktouf, 2013**). Elles sont utilisées aussi dans l'industrie du textile pour le désencollage des tissus ainsi que dans les domaines de la tannerie, de la papeterie (**Teodoro et al., 2000**) et des détergents (**Malhotra et al., 2002**).

II.3.3. Cellulase

II.3.3.1. Définition

Les cellulases [1,4-(1,3;1,4)- β -D-Glucanohydrolase] sont des enzymes extracellulaires qui peuvent briser les liaisons β -(1, 4) des polysaccharides de la cellulose en glucose. C'est l'un des principaux membres de la famille des glycosides hydrolases, elles sont classées selon leur mode d'action catalytique et selon leur structure (**Korish, 2003**). C'est un système enzymatique complexe, composé de trois types principaux d'enzymes :

- **L'endo-cellulase (EC 3.2.1.4)** casse les liaisons internes pour perturber la structure cristalline de la cellulose et pour exposer les différentes chaînes de polysaccharide de cellulose, en diminuant rapidement le degré de polymérisation du substrat (**Kleman-Leyer et al., 1994; Davies et Henrissat, 1995; Warren, 1996; Xu et al., 2000**).
- **L'exoglucanase (EC 3.2.1.91)** attaque les liaisons β (1-4) glycosidiques des chaînes de cellulose par les extrémités non réductrices et libère exclusivement du cellobiose (**Teeri, 1997; Xu, 2002**).
- **La cellobiase (EC 3.2.1.21)** hydrolyse les liaisons β (1-4) glycosidiques du cellobiose, pour donner deux molécules de glucose (**Onsori et al., 2005**).

II.3.3.2. Nomenclature des cellulases

-Nom codifié : E.C.3.2.1.4

-Nom systématique : 1,4-(1,3 ; 1,4)- β -D-Glucan 4-glucanohydrolase.

-Nom recommandé : Cellulase.

-Synonymes : Endoglucanase, Endo-1,4- β -Glucanase, Cellulase carboxyméthylque, β -1,4-endoglucanhydrolase, Celludextrinase, Avicelase, ect. (**Schamburg et Salzmann, 1991**).

II.3.3.3. Source microbienne des cellulases

Les cellulases peuvent être produites par champignons : *Neocallimastix frontalis*, *Sphaeromonas communis* et *Piromonas communis* et les levures : le genre *Khryveromyces lactis* (**Hasper et al., 2002**).

Parmi les bactéries cellulolytiques : *Sporocytophaga*, *Myxococcoides*, *Baccillus subtilis*, *Cellulomonas* et *Pseudomonas*, *Clostridium thermocellum*, *Clostridium stercorarium*,

Ruminococcus albus, *Ruminococcus flavefasciens* et *Bactéroides succinogenes* (Vidaud, 1984) et *Erwinia chrysantharum* qui possèdent un seul complexe multienzymatique extracellulaire appelé cellulosome (Schwarz, 2001). Des actinomycètes tels que *Thermomonospora fusca* (Tuncer et al., 1999), quelques archaebactéries *Pyrococcus orikoshii* (Ando et al., 2002).

II.3.3.4. L'application des cellulases

Les cellulases sont des enzymes très importantes utilisées dans plusieurs industries comme les industries alimentaires, textiles, pharmaceutiques, thérapeutiques, l'industrie des détergents et la papeterie, pour faciliter la filtration des diverses suspensions riches en fibre cellulosiques (Hamoudi, 2011). Elles sont également utilisées en nutrition animale, l'extraction de jus de fruits et légumes et dans la production de biocarburants (Smeets et al., 2004).

II.3.4. Les enzymes lipolytiques

Les enzymes lipolytiques sont des hydrolases qui catalysent l'hydrolyse de liaisons esters (C-O) dans les huiles et autres esters aliphatiques, elles sont impliquées dans le métabolisme des lipides. Les enzymes lipolytiques sont ubiquitaires dans la nature et on les retrouve dans les trois règnes du vivant jouant des rôles physiologiques très diversifiés (Hui et Howles, 2002).

II.3.4.1. Classification des enzymes lipolytiques

Les enzymes lipolytiques peuvent être classées en trois grands groupes sur la base de leur fonction et de leurs spécificités, les carboxylesterases (EC 3.1 .1.1), les lipases (EC 3.1.1.3) et les phospholipases (EC 3.1.1.4). Les carboxylesterases et les lipases bactériennes ont été originalement classées en huit familles distinctes nommées (I-VIII) sur la base de leurs séquences et de leurs propriétés biochimiques (tableau2)(Arpigny et Jaeger, 1999). Une classification plus exhaustive a été réalisée par Fisher et Pleiss, 2003, « The lipase engineering database » déposée sur le site web <http://www.led.uni-stuttgart.de/>.

Tableau II. Le système de classification des familles des enzymes lipolytiques établie par Arpigny et Jaeger (1999).

Familles	Sous-familles	Particularités
I	1	Lipases nécessitant une chaperonne; sécrétion de type II; poids moléculaire 30-32 kDa
	2	Lipases nécessitant une chaperonne; sécrétion de type II; poids moléculaire 33 kDa
	3	Lipases de <i>Pseudomonas</i> sp.; sécrétion de type I; poids moléculaire 50-65 kDa
	4	Lipases de <i>Bacillus</i> sp.; pentapeptide AxSxG; poids moléculaire 20 kDa
	5	Lipases de <i>Geobacillus</i> sp. et <i>Staphylococcus</i> sp.; poids moléculaire 40-65 kDa (bactéries Gram-positives)
	6	Lipases de <i>Streptomyces</i> sp. et <i>Propionobacterium</i> sp.
II (GDSL)		Lipases de type GDSL; site actif en N-terminal; 5 régions conservées (I à V)
III		Homologie élevée entre 2 lipases de <i>Streptomyces</i> sp. et <i>Moraxella</i> sp.
IV (HSL)		Famille des HSL (<i>Hormone sensitive lipase</i>); pentapeptide GDSAG pour le site actif et HGGG en amont
V		Présence de triade catalytique et repliement α/β ; similarités avec déhalogénases, haloperoxydases et époxide hydrolases
VI		Estérases; poids moléculaire 23-26 kDa
VII		Estérases; poids moléculaire ~ 55 kDa
VIII		Pentapeptide conservé GxSxG mais absence de triade catalytique Ser-Asp-His; motif particulier SxxL en N-terminal

II.3.4.2. Lipases

II.3.4.2.1 Définition

Les lipases ou Tri-acyl-glycérol hydrolases (EC3.1.1.3) sont une classe particulière des hydrolases d'esters carboxyliques. Ces enzymes catalysant en présence d'eau, le clivage des liaisons esters des triglycérides libérant des acides gras et successivement des diglycérides, des monoglycérides et dans certains cas du glycérol. Ils peuvent aussi, dans les conditions appropriées, catalyser la réaction inverse d'estérification (verger et al., 1985).

II.3.4.2.2. Source des lipases

Les lipases sont ubiquitaires dans l'environnement. Elles sont produites par une variété de plantes, d'animaux et de microorganismes. Les lipases microbiennes, c'est-à-dire produites par des bactéries du genre : *Achromobacter*, *Alcaligenes*, *Arthrobacter*, *Bacillus*, *Burkholderia*, *Chromobacterium* et *Pseudomonas* (Gupta et al., 2004). Par certaines levures du genre : *Geotrichium* (Schrage et Cygler, 1993 ; Schrage et al., 1991), *Candida* (Grochulski et al., 1993 ; Grochulski et al., 1994) ainsi que chez les champignons : *Thermomyces*, *Penicillium* et *Rhizopus* (Derewenda et al., 1994).

II.3.4.3. Les estérases

II.3.4.3.1. Définition

L'estérase « carboxylique ester hydrolase » est spécifique aux esters solubles, en revanche la lipase « carboxylique ester hydrolase » est spécifiquement active sur les esters

d'acide gras insolubles et elle n'hydrolyse que les liaisons esters présents uniquement à l'interface eau-huile. L'estérase est une enzyme qui catalyse l'hydrolyse de diverses liaisons esters. Elle est subdivisée en plusieurs groupes dépendants de la liaison esters qu'elle a hydrolysée (**Ismail, 1998**).

II.3.4.3.2. Source des estérases

Les estérases sont des enzymes ubiquitaires qui ont été retrouvées autant chez des Eucaryotes, les Eubactéries, que chez des Archaeobactéries, telles que *Bacillus* spp., *Pseudomonas* spp., *Arthrobacter* spp., *Aspergillus* spp. (**Ramnath et al., 2016**).

II.3.4.4. Applications industrielles des enzymes lipolytiques

Les enzymes lipolytiques sont utilisées dans l'industrie : Agro-alimentaire (Développement de saveurs dans les fromages, Transformation/production d'huiles), Pharmaceutique et biomédical (Biomarqueurs), Produits nettoyants (Détergents), Environnement (Traitement des eaux usées) et en Industrie du textile (Modification de fibres synthétiques...) (**Amélie, 2010**).

**Chapitre III. Méthodes d'isolement,
d'identification et d'étude des
activités enzymatiques des bactéries
rhizosphériques**

III.1. Isolement des bactéries rhizosphériques

Afin d'isoler les bactéries rhizosphériques, des prélèvements à partir de la partie rhizosphérique du sol doivent être effectués, ces prélèvements doivent être mis dans des sachets fermés préalablement stérilisés dans un autoclave, puis transportés directement au laboratoire dans une glacière (4°C) (Abdesselam et Latache, 2017).

III.1.1. Préparation des dilutions

A l'aide d'une micropipette de 1000 µL, une série de dilution (10^{-1} à 10^{-7}) doit être préparée en prélevant 1g du sol et en le plaçant dans un tube à essai stérile contenant 9 ml d'eau physiologique pour obtenir la première dilution de 10^{-1} puis de chaque dilution la même opération est répétée jusqu'à obtention de la dilution 10^{-7} (Abdesselam et Latache, 2017).

III.1.2. Mise en culture

En général, 100 µL des dilutions 10^{-4} jusqu'à 10^{-7} sont prélevés et étalés sur les milieux PCA, King A et King B. Les boîtes de Pétri portant les indications nécessaires (dilution, type du milieu de culture, origine de l'échantillon, la date) sont incubées à 30°C pendant 24-72 heures (Abdesselam et Latache, 2017).

III.2. Purification et conservation des isolats

Dans le but d'obtenir des souches pures, chaque colonie apparaissant différente phénotypiquement sur PCA, et présentant une pigmentation diffusible bleu-verte et jaune-verte sur King A et B respectivement est purifiée par repiquage sur PCA en utilisant la méthode des stries serrées. La méthode de conservation des isolats pures consiste à repiquer les souches en tube sur gélose inclinée, les tubes sont ensuite incubés 24 heures, pour être stockés ensuite à 4°C pour favoriser leur viabilité et limiter les possibilités de variations (Abdesselam et Latache, 2017).

III.3. Identification des isolats

L'identification des isolats bactériens est réalisée par des examens macroscopique et microscopique et par l'étude de quelques caractères biochimiques.

III.3.1. Identification morphologique et culturale

III.3.1.1. Examen macroscopique

L'examen macroscopique des cultures est le premier examen effectué après l'isolement, il consiste à observer directement, à l'œil nu, l'aspect morphologique des

colonies obtenues sur milieu PCA, King A et King B après 24 à 48 heures d'incubation en tenant compte des critères suivants :

- **La taille** : Elle peut être mesurée à l'aide d'une règle graduée pour les grandes colonies. Il est possible aussi d'utiliser le microscope au grossissement le plus faible pour mesurer la taille des petites colonies en utilisant les micromètres oculaires.
- **La forme des colonies** : Circulaire, filamenteuse, irrégulière, ronde, étoilée, etc.
- **Le relief** : Plane, élevée, convexe, bombée, bossue, etc.
- **Le bord** : Régulier, ondulé, lobé, dentelé, filamenteux, bouclé,
- **L'aspect** : Duveteux, poudreux, granuleux, etc.
- **La consistance** : Molle, élastique, cartonneuse,
- **La couleur de la culture et de son verso,**
- **L'opacité** : Les colonies sont soit opaques et ne laissent pas passer la lumière, translucides en laissant passer la lumière mais on ne voit pas les formes au travers, comme le verre dépoli ou transparentes (laissent passer la lumière et voir les formes au travers) (**Ripert, 2013**).

III.3.1.2. Examen microscopique

L'observation microscopique permet de définir certains caractères morphologiques et organisationnels des bactéries.

III.3.1.2.1. Examen microscopique à l'état frais

L'état frais permet d'observer des bactéries vivantes et apporte des renseignements sur la morphologie, le mode de groupement, la mobilité et la quantité approximative de bactéries. (**Delarras et al., 2003**). Pour cela, une goutte de la culture bactérienne en milieu liquide est déposée à l'aide d'une anse de platine préalablement stérilisée sur une lame propre. Dans le cas de culture bactérienne solide, il faut déposer tout d'abord sur la lame une goutte d'eau distillée stérile, puis y dissocier l'inoculum bactérien. La lame est ensuite recouverte d'une lamelle et l'observation se fait au microscope à l'objectif moyen $\times 40$. Afin de mettre en évidence certains détails de structure, l'objectif $\times 100$ à immersion est utilisé (**Rejsek, 2002**).

III.3.1.2.2. Coloration de Gram

C'est la coloration de référence en bactériologie. Elle est réalisée comme suit : Sur un frottis fixé à la chaleur ou à l'alcool, la lame est recouverte de violet de gentiane, après 1 minute, le colorant est rejeté, et la lame est recouverte de lugol pendant 1 minute puis il est rejeté, une décoloration à l'alcool est ensuite réalisée, la lame étant tenue inclinée, la durée de décoloration à l'alcool est variable selon l'épaisseur du frottis. En pratique, la durée de

décoloration est suffisante lorsque ce qui s'écoule en bas de la lame inclinée devient clair, la décoloration est stoppée par un nouveau lavage à l'eau. La lame est recouverte ensuite de fuchsine diluée pendant 30 secondes à 1 minute puis lavée à l'eau et séchée entre deux feuilles de papier filtre, puis à la chaleur, elle est ensuite examinée à l'immersion.

Les bactéries à Gram positif doivent apparaître colorées en violet et les bactéries à Gram négatif en rose. (**Lanotte et al., 2016a**).

III.3.2. Tests biochimiques

III.3.2.1. Etude des enzymes respiratoires

III.3.2.1.1. Recherche de la catalase

La catalase est une enzyme présente chez la plupart des bactéries aérobies strictes et anaérobies facultatifs. Elle décompose l'eau oxygénée (H_2O_2) provenant de la respiration oxydative, en eau et en oxygène qui se dégage (**Marchal et al., 1982**).

La recherche de la catalase se fait en suivant le protocole suivant : A l'aide d'une pipette pasteur une goutte d'eau oxygénée à 10 volumes est déposée au milieu d'une lame propre et dégraissée, avec une pipette boutonnée, un prélèvement à partir d'une culture pure de 18 heures est déposé sur l'eau oxygénée (**Marchal et al., 1982**). Le dégagement des bulles de gaz indique la présence de catalase. S'il n'y a pas de dégagement des bulles de gaz cela indique l'absence de la catalase.

III.3.2.1.2. Recherche de l'oxydase

C'est une enzyme qui intervient dans divers couples d'oxydoréduction, l'enzyme recherchée est la phénylène-diamine-oxydase, pour cela, un disque d'oxydase est déposé sur une lame, il est imbibé avec une goutte d'eau physiologique stérile. Puis une partie de la colonie à étudier y est étalée (**Flandroits et Chomarot, 1988**). Une coloration violet foncé apparaît immédiatement sur le disque indiquant une oxydase positive. L'absence de coloration indique que l'oxydase est négative.

III.3.2.1.3. Recherche du nitrate réductase

Certaines bactéries peuvent utiliser les glucides en anaérobie en présence d'un accepteur d'hydrogène qui peut être l'ion NO^- . Elles possèdent alors une enzyme spéciale : La nitrate réductase qui catalyse la réduction des nitrates en nitrite et éventuellement en azote.

La recherche de cette enzyme se fait selon les étapes suivantes : Un tube de bouillon nitraté (bouillon nutritif supplément de 1,5% de nitrate de potassium) estensemencé avec la bactérie a étudié, et est on incube à $37^\circ C$ après une incubation de 18 à 24 heures, 3 gouttes du

réactif sulfanilique + acide acétique (nitrate1) et 3 gouttes du réactif alpha-naphtylamine + acide acétique (nitrate2) sont rajouté (**Frenry et al., 2007**).

Une coloration rouge permet de dire qu'il y a présence de NO₂ donc la bactérie est nitrate réductase positive. En absence de coloration une poudre de zinc est ajoutée, s'il y a coloration rouge ceci signifie que la poudre de zinc a réduit les nitrates en nitrites donc la bactérie est nitrate réductase négative, s'il n'y a pas de coloration ceci veut dire que la bactérie est nitrate réductase positive.

III.3.2.2. Etude du métabolisme glucidique

III.3.2.2.1. Etude des différents sucres

- **TSI (Tri Sugar Iron)**

Ce complexe permet de confirmer la fermentation du glucose avec ou sans production de gaz et d'orienter l'identité du germe par l'étude de l'attaque du saccharose, lactose et la production d'H₂. La fermentation des sucres entraîne la production d'acides faisant virer au jaune l'indicateur du pH qui est le rouge de phénol. (**Marchal et al., 1982**). Pour cela, un ensemencement en stries serrées de la pente et par piqure centrale profonde le culot à l'aide d'une pipette pasteur ou d'une anse préalablement stérilisée. Les tubes sont incubés avec le bouchon non bien vissé (**Marchal et al., 1982**).

Au niveau du culot, s'il y a virage de la couleur vers le jaune ceci indique une fermentation du glucose. Un décollement de la gélose indique une production de gaz, un noircissement du milieu indique une production d'H₂S.

Au niveau de la pente, si la pente est rouge, la bactérie est lactose négatif, saccharose négatif, dans le cas où la pente est jaune, la bactérie est dite lactose positif, saccharose positif.

- **Etude de la dégradation du mannitol (test du mannitol mobilité)**

Le milieu mannitol mobilité permet de détecter la fermentation du mannitol et la mobilité de la bactérie à étudier, pour ce faire, à l'aide d'une anse de platine les tubes sont ensemencés par piqure centrale dans la gélose en culot, jusqu'au fond et sont incubés à 37°C pendant 18 à 24 heures (**Frenry et al., 2007**).

Le virage au jaune indique que le mannitol est fermenté donc la bactérie est mannitol positif, alors que si le milieu reste rouge, la bactérie est dite mannitol négatif. S'il y a une diffusion des bactéries dans la gélose, la bactérie est mobile, si la culture est uniquement au niveau de la piqure d'ensemencement la bactérie n'est pas mobile (**AFSSAPS, 2008**).

III.3.2.2.2. Voie d'attaque des glucides

Les bactéries utilisent les glucides suivant deux voies métaboliques : Une voie oxydative en présence d'oxygène de l'air et une voie fermentative en absence d'oxygène de l'air (**Ferron, 1984**). Afin de déterminer quelle voie est utilisée, deux tubes de MEVAG (Milieu pour l'Etude de la Voie d'Attaque des Glucides) sont ensemencés par piqure central jusqu'au fond avec une culture pure et jeune. L'un des tubes est recouvert d'une couche d'huile de vaseline stérile (**Ferron, 1984**). Un virage de la couleur au jaune dans les deux tubes démontre un métabolisme de fermentation, alors qu'une acidification uniquement de la partie supérieure du tube ouvert indique un métabolisme oxydatif.

III.3.2.2.3. Détermination de la voie de fermentation

La mise en évidence de la voie fermentaire empruntée par un germe est très importante. Elle consiste à différencier entre les deux voies de la fermentation des acides mixtes mise en évidence par le test RM (rouge de méthyle) et la voie butandiol mis en évidence par la réaction de Voges Proskauer (VP). Ce test consiste à utiliser le milieu Clark et Lubs qui est ensemencé avec une culture pure et incubé à 37°C. Après incubation de 24 heures, le milieu est réparti entre deux tubes, dans le premier tube, quelque goutte de RM est ajoutée alors que dans le deuxième tube on ajoute de la soude NaOH et de l' α -naphthol (**Marchal et al., 1982**).

Une coloration rouge pour le premier tube (RM+) et une coloration jaune pour le deuxième (VP-) indiquent une fermentation acide mixte, alors qu'une coloration jaune pour le premier tube (RM-) et une coloration rouge pour le deuxième (VP+) indiquent une fermentation butandiolique.

III.3.2.2.4. Enzymes intervenant dans la dégradation des sucres

- **Étude de la dégradation du lactose**

Il s'agit de la recherche d'une bêta-galactosidase qui dégrade le lactose en galactose et glucose. En pratique, ce test utilise l'ortho-nitrophényl-galacto-pyranoside (ONPG) ou le paranitrophényl-galacto-pyranoside (PNPG). L'ONPG et le PNPG diffusent spontanément dans la bactérie (à la différence du lactose qui nécessite une perméase) et sont dégradés par la bêta-galactosidase en galactose et orthonitrophénol ou paranitrophénol respectivement, qui sont des composés jaunes. Ce test est inclus dans la plupart des galeries d'identification. Individuellement, il peut être réalisé en mettant en contact une suspension bactérienne épaisse en eau physiologique avec un disque d'ONPG. Après une mise à l'étuve à 37 °C pendant 18 heures, l'apparition d'une coloration jaune peut être observée (**Lanotte et al., 2016b**).

III.3.3. Etude du métabolisme des protéides

III.3.3.1. Recherche des décarboxylases

Trois décarboxylases sont fréquemment recherchées : La lysine décarboxylase (LDC), l'ornithine décarboxylase (ODC) et l'arginine dihydrolase (ADH). Lorsque les bactéries possèdent ces enzymes, elles vont métaboliser les acides aminés en formant des amines. La recherche de ces décarboxylases se fait en ensemencement à l'aide d'une culture pure trois tubes de bouillons contenant l'acide aminé à étudier, une petite quantité de glucose et du pourpre de bromocrézol d'où la coloration violette du milieu. Après 18 heures d'incubation à 37°C, un milieu trouble de couleur violette correspond à une réaction positive et un milieu jaune correspond à une réaction négative (**Lanotte et al., 2016b**).

III.3.3.2. Recherche de la tryptophanase

La production d'indole par hydrolyse du tryptophane peut être déterminée en utilisant une culture de la souche à étudier âgée de 24 heures et l'ensemencer dans le milieu de Ferguson ou en eau peptonée dépourvue d'indole. L'indole produit donne une coloration rouge en présence du réactif de Kovacs (para-diméthylaminobenzaldéhyde + alcool isoamylique) ou du réactif de James. La formation d'un anneau rouge correspond à une réaction positive (**Lanotte et al., 2016b**).

III.3.3.3. Recherche de désulphydrases

Cette recherche est réalisée sur milieu de Kligler-Hajna. La dégradation des acides aminés soufrés conduit à la formation de groupements SH ou H₂S qui se combinent avec le citrate de fer ammoniacal du milieu pour former du sulfure de fer noir (**Lanotte et al., 2016b**).

III.3.4. Utilisation du citrate comme seule source de carbone

Les bactéries possédant une citrate perméase sont capables d'utiliser le citrate en induisant une alcalinisation du milieu. Dans ce test, le milieu citrate de Simmons est utilisé, il ne contient qu'une seule source de carbone (citrate) en plus d'un indicateur de pH (bleu de bromothymol). L'ensemencement se fait sur la moitié de la pente et la partie supérieure servira de témoin négatif. Après une incubation à 35°C pendant 18 heures, les observations suivantes sont faites :

Un virage du milieu du vert au bleu correspond à une dégradation du citrate, donc bactérie citrate positif

Milieu inchangé, donc la bactérie ne possède pas la perméase nécessaire pour l'utilisation du citrate (bactérie citrate négatif). (**Marchal et al., 1982**).

Absence d'anneau rouge en surface indique que la bactérie est indole est négatif.

III.3.5. Les galeries Api

Le système API® BioMérieux (Appareillage et Procédé d'Identification) est une version miniaturisée et standardisée des techniques biochimiques conventionnelles pour l'identification des bactéries. Lorsqu'une suspension bactérienne de densité convenable est répartie dans les différentes alvéoles qui composent la micro-galerie (contenant de substrats déshydratés), les métabolites produits durant la période d'incubation se traduisent par des changements de couleur spontanés ou révélés par addition de réactifs. Elle permet l'identification d'une centaine de bacilles à Gram négatif dont les Entérobactéries. Elle comprend 20 tests biochimiques (**annexe**) (**Anonyme 1**).

III.3.6. Détermination de l'activité enzymatique

La détermination de la production de certaines enzymes est également utilisée afin d'identifier les bactéries. Le principe de ces tests est décrit ci-après.

III.4. Identification moléculaire

III.4.1. Extraction de l'ADN

L'extraction de l'ADN bactérien est une étape primordiale avant toute manipulation génétique. L'ADN bactérien chromosomique est extrait par chauffage à 100°C dans un tampon Tris-EDTA (TE) (1mM de Tris-HCl et EDTA 10 mM pH 7,4). Quelques colonies d'une culture pure sont introduites dans un tube Eppendorf stérile contenant 180 µl de tampon TE stérile. La suspension est agitée puis chauffée à 100°C dans un bain sec pendant 10 mn, elle est ensuite placée dans un bain de glace pendant 10 mn ; le choc thermique permet la lyse cellulaire. La suspension est centrifugée à 12000 rpm à 4°C/10 mn. Le surnageant est récupéré stérilement dans un autre tube Eppendorf pour être conservé à 4°C pendant une nuit pour permettre l'élimination de l'ARN par lyse (**Cherif, 2014**).

III.4.2. Dosage de l'ADN

Un dosage est nécessaire pour déterminer la qualité, la quantité et la pureté de l'ADN dans les échantillons. Il est effectué à l'aide d'un Spectrophotomètre UV. 1µl de chaque surnageant est déposé dans une cellule de l'appareil et la lecture de la DO se fait par un balayage de 230 à 280 nm. Le rapport 260/280 (indiquant la contamination par les protéines) doit être compris entre 1,7 et 1,9 (**Cherif, 2014**).

III.4.3. Amplification par PCR

La PCR permet l'amplification spécifique d'un fragment de l'ADN cible en présence d'oligonucléotides codant cette région d'intérêt. Le principe de la PCR consiste en la répétition d'un cycle triphasique : 1- Dénaturation de l'ADN à amplifier .2-Hybridation de deux amorces de part et d'autre de la séquence cible. 3-Une élongation des amorces par l'activité d'une ADN polymérase en présence de dNTP (**Cherif, 2014**).

La Taq ADN polymérase possède une activité terminal-transférase qui a pour effet l'ajout d'une désoxyadénosine aux extrémités 3' des fragments amplifiés. La PCR est réalisée dans un thermocycleur après addition des réactifs suivants : 0,25 µl de dNTP, 4 µl du tampon MgCl₂, 0,22 µl de Taq-polymérase, 1 µl de l'échantillon d'ADN, 0,3µl de chaque amorce spécifique du gène à amplifier, H₂O (eau ultra pure stérile) pour avoir un volume final de 25µl. L'amplification de l'ADN se déroule comme suit : après une première phase de dénaturation (5vmn à 94°C), 35 cycles comprenant chacun trois étapes de variation de température : une dénaturation de 45 s à 94°C, une hybridation de 1mn à 55°C et une élongation de 2 mn à 72°C. A la fin du dernier cycle, une incubation de 7 mn à 72°C permet d'achever les synthèses de l'ADN en cours. Un refroidissement de 10 mn est réalisé à 14°C. La réaction PCR nécessite un témoin positif (ADN d'une souche de collection de référence amplifiée selon le même protocole), un témoin négatif (réactifs sans ADN) (**Cherif, 2014**).

III.4.4. Electrophorèse sur gel d'agarose

Les produits d'amplification sont analysés sur gel d'agarose à 1.5% (p/v) contenant quelques gouttes d'une solution de bromure d'éthidium (0,5 mg/l). La migration se fait pendant 20 mn à 100V. Le gel est visualisé sous lumière UV (**Cherif, 2014**).

III.4.5. Séquençage

Le produit de l'amplification du gène de l'ARNr 16S est séquencé. Une purification des fragments d'ADN amplifiés est effectuée au préalable par un traitement enzymatique (exonuclease I et Shrimp phosphatase alcaline SAP) dégradant les amorces et les dNTP restants. Par la suite, les échantillons sont réamplifiés et marqués en utilisant un kit de marquage « Big Dye Terminator Cycle Sequencing ». Le milieu réactionnel est composé : de Taq polymérase, dNTP, ddNTP marqués par un composé fluorescent « dye », d'une amorce reverse fraîchement préparée à une concentration de 25 µM, d'un tampon de dilution (200mM Tris pH9, 5mM MgCl₂) et de l'eau ultrapure. L'amplification s'effectue dans un thermocycleur selon le programme suivant : 1mn à 96°C, puis 25 cycles de : 10 s à 96°C, 5 s à 50°C, 4 mn à 60°C (amplification) et un cycle à 4°C (refroidissement). L'ADN obtenu est

ensuite précipité par 1µl de l'acétate de sodium 3M pH 5.2 dans 50µl d'éthanol à 95%, centrifugé 4000 rpm/40min, puis lavé dans l'éthanol à 70% et centrifugé une deuxième fois à 4000 rpm/ 30°C. Le culot est séché par centrifugation à 1000 rpm dans une centrifugeuse plaque inversée (Soft Start). Le culot sec est suspendu dans une solution de formamide, puis introduit dans un séquenceur (**Cherif, 2014**).

III.4.6. Analyse phylogénétique

Les séquences partielles de l'ARNr 16S des souches obtenues sont comparées avec les séquences des ARNr 16S disponibles par la recherche des BLAST (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov>), dans le National Center of Biotechnology Information- USA (NCBI) data-base.

L'alignement multiple des séquences est réalisé en utilisant le Clustal W version 1.8. Le dendrogramme phylogénétique est analysé par la méthode Neighbor -Joining en utilisant le logiciel Mega 5 (5.05) (**Cherif, 2014**).

III.5. Etude de l'activité enzymatique

III.5.1. Activité amylolytique

La détection de la production de l'amylase, se fait en utilisant de la gélose nutritive additionnée de 0.2% d'amidon soluble, les souches bactériennes sont inoculées au centre des boîtes de Pétri, après une incubation de 48 heures à 37°C, la révélation se fait par une inondation de la boîte de Pétri avec une solution d'iode (**Gopinath et al., 2017**).

La présence d'une zone claire (pas de couleur bleue) autour des colonies indique la capacité d'hydrolyse de l'amidon tandis que la couleur bleue indique une incapacité à dégrader l'amidon (**Izyan et al., 2020**).

III.5.2. Activité protéolytique

La détermination de la protéase peut se faire en utilisant deux substrats différents :

- **Hydrolyse de la caséine**

Pour cela, un milieu de culture contenant du bouillon nutritif (8 g), glucose (1 g) et de l'agar (18 g), pH 7,4 est préparé, après autoclavage 15 ml de lait écrémé sont autoclaver séparément et ajouté au milieu.

Les bactéries sont ensuite inoculées sur ce milieu, après une période de croissance de 72 heures à 30°C, 2 ml de HCl (0,1 mol l⁻¹) sont ajouté sur le milieu. La présence de halos clairs autour des colonies signifie une production de protéase (**Carrim et al., 2006**).

- **Hydrolyse de la gélatine**

Un autre milieu de culture est préparé, c'est le milieu de Frazier, contenant de la gélose nutritive (pH 7,0) et de la gélatine bactériologique (4,0 g/L). Les bactéries sont ensuite inoculées et les boîtes incubées à 30 C pendant 72 heures.

Après révélation par inondation des boîtes de Pétri par le révélateur de Frazier (eau distillée 100 ml, HCl 20 ml et dichlorure de mercure 15 g), la présence d'un halo clair autour de la colonie bactérienne est signe de production de la protéase (**Carrim et al., 2006**).

III.5.3. Activité cellulosique

Pour le criblage primaire des bactéries hydrolysant la cellulose, les souches bactériennes sont cultivées sur un milieu gélosé minimal additionné de 1% de CMC (carboxyméthyl cellulose) (pH 7,0), après une incubation à 30°C pendant 4 à 5 jours, une révélation avec une solution de rouge Congo à 0,1% suivie par une solution de NaCl (1 M) (décoloration) est réalisée. L'apparition d'une zone d'hydrolyse autour des colonies indique la synthèse de cellulase extracellulaire (**Saini et al., 2017**).

III.5.4. Activité lipolytique

Pour détecter la production des lipases et des estérases se fait tous d'abord par un test de précipitation en utilisant un milieu de culture de base additionné de Tween 20 et Tween 80 respectivement. Cette méthode est basée sur le principe de la précipitation du sel de calcium. L'hydrolyse du tween libère des acides gras qui se lient au calcium dans le milieu pour former des cristaux insolubles autour du point d'inoculation. Le Tween 80 est utilisé pour la détection des lipases car il contient des esters d'acide oléique, tandis que le Tween 20 est utilisé pour les estérases car il contient des esters d'acides gras à chaîne inférieure

Les bactéries à tester sont inoculées sur un milieu de culture composé de : 10 g de peptone, 5 g de NaCl, 0,1 g de CaCl₂.2H₂O, 20 g d'agar et 10 ml (v / v) de Tween 20/80. Après incubation à 37 ° C pendant 2 à 4 jours, une précipitation blanche autour de la limite de la colonie indique une activité lipasique ou estérasique (**Ramnath et al., 2017**).

III.5.5. Détermination de l'indice enzymatique

Une détermination de l'indice enzymatique se fait après chaque test en utilisant l'équation suivante (**Lechuga et al., 2016**) :

$$\text{Indice d'activité enzymatique} = \frac{\text{Diamètre de l'halo}}{\text{Diamètre de la colonie}}$$

Conclusion

« Messieurs, c'est les microbes qui auront le dernier mot »

Louis Pasteur

Conclusion

Plusieurs études, ont démontré la capacité des bactéries rhizosphériques à produire des enzymes extracellulaires, on citera à titre d'exemple, l'étude de **Alouache et Chouder (2019)** qui ont étudié le pouvoir de production de cinq enzymes extracellulaires par les bactéries rhizosphériques de deux plantes médicinales *Origanum vulgare*, *Teucrium polium* collectées dans la région de Ghailassa de la wilaya de Bordj Bou Arreridj (Algérie). Concernant les bactéries isolées à partir de la rhizosphère *Origanum vulgare*, 52,5 % des bactéries produisaient la cellulase, 65% de la protéase, 42.5 de la lipase mais aucune ne produisait de l'amylase ni l'estérase. Pour *Teucrium polium*, 52.5% produisaient de la cellulase, 5.76% de l'amylase, 55.76% de la protéase, et aucune ne produisait l'estérase.

Une autre étude faites sur les bactéries rhizosphériques de *Matricaria chamomilla* et *Rosmarinus officinalis* de la région de Hasnaoua de la wilaya de Bordj Bou Arreridj (Algérie) a permis la détection de la production de tous les enzymes étudiées par les bactéries des deux parties rhizosphériques, cellulase (51% et 39.09%), amylase (27.17% et 20.95) , protéase (43.47% et 66.67%), lipase 4.34% et 6.67%), estérase (20.65% et 10.47%) (**Lefkir et Mahbous, 2018**).

Selon **Mukhtar et ces collaborateurs (2019)**, sur les 45 souches identifiées dans la rhizosphère de *Salsola stocksii*, plus de 50% ont montré des résultats positifs pour les activités catalase, protéase, gélatinase et lipase, alors qu'environ 84% des souches ont montré une activité gélatinase, 76% une activité catalase, 74% une activité lipase et 47% des souches ont montré des résultats positifs pour les activités protéolytique et amylolytique de la rhizosphère d'*Atriplex amnicola*.

Les rhizobactéries sont devenues dernièrement un sujet intéressant qui a pour objectif principal d'étudier les microorganismes présents dans la rhizosphère et d'exploiter leurs particularités qui offrent des perspectives biotechnologiques divers. Selon les résultats des recherches précédentes, les rhizobactéries représentent une bonne source de différentes enzymes qui peuvent être utilisées dans divers domaine tels que l'industrie alimentaire humaine et animale, les détergents pour lessives, l'industrie des tanneries et l'industrie pharmaceutique, etc.

Références bibliographiques

Références bibliographiques

A

Abdesselam N., Latache N. E. H., 2017, Identification et caractérisation des bactéries isolées à partir de différents sols, Diplôme de Master En Biologie Option Microbiologie, Université de Tlemcen. p.18.

Abhilash P. C. and Singh N., 2009, Seasonal variation of HCH isomers in open soil and plant-rhizospheric soil system of a contaminated environment. *Environmental Science and Pollution Research*, 16 :727-740.

Afssaps. Agence française de sécurité et produit de santé, 2008, Diagnostic et antibiothérapie des infections urinaires bactériennes communautaires de l'adulte.

Alouache W., Chouder W., 2019, Activités enzymatiques des bactéries rhizosphériques de deux plantes médicinales (*Teucrium polium* et *Origanum vulgare*), Diplôme de Master, Université Mohamed El Bachir El Ibrahim B.B.A. p. 32-38.

Amélie C., 2010, Identification et caractérisation de nouvelles enzymes lipolytiques thermostables provenant d'une banque métagénomique. Mémoire de Magister. Université du Québec INRS-Institut Armand-Frappier. p.38.

Ando S., Ishia H., Kosugi Y., 2002, Hyperthermostable Endoglucanase from *Pyrococcus horikoshii*. *Applied and Environmental Microbiology*. 68(1):430-433.

Aouar L., 2012, Isolement et identification des actinomycètes antagonistes des microorganismes phytopathogènes. Mémoire de master. Université Mentouri, Constantine. p.5.

Arpigny J. L. et Jaeger K. E., 1999, Bacterial lipolytic enzymes : Classification and properties. *Biochemical Journal*, 343 : 177-83.

Assamoi A. A., Destain J., Thonart P. H., 2009, Aspect microbiologique de la production par fermentation solide des endo-beta 1-4-xylanes de moisissures le cas de *Penicillium canescens*. *Biotechnologie, Agronomie, Société et Environnement*, 13(2) : 281-294.

Anonyme 1 : Galerie d'identification miniaturisée, le système api

http://mas.stephanie.free.fr/microbiologie_bio1/fiches%20pdf/galerieAPI20E.pdf.

B

Baldani J. I., Krieg N. R., Divan-Baldani V. L. Hartmann A., Döbereiner J., 2005, *In* : Bergey's Manual of Systematic Bacteriology, 2nd edn, Springer-Verlag, Garrity, New York, Berlin, Heidelberg, vol. 2, pp. 7–26.

Barredo J. L., 2005, Microbial enzymes and biotransformations, Part of Methods in Biotechnology, Humana Press, (MIBT, vol.17) .p.1-319.

Barriuso J., Pereyra M. T., Lucas Garcia J. A., Megias M., Gutierrez Manero F. J. et Ramos B., 2005, Screening for putative PGPR to improve establishment of the symbiosis *Lactarius deliciosus* *Pinus* sp. *Microbial Ecology*, 50(1) :82–89.

Bashan Y. and Holguin G., 1998, Inoculants of plant growth promoting bacteria for use in agriculture. *Biotechnology Advances*, 16: 729-770.

- 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(1) :19-27.
- Belmessikh A., 2011**, Optimisation de la production de la protéase neutre par *Aspergillus oryzae* sur milieu à base de déchets de tomates. Comparaison entre milieu solide et milieu liquide. Mémoire de Magister. Université Mentouri Constantine. Algérie .p.25.
- Benabdallah A., 2014**, Screening de souches extrémophiles halophiles du genre *Bacillus* de la sebkha d'Oran (caractérisation phénotypique). Mémoire De Master. Université de Tlemcen. Algérie. p.35.
- Benaouida K., 2008**, Etude de l'alpha amylase de levures isolées d'un écosystème extrême (sol environnant des sources thermales) et cultivées sur un milieu à base de lactosérum. Mémoire Magistère. Université Mentouri. Constantine. p.104.
- Bergey's M., 2010a**, *Bacillus* and *Paenibacillus* sp. *In: Plant Growth and Health Promoting Bacteria*, Springer Science & Business Media: 330-336.
- Bergey's M., 2010 b**, L'évaluation, la taxonomie et la diversité microbien *In : Microbiologie*, Ed. De Boek supérieur : 498-501.
- Bergmeyer H. U., Gawekn K., 1979**, Principes de l'analyse enzymatique. Technique Et Documentation , Lavoisier. Paris. p. 17.
- Boudehane A., Mezioud R., 2017**, Caractérisation physico-chimique d'enzymes bactériennes d'intérêt industriels et thérapeutiques, Mémoire Master, Université Akli Mohand Oulhadj – Bouira. p.5.
- Bouix M., Leveau J. Y., 1999**, Production des enzymes. *In* Scriban R (Ed): *Biotechnologie* Ed. Lavoisier. p.344-400.
- Bousseboua H., 2002**, Eléments de Microbiologie Générale. Programmes de graduation. Editions de l'Université Mentouri. Constantine Algérie p.230-231.
- Bowen G. D., Rovira A. D., 1991**, Microbial colonization of plant roots. *Annual Review of Phytopathology*, 14: 121-144.

C

- Campbell R., Greaves M. P., 1990**, Anatomy and community structure of the rhizosphere *In: The Rhizosphere*, Ed. Lynch J. M. Wiley J & Sons, Ltd, Essex. p.11-34.
- Carrim A. J. I., Barbosa E. C., Gonçalves V. J. D., 2006**, Enzymatic activity of endophytic bacterial isolates of *Jacaranda decurrens* Cham. (Carobinha-do-campo), *Brazilian Archives of Biology and Technology*, 49(3), p. 353-359.
- Cavaglieri L., Orlando J., Rodriguez M. L., Chulze S., Etcheverry M., 2005**, Biocontrol of *Bacillus subtilis* against *Fusarium verticillioides* in vitro and at the maize root level. *Research in Microbiology*, 156 (5-6) :748-754.
- Cherif H., 2014**, Amélioration de la croissance du blé dur en milieu salin par inoculation avec *Bacillus* sp. et *Pantoea agglomerans* isolées de sols arides, Diplôme de Doctorat en Sciences, Université Ferhat Abbas Sétif 1, p.57.
- Chi Z., Ma C., Wang P., Li H. F., 2007**, Optimization of medium and cultivation conditions for alkaline protease production by the marine yeast *Aureobasidium pullulans*. *Bioresource Technology*, 98; 534–538.

Copeland R. A., 2004, Enzymes: a practical introduction to structure, mechanism, and data analysis, 2nd ed. John Wiley & Sons, Inc., New York, NY, USA. p.112.

D

Darrah P. R., 1993, The rhizosphere and plant nutrition: a quantitative approach. *Plant and Soil*, 155 : 1-20.

Davet P., 1996, Vie microbienne du sol et production végétale, éditions INRA. p.52-57.

Davies G., Henrissat B., 1995, Structures and mechanisms of glycosyl hydrolases. *Structure*, 3 : 853-859.

Delarras C., Trebaol B., 2003, Surveillance sanitaire et microbiologique des eaux : Réglementation - prélèvements - analyses. TEC & DOC. p.269.

Dendouga W., 2006, Isolement et identification de moisissures productrices de protéases à partir de milieux extrêmes. Extraction et étude des propriétés de la protéase produite. p.1-84.

Derewenda U., Swenson L., Wei Y., Green R., Kobos P.M, Joerger R., Hass M.J., Derewenda Z. S., 1994, Conformational lability of lipases observed in the absence of an oil –Water interface: crystallographic studies of enzymes from the fungi *Humicola lanuginosa* and *Rhizopus delemar*. *Journal of lipid Research*, 35: 524-534.

F

Ferron A., 1984, Bactériologie médicale à l'usage des étudiants e médecine. La Madeleine: Crouan et Roques; p.375.

Fischer M., Pleiss J., 2003, The Lipase Engineering Data base: a navigation and analysis tool for protein families. *Nucleic Acids Research*, 31(1) : 319–321.

Flandrois J. P., Chomar M., 1988, L'examen cytbactériologique des urines. *in* : Bactériologie médical pratique, MEDSI / Mc GRAW-HILL, Paris ; 21, p.3-11.

Frenry J., Renard R. P., 2007, Précis de bactériologie clinique, 2^{ème} édition, paris, p.1764.

G

García-Gómez M. J., Huerta-Ochoa S., Loera-Corral O., Prado-Barragán L. A., 2009, Advantages of a proteolytic extract by *Aspergillus oryzae* from fish flour over a commercial proteolytic preparation. *Food Chemistry*, 112: 604–608.

Garrity G. M., Bell J. A., Lilburn T., 2005, Bergey's Manual of Systematic Bacteriology, 2nd Ed, The Proteobacteria, Part A, Introductory Essays (edited by Brenner, Krieg, Staley and Garrity), Springer, New York, 2 :159–206.

Gassara F., 2012, Production économique d'enzymes ligninolytiques par fermentation à l'état solide des déchets agroindustriels et leurs applications. Université du Québec, Institut national de la recherche scientifique. p.6-7.

Germida J. J., Siciliano S. D., de Freitas J. R., Seib A. M., 1998, Diversity of root-associated bacteria associated with field-grown canola (*Brassica napus* L.) and wheat (*Triticum aestivum* L.). *FEMS Microbiology Ecology*, 26(1): 43-50.

- Glick B. R., Grichko V. P., 2001**, Amelioration of flooding stress by ACC deaminase-containing Plant -growth promoting bacteria. *Plant Physiology and Biochemistry*, 39: 11-17.
- Gopinath S. C., Anbu P., Lakshmipriya T., Tang T. H., Chen Y., Hashim U., Ruslinda A. R., Arshad M., 2015**, Biotechnological aspects and perspective of microbial keratinase production. *BioMed research international*.
- Gopinath S. C. B., Periasamy Anbu M. K., Arshad M. D., Thangavel L., Voon C. H., Hashim U., Chinni S. V., 2017**, Biotechnological Processes in Microbial Amylase Production: a review, *BioMed Research International*, pages 9.
- Granner D. K., Murray R. K., Rodwell V. W., 2008**, *Biochimie de HARPER*. 3ème édition. De Boeck. Bruxelles., 47. pp. 49-51, 483.
- Gray E. J., Smith D., 2005**, Intracellular and extracellular PGPR: commonalities and distinctions in the plant-bacterium signaling processes. *Soil Biology and Biochemistry*, 37: 395-412.
- Grochulski P., Li Y., Schrag J. D., Bouthillier F., Smith P., Harrison D., Rubin B., Cygler M., 1993**, Insights into interfacial activation from an open structure of *Candida rugosa* lipase. *Journal of Biological Chemistry*, 268:12843-12847.
- Grochulski P., Li Y., Schrag J. D., Cygler M., 1994**, Two conformational states of *Candida rugosa* lipase. *Protein science*,3: 82-91.
- Gupta A., Gopal M., Tilak K. V., 2000**, Mechanism of plant growth promotion by rhizobacteria. *Indian Journal of Experimental Biology*, 38: 856–862.
- Gupta M. R., 2004**, Bacterial lipases: an overview of production, purification and biochemical properties. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 64(6):763-81.

H

- Haas D., Défago G., 2005**, Biological control of soil-borne pathogens by fluorescent *Pseudomonas*. *Nature Reviews Microbiology*, 3(4) : 19-307.
- Hamoudi H., 2011**, Criblage de souches d'actinomycètes productrices de cellulases industrielles. Mémoire De Magister. Université Abderrahmane Mira de Bejaia. Algérie. p.14.
- Hartley B. S., 1960**, Proteolytic enzymes. *Annual Review of Biochemistry*, 29: 45–72.
- Hartmann A., Rothballer M., Schmid M., 2008**, Lorenz Hiltner, a pioneer in rhizosphere microbial ecology and soil bacteriology research, *Plant and Soil*. 312: 7-14
- Hasper A. A., Dekkers E., Mil M. V., Van de Vondervoort P. J. I., De Graaff L. H., 2002**, EglC, a new endoglucanase from *Aspergillus niger* with major activity towards xyloglucan. *Applied and Environmental Microbiology*, 68(4):1556-1560.
- Hoorman J. J., Islam R., 2010**, Understanding soil microbes and nutrient recycling. FACT SHEET. Agriculture and Natural Resources. The Ohio State University, p.1-5.
- Hui D.Y., Howles P. N., 2002**, Carboxyl ester lipase: structure-function relationship and physiological role in lipoprotein metabolism and atherosclerosis. *Journal of Lipid Research*, 43(12) :2017-30.
- Hugenholtz P., 2002**, Exploring prokaryotic diversity in the genomic era. *Genome Biology* 3(2).

Hupé J., 2008, Enrichissement Et Recherche de certaines activités enzymatiques produites par des bactéries aérobies thermophiles. Mémoire de Magister. Université du Québec INRS-Institut Armand-Frappier. p.5.

I

Ismail S., 1998, Production of fatty acid alcohol esters by esterase activity from *Pseudomonas fragi*. the degree of Master of Science, McGill University Montreal, Québec. page 4.

Izyan, N. S., Azman, D. N., Mohd Saad, N. A., Sauid, S. M., & Hamzah, F., 2020, Effect of Tacca Starch Loading on Production of Amylolytic Enzymes from Ragi Tapai, Materials Science Forum, 987: 118-123.

K

Kleman-Leyer K. M., Gilkes N. R., Miller R. C., Kirk T. K., 1994, Changes in the molecular size distribution of insoluble cellulose by the action of recombinant *Cellulomonas fimi* cellulases. Biochemical Journal, 302: 463-469.

Klopper J. W., Leong M., Teinteze, Schroth M. N., 1980, Enhancing plant growth by siderophores produced by plant growth promoting rhizobacteria. Nature, 286: 885–886.

Klopper J. W., Litshitz R., Zablutowicz R. M., 1989, Free living bacterial inoculation for enhancing crop productivity. Trends in Biotechnology, 7: 39-43.

Klopper J. W. 1993, Plant-growth-promoting rhizobacteria as biological control agents, *In: Soil Microbial Ecology-Applications in Agricultural and Environmental Management*. Ed., F.B. Metting , Journal, Marcel Dekker inc., New York . p. 255-274.

Korish M., 2003, Production, Purification, Properties and Application of the Cellulase from a Wild type Strain of a Yeast isolate. Faculty of Biology, Johannes Gutenberg- University, Mainz, Germany. p.13.

L

Lanotte P., Isnard C., Garnier F., Mereghetti L., 2016 a, Du prélèvement à la caractérisation des souches *In : Bactériologie médicale Techniques usuelles*, 3e édition Elsevier Masson SAS, p. 20.

Lanotte P., Isnard C., Garnier F., Mereghetti L., 2016 b : Du prélèvement à la caractérisation des souches *In : Bactériologie médicale Techniques usuelles*, 3e édition Elsevier Masson SAS, p.32-34.

Lechuga E. G. O., Zapata I. Q., Niño K. A., 2016, Detection of extracellular enzymatic activity in microorganisms isolated from waste vegetable oil contaminated soil using plate methodologies, African Journal of Biotechnology, 15(11): 408-416.

Lefkir S., Mahbous A., 2018, Activités enzymatiques des bactéries rizosphériques de deux plantes médicinales (*Matricaria chamomilla* et *Rosmarinus officinallis*), Diplôme de Master, Université Mohamed El Bachir El Ibrahim B.B.A.p.22-45.

Lemanceau P., 1992, Effets bénéfiques de rhizobactéries sur les plantes : exemple des *Pseudomonas* spp. fluorescents. Agronomie, 12 : 413-437.

Lepinay C., 2013, Etude des interactions plantes-microbes et microbes-microbes au sein de la rhizosphère, sous un aspect coûts-bénéfices, dans un contexte de variation environnementale, Université de Bourgogne, p.263.

- Lombi E., Wenzel W. W., George R. G., Adriano C. D., 2001**, Trace Elements in the Rhizosphere. CRC Press LLC. *In: Microbial Health of the Rhizosphere.* p.5.
- Lugtenberg B. J. J., Dekkers L. C., Bloemberg G. V., 2001**, Molecular determinants of rhizosphere colonization by *Pseudomonas*. *Annual Review of Phytopathology*, 39:461-90.
- Lynch J. M., 1990**, The Rhizosphere. Lynch J. M., (ed.) John Wiley & Sons Ltd, Chichester. p.1-10.
- Lynch J. M., Whipps J. M., 1990**, Substrate flow in the rhizosphere. *Plant and soil* 129: p.1-10.

M

- Maktouf S., 2013**, Activités amylase et lichenase d'une nouvelle souche de *Bacillus* Production sur milieu solide et caractérisation. Thèse de Doctorat. Université De Toulouse. p.27.
- Malhotra R., Noorwez S. M., Satyanarayana T., 2002**, Production and partial characterization of thermostable and calcium-independent alpha-amylase of an extreme thermophile *Bacillus thermooleovorans* NP54. *Letters in Applied Microbiology*, 31(5):378-384.
- Marchal bourdon J. L., richard C., 1982**, Les milieux de cultures pour l'isolement et l'identification biochimique des bactéries. Editeurs, paris, p.482.
- Meunier N. , 1999**, Evaluation du potentiel de production de protéases bactériennes à partir de boues d'épuration municipales .Mémoire pour l'obtention du grade de Maitre ès Sciences , INRSETE-eau , Université du Quebec. Canada. p.1-168.
- Moulin L., Munive A., Dreyfus B., Boivin-Masson C., 2001**, Nodulation of legumes by members of the β -subclass of Proteobacteria. *Nature*, 411(6840): 948–950.
- Mukhtar S., Mehnaz S., Mirza M. S., Malik K. A., 2019**, Isolation and characterization of bacteria associated with the rhizosphere of halophytes (*Salsola stocksii* and *Atriplex amnicola*) for production of hydrolytic enzymes, *Brazilian Journal of Microbiology*, 50:85–97.

N

- Nouadri T., 2011**, L' α -amylase de *Penicillium camemberti* PL21 : Production, Purification, Caractérisation et Immobilisation. Thèse de Doctorat. Université Mentouri Constantine. Algérie. p. 28.

O

- Onsori H., Zamani M. R., Motallbei M., Zarghami N., 2005**, Identification of over producing strain of endo- β -1, 4-glucanase in *Aspergillus* species: characterization of crude carboxymethyl cellulose. *African Journal Biotechnological*, 4 (1): 26-30.
- Osman K. T., 2013**, Concepts of soil. *In: Osman K. T. (ed) Soils: Principles, Properties and Management.* Springer Science Business Media, Dordrecht, p 1-7.

P

- Peter H., Georges B. J., Raven K. A., Mason J. B., Losos S. R., 2015**, *Biologies*, 9ème Ed. amirécaïne du Raven, p.1406.
- Petit J., Jobin P., 2005**, La fertilisation organique des culture les bases. Fédération d'agriculture biologique du Québec. Bibliothèque nationale de Canada. ISBN: 2-9809006-0-5, p. 48.

Prescott L. M., Harley J. P., Klein D. A., Claire M., Bacq C., Dusart J., 2007, Microbiologie. Ed, De Boeck université, p.492.

Prescott L. M., Harley J. P., Klein D. A., 2003, Microbiologie. De Boeck : Bruxelles.2ème édition. p.1164.

R

Raaijmakers J. M., Vlami M., de Souza J. T., 2002, Antibiotic production by bacterial biocontrol agents. *Antonie Van Leeuwenhoek*, 81: 537-547.

Raaijmakers J. M., Paulitz T. C., Steinberg C., Alabouvette C., Moëgne-Loccoz T., 2009, The rhizosphere: a playground and battlefield for soil-borne pathogens and beneficial microorganisms. *Plant Soil*, 321, 341–361.

Ramnath L., Sithole B., Govinden R., 2016, Classification of lipolytic enzymes and their biotechnological application in the pulping industry: A review. *Canadian Journal of Microbiology* (3) :3-20.

Ramnath L., Sithole B., Govindena R., 2017, Identification of lipolytic enzymes isolated from bacteria indigenous to Eucalyptus wood species for application in the pulping industry, *Biotechnology Reports*, 15: 114-124.

Rao M. B., Tanksale A. M., Ghatger M. S., Deshpande V. V., 1998, Molecular and biotechnological aspects of microbial proteases. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 62 (3): 597-635.

Rawat S., Mushtaq A., 2015, Plant growth promoting rhizobacteria, a formula for sustainable agriculture: A review. *Asian Journal of plant Science and Research*, 5(4): 43-46

Rawlings N. D., Barret A. J., 1994, Families of cysteine peptidases. *Methods in Enzymology*, 244 : 461-486.

Rejsek F., 2002, Analyse des eaux : techniques et aspects réglementaires. Scérèn CRDP Aquitaine. p.358.

Ripert C., 2013, Mycologie médicale. Edition Lavoisier. p. 327.

S

Saini A., Aggarwal N. K., Yadav A., 2017, Isolation and screening of cellulose hydrolyzing bacteria from different ecological niches, *Bioengineering and Bioscience* 5(1): 7-13.

Saharan B. S., Nehra V., 2011, Plant Growth Promoting Rhizobacteria: A Critical Review. *Life Sciences and Medicine Research*, 21:1-30.

Sawada H., Kuykendall L. D., Young J. M., 2003, Changing concepts in the systematics of bacterial nitrogen fixing legume symbionts. *Journal of General and Applied Microbiology*, 49: 155-179.

Schamburg D., Salzman M. G. B. F., 1991, cellulase. *In: Enzyme Handbook*, Springer-Verlag Berlin, Vol IV. p: 1-11.

Schrag J. D., Li Y., Wu S., Cygler M., 1991, Ser- his- Glu triad from the catalytic site of the lipase from *Geotrichum candidum*. *Nature*, 4: 351-761.

- Schrag J. D., Cygler M., 1993**, A refined structure of the lipase from *Geotrichum candidum*. Journal of Molecular Biology, 230: 575-591.
- Schwarz W. H., 2001**, The cellulosome and cellulose degradation by anaerobic bacteria. Applied Microbiology and Biotechnology, 56: 634-649.
- Scow K. M., 2004**, Soil microbiology. In: Schaechter, M. (ed). The Desk Encyclopedia of Microbiology. Elsevier Ltd, China, p. 914-926.
- Smeets E., Faaij A., Lewandowski I., 2004**, Quicksan of global bio-energy potentials to 2050. An analysis of the regional availability of biomass resources for export in relation to underlying factors. 69: 175-202.
- Somers E., Vanderleyden J., Srinivasan M., 2004**, Rhizosphere bacterial signalling: a love parade beneath our feet. Critical Reviews in Microbiology, 304 : 205–240.
- Soufiane B., 1989**, Isolement à partir de la rhizosphère des conifères de bactéries et d'actinomycètes antagonistes aux champignons phytopathogènes Diplôme de maître ès science, université Laval.
- Sturz A. V., Christie B. R., 2003**, Beneficial microbial allelopathies in the root zone: the management of soil quality and plant disease with rhizobacteria. Soil and Tillage Research, 72:107-123.
- Subba Rao N. S., 1999**, Soil microbiology: of soil microorganisms and plant growth, No 631.46 S82 (1999).

T

- Teeri T. T., 1997**, Crystalline cellulose dégradation: new insight into the function of cellobiohydrolases. Trends biotechnology , 15: 160-165.
- Tejera N. A., Ortega E., González-López J., Lluch C., 2003**, Effect of some abiotic factors on the biological activity of *Gluconacetobacter diazotrophicus*. Journal of Applied Microbiology, 95(3): 528–535.
- Teodoro C. E. D., Martins M. L. L., 2000**, Culture conditions for the production of thermostable amylase by *Bacillus* sp. Brazilian Journal of Microbiology, (31):28-302.
- Tuncer M., Balli A. S., Rob A., Wilson M. T, 1999**, Optimization of extracellular lignocellulolytic enzyme production by a termophilic actinomycete *Termomonospora fusca* BD25. Enzyme and Microbiol Technology, 25:38-47.

V

- Verger R., 1985**, Les enzymes lipolytiques. In Mouranche A. & Costes C. Hydrolases et dépolymérasés. Enzymes d'intérêt industriel. Paris, Edition : Gauthier Villars. 313-329.
- Vidaud C., 1984**, Contribution à l'étude de l'introduction du système cellulasique de *Trichoderma* sp. par utilisation d' analogue de substrat thiosaccharidique. Thèse de 3eme Cycle. Université de Grenoble.

W

- Warren R. A. J., 1996**, Microbial hydrolysis of polysaccharides. Annual Review of Microbiology, 50 :183-212.

Weller D. M., 1988, Biological control of soilborne plant pathogens in the rhizosphere with bacteria. Annual Review of Phytopathology, 26: 379-407.

X

Xu B., Hellman U., Ersson B., Janson J. C., 2000, Purification, characterization and aminoacid sequence analysis of a thermostable, low molecular mass endo- β -1,4-glucanase from blue mussel, *Mytilus edulis*. European Journal of Biochemistry, 267:4970-4977.





















Xu B., 2002, Endoglucanase and Mannanase from Blue Mussel, *Mytilus edulis*: Purification, Characterization, Gene and Three Dimensional Structure. Thèse de doctorat. Faculty of Science and Technology, Uppasala University, Sweden.

Z

Zahir Z. A., Arshad M., Frankenberger W. T., 2004, Plant growth promoting rhizobacteria: applications and perspectives in agriculture. Advances in Agronomy, 81 : 97-168.

Annexe

Tableau de lecture de la galerie miniaturisée API

Microtube	Substrat	Caractère recherché	Lecture directe ou indirecte (Test si nécessaire)	Résultat +	Résultat -
ONPG	Ortho-Nitro-Phényl-Galactoside	β -galactosidase	Lecture directe		
ADH LDC ODH	Arginine Lysine Ornithine	Arginine dihydrolase Lysine décarboxylase Ornithine décarboxylase	Lecture directe		
CIT	Citrate	Utilisation du citrate	Lecture directe		
H ₂ S	Thiosulfate de sodium	Production d'H ₂ S	Lecture directe		
URE	Urée	Uréase	Lecture directe		
TDA	Tryptophane	Tryptophane désaminase	Lecture indirecte Test : ajouter 1 goutte de Perchlorure de Fer		
IND	Tryptophane	Production d'indole	Lecture indirecte Test : ajouter 1 goutte de réactif de Kovacs		
VP	Pyruvate de sodium	Production d'acétoïne	Lecture indirecte (Attendre 10 minutes) Test : ajouter 1 goutte de KOH et d' α -naphthol		
GEL	Gélatine emprisonnant des particules de charbon	Gélatinase	Lecture directe		
GLU à ARA	Substrat carboné	Utilisation de substrat carboné	Lecture directe		
NO ₂ / N ₂	Nitrates (NO ₃)	Nitrate réductase	Lecture indirecte dans la cupule GLU Test : ajouter 1 goutte de réactif de Griess Ajouter de la poudre zinc en cas de résultat négatif	