



UNIVERSITE MOHAMED EL BACHIR EL IBRAHIMI
BORDJ BOU ARRERIDJ

UNIVERSITY MOHAMED EL BACHIR EL IBRAHIMI
BORDJ BOU ARRERIDJ

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 بوعرييرج

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

كلية علوم الطبيعة والحياة وعلوم الارض 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



UNIVERSITE MOHAMED EL BACHIR EL IBRAHIMI
BORDJ BOU ARRERIDJ

UNIVERSITY MOHAMED EL BACHIR EL IBRAHIMI
BORDJ BOU ARRERIDJ

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

Activités enzymatiques des bactéries rhizosphériques

de deux plantes médicinales

(*Matricaria chamomilla* et *Rosmarinus officinalis*)

Présenté par : Lefkir Samra

Mahbous Ahlem

Devant le jury :

Président: M^r. Bensouilah Taqiyeddine M.C.B (Univ Mohamed El Bachir El Ibrahimi B.B.A)

Encadrant: M^r. Sedrati Nouari M.A.A (Univ Mohamed El Bachir El Ibrahimi B.B.A)

Examineur M^{me}. Iratni Nadjet M.A.A (Univ Mohamed El Bachir El Ibrahimi B.B.A)

Année universitaire: 2017/2018

Remerciements

Avant toute chose, nous tiens à remercier «Allah» qui nous a donné la force et la volonté la patience pour terminer ce modeste travail.

Ces quelques lignes vont nous permettre de remercier les responsables et les personnes qui ont contribué de près ou de loin à la réalisation de ce travail.

*Nous adressons notre gratitude et nous remercions **Mr. Sedrati Nouari** qui a dirigé ce travail, ça ne sera pas suffisant pour lui exprimer toute notre grande reconnaissance pour la confiance, la disponibilité, la générosité et le grand soutien qu'il nous a accordé pour faire aboutir ce travail.*

*Nous sommes très honorées par la présence de **Mr. Bensouilah Taqiyeddine***

Pour avoir accepté de présider le jury de la soutenance de notre thèse, qu'il trouve ici nôtres vifs remerciements.

*Nos remerciements sont aussi adressés aux membres de jury **M^{me}. Iratni Nadjet***

qui nous ont fait l'honneur d'avoir accepté l'évaluation ce travail et qu'elle accepte ici nos sentiments de gratitude.

*Nous remercions également toute l'équipe du laboratoire, particulièrement **M.***

***Khalil, M. Wassima, M. Sabrina** et **Melle Hayat**, pour leur disponibilité, leur aide et leur patience.*

Merci à nos enseignants qui nous encadraient durant les deux ans de notre formation.

Dédicaces

À mes très chers parents aucune dédicace, aucun mot, ne saurait exprimer réellement mon profond amour, mon respect et ma vive gratitude.

À mon très cher Père l'homme de ma vie, mon exemple éternel, mon source de joie et de bonheur, qui m'a toujours soutenu, et a été toujours présent pour moi.

À la plus chère au monde, ma Mère la lumière de ma vie pour son amour, qui m'a toujours encouragé durant toutes mes années d'études.

A mon binôme SAMRA qui était une sœur plus qu'un binôme.

À mes frères : Mouloud, Zineddine, Anis, Youcef.

A toutes la famille : oncles et tantes, cousins et cousine

A toutes mes amies surtout NADA.

À mes chers enseignants sans exception.

À mes collègues de promotion Microbiologie

A tous ceux que j'aime.

AHLEM

Dédicaces

*À ma motivation de rester dans cette vie
Mon Père et ma Mère Vous êtes ma priorité*

*À ceux qui m'ont accompagné dans ce travail avec tout
l'amour et la patience
Ahlem Acceptez mes excuses.*

*A mon amie et sœur
Sara.....Merci d'être là*

*À Dr. Amína, Dr. Samír, Dr. Mouhammed, Dr.
Mouhammed Amine.....Je vous remercie pour votre
soutien et vos conseils.*

*A toute ma famille..... Je n'oublierai pas vos
encouragements.*

*A tous mes professeurs Que Dieu bénisse vos
efforts*

*A mes collègues de travail.....Je vous remercie
pour votre patience avec moi.*

*A mes collègues de spécialité.....votre connaissance
est un honneur pour moi.*

Aux étudiants ambitieux et courageux

Je vous dédie ce travail.

N'abandonnez pas vos rêves.....vous pouvez les réaliser

SAMRA

Résumé

Résumé

Ce travail s'intéresse à la mise en évidence des activités enzymatiques chez les bactéries rhizosphériques de deux plantes médicinales collectées pendant le mois d'avril (2018) dans la région de Hasnaoua de la wilaya de Bordj Bou Arreridj (Algérie). Après la purification, 92 isolats différents ont été isolés à partir de la rhizosphère de *Matricaria chamomilla*, et 105 à partir de celle de *Rosmarinus officinalis* sur le milieu PCA. En plus de 26 et 22 isolats de *Pseudomonas* spp. obtenus à partir de *M. chamomilla* et *R. officinalis* respectivement sur les milieux King (A et B). Des tests d'activités enzymatiques: cellulase, amylase, protéase, estérase, et lipase ont été effectués. Les résultats obtenus montrent que pour les isolats de *M. chamomilla*, 51% des bactéries isolées possédaient une activité cellulosique, 43,47% une activité protéolytique suivie de 27,17% de souches possédant une activité amylolytique, alors que le pourcentage des souches possédant les activités lipolytique et estérasique ne dépassait pas les 20%. Dans le deuxième échantillon de la rhizosphère de *R. officinalis*, 66,67% des souches possédaient une activité protéolytique alors que pour l'activité cellulosique et amylolytique, les pourcentages des souches actives étaient de 39,09% et 20,95% respectivement. Pour les activités lipolytique et estérasique les pourcentages étaient de 6,67% et 10,47 % respectivement. Concernant les isolats de *Pseudomonas* spp. la cellulose est le substrat le plus dégradé par les isolats de *M. chamomilla* avec un pourcentage de 57,69%; suivi par l'amidon et la caséine avec 19,23 % ensuite la Tween 80 et la Tween 20 avec 7,6% et 3,44 respectivement. Pour les isolats de *R. officinalis*, 50% sont capable de dégrader la cellulose. En deuxième position, on trouve la caséine avec un pourcentage de 27,27%, cependant ces isolats ne dégradent ni l'amidon, ni le Tween 80 ni le Tween 20. Ces résultats montrent l'importance des bactéries rhizosphériques dans la production des différentes enzymes en particulier la cellulase, protéase et l'amylase.

Mots clés: isolats, bactéries rhizosphériques, activité enzymatique, *Matricaria chamomilla*, *Rosmarinus officinalis*

الملخص:

تهدف هذه الدراسة إلى الكشف عن النشاطية الإنزيمية لعزلات بكتيرية جذرية تم عزلها من نبتتين طبيئتين. تم جمعها خلال شهر أبريل 2018 في منطقة حسناوة في ولاية برج بوعرييج (الجزائر). بعد التنقية 92 عزلة مختلفة تم الحصول عليها من *Matricaria chamomilla* و 105 عزلة من *Rosmarinus officinalis* تم عزلها على وسط الزرع PCA. بالإضافة إلى 26 و 22 عزلة من *Pseudomonas spp.* تم الحصول عليها من *M. chamomilla* و *R. officinalis* على التوالي والتي تم عزلها على أوساط الزرع King A و King B. تم إجراء إختبارات النشاط الأنزيمي لكل من السيلولاز، الأميلاز، البروتياز، الإستيراز، والليباز. أظهرت النتائج المتحصل عليها أنه بالنسبة لعزلات *M. chamomilla* النشاطية الأعلى هي نشاطية السيلولاز 51% تليها البروتياز 43,47% بعدها الأميلاز 27,17%، بينما لا تزيد نشاطية الليباز والاستراز عن 20%. بالنسبة للعينة الثانية *R. officinalis* فإن نشاطية البروتياز تمثل أعلى نشاط 66.67% متبوعة بنشاطية السيلولاز والأميلاز بنسبة 39.09% و 20.95% على التوالي. في حين النشاطية الأدنى مثلتها نشاطية الليباز والإستراز. فيما يخص عزلات *Pseudomonas spp.* فقد أظهرت النتائج أن السليلوز هو الأكثر تحللا من طرف عزلات *M. chamomilla* بنسبة 57.69% متبوع بالنشاء والكازيين بنسبة 19.23% يليهم Tween 80 و Tween 20 بنسبة 7.66% و 3.44% على الترتيب. بالنسبة لعزلات *R. officinalis* 50% منها قادرة على تحليل السليلوز، في المرتبة الثانية نجد الكازيين بنسبة 27.27% إلا أن هذه العزلات غير قادرة على تحليل النشاء، Tween 20 و Tween 80. هذه النتائج تبين أهمية البكتيريا الجذرية في صناعة مختلف الانزيمات وبالتحديد السيلولاز، البروتياز و الأميلاز.

الكلمات المفتاحية: عزلات، بكتيريا جذرية، نشاطية إنزيمية، *Rosmarinus officinalis*، *Matricaria chamomilla*

Liste des abréviations

ABA: Acide Abscissique

AIA: Acide Indole Acétique

BN: Bouillon Nutritif

EC: Enzyme Commission

KDa: Kilo Dalton

PCA: Plate Count Agar

PGPR: Plant Growth-Promoting Rhizobacteria

PSM: Phosphate Solubilizing Microorganisms

UFC: Unité Formant Colonie

Liste des figures

Figure 1	Représentation schématique des mécanismes d'action directe et indirecte employés par les PGPR	5
Figure 2	Plante de Romarin (<i>Rosmarinus officinalis</i>).....	16
Figure 3	Plante de Camomille (<i>Matricaria chamomilla</i>).....	17
Figure 4	Prélèvement des échantillons de la rhizosphère.....	19
Figure 5	Nombre des isolats obtenus sur les différents milieux de culture pour les deux plantes.....	23
Figure 6	Quelques images des aspects des colonies obtenues sur PCA.....	23
Figure 7	Conservation des souches purifiées sur bouillon nutritif.....	24
Figure 8	Quelques images des résultats de l'activité cellulasique.....	32
Figure 9	Répartition de l'activité cellulasique selon les index enzymatiques.....	33
Figure 10	Quelques images des résultats de l'activité amylolytique.....	34
Figure 11	Répartition de l'activité amylolytique selon les index enzymatiques.....	35
Figure 12	Quelques images des résultats de l'activité protéolytique.....	36
Figure 13	Répartition de l'activité protéolytique selon les index enzymatiques.....	37
Figure 14	Quelques images des résultats de l'activité lipolytique.....	38
Figure 15	Quelques images des résultats de l'activité estérasique.....	38
Figure 16	Répartition de l'activité lipolytique selon les index enzymatiques.....	38
Figure 17	Répartition de l'activité estérasique selon les index enzymatiques.....	39
Figure 18	Pourcentages des isolats actifs isolés à partir de la rhizosphère de <i>M. chamomilla</i>	40
Figure 19	Pourcentages des isolats actifs isolés à partir de la rhizosphère de <i>R. officinalis</i>	41
Figure 20	Pourcentages de <i>Pseudomonas</i> spp. actifs.....	43

Liste des tableaux

Tableau I	Système de Classification des familles enzymes lipolytiques.....	15
Tableau II	Dénombrement des colonies des échantillons sur milieux PCA, king A et king B.....	22
Tableau III	Index enzymatiques des différentes activités enzymatiques des bactéries isolés de la rhizosphère de <i>M. chamomilla</i>	25
Tableau IV	Index enzymatique des différentes activités enzymatiques des bactéries isolés de la rhizosphère de <i>R. officinalis</i>	27
Tableau V	Comparaison des moyennes des index enzymatiques des souches isolées à partir de la rhizosphère de <i>M. chamomilla</i>	29
Tableau VI	Comparaison des moyennes des index enzymatiques des souches isolées à partir de la rhizosphère de <i>R. officinalis</i>	31
Tableau VII	Index enzymatiques des différentes activités enzymatiques chez les isolats de <i>Pseudomonas</i> spp. à partir de la rhizosphère de <i>M. chamomilla</i>	42
Tableau VIII	Comparaison des moyennes des activités enzymatiques des souches de <i>Pseudomonas</i> spp. isolées à partir de la rhizosphère de <i>M. chamomilla</i>	43
Tableau IX	Index enzymatiques des différentes activités enzymatiques chez les isolats de <i>Pseudomonas</i> spp. à partir de la rhizosphère de <i>R. officinalis</i>	44
Tableau X	Comparaison des moyennes des activités enzymatiques des souches de <i>Pseudomonas</i> spp. isolées à partir de la rhizosphère de <i>R. officinalis</i>	45

Table des matières

Résumé

Liste des abréviations

Liste des figures

Liste des tableaux

Introduction 01

I. Synthèse bibliographique

I.1 La rhizosphère et les rhizobactéries 02

I.1.1 Le sol 02

I.1.2 La rhizosphère 02

I.1.3 La microflore rhizosphérique 02

I.1.4 Les rhizobactéries 03

I.1.5 Effets bénéfiques des rhizobactéries sur les plantes 03

I.1.5.1 Effets directs 04

I.1.5.1.1 Fixation de l'azote 04

I.1.5.1.2 Solubilisation du phosphate 04

I.1.5.1.3 Production de sidérophores 04

I.1.5.1.4 Production de phytohormones 04

I.1.5.2 Effets indirects 05

I.1.6 Les *Pseudomonas* spp. 06

I.2 Les enzymes potentiellement importantes en industrie 07

I.2.1 Généralité sur les enzymes 07

I.2.2 Enzymes importantes à l'échelle industrielle 07

I.2.2.1 Protéase 07

I.2.2.1.1 Définition 07

I.2.2.1.2 Classification et nomenclature 08

I.2.2.1.3 Source microbienne des Protéases 08

I.2.2.1.4 Applications industrielles des protéases 08

I.2.2.2 L'alpha-amylase 09

I.2.2.2.1 Définition 09

I.2.2.2.2 Classification et nomenclature	09
I.2.2.2.3 Source microbienne de l'alpha-amylase	09
I.2.2.2.4 Applications industrielles de L'α- amylase	09
I.2.2.3 Les cellulases.....	10
I.2.2.3.1 Définition	10
I.2.2.3.2 Classification et nomenclature.....	10
I.2.2.3.3 Source microbienne des cellulases.....	11
I.2.2.3.4 Applications industrielles des cellulases.....	12
I.2.2.4 Les enzymes lipolytiques.....	12
I.2.2.4.1 Classification des enzymes lipolytiques.....	12
I.2.2.4.1.1 Les lipases.....	13
I.2.2.4.1.1.1 Sources microbiennes des lipases.....	13
I.2.2.4.1.2 Les estérases.....	13
I.2.2.4.1.2.1 sources microbiennes des estérases	14
I.2.2.4.2 Applications industrielles des enzymes lipolytiques	14
I.1.3 Les plantes modèles.....	15
I.1.3.1 Le Romarin.....	15
I.1.3.1.1 Classification.....	16
I.3.2 La Camomille.....	16
I.3.2.1 Classification.....	17

II. Matériels et Méthodes

II.1 Matériels.....	18
II.1.1 Matériel végétal.....	18
II.1.2 Matériel microbien.....	18
II.1.3 Matériel lourd et chimique.....	18
II.2 Méthodes.....	18
II.2.1 Échantillonnage et isolement de bactéries rhizosphériques	18
II.2.1.1 Échantillonnage du sol rhizosphérique	18
II.2.1.2 Isolement des bactéries	19
II.2.1.3 Purification et conservation des isolats	19
II.2.2 Mise en évidence de l'activité enzymatique	19

II.2.2.1 Screening de l'activité cellulasique	20
II.2.2.2 Screening de l'activité amylolytique	20
II.2.2.3 Screening de l'activité protéolytique	20
II.2.2.4 Screening de l'activité estérasique	21
II.2.2.5 Screening de l'activité lipolytique	21
II.2.3 Analyse statistique	21

III. Résultats et Discussion

III.1 Isolement des bactéries	22
III.2 Purification et conservation des isolats	23
III.3 Mise en évidence de l'activité enzymatique.....	24
III.3.1 l'activité enzymatique de la flore totale isolée sur PCA.....	24
III.3.1.1 Activité cellulasique.....	32
III.3.1.2 Activité amylolytique.....	34
III.3.1.3 Activité protéolytique.....	36
III.3.1.4 Activité lipolytique et estérasique	37
III.3.2 L'activité enzymatique des isolats de <i>Pseudomonas</i> spp.....	41

Conclusion et perspectives

Références bibliographiques

Annexe

Résumé

Introduction

Introduction

Sur terre, les microorganismes ont colonisé à peu près tous les écosystèmes. Certains microorganismes appelés rhizobactéries ont l'aptitude de coloniser les racines de façon intense. Il s'agit par exemple de: *Rhizobium*, *Bradyrhizobium*, *Azorhizobium*, *Arthrobacter*, *Azotobacter*, *Azospirillum*, *Bacillus*, *Enterobacter*, *Pseudomonas*, *Serratia*, *Streptomyces* (Saharan et Nahra., 2011).

Les effets bénéfiques des rhizobactéries sont liés à leur position stratégique à l'interface sol-racine. En effet, le rhizoplan et la rhizosphère sont le siège d'échanges intenses entre la plante et le milieu environnant (Lugtenberg et al., 2002 ; Rawat et Mushtaq, 2015). Les bactéries colonisant les systèmes racinaires peuvent exercer leurs actions bénéfiques de plusieurs façons (Glick, 2001; Rawat et Mushtaq, 2015). Très nombreuses activités enzymatiques peuvent être décelées dans le sol: cellulase, amylase, lipase, protéase... Les rhizobactéries sont parmi les microorganismes qui ont montré un véritable potentiel de ces activités enzymatiques (Chin-A-Woeng et al., 2003).

Les enzymes microbiennes sont largement utilisées dans les procédés industriels en raison de leur faible coût, grande productivité, protection de l'environnement, la plasticité et la grande disponibilité (Burhan et al., 2003). Leurs utilisations dans divers domaines d'applications, tels que l'industrie alimentaire humaine et animale, les détergents pour lessives, l'industrie des tanneries et l'industrie pharmaceutique. Le marché mondial des enzymes industrielles s'élevait à 3,3 milliards de dollars en 2010. En calculant un taux de croissance de 6,6 %, des revenus de 4,4 milliards de dollars ont été prévus pour 2015. Ce marché est estimé à 7,1 milliards de dollars en 2018. (BCCResearch, 2014)

C'est dans cette optique que notre travail est dirigé; il s'agit d'un isolement de bactéries à partir de la rhizosphère de deux plantes médicinales. Ces bactéries sont sélectionnées sur la base de leur production d'enzymes d'intérêt industriel

La stratégie d'étude de ce travail consiste à :

- L'isolement et la purification des bactéries à partir de la rhizosphère de *Matricaria chamomilla* (la camomille) et de *Rosmarinus officinalis* (le romarin).
- La mise en évidence des activités enzymatiques (cellulase, amylase, protéase, lipase, et estérase).

Chapitre I
Synthèse
Bibliographique

I.1 La rhizosphère et les rhizobactéries

I.1.1 Le sol

Le sol est un environnement complexe caractérisé par une grande diversité d'organismes (notamment les microorganismes) de composés chimiques et une structure physique complexe (Wild, 1993). Il est également le substrat qui fournit un soutien physique et des éléments minéraux pour les plantes constituant un élément fondamental pour l'écosystème terrestre (Nehl *et al.*, 2006).

I.1.2 La rhizosphère

La rhizosphère, telle que définie par Hiltner (1904) est le volume du sol soumis à l'influence des racines des plantes, y compris les racines elles-mêmes (Hartmann *et al.*, 2008). Elle est composée de l'endo-rhizosphère, le rhizoplan et l'exo-rhizosphère ou le sol rhizosphérique (Gray et Smith, 2005). La rhizosphère est le lieu d'interactions entre le sol, la plante et les microorganismes. Ces interactions dépendent des conditions physiques du milieu et des organismes mis en jeu (Miah *et al.*, 2000). Cette zone d'interactions s'étend de quelques micromètres à plus de 2 mm en dehors de la surface racinaire (Kennedy et De Luna, 2004). De même, la densité des bactéries est plus élevée dans la rhizosphère que dans le sol distant des racines (Whipps, 2001).

I.1.3 La microflore rhizosphérique

La rhizosphère est l'un des sites écologiques les plus intéressants. Elle inclut une grande diversité de microorganismes qui sont organisés en communautés microbiennes variées, vivant en association avec les systèmes racinaires des plantes supérieures (Khalid *et al.*, 2006).

Dans la rhizosphère, la quantité de microorganismes est au moins 1000 fois plus importante que dans le sol ambiant non influencé par les racines, les bactéries sont les organismes les plus variés et les plus nombreux, leur densité est de l'ordre de 10^9 par gramme de sol (Davet, 1996). La densité des champignons est estimée à 10^6 par gramme de sol. Les protozoaires et les algues sont les moins nombreux, leur densité est de l'ordre de 10^3 par

gramme de sol. Les bactéries filamenteuses ou actinomycètes; peuvent atteindre 10^7 unités par gramme de sol (Davet, 1996).

I.1.4 Les rhizobactéries

Les rhizobactéries représentent le groupe le plus important des microorganismes de la rhizosphère, ce sont les bactéries qui se trouvent sur la surface des racines ou dans le sol rhizosphérique (Li et Kremer, 2000), elles sont caractérisées par leur compétitivité et leur grande capacité d'envahir le réseau racinaire riche en éléments nutritifs durant le cycle de développement de la plante (Kloepper, 1993). Les genres les plus abondants sont notamment *Pseudomonas*, *Bacillus*, *Aéromonas*, *Azoarcus*, *Azospirillum*, *Azotobacter*, *Arthrobacter*, *Clostridium*, *Enterobacter*, *Gluconacetobacter*, *Klebsiella*, et *Serratia* (Tripathi et al., 2007).

Les rhizobactéries sont des hétérotrophes typiques qui ont besoin donc des composés organiques afin de combler leurs demandes énergétiques. Leurs nécessités sont complètement satisfaites à l'intérieur même de la rhizosphère. En effet, la plante secrète de nombreux substrats tels: les cellules corticales et épidermales qui se détachent des racines, les polysaccharides du mucilage racinaire, les sucres et les acides aminés et organiques des exsudats racinaires, et qui peuvent être utilisés par la suite par les rhizobactéries (Campbell et Greaves, 1990).

I.1.5 Effets bénéfiques des rhizobactéries sur les plantes

Certains microorganismes, principalement des bactéries telles *Arthrobacter*, *Azotobacter*, *Azospirillum*, *Bacillus*, *Enterobacter*, *Pseudomonas*, *Serratia* (Gray et Smith, 2005) et *Streptomyces* spp. (Tokala et al, 2002) sont capables de coloniser efficacement les systèmes racinaires. Elles influencent de manière bénéfique la plante en stimulant sa croissance (voie directe) et/ou en la protégeant contre des infections par des agents phytopathogènes (voie indirecte). Ces bactéries de la rhizosphère sont alors reprises sous le terme PGPR (Plant Growth-Promoting Rhizobacteria) (Figure 1).

I.1.5.1 Effets directs**I.1.5.1.1 Fixation de l'azote**

la fixation d'azote par les rhizobactéries est importante pour un système agricole durable, les plantes dépendent principalement du processus de fixation d'azote par les bactéries vivant dans la rhizosphère (Mia et al., 2005; Martinez-Viveros et al., 2010) grâce à la nitrogénase, une enzyme catalysant la réduction de l'azote atmosphérique en ammoniac (Weyens et al., 2010).

I.1.5.1.2 Solubilisation du phosphate

Certains microorganismes sont capables de solubiliser le phosphate et sont appelés des microorganismes solubilisant le phosphate (PSM). Les rhizobactéries du genre *Pseudomonas*, *Bacillus* et *Rhizobium*, sont considérés comme des solubilisatrices principales du phosphate (Rodriguez et Fraga, 1999; Arcand et Schneider, 2006).

I.1.5.1.3 Production de sidérophores

Plusieurs bactéries produisent des molécules appelées sidérophores, ces derniers fixent le fer ferrique (Fe^{3+}) et le transforment en sa forme soluble qui est le fer ferreux (Fe^{2+}). Les sidérophores sont utilisés dans la lutte biologique contre les champignons phytopathogènes. Ces derniers seront privés de fer détourné par les bactéries (Glick et Pasternak, 1998). Une grande variété de sidérophore est produite par des bactéries (Sayyed et Patel, 2011), à titre d'exemple, *Agrobacterium*, *Bacillus*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas*, *Rhizobium* (Zahir et al., 2004).

I.1.5.1.4 Production de phytohormones

Les phytohormones comprennent 5 groupes de substances majeures: Les auxines tel qu'Acide Indole Acétique (AIA), les Cytokinines, les Gibbérelines, l'Acide Abscissique (ABA) et l'éthylène (Vessey, 2003). Les auxines sont impliquées dans l'initiation de la croissance des racines, la division cellulaire et l'élargissement de la cellule (Vessey, 2003). Les cytokinines et les gibbérellines sont impliquées dans la modification de la morphologie des plantes et dans la stimulation de la croissance de la partie aérienne (Van Loon, 2007). L'acide abscissique intervient également dans la régulation de la germination des graines. Pour l'éthylène, il agit comme stimulateur à des concentrations modérées, mais au-delà de ce

niveau, il devient un inhibiteur de l'élongation racinaire, de la croissance latérale des racines et de la formation des poiles (Glick *et al.*, 2007).

I.1.5.2 Effets indirects

L'effet phyto-bénéfiques indirect des bactéries PGPR résulte des interactions entre ces dernières et les pathogènes et/ou parasites de la plante, à l'occasion desquelles les effets négatifs de ces derniers sont diminués (Ramette *et al.*, 2006; Rezzonico *et al.*, 2007). Ces interactions correspondent souvent à:

- La compétition pour l'espace et les éléments nutritifs dont la disponibilité dans le sol est faible (Joshi *et al.*, 2006).
- La synthèse d'enzymes hydrolytiques pour le biocontrôle des champignons phytopathogènes (Woo *et Lorito*, 2007).
- L'inhibition des enzymes ou des toxines produites par les phytopathogènes (Harman *et Shoresh*, 2007).
- L'induction des mécanismes de résistance de la plante (Antoun *et Prévost*, 2005; Kaymak, 2010).

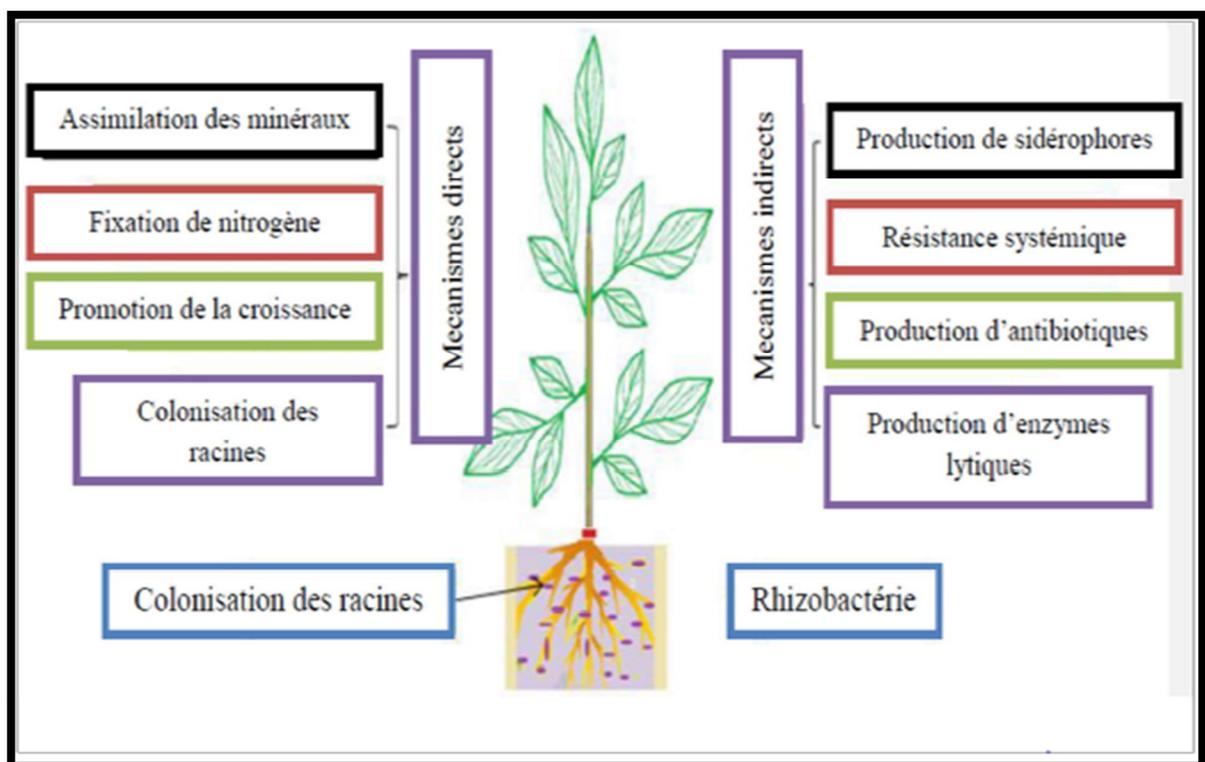


Figure 1: Représentation schématique des mécanismes d'action directe et indirecte employés par les PGPR (Ngoma *et al.*, 2012).

I.1.6 Les *Pseudomonas* spp.

Les *Pseudomonas* sont parmi les bactéries les plus importantes dans la rhizosphère (Misko et Germida, 2002), ce sont des bacilles à Gram négatif de 0,5-1,3 µm de diamètre (Eyquem et al., 2000). Le genre *Pseudomonas* a été décrit en 1894 (Migula, 1894), englobe des bactéries ubiquitaires possédant une grande diversité, incluant des espèces saprophytes et parasites (Lefrère et Rouger, 2000; Choudhary et al., 2009). Ces bactéries se caractérisent par un métabolisme aérobie strict, certaines souches ont une respiration anaérobie avec le nitrate comme accepteur terminal d'électrons et/ou l'arginine. Les *Pseudomonas* sont mobiles grâce à un ou plusieurs flagelles polaires (Eyquem et al., 2000; Haas et Défago, 2005), sont rarement immobiles et sont non sporulés. La plupart des *Pseudomonas* se cultivent à 30 °C et se caractérisent par une croissance lente à 4 °C (Eyquem et al., 2000).

Les *Pseudomonas* spp. fluorescents ont été étudiés depuis des décennies pour leurs effets bénéfiques sur la stimulation de la croissance et la suppression efficace des maladies telluriques des plantes (Bakker et al., 2007). Ces rhizobactéries possèdent de nombreuses caractéristiques qui permettent leur utilisation dans la protection des cultures agricoles (Weller, 2007), elles montrent de multiples propriétés: l'utilisation efficace des exsudats racinaires, la colonisation et la multiplication dans la rhizosphère, la spermosphère et à l'intérieur des cellules végétales (Weller et al., 2002). La diversité métabolique des *Pseudomonas* spp. fluorescents confère à ces bactéries une plasticité importante pour s'adapter à de différents environnements (Latour et Lemanceau, 1997; Misko et Germida, 2002), ce qui implique leur utilisation comme biofertilisants, phytostimulateurs et agents de lutte biologique (Misko et Germida, 2002). Ces rhizobactéries fluorescentes sont devenues un modèle important pour les études écologiques de la rhizosphère et l'analyse du métabolisme secondaire bactérien (Couillerot et al., 2009).

Durant la colonisation du système racinaire des plantes, les *Pseudomonas* fluorescents peuvent agir sur les phytopathogènes par leurs actions antagonistes en produisant des substances antimicrobiennes (Haas et Défago, 2005) et des enzymes lytiques des parois des champignons (Diby et al., 2005; Siddiqui et al., 2005). Comme ils peuvent exécuter leurs actions bénéfiques directement sur les plantes, en induisant leurs défenses naturelles et/ou par la stimulation de leur croissance (Haas et Défago, 2005; Van Loon et al., 1998).

I.2 Les enzymes potentiellement importantes en industrie

I.2.1 Généralité sur les enzymes

Les enzymes sont des protéines de masse moléculaire élevée entre 10 à 1 000 k Da, thermolabiles, biocatalyseurs des réactions métaboliques, possédant des groupements fonctionnels au niveau desquels s'effectue la transformation ou le transfert des substances. Elles sont réparties en 6 classes numérotées de 1 à 6 selon le type de catalyse (**Ulrich Bergmeyer, 1979**):

1. Oxydoréductase: réaction d'oxydo-réduction.
2. Transférase : transfert de radicaux fonctionnels.
3. Hydrolase : réactions d'hydrolyse.
4. Lyase : réaction d'addition sur les doubles liaisons.
5. Ligase : formation de liaison avec l'utilisation d'ATP.
6. Isomérase : formation des isomères.

La production des enzymes est une poursuite centrale au domaine de l'industrie et en biotechnologie. Le marché des enzymes industrielles actuel continue à croître de plus en plus avec une demande accrue sur l'avancement des procédés biotechnologiques qui restent en déficit face à la demande en augmentant de nombre de biocatalyseurs (**Fossi *et al.*, 2005**). Les enzymes peuvent être obtenus à partir de plusieurs sources, telles que les plantes, les animaux et les microorganismes (**Headon et Walsh, 1994**).

I.2.2 Enzymes importantes à l'échelle industrielle

I.2.2.1 Protéase

I.2.2.1.1 Définition

Les enzymes protéolytiques sont des hydrolases, Elles catalysent le clivage des liaisons peptidiques des protéines en fragments polypeptidiques, qui seront par la suite, les acides aminés, offrant une multitude de structures (**Barrett, 1994**). Ces enzymes sont produites aussi bien par les animaux que les végétaux et les microorganismes; leur synthèse s'effectue extracellulairement comme intracellulairement (**Palma *et al.*, 2002**).

Les protéases microbiennes sont plus intéressantes que celles provenant des sources végétales ou animales depuis qu'elles présentent les caractéristiques les plus recherchées dans les applications biotechnologiques. (Coral et al., 2002; Sandhya et al., 2005; Aguilar et al., 2008).

I.2.2.1.2 Classification et nomenclature

Les protéases sont classées dans le sous groupe 4 du groupe 3 (hydrolases) (E.C.3.4.X.X) (IUBMB, 1998). Cependant, elles ne se soumettent pas facilement dans ce système de classification à cause de la complexité de leur structure et de leur mécanisme d'action, leur classification se base sur plusieurs critères: le mode d'attaque de la chaîne, le pH d'activité et la nature de résidu impliqué dans le site actif (Rao et al., 1998).

I.2.2.1.3 Source microbienne des protéases

Les protéases peuvent être produites par les moisissures, les levures et les bactéries. Pour les moisissures les protéases constituent les enzymes les plus importantes qui peuvent être produites par plusieurs genres fongiques tels que *Aspergillus*, *Penicillium*, *Trichoderma*, *Mucor*, *Rhizopus*, *Geotrichum*, *Fusarium*, *Rhizomucor*, *Endothia*, etc. (Frazier, 1967; haq et al., 2003). Certaines levures produisent aussi des enzymes protéolytiques, il s'agit essentiellement des genres *Saccharomyces*, *Rhodotorula*, *Candida*, *Debaryomyces*. *Saccharomyces cerevisiae* (Kresze, 1991; Boiron, 1996). Des Protéases d'origine bactériennes il s'agit essentiellement de la subtilisine ou subtilase, une protéase produite par *Bacillus subtilis* et quelques genres apparentés. (Frazier, 1967). Les bactéries psychrotrophes 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 du fromage (Cousin et al., 1982).

I.2.2.1.4 Applications industrielles des protéases

De toutes les enzymes industrielles, les protéases sont de loin le groupe le plus important. En effet, les protéases représentent à elles seules entre 60% du total des ventes d'enzymes. (García-Gómez et al., 2009). ils sont largement utilisée dans l'industrie alimentaire entre autre dans la synthèse de l'aspartame, la préparation de produits à base de soja et dans l'industrie fromagère qui emploie une quantité importante de protéases, (Rao et al., 1998). Également la grande diversité des protéases est un avantage qui permet à ces enzymes d'être utilisées dans le développement de nouveaux agents thérapeutiques (Rao et

al., 1998; Gupta *et al.*, 2002). Mais à l'heure actuelle l'industrie des détergents est la plus grande utilisatrice des protéases qui sont ajoutées comme des ingrédients clé dans la formulation des détergents pour usage domestique (détergents à lessive, détergents à vaisselle)(Rao *et al.*, 1998).

I.2.2.2 L'alpha-amylase

I.2.2.2.1 Définition

L'alpha-amylase [α -(1,4)-D-glucane glucanohydrolase] comme toutes les enzymes est une macromolécule appartenant à la classe des protéines globulaires (Nouadri, 2011). Les α -amylases sont des endo-enzymes dont la masse moléculaire est comprise entre 50 et 60 kDa (Feillet, 2000), qui hydrolyse au hasard les liaisons osidiques (1,4), 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 d' α -dextrines (Benaouida, 2008).

I.2.2.2.2 Classification et nomenclature

Selon la commission des enzymes (EC), α -amylase appartient à la troisième classe, celle des hydrolases [α -(1,4)-D- glucanohydrolase (E.C.3.2.1.1)].

- **Nom systématique:** α -(1-4) D-glucane glucanohydrolase.
- **Nom codifié:** E.C .3.2.1.1
- **Nom recommandé:** Alpha-amylase.
- **Synonymes:** glycogenase, endoamylase, maxilase, taka-amylase A, thermolase, clarase, amylopsin (Graber, 1989).

I.2.2.2.3 Source microbienne de l'alpha-amylase

Les alpha-amylases sont abondantes dans tous les règnes, elles ont été isolées par extraction à partir des tissus végétaux et animaux ou par fermentation par des cellules microbiennes (Haq *et al.*, 2003; Rao *et al.*, 2004). pour L'alpha -amylase bactérienne ce type d'enzyme est obtenu principalement par fermentation de *Bacillacées* (Milner *et al.*, 1997). Historiquement la première enzyme a été produite à partir de souches de *Bacillus amyloliquefaciens*, *B. licheniformis* (Bousseboua, 2002) ou *B. subtilis* (Mctigue *et al.*, 1995). Cependant d'autres espèces, produisant également cette enzyme telle que *Thermobifida fusca* (Chao-Hsun Yang *et Wen-Hsiung Liu*, 2004), *Streptomyces* sp. (Samrat Chakrabortya *et*

al., 2009). Les producteurs principaux de l'alpha-amylase d'origine fongique sont les moisissures des genres *Aspergillus* et *Rhizopus*. En plus des moisissures, les levures participent également à la production de l'alpha- amylase (**Bouix et Leveau, 1999**).

I.2.2.2.4 Applications industrielles de L' α - amylase

L' α - amylase par sa capacité à modifier un certain nombre des propriétés de l'amidon, participe à de nombreuses applications, permettant de fabriquer des sucres adaptés aux demandes spécifiques des utilisateurs en industrie alimentaire (**Palmer., 1975**). Actuellement, les α -amylases microbiennes sont parmi les enzymes les plus utilisés dans les procédés industriels autres qu'alimentaires (industrie pharmaceutique, textile, papeterie et détergents), en raison de leur productivité et thermostabilité (**Burhan et al., 2003**).

I.2.2.3 Les cellulases

I.2.2.3.1 Définition

Les cellulases [1,4-(1,3; 1,4)- β -D-Glucanohydrolase] se rapportent à un groupe d'enzymes qui, agissant ensemble, hydrolysent la cellulose en sucres simples (**Kader et al., 1999; Korish, 2003**). Elle est l'une des principaux membres de la famille des glycosides hydrolases.

I.2.2.3.2 Classification et nomenclature

Le cellulase 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 différentes chaînes de polysaccharide de cellulose, en diminuant rapidement le degré de polymérisation du substrat (**Kleman-Leyer et al., 1994; Davies et Hanrissat, 1995; Harjunpaa et al., 1996; 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**).

Les cellulases sont classées dans le sous groupe 4 du groupe 3 (hydrolases) :

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 carboxyméthylrique, β -1,4-endoglucanhydrolase, Celludextrinase, Avicelase, ect. (**Schamburg et Salzmann, 1991**).

I.2.2.3.3 Source microbienne des cellulases

Un grand nombre de microorganismes (bactéries, moisissures et levures aérobies et anaérobies) sont capables d'attaquer la cellulose (**Brisou, 1971**). Néanmoins, ce sont les cellulases bactériennes et fongiques qui ont été les plus étudiées notamment en raison de leurs utilisations potentielles en biotechnologie (**Odier et Rouau, 1985**). Parmi les bactéries cellulolytiques, certaines sont aérobies (*Sporocystophaga*, *Myxococcoides*, *Bacillus subtilis*, *Cellulomonas* et *Pseudomonas*, d'autres sont anaérobies strictes (*Clostridium thermocellum*, *Clostridium stercorarium*, *Ruminococcus albus*, *Ruminococcus flavefasciens* et *Bactéroides succinogenes*) (**Vidaud, 1984**) ou encore des anaérobies facultatives (*Erwinia chrysantharum*) qui possèdent un seul complexe multienzymatique extracellulaire appelé cellulosome (**Schwarz, 2001**).

De plus, les cellulases ont été identifiées chez des actinomycètes tels que *Thermomonospora fusca* (Tuncer *et al.*, 1999), *Streptomyces reticuli* (**Schlochtermeyer et al., 1992**), quelques archaebactéries *Pyrococcus orikoshii* (**Ando et al., 2002**) et *Thermotoga neapolitana* (**Bok et al., 1998**) qui constituent une source importante de cellulases thermostables. De nombreux champignons sont cellulolytiques, ils produisent des endoglucanases, des exoglucanases et des β -glucosidases (**Bèguin, 1990**). *Trichoderma reesei* est le champignon le plus étudié (**Shomaker et al., 1983; Chen et al., 1987**), Chez les levures, les genres pouvant présenter une activité cellulasique, sont beaucoup plus rares, néanmoins on peut citer le genre *Trichosporon* (**Scriban, 1999**), *Candida wickerhamii* (**Gunata et al., 1990**), ainsi que *Khryveromyces lactis* (**Hasper et al., 2002**).

I.2.2.3.4 Applications industrielles des cellulases

La biotechnologie des cellulases a débuté vers les années 1980 dans l'alimentation animale (**Chesson, 1987**) et ensuite dans l'industrie du textile, de la lessive et du papier. Actuellement, elle occupe environ 20 % du marché mondial des enzymes (**Bhat, 2000, Lekchiri et al., 2006**). Les performances élevées atteintes leurs ouvrent des perspectives intéressantes pour différentes applications industrielles (**Scriban, 1993**), dans les industries de transformation de l'amidon, de brasserie, l'extraction de jus de fruits et légumes (**Gao et al., 2008**).

I.2.2.4 Les enzymes lipolytiques

Les enzymes lipolytiques sont des hydrolases qui catalysent l'hydrolyse ou la synthèse 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**). Toutefois, les connaissances acquises sur ces enzymes ont démontré qu'il existait deux types d'enzymes lipolytiques: les estérases et les lipases « vraies ». Le mécanisme d'hydrolyse des triglycérides est le même pour ces deux types d'enzymes (**Fojan et al.2000**). Par contre, la principale différence se situe au niveau de la nature du substrat à hydrolyser (**Jaeger et Reetz, 1998; Sharma et al., 2001; Fickers et al.,2008**). Les mammifères, les plantes, les levures, les actinomycètes et les bactéries sont tous de bons producteurs de ces biocatalyseurs. Par contre, les micro-organismes sont de bien meilleures sources de ces enzymes car ils produisent des lipases plus stables ayant des activités catalytiques variées (**Sharma et al., 2001; Fickers et al.,2008**).

I.2.2.4.1 Classification des enzymes lipolytiques

Les enzymes lipolytiques microbiennes ont été regroupées en plusieurs sous-familles sur la base de leurs séquences en acides aminés ainsi que des propriétés biologiques fondamentales (**Kanwar et al., 2006**). Cette classification permet de prédire les caractéristiques structurales comme les résidus du site catalytique ou la présence de ponts disulfures, le mécanisme de sécrétion et l'exigence d'une protéine chaperonne spécifique à certaines lipases, et les relations potentielles avec d'autres familles d'enzymes (**Lotti et Alberghina, 2002**). Elle permet aussi une identification plus facile et plus rapide de nouvelles enzymes lipolytiques microbiennes (**Najjar, 2010**). En (1999), Arpigny et Jaeger ont réparti

en huit familles les enzymes lipolytiques bactériennes sur la base d'homologies de séquence (Tableau I)

I.2.2.4.1.1 Les lipases

Encore appelées triacylglycérols acyl hydrolases (EC 3.1.1.3); elles appartiennent à la famille des hydrolases d'esters carboxyliques. (Alloue et al., 2008) ce sont des enzymes atypiques par leur mécanisme d'action et leur spécificité de substrats (Reis et al., 2009). Leur rôle physiologique est d'hydrolyser les triglycérides en diglycérides, monoglycérides, acides gras et glycérol. L'hydrolyse des liaisons esters des substrats lipidiques, insolubles dans l'eau, se produit à l'interface entre lipide et eau (Alloue et al., 2008). Dans le milieu eau /solvant organique immiscible, elles sont également capable de catalyser la réaction réversible de synthèse et échangeuse de groupes d'esters et résolution de mélange racémique en alcools et acides optiquement actives (Fickers et al., 2008; Pabai, 1997).

I.2.2.4.1.1.1 Sources microbiennes des lipases

Les lipases sont omniprésentes dans la nature et peuvent être obtenues à partir de nombreuses sources, telles que les plantes, les microorganismes et les animaux (Treichel et al., 2010; Liua et al., 2011; Salihu et al., 2012; Casas- Godoy et al., 2012). De nombreux microorganismes sont connus comme des producteurs potentiels de lipases extracellulaires, notamment les bactéries, les levures et les moisissures. Elles sont aussi bien produites chez les bactéries Gram (+) telles que celles de genres *Bacillus* et *Staphylococcus* que par des bactéries Gram (-) telles que *Pseudomonas*. Elles sont également largement répondues chez les levures du genre *Candida* ou *Geotricum* ainsi que chez les champignons filamenteux tels que *Rhizopus* ou *Thermomyces* (Lawrence et al., 1967).

I.2.2.4.1.2 Les estérases

Les estérases (E C 3.1.1.1) hydrolysent les solutions d'esters de chaîne acyl courte soluble dans l'eau et inactifs contre les triacylglycérols à longue chaîne insoluble dans l'eau (Chahinian et Sarda, 2009). Elles sont localisées dans le réticulum endoplasmique, le cytosol de différents tissus et abondantes dans le foie. Elles manifestent une large spécificité en substrat tels que amides, esters, thioesters, hydrolysent un grand nombre de composés de différentes structures et jouent un rôle très important dans l'élimination des produits toxiques et xénobiotiques (Gilham et Lehner, 2005).

I.2.2.4.1.2.1 sources microbiennes des estérases

Les estérases sont produites par un ensemble d'organismes, tels que *Streptomyce* ssp, *Pseudomona* ssp, *Lactobacillus* sp, *Thermoanaerobacterium* sp, *Micrococcus* sp, *Ophistoma* sp, *Penicillium* sp, *Aspergillus* sp, *Humicola* sp, *Sporotrichum* sp, *Saccharomyces* sp, *Candida* sp, des plantes et des animaux (**Ramnath et al., 2001**).

I.2.2.4.2 Applications industrielles des enzymes lipolytiques

En premier lieu, les enzymes lipolytiques sont utilisées pour la fabrication de détergents. Tout comme les protéases et amylases, un pourcentage élevé, soit un peu plus de 30% des lipases sont utilisées dans ce domaine (**Sharma et al., 2001**). Les réactions d'hydrolyse sont également recherchées dans d'autres domaines d'application, essentiellement dans le traitement des pâtes et papiers et des effluents ou encore l'industrie du textile/cuir. Dans l'industrie alimentaire, les applications sont nombreuses. Les fonctions d'hydrolyse et de synthèse sont toutes les deux exploitées. Ces enzymes dégradent les triglycérides afin de former des acides gras volatils qui permettent le développement d'arômes et de saveurs dans les fromages, le vin, les saucissons ou le thé noir (**Jaeger et al., 1994; Pandey et al., 1999; Hasan et al., 2006; Fickers et al., 2008**).

Egalement, un certain nombre d'ingrédients présents dans plusieurs produits cosmétiques sont synthétisés par des lipases. Les lipases ont également trouvé plusieurs voies d'application dans le secteur biomédical (**Kirk et al., 2002; Hasan et al., 2006; Fickers et al., 2008**).

Une autre utilité des lipases en biopharmaceutique est la synthèse de médicaments (**Pandey et al., 1999; Sharma et al., 2001; Jaeger et Eggert, 2002; Hasan et al., 2006**). Enfin, la grande versatilité de ce groupe d'enzymes a soulevé un intérêt particulier parmi les producteurs de biodiesel. Ce carburant produit à partir de ressources renouvelables (**Jaeger et Eggert, 2002; Hasan et al., 2006**).

Tableau I: 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

I.1.3 Les plantes modèles

I.1.3.1 Le Romarin

Le Romarin vient du latin *Rosmarinus officinalis* « Rosée de la mer », c'est un arbrisseau aromatique, peut atteindre jusqu'à 1,5 mètre de hauteur (**Brineton, 1991**). Le Romarin fait partie de la famille des labiées c'est l'une des familles les plus répandues dans le bassin méditerranéen et spécialement en Algérie. Elle comprend plus de 3300 espèces et environ 200 genres. Le Romarin pousse sur les côtes méditerranéennes, et le sud-ouest de l'Asie et souvent cultivé dans le jardin comme clôture. Le Romarin affectionne particulièrement les terrains calcaires. En Algérie, le Romarin est l'une des sept espèces végétales excédant 50000 hectares sur le territoire national (**Iserin et al., 2007**)(Figure 2).

I.1.3.1.1 Classification (Crete, 1965).**Règne:** Plantae**Division:** Magnoliophyta**Classe:** Magnoliopsida**Ordre:** Lamiales**Famille:** Lamiaceae**Genre:** *Rosmarinus***Espèce:** *Rosmarinus officinalis***Nom commun:** Le romarin**Nom locale:** El iklile

Figure 2: Plante de Romarin (*Rosmarinus officinalis*)

I.3.2 La Camomille

C'est une plante herbacée annuelle de 10 à 40 cm de hauteur, glabre et odorante. Sa tige unique dressée, et très rameuse, avec des feuilles vertes, alternes, profondément divisées, à division sans sillon, sans pointes piquantes. Ses fleurs libres en capitule, c'est à dire serrées les unes contre les autres, sans pédoncules et placée sur l'extrémité d'une tige entourée d'une collerette de bractées (involucre) simulant un calice; capitule de 1,5 à 2,5 mm, ayant des fleurs de deux couleurs différentes, les fleurs du milieu en tube cylindrique (tubuleuses) jaunes à cinq lobes, les fleurs du pourtour en languette blanche (ligulées) souvent réfléchies ; radiées tous sont insérées sur un réceptacle conique. Les fruits sont des akènes (**Grisebahl, 1965; Harborne, 1988**). On peut la trouver dans plusieurs régions, en Europe, Asie Afrique,

Amérique du Nord et du Sud. Elle pousse dans les prairies, les champs et au bord des chemins.

I.3.2.1 Classification. (Achoub , 2013)

Embranchement: Angiospermae

Classe: Dicotyledoneae

Ordre: Asterales

Famille: Compositae

Genre: *Matricaria*

Espèce: *Matricaria chamomilla*

Nom commun: La Camomille

Nom locale: Baboundedj



Figure 3: Plante de Camomille (*Matricaria chamomilla*)

Chapitre II
Matériels & Méthodes

II.1 Matériels**II.1.1 Matériel végétal**

Il consiste en deux plantes médicinales *Matricaria chamomilla* et *Rosmarinus officinalis* connus sous les noms la camomille et le romarin respectivement.

II.1.2 Matériel microbien

Le matériel microbien comprend des souches isolées à partir de la rhizosphère de deux plantes médicinales collectées pendant le mois d'avril (2018) dans la région de Hasnaoua de la wilaya de Bordj Bou Arreridj (Algérie).

II.1.3 Matériel lourd et chimique

Voir l'annexe

II.2 Méthodes**II.2.1 Échantillonnage et isolement de bactéries rhizosphériques****II.2.1.1 Échantillonnage du sol rhizosphérique**

Dans le but de rechercher des bactéries productrices d'enzymes d'intérêt industriel, nombres d'échantillons du sol rhizosphérique de deux plantes médicinales *Matricaria chamomilla* (la camomille) et *Rosmarinus officinalis* (le romarin) ont été collectés pendant le mois d'avril (2018) dans la région de Hasnaoua de la wilaya de Bordj Bou Arreridj (Algérie). Les prélèvements ont été effectués à partir de la partie rhizosphérique du sol, et ont été mis dans des sachets fermés préalablement stérilisés dans un autoclave, puis transportés directement au laboratoire dans une glacière (4°C) (Figure 4).



Figure 4: Prélèvement des échantillons de la rhizosphère.

II.2.1.2 Isolement des bactéries

1 g de chaque échantillon du sol a été dissous dans 9 ml d'eau physiologie, des dilutions décimales de (10^{-1} , 10^{-2} , 10^{-3} , 10^{-4} , 10^{-5} et 10^{-6}) ont ensuite été effectuées. 100 μ l de chacune de ces dilutions ont été ensemencées en surface sur les milieux Plate Count Agar (PCA), king A et king B (Annexe) avec 04 répétitions pour chaque dilution, les boîtes ont été ensuite incubées à 30°C pendant 24 à 72 h (Mehenna et Mezhoud, 2017).

II.2.1.3 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 bleue-verte et jaune-verte sur King A et B respectivement a été purifiée en la repiquant sur PCA par la méthode des stries serrées. La conservation des souches pures a été réalisée dans des tubes à essais contenant du bouillon nutritif (BN) (Annexe). Après incubation des tubes à 30°C pendant 24 h et l'apparition d'un trouble, ces derniers ont été placés dans le réfrigérateur à 4°C.

II.2.2 Mise en évidence de l'activité enzymatique

Afin de déterminer la capacité des isolats à produire des enzymes d'intérêt industriel, plusieurs enzymes ont été recherchées, tels que la protéase, cellulase, amylase, l'estérase et lipase. Après repiquage des souches à partir des tubes de conservation, Le screening a été effectué par la méthode des spots et en duplicata.

Un index enzymatique a été calculé pour toutes les activités selon l'équation suivante:

$$\text{IE} = \frac{\text{Diamètre du Halo}}{\text{Diamètre de la colonie}} \text{ (Carrim et al., 2006).}$$

II.2.2.1 Screening de l'activité cellulasique

La présence de cellulase est révélée par le repiquage des isolats sur le milieu de Carder (1986) qui contient en g/l: Na_2HPO_4 (6); KH_2PO_4 (3); NaCl (0,5); NH_4Cl (1); extrait de levure (3); cellulose (7); agar (15). Le pH a été ensuite ajusté à 7,4 et le milieu a été autoclavé à 121°C pendant 20 min. Les boîtesensemencées ont été incubées pendant 8 jours (Carrim et al., 2006).

Après la fin de l'incubation, une solution de lugol (Annexe) préalablement préparée a été dispersée sur toute la surface du milieu. Après cinq minutes de contact, l'excès a été éliminé et les boîtes lavées à l'eau distillée. La présence d'une cellulase extracellulaire se manifeste par l'apparition d'un halo clair autour des colonies.

II.2.2.2 Screening de l'activité amylolytique

Le test qui indique l'activité amylolytique est réalisé sur gélose à base d'amidon. Le milieu contient en (g/l): KNO_3 (0,5), K_2HPO_4 (1,0), MgSO_4 (0,2), CaCl_2 (,1), FeCl_3 (0,001), amidon soluble (10,0), agar (15,0). Le pH a été ensuite ajusté à 7,2 et le milieu autoclavé à 121°C pendant 30 min. Un ensemencement du milieu par la méthode des spots a été effectué pour chaque isolat.

Après incubation à 30°C pendant 48 à 72h, une solution de lugol (révélateur, Annexe) préalablement préparée a été dispersée sur toute la surface du milieu. Après quelques minutes de contact, l'excès a été éliminé et les boîtes lavées à l'eau distillée. La lecture a été effectuée de la manière suivante:

La présence de l'amidon dans le milieu donnera une couleur bleue noirâtre, ceci implique une absence d'activité amylolytique. En revanche, si l'amidon est hydrolysé, une zone claire apparaîtrait autour des colonies. Ce qui traduit une présence d'activité amylolytique chez les isolats (Vinoth Raj et al., 2009).

II.2.2.3 Screening de l'activité protéolytique

Le milieu de culture utilisé pour cette activité contient en g/l: Extrait de levure (2,5); glucose (1), et agar (15). Le milieu a été ajusté à un pH de 7 et autoclavé pendant 20 min à 121°C. Simultanément, 100 ml d'une solution de lait écrémé à 05 % a été préparé et stérilisé à

110°C pendant 10 min et ajouté au milieu Ce dernier est ensuite ensemencé par la méthode des spots. L'activité protéolytique se traduit par l'apparition d'un halo clair autour des colonies (**Bach et Munch, 2000**).

II.2.2.4 Screening de l'activité estérasique

Le milieu de culture utilisé est celui utilisé par Sierra (1957). Il contient en g/l: peptone (10); NaCl (5.0); CaCl₂·2H₂O (0.1); Tween 80 (1%, v/v) et agar (18). Le pH est ajusté à 7,4. Le milieu est ensemencé et incubé à 30°C pendant 48h. La présence d'une activité estérasique s'exprime par un halo autour des colonies (**Sierra, 1957**).

II.2.2.5 Screening de l'activité lipolytique

La détermination de l'activité lipolytique est réalisée de la même manière que l'activité estérasique, cependant, le tween 80 est remplacé par le tween 20, et le résultat positif se traduit par la présence d'un halo autour des colonies (**Sierra, 1957**).

II.2.3 Analyse statistique

L'étude statistique a été faite en utilisant le logiciel SAS/STAT® 9.2,

Les résultats des activités enzymatiques ont été analysés statistiquement par le test de (One-Way ANOVA) suivie de Student-Newman-Keuls multip-rang test, pour comparer les moyennes des index de dégradation pour chaque bactéries.

Les résultats ont été exprimés en moyenne et les mesures ont été répétées deux fois (n=2), la différence a été considérée statistiquement significative lorsque la valeur de p est ≤ 0.05.

Chapitre III
Résultats &
Discussion

III. Résultats et Discussion

III.1 Isolement des bactéries

Au départ, l'isolement des bactéries à partir des échantillons récoltés sur les milieux PCA, King A et King B nous a permis d'évaluer la charge bactérienne dans les différents échantillons. Le dénombrement a été effectué à partir de la dilution 10^{-3} jusqu'à 10^{-6} selon l'équation suivante :

$$N = \frac{n}{v} \times \frac{1}{d}$$
 (Avec: v = volume de dilution ; n = nombres de colonies; d = facteur de dilution)

Les résultats du dénombrement sont représentés dans le tableau II.

Le résultat a révélé que le nombre de colonies de l'échantillon du sol rhizosphérique de *R.officinalis* était de 52.58×10^6 UFC/g de sol, tandis que l'échantillon du sol rhizosphérique de *M.chamomilla* contient approximativement un nombre proche de celui de *R.officinalis* estimé à 52.15×10^6 UFC/ g de sol (Tableau II).

Les résultats du dénombrement sur le milieu King A a montré que le nombre de colonies à partir du sol rhizosphérique de *M.chamomilla* était de 38×10^6 UFC/ g de sol, alors que le nombre de colonies à partir de *R.officinalis* était de 53×10^5 UFC/ g de sol. (Tableau II).

Pour le milieu King B les résultats obtenus a révélé que le nombre de colonies était de 47×10^6 UFC/ g de sol et 53×10^5 UFC/ g de sol à partir des sols rhizosphérique de *M.chamomilla* et *R.officinalis* respectivement (Tableau II).

Tableau II: Dénombrement des colonies des échantillons sur milieux PCA, king A et king B.

Le milieu	Charge bactérienne(UFC/g de sol)	
	<i>M.chamomilla</i>	<i>R.officinalis</i>
PCA	52.15×10^6	52.58×10^6
King A	38×10^6	53×10^5
King B	47×10^6	58×10^5

III.2 Purification et conservation des isolats

Les isolats des bactéries obtenus ont été purifiés par un repiquage successif sur PCA jusqu'à l'obtention des souches pures. Cette purification nous a permis d'obtenir les résultats présentés dans la figure 5.

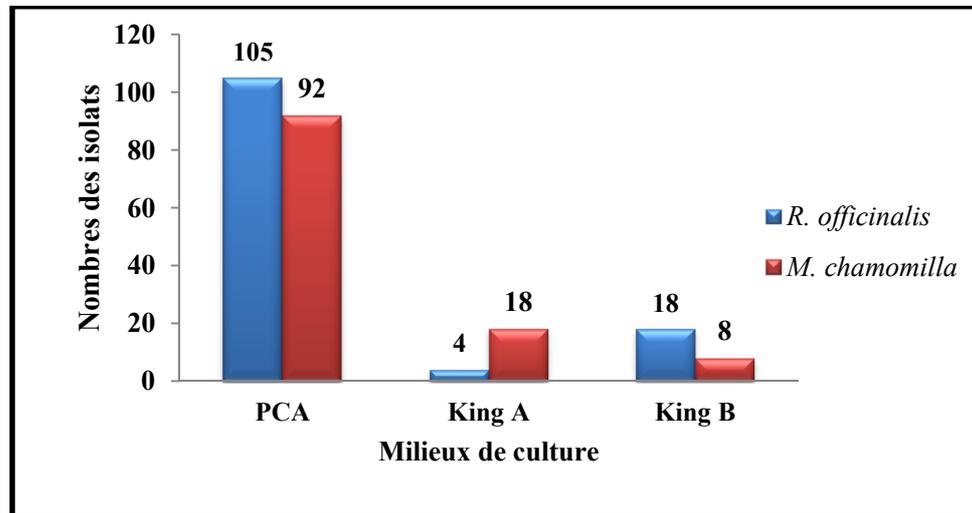


Figure 5: Nombre des isolats obtenus sur les différents milieux de culture pour les deux plantes.

En se basant sur l'aspect des colonies sur milieu solide, ces dernières représentent une grande diversité de taille, forme, couleur et consistance (Figure 6).

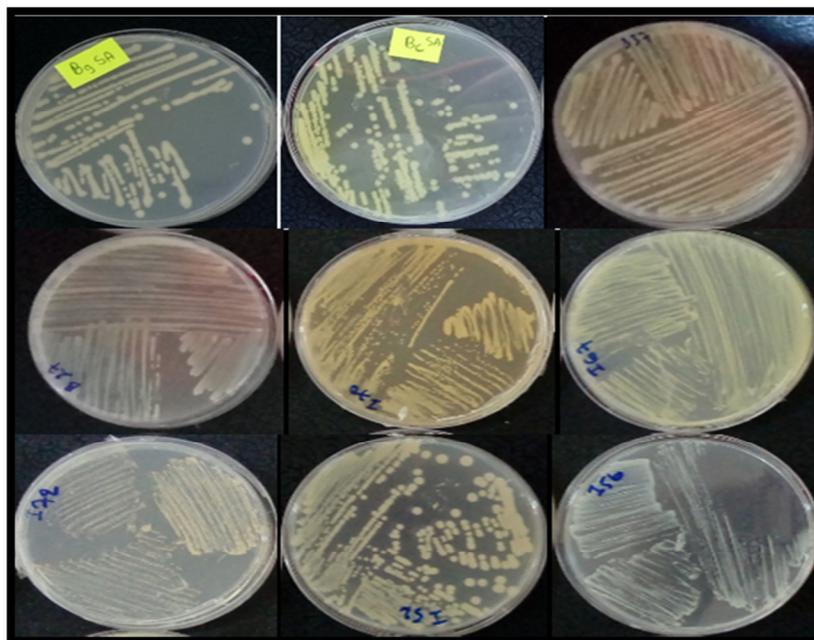


Figure 6: Quelques images des aspects des colonies obtenues sur PCA.

Après l'incubation des isolats à 30°C pendant 24 h, les tubes caractérisés par l'apparition d'un trouble, indiquant la croissance des souches dans le bouillon nutritif ont été conservés à 4°C pour les futurs tests (Figure 7).

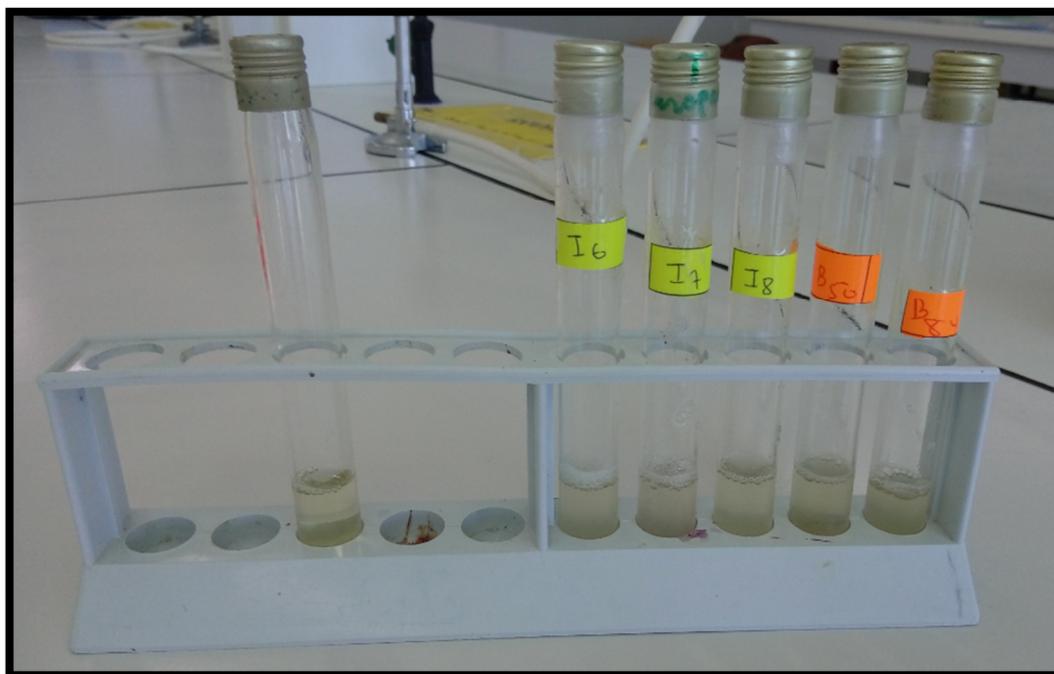


Figure 7:Conservation des souches purifiées sur bouillon nutritif.

III.3 Mise en évidence de l'activité enzymatique

Tous les isolats ont été testés pour évaluer leur capacité à produire diverses enzymes tels que la cellulase, estérase, protéase, amylase et lipase. L'activité enzymatique a été quantifiée par mesure des diamètres des zones formées autour des colonies ensemencées par spots sur la surface des milieux de culture, ce paramètre permet de calculer l'index de l'activité enzymatique.

III.3.1 l'activité enzymatique de la flore totale isolée sur PCA

Les résultats des index enzymatiques des isolats des rhizosphères de *M. chamomilla* et *R. officinalis* recherchés dans ce travail sont représentés dans les tableaux (III, IV).

On a procédé à une analyse statistique des différentes activités enzymatiques pour tous les isolats obtenus afin de sélectionner les meilleures souches productrices, et les résultats sont représentés dans les tableaux (V, VI).

Tableau III: Index enzymatiques des différentes activités enzymatiques des bactéries isolés à partir de la rhizosphère de *M.chamomilla*.

Isolats	Index enzymatiques				
	Cellulase	Amylase	Protéase	Lipase	Estérase
MC1	-	-	-	-	-
MC2	-	-	2,00	-	1,00
MC3	1,43	-	1,76	-	-
MC4	-	-	-	-	-
MC5	-	-	1,50	-	-
MC6	2,80	0,67	-	-	-
MC7	-	-	-	-	-
MC8	2,69	2,17	2,00	-	-
MC9	1,92	-	1,82	-	-
MC10	4,00	-	1,57	-	-
MC11	1,20	-	2,33	-	-
MC12	-	1,00	-	-	-
MC13	1,85	1,00	2,00	1,25	-
MC14	-	-	2,22	-	-
MC15	5,00	4,00	1,67	1,67	-
MC16	1,15	0,50	2,00	1,22	-
MC17	-	-	1,40	-	-
MC18	4,31	0,88	1,30	-	-
MC19	2,44	-	1,75	-	1,67
MC20	4,31	0,67	1,50	-	-
MC21	3,09	-	2,67	-	-
MC22	4,40	3,00	1,80	-	-
MC23	2,13	-	-	-	3,33
MC24	2,67	-	-	-	-
MC25	-	-	-	-	-
MC26	1,54	-	-	-	3,08
MC27	1,20	2,00	2,86	-	0,63
MC28	-	-	2,54	-	-
MC29	2,18	-	2,92	-	-
MC30	-	-	-	-	-
MC31	-	-	-	-	-
MC32	3,00	-	-	-	-
MC33	-	-	-	-	-
MC34	-	-	-	-	-
MC35	2,50	-	-	-	-
MC36	2,00	-	-	-	-
MC37	-	-	-	-	1,00
MC38	1,25	-	-	1,73	2,67
MC39	-	-	-	-	1,10
MC40	-	-	-	-	-
MC41	-	-	-	-	1,08
MC42	-	-	-	-	1,30

MC43	-	-	-	-	-
MC44	-	-	-	-	3,85
MC45	1,43	-	-	-	-
MC46	-	-	2,11	-	-
MC47	-	-	-	-	1,90
MC48	-	-	3,75	-	1,88
MC49	8,75	-	-	-	0,50
MC50	2,80	-	1,30	-	-
MC51	-	-	1,27	-	-
MC52	-	-	7,00	-	-
MC53	1,92	1,00	2,31	-	-
MC54	5,00	-	2,22	-	0,59
MC55	2,20	1,00	3,08	-	-
MC56	-	0,77	2,54	-	-
MC57	2,53	-	-	-	-
MC58	-	1,17	-	-	-
MC59	5,00	-	3,00	-	-
MC60	2,00	-	-	-	-
MC61	-	-	-	-	-
MC62	1,77	-	-	-	-
MC63	1,43	-	-	-	-
MC64	-	-	-	-	-
MC65	-	-	-	-	-
MC66	-	2,00	-	-	1,00
MC67	-	-	3,00	-	-
MC68	-	2,00	-	-	-
MC69	-	1,50	1,39	-	-
MC70	-	1,00	1,50	-	-
MC71	-	1,08	1,79	-	-
MC72	-	-	2,00	-	-
MC73	1,25	-	1,25	-	-
MC74	1,15	-	-	-	-
MC75	1,50	6,00	1,50	-	-
MC76	7,25	2,50	-	-	-
MC77	7,25	-	-	-	-
MC78	3,00	-	-	-	-
MC79	3,00	-	-	-	-
MC80	5,60	-	-	-	-
MC81	-	1,70	-	-	4,00
MC82	-	-	-	-	-
MC83	6,22	3,00	3,50	-	2,00
MC84	-	-	2,80	-	-
MC85	1,31	-	1,71	-	3,57
MC86	3,00	-	-	-	-
MC87	2,00	-	-	-	-
MC88	-	-	-	-	-
MC89	-	-	-	-	-

MC90	-	1,54	-	-	-
MC91	-	-	-	-	-
MC92	5,63	0,47	-	-	-

MC: *M. chamomilla*, [< 1]: Activité faible; [1-3]: Activité moyenne ;[> 3]: Activité forte ; [-]: Pas d'activité enzymatique.

Tableau IV: Index enzymatique des différentes activités enzymatiques des bactéries isolés à partir de la rhizosphère de *R. officinalis*.

Isolats	Index enzymatiques				
	Cellulase	Amylase	Protéase	Lipase	Estérase
RO1	-	0,61	-	-	1,43
RO2	-	1,50	2,62	-	1,00
RO3	-	0,68	-	-	1,78
RO4	-	0,46	2,50	-	-
RO5	-	1,80	1,20	-	-
RO6	-	-	1,17	-	1,00
RO7	-	-	2,31	-	-
RO8	-	-	2,29	-	-
RO9	-	0,71	2,69	-	-
RO10	-	-	1,61	1,28	-
RO11	-	-	1,83	-	-
RO12	-	-	-	-	-
RO13	-	-	1,50	-	-
RO14	-	0,40	-	-	-
RO15	-	0,71	1,00	-	-
RO16	3,54	-	-	1,38	-
RO17	-	-	1,67	-	-
RO18	-	-	-	-	-
RO19	-	-	-	-	1,25
RO20	-	-	-	3,50	-
RO21	-	1,00	1,67	-	-
RO22	4,00	-	1,92	1,15	-
RO23	-	-	2,00	-	-
RO24	2,90	0,50	3,00	-	-
RO25	2,53	-	2,33	-	-
RO26	-	0,56	1,43	-	-
RO27	-	-	2,00	-	-
RO28	-	-	-	-	2,00
RO29	-	1,00	1,33	-	5,00
RO30	-	-	2,14	-	2,00
RO31	-	-	1,60	-	-
RO32	-	-	1,33	1,27	-
RO33	-	-	-	-	-
RO34	-	-	2,50	-	1,88
RO35	-	0,60	3,17	-	-
RO36	-	-	-	-	-

RO37	-	-	-	-	-
RO38	-	0,67	2,60	1,00	-
RO39	3,60	-	1,87	-	-
RO40	-	-	2,21	-	-
RO41	-	-	-	-	-
RO42	5,00	1,50	1,50	-	-
RO43	-	-	2,86	-	-
RO44	-	-	2,00	-	-
RO45	-	-	1,50	-	-
RO46	1,67	-	1,67	-	-
RO47	3,00	0,67	-	-	-
RO48	2,00	-	1,38	-	-
RO49	2,08	-	1,65	-	-
RO50	2,50	-	1,67	-	-
RO51	2,00	-	-	-	-
RO52	2,33	-	-	-	-
RO53	4,62	-	1,50	-	-
RO54	-	-	2,67	-	-
RO55	2,20	-	2,00	-	-
RO56	-	-	-	-	-
RO58	3,50	-	-	-	-
RO59	2,00	-	2,00	-	-
RO60	2,90	-	-	-	-
RO61	-	2,00	2,36	-	-
RO62	3,40	-	-	-	3,00
RO63	3,00	-	3,00	-	-
RO64	-	-	1,43	-	-
RO65	1,50	1,38	3,71	-	-
RO66	-	-	1,50	-	-
RO67	-	-	-	-	-
RO68	2,75	-	2,50	-	-
RO69	-	-	3,00	-	-
RO70	-	1,60	2,69	-	-
RO71	5,00	1,50	2,33	-	-
RO72	-	-	-	-	-
RO73	3,60	-	1,43	-	-
RO75	-	1,75	2,14	-	-
RO77	1,36	-	2,31	-	-
RO78	1,82	-	-	-	-
RO79	6,25	-	-	-	-
RO83	-	-	1,92	-	-
RO84	2,00	-	2,00	-	-
RO85	2,00	-	2,00	-	-
RO86	2,30	-	-	-	-
RO87	-	-	1,79	-	-
RO89	1,43	-	-	-	-
RO90	-	-	2,00	-	-

RO91	-	-	1,63	-	-
RO92	6,33	-	2,00	-	2,30
RO93	2,69	-	-	-	-
RO94	-	-	-	-	-
RO95	1,60	-	-	-	-
RO96	3,00	-	1,30	-	-
RO97	3,00	-	-	-	-
RO99	3,00	-	-	-	-
RO100	3,89	-	-	-	-
RO101	1,08	-	-	1,50	-
RO107	-	-	-	-	-
RO108	1,60	-	1,20	-	-
RO109	-	-	-	-	-
RO110	-	-	2,67	-	-
RO111	-	-	3,08	-	-
RO112	-	-	3,00	-	-
RO113	-	-	3,08	-	-
RO114	-	-	1,50	-	-
RO115	-	-	2,33	-	-
RO116	4,00	1,54	1,67	-	-
RO117	3,00	-	1,60	-	-
RO118	5,83	-	2,22	-	-

RO:*R. officinalis*.< 1]: Activité faible; [1-3]: Activité moyenne ;>3]: Activité forte; [-]: Pas d'activité enzymatique.

Tableau V: Comparaison des moyennes des index enzymatiques des souches isolées à partir de la rhizosphère de *M. chamomilla*.

N°	Cellulase		Amylase		Protéase		Lipase		Estérase	
	Isolats	MIE	Isolats	MIE	Isolats	MIE	Isolats	MIE	Isolats	MIE
1	MC49	8,75 _A	MC75	6 _A	MC52	7 _A	MC38	1,73 _A	MC81	4 _A
2	MC76	7,25 _B	MC15	4 _B	MC48	3,75 _B	MC15	1,67 _B	MC44	3,85 _B
3	MC77	7,25 _B	MC83	3 _C	MC83	3,5 _C	MC13	1,25 _C	MC85	3,57 _C
4	MC83	6,22 _C	MC22	3 _C	MC55	3,08 _D	MC16	1,22 _D	MC23	3,33 _D
5	MC92	5,63 _D	MC76	2.50 _D	MC59	3 _E			MC26	3,08 _E
6	MC80	5,6 _E	MC08	2.19 _E	MC67	3 _E			MC38	2,67 _F
7	MC15	5 _F	MC68	2 _F	MC29	2,92 _F			MC83	2 _G
8	MC54	5 _F	MC27	2 _F	MC27	2,86 _G			MC47	1,9 _H
9	MC59	5 _F	MC66	2 _F	MC84	2,8 _H			MC48	1,88 _I
10	MC22	4,4 _G	MC81	1.70 _G	MC21	2,67 _I			MC19	1,67 _J
11	MC18	4,31 _H	MC90	1.54 _H	MC28	2,54 _J			MC42	1,3 _K
12	MC20	4,31 _H	MC69	1.50 _I	MC56	2,54 _J			MC39	1,1 _L
13	MC10	4 _I	MC58	1.17 _J	MC11	2,33 _K			MC41	1,08 _M
14	MC21	3,09 _J	MC71	1.08 _K	MC53	2,31 _L			MC2	1 _N
15	MC32	3 _K	MC13	1 _L	MC14	2,22 _M			MC37	1 _N
16	MC78	3 _K	MC55	1 _L	MC54	2,22 _M			MC66	1 _N

17	MC79	3 _K	MC53	1 _L	MC46	2,11 _N			MC27	0,63 _O
18	MC86	3 _K	MC12	1 _L	MC2	2 _O			MC54	0,59 _P
19	MC6	2,8 _L	MC70	1 _L	MC8	2 _O			MC49	0,5 _Q
20	MC50	2,8 _L	MC18	0.88 _M	MC13	2 _O				
21	MC8	2,69 _M	MC56	0.77 _N	MC16	2 _O				
22	MC24	2,67 _N	MC20	0.67 _O	MC72	2 _O				
23	MC57	2,5 _O	MC06	0.67 _O	MC9	1,82 _P				
24	MC35	2,5 _O	MC16	0.50 _P	MC22	1,8 _Q				
25	MC19	2,44 _P	MC92	0.47 _Q	MC71	1,79 _R				
26	MC55	2,2 _Q			MC3	1,76 _S				
27	MC29	2,18 _R			MC19	1,75 _T				
28	MC23	2,13 _S			MC85	1,71 _U				
29	MC36	2 _T			MC15	1,67 _V				
30	MC60	2 _T			MC10	1,57 _W				
31	MC87	2 _T			MC5	1,5 _X				
32	MC9	1,92 _U			MC20	1,5 _X				
33	MC53	1,92 _U			MC70	1,5 _X				
34	MC13	1,85 _V			MC75	1,5 _X				
35	MC62	1,77 _W			MC17	1,4 _Y				
36	MC26	1,54 _X			MC69	1,39 _Z				
37	MC75	1,5 _Y			MC18	1,3 _A				
38	MC3	1,43 _Z			MC50	1,3 _A				
39	MC45	1,43 _Z			MC51	1,27 _B				
40	MC63	1,43 _Z			MC73	1,25 _C				
41	MC85	1,31 _A								
42	MC38	1,25 _B								
43	MC73	1,25 _B								
44	MC11	1,2 _C								
45	MC27	1,2 _C								
46	MC16	1,15 _D								
47	MC74	1,15 _D								

Les moyennes qui ont la même lettre ne sont pas significativement différentes.

MIE: Moyennes des index enzymatiques, **MC:** *M. chamomilla*.

Tableau VI: Comparaison des moyennes des index enzymatiques des souches isolées à partir de la rhizosphère de *R. officinalis*.

N	Cellulase		Amylase		Protéase		Lipase		Estérase	
	Isolats	MIE	Isolats	MIE	Isolats	MIE	Isolats	MIE	Isolats	MIE
1	RO92	6,33 _A	RO61	2 _A	RO65	3,71 _A	RO20	3,5 _A	RO29	5 _A
2	RO79	6,25 _B	RO05	1.80 _B	RO35	3,17 _B	RO111	1,5 _B	RO62	3 _B
3	RO118	5,83 _C	RO75	1.75 _C	RO111	3,08 _C	RO16	1,38 _C	RO92	2,3 _C
4	RO71	5 _D	RO70	1.60 _D	RO113	3,08 _C	RO10	1,28 _C	RO28	2 _D
5	RO42	5 _D	RO116	1.54 _E	RO24	3 _D	RO32	1,27 _D	RO30	2 _D
6	RO53	4,62 _E	RO71	1.50 _F	RO63	3 _D	RO22	1,15 _E	RO34	1,88 _E
7	RO22	4 _F	RO02	1.50 _F	RO69	3 _D	RO38	1 _G	RO3	1,78 _F
8	RO116	4 _F	RO42	1.50 _F	RO112	3 _D			RO1	1,43 _G
9	RO100	3,89 _G	RO65	1.38 _G	RO43	2,86 _E			RO19	1,25 _H
10	RO73	3,6 _H	RO29	1 _H	RO9	2,69 _F			RO2	1 _I
11	RO39	3,6 _H	RO21	1 _H	RO70	2,69 _F			RO6	1 _I
12	RO16	3,54 _I	RO09	0.71 _I	RO54	2,67 _G				
13	RO58	3,5 _J	RO15	0.71 _I	RO110	2,67 _G				
14	RO62	3,4 _K	RO03	0.68 _J	RO2	2,62 _H				
15	RO47	3 _L	RO38	0.67 _K	RO38	2,6 _I				
16	RO63	3 _L	RO47	0.67 _K	RO4	2,5 _J				
17	RO96	3 _L	RO01	0.61 _L	RO34	2,5 _J				
18	RO97	3 _L	RO35	0.60 _M	RO68	2,5 _J				
19	RO99	3 _L	RO26	0.56 _N	RO61	2,36 _K				
20	RO117	3 _L	RO24	0.50 _O	RO25	2,33 _L				
21	RO24	2,9 _M	RO04	0.46 _P	RO71	2,33 _L				
22	RO60	2,9 _M	RO14	0.4 _Q	RO115	2,33 _L				
23	RO68	2,75 _N			RO7	2,31 _M				
24	RO93	2,69 _O			RO77	2,31 _M				
25	RO25	2,53 _P			RO8	2,27 _N				
26	RO50	2,5 _Q			RO118	2,22 _O				
27	RO86	2,5 _Q			RO40	2,21 _P				
28	RO52	2,33 _R			RO30	2,14 _Q				
29	RO55	2,2 _S			RO75	2,14 _Q				
30	RO49	2,08 _T			RO23	2 _R				
31	RO48	2 _U			RO27	2 _R				
32	RO51	2 _U			RO44	2 _R				
33	RO59	2 _U			RO55	2 _R				
34	RO84	2 _U			RO59	2 _R				
35	RO85	2 _U			RO84	2 _R				
36	RO78	1,82 _V			RO85	2 _R				
37	RO46	1,67 _W			RO90	2 _R				
38	RO95	1,6 _X			RO92	2 _R				
39	RO108	1,6 _X			RO22	1,92 _S				
40	RO65	1,5 _Y			RO83	1,92 _S				
41	RO89	1,43 _Z			RO39	1,87 _T				
42	RO77	1,36 _A			RO11	1,83 _U				

43	RO101	1,08 _B			RO87	1,79 _V			
44					RO17	1,67 _W			
45					RO21	1,67 _W			
46					RO46	1,67 _W			
47					RO50	1,67 _W			
48					RO116	1,67 _W			
49					RO49	1,65 _X			
50					RO91	1,63 _Y			
51					RO10	1,61 _Z			
52					RO31	1,6 _A			
53					RO117	1,6 _A			
54					RO13	1,5 _B			
55					RO42	1,5 _B			
56					RO45	1,5 _B			
57					RO53	1,5 _B			
58					RO66	1,5 _B			
59					RO114	1,5 _B			
60					RO26	1,43 _C			
61					RO64	1,43 _C			
62					RO73	1,43 _C			
63					RO48	1,38 _D			
67					RO29	1,33 _E			
68					RO32	1,33 _E			
69					RO96	1,3 _E			
70					RO5	1,2 _G			

Les moyennes qui ont la même lettre ne sont pas significativement différentes.

MIE: Moyennes des index enzymatiques, **RO:** *R. officinalis*.

III.3.1.1 Activité cellulosique

Ce test permet de mettre en évidence la capacité des bactéries à décomposer la cellulose, l'apparition d'un halo jaune orangé autour des colonies indique la présence d'une cellulase(Figure 8).

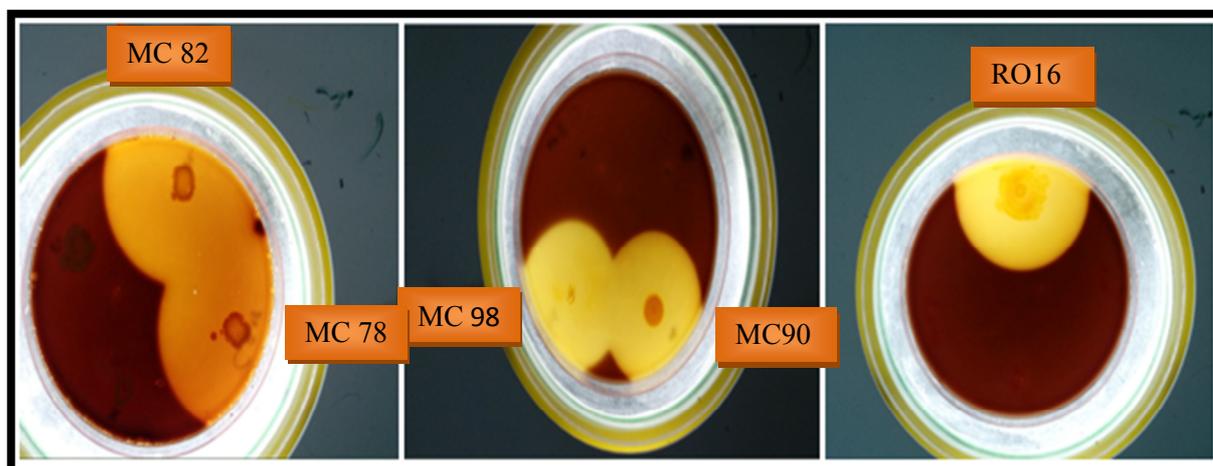


Figure 8: Quelques images des résultats de l'activité cellulosique.

Sur les 92 isolats obtenus à partir de la rhizosphère de *M.chamomilla*, 51% (47/92) ont montré une activité cellulosique positive (Figure 18), avec une forte activité chez 18 isolats (38.29%) et moyenne chez 29 isolats (61.70%) (Figure 9).

La production de la cellulase est observée chez 39.09 % (43/105) des isolats obtenus à partir de la rhizosphère de *R.officinalis* (Figure 19), avec une activité enzymatique forte chez 20 isolats (46.51%) et une activité enzymatique moyenne chez 23 isolats (53.48%) (Figure 9).

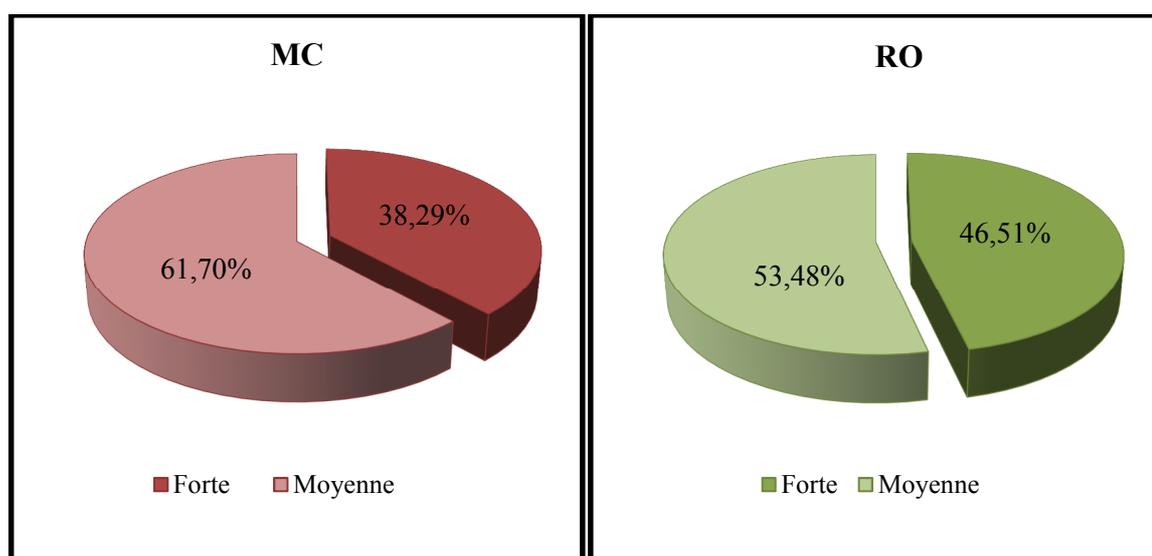


Figure 9: Répartition de l'activité cellulosique selon les index enzymatiques.

MC: *M.chamomilla*; **RO:** *R.officinalis*

Les résultats des analyses statistiques ont démontrés que la plus grande activité cellulosique était observée chez 09 isolats de *M. chamomilla* regroupés dans 06 groupes (A, B, C, D, E et F), où les moyennes des index enzymatiques allaient de 5 à 8,75. Et chez 05 isolats (RO92, RO79, RO118, RO71, RO42) de *R. officinalis* avec des moyennes des index enzymatiques allant de 5 à 6,33. Tableau (V, VI).

Dans les études réalisées par Tabli et *al.* (2013), Ahmad et *al.* (2013) et Dinesh et *al.* (2015), 25% des isolats montrent une activité cellulosique. Ces résultats ne corroborent pas avec les nôtres. Alors que Avinash et Rai, (2014), Bensidhoum et *al.* (2016) et Gontia-Mishra et *al.* (2016) ont constaté que 50% des isolats montrent une activité cellulosique, ce qui correspond plus à nos résultats.

En plus de leurs applications dans différents domaines industriels, les cellulases bactériennes jouent un rôle important dans la dégradation des débris de plantes, des parois cellulaires fongiques, l'inhibition de la germination des spores, de l'élongation du tube germinatif et de la croissance fongique, ainsi que dans le biocontrôle des pathogènes et des maladies de plantes (Bhat, 2000).

III.3.1.2 Activité amylolytique

La présence de l'activité amylolytique chez les bactéries productrices d'amylase dans le milieu de culture, se manifeste par la formation d'une zone d'hydrolyse claire autour des coloniesensemencées par spots (Figure 10).

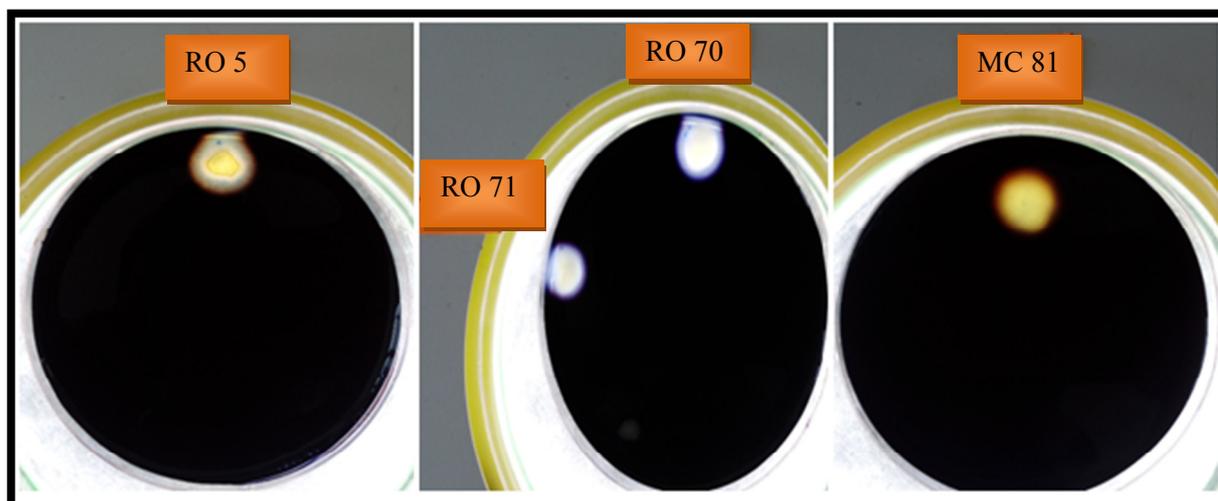


Figure 10: Quelques images des résultats de l'activité amylolytique.

Dans ce travail, 27,17% (25/92) des bactéries isolées à partir de la rhizosphère de *M. chamomillase* sont révélées productrices d'amylase (Figure 18). 16% ont montré une meilleure activité avec des index enzymatiques supérieurs à 3 et 60% ont une activité moyenne avec des index compris entre 1 et 3. Cependant, une faible activité a été observée chez 24% des isolats (Figure 11).

Pour *R. officinalis*, sur l'ensemble des 105 isolats testés, 20,95% (22/105) des isolats possèdent une activité amylolytique (Figure 19), où 50% d'entre eux ont montré une activité forte et 50% une activité moyenne (Figure 11).

D'après l'analyse statistique l'activité amylolytique était meilleure chez 04 isolats (MC75, MC15, MC83, MC22,) de *M. chamomilla* classés en 03 groupes dont les moyennes des index enzymatiques étaient de 6; 4; 3 et 3 respectivement ainsi que chez un seul isolat (RO61,) de *R. officinalis* avec une moyenne des index enzymatiques de 2. Tableaux (V,VI)

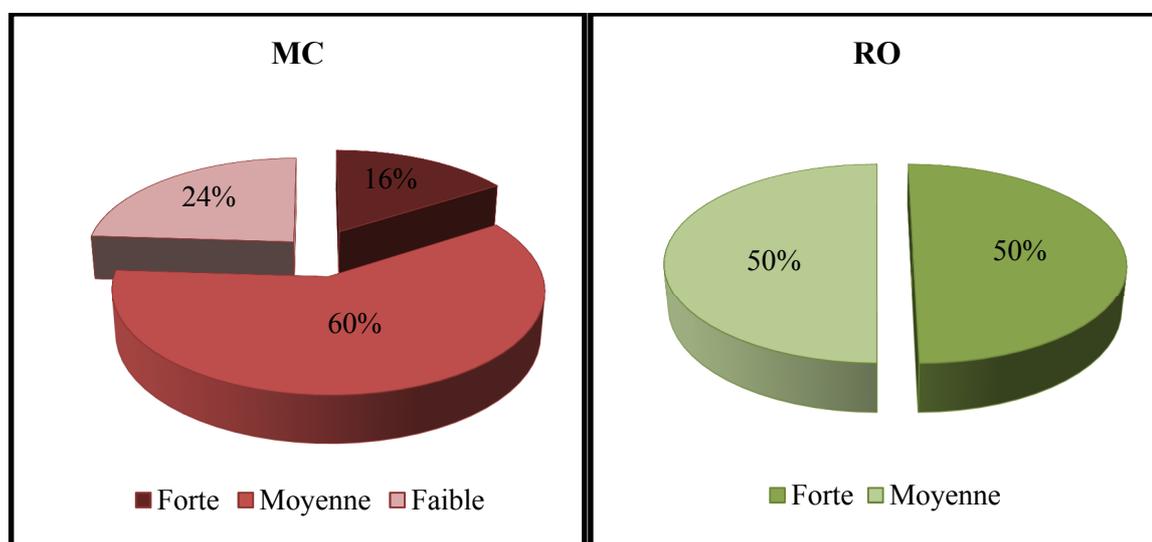


Figure 11: Répartition de l'activité amylolytique selon les index enzymatiques.

MC: *M. chamomilla*; **RO:** *R. officinalis*

Nos résultats sont semblables à ceux observés par Dinesh et *al.* (2015), ayant trouvé que 25% des souches possédant une activité amylolytique. Tandis que Tabli et *al.* (2013), Nabti et *al.* (2014) ont constatés que 100% des souches avaient montrés une activité positive pour ce test. Les résultats obtenus par Gontia-Mishra et *al.* (2016) sont tous négatifs pour ce test.

Les amylases sont produites par une large gamme d'organismes vivants allant des bactéries, plantes aux êtres humains. Les bactéries et les champignons sécrètent des amylases à l'extérieur de leurs cellules pour effectuer la digestion extracellulaire. Quand l'amidon est dégradé, les produits finaux solubles tels que (le glucose ou le maltose) sont absorbés par les cellules (Ekunsaumi, 2002).

La synthèse des amylases par les bactéries de la rhizosphère permet une dégradation de la matière organique dans la nature en fournissant des éléments minéraux que les plantes exigent pour leur croissance (Belhadi et Ait Meddour, 2013).

III.3.1.3 Activité protéolytique

Cette activité se traduit par la présence d'un halo clair autour des colonies, visible sans l'ajout d'aucun réactif (Figure 12).

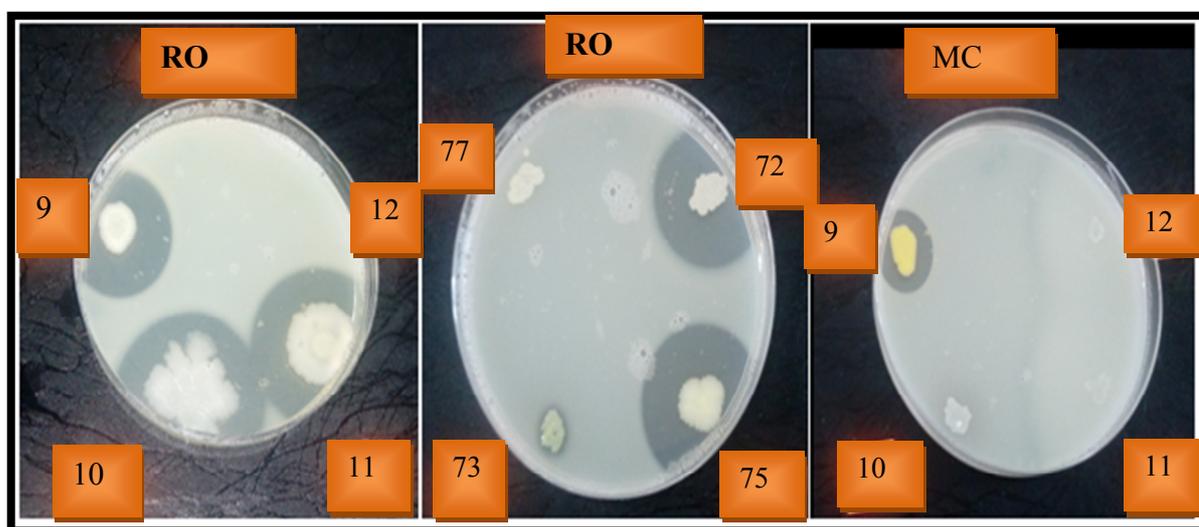


Figure 12: Quelques images des résultats de l'activité protéolytique.

Dans notre travail 43,47% (40/92) des isolats collectés à partir de la rhizosphère de *M. chamomilla* ont été capables de dégrader les protéines sur gélose au lait écrémé (Figure 18). Parmi ces isolats 15 % (6/40) possèdent une forte activité, alors que 85% (34/40) possèdent une activité moyenne (Figure 13).

Les résultats de ce test obtenus avec les bactéries isolées à partir de la rhizosphère de *R. officinalis* montrent que 66,67% (70/105) des isolats ont une activité positive (Figure 19). La meilleure activité a été observée chez 11,43% des isolats et 88,57% démontrent une activité moyenne (Figure 13).

Pour l'activité protéolytique, l'analyse statistique montre que la plus grande activité était observée chez 06 isolats (MC52, MC48, MC83, MC55, MC59, MC67) de *M. chamomilla* regroupés en 05 groupes où les moyennes des index enzymatiques allaient de 3 à 7. Tandis que chez les isolats de *R. officinalis* la meilleure activité protéolytique a été observée chez 08 isolats avec des moyennes des index enzymatiques de 3 à 3,71 regroupés en 04 groupes. Tableaux (V, VI)

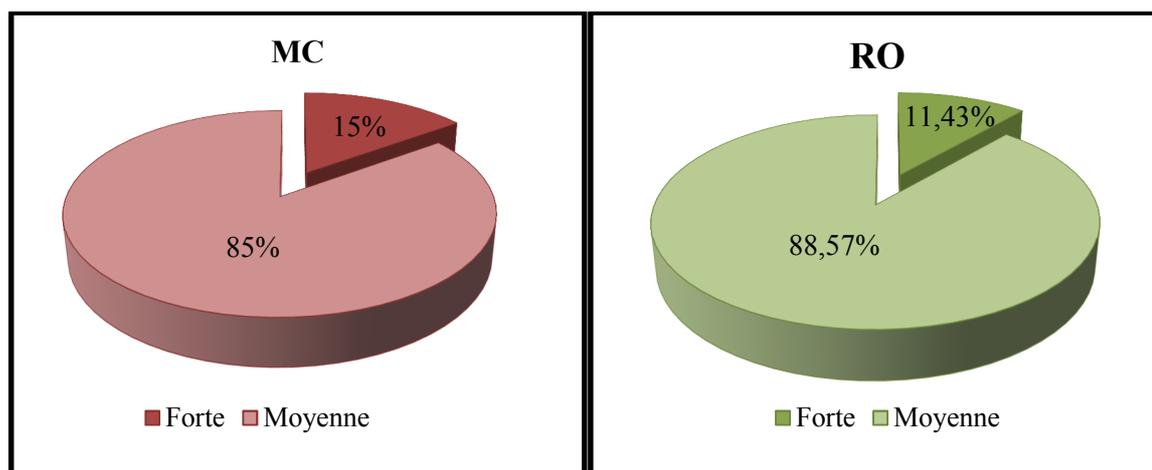


Figure 13: Répartition de l'activité protéolytique selon les index enzymatiques.

MC: *M. chamomilla*; RO: *R. officinalis*

Dans les études réalisées par Ahmad et al., (2013) et Dinesh et al., (2015), 75% des résultats positifs sont obtenus pour ce test. Alors que dans d'autres études similaires d'Avinash et Rai. (2014) et Gontia-Mishra et al. (2016) 50% et 25% des isolats produisent des protéases respectivement.

Les protéases d'origine microbienne sont parmi les enzymes les plus secrétées (Ningthoujam et al., 2009). La dégradation des protéines par les protéases microbiennes joue un rôle important dans le cycle d'azote au niveau du sol en le rendant disponible pour les plantes et les micro-organismes (Petit et Jobin, 2005). Les protéases sont les enzymes les plus importantes dans le domaine industriel, elles comptent environ 40% des ventes mondiales. Elles sont généralement utilisées dans les détergents, l'industrie alimentaire, le cuir, le traitement de la fabrication du fromage, la récupération de l'argent et certains traitements médicaux et pharmaceutiques (Muthulakshmi et al., 2011).

III.3.1.4 Activité lipolytique et estérasique

La présence d'une activité estérasique et lipolytiques s'exprime par la présence d'un halo autour des colonies Figures (14, 15).

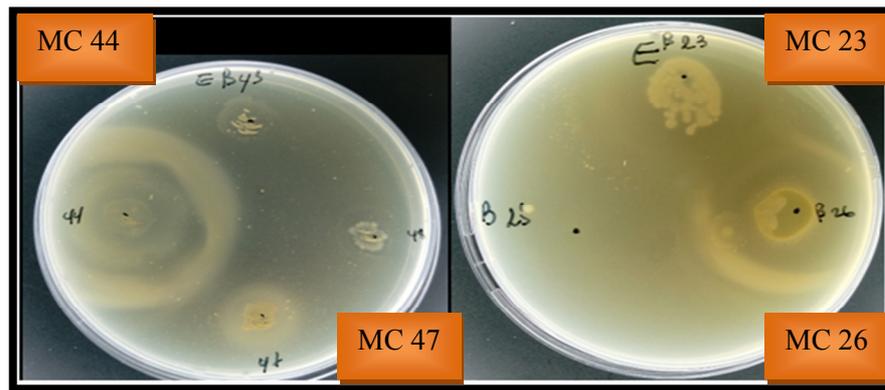


Figure 14: Quelques images des résultats de l'activité lipolytique

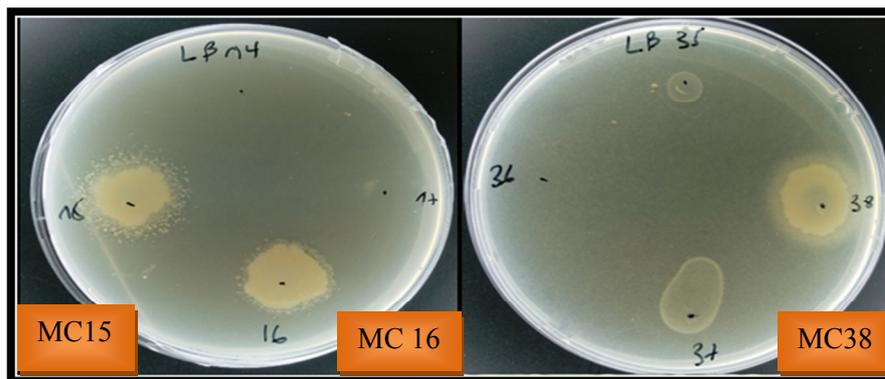


Figure 15: Quelques images des résultats de l'activité estérasiq

L'activité lipolytique est observée chez 4,34 % (4/92) des souches isolées à partir de la rhizosphère de *M.chamomilla* ayant tous une moyenne activité (Figure 18). Tandis qu'un pourcentage d'isolats actifs de 6.67% (7/105) a été observé chez les isolats de *R.officinalis* (Figure 19), où 85.71% des isolats possèdent une activité moyenne et un seul isolat (14.29%) présente une forte activité (Figure 16).

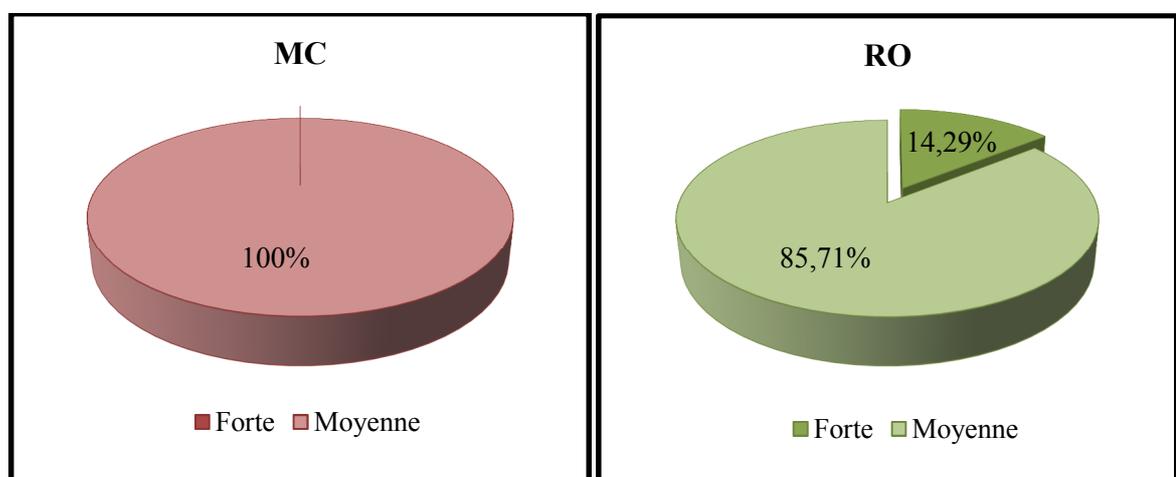


Figure 16: Répartition de l'activité lipolytique selon les index enzymatiques.

MC: *M.chamomilla*; RO: *R.officinalis*

La production de l'estérase est observée chez 20.65% (19/92) des isolats obtenus à partir de la rhizosphère de *M.chamomilla*(Figure 18), avec une forte activité observée chez 05 isolats (26.31%), une activité moyenne chez 11 isolats (57.89%) et une faible activité pour 03 isolats (15.78%).

Pour *R.officinalis* l'activité estérasiq est observée chez 10.47 % (11/105)(Figure 19),avec une activité forte chez 2 isolats (18,18%) et une activité moyenne chez 9 isolats (81.82%)(Figure 17).

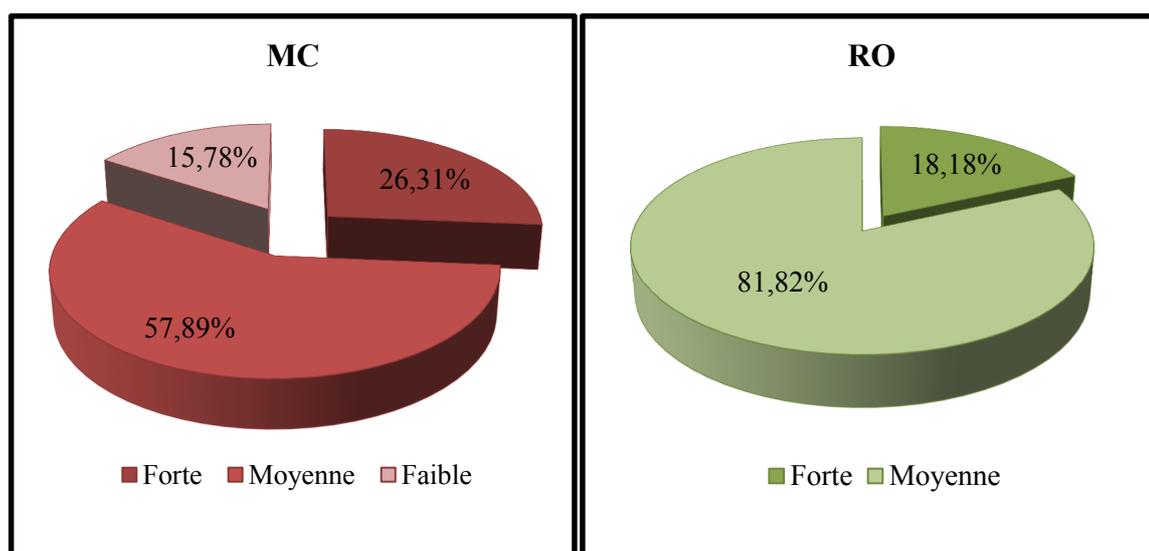


Figure 17: Répartition de l'activité estérasiq selon les index enzymatiques.

MC: *M. chamomilla*; RO: *R. officinalis*

L'analyse statistique montre que sur les 07 isolats de *R. officinalis* ayant une activité lipolytique, l'isolat RO20 a montré une forte activité avec une moyenne des index enzymatiques de 3,5, tandis que les isolats de *M. chamomilla* qui possèdent une activité lipolytique (MC15, MC38, MC13, MC16) ils présentent des moyennes des index enzymatiques supérieurs à 1,2. La production de l'estérase était meilleure chez 05 isolats (MC81, MC44, MC85, MC23, MC 26) de *M. chamomilla* où les moyennes des index enzymatiques allaient de 3 à 4. Et chez les isolats RO29, RO62, RO92, RO28, RO30 de *R. officinalis* avec des moyennes des index enzymatiques de 2 à 5. Tableaux (V, VI)

Dans l'étude réalisée par Tabli et *al.* (2013), 50% des souches avaient des résultats positifs pour l'activité lipolytique et 100% pour l'activité estérasique. Ces résultats ne corroborent pas avec les nôtres.

La synthèse des lipases et des estérases par les bactéries testées contribue à la dégradation de la matière grasse et par conséquent, ces bactéries pourraient participer au recyclage de la matière organique en fournissant les éléments nécessaires aux plantes (Azrou et Guettafi, 2014).

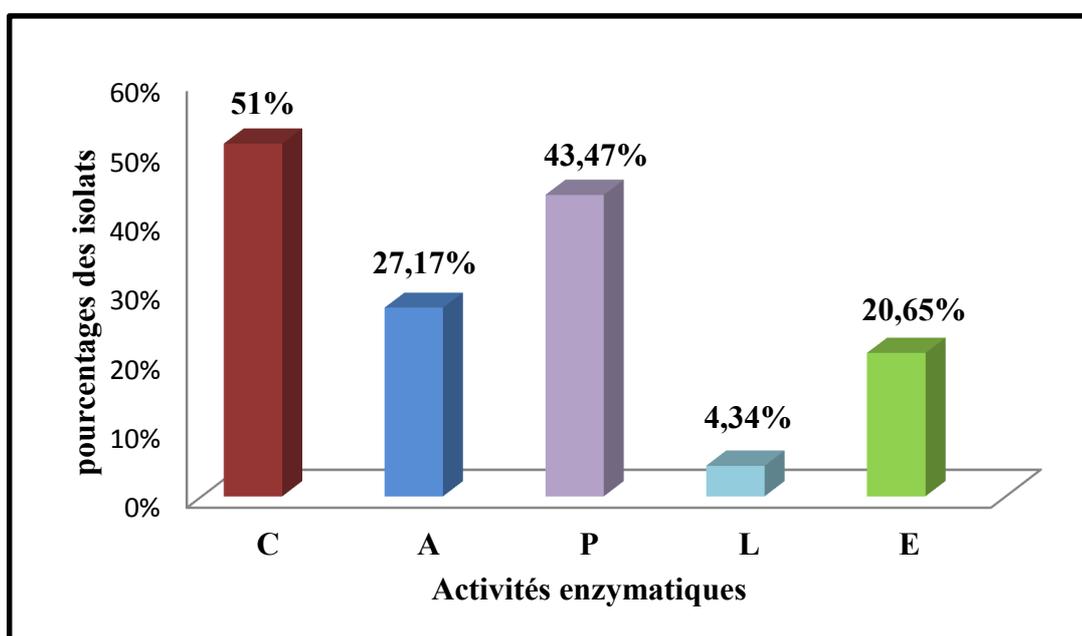


Figure 18: Pourcentages des isolats actifs isolés à partir de la rhizosphère de *M. chamomilla*.

C: Cellulase; P: Protéase; A: Amylase; L: Lipase; E: Estérase.

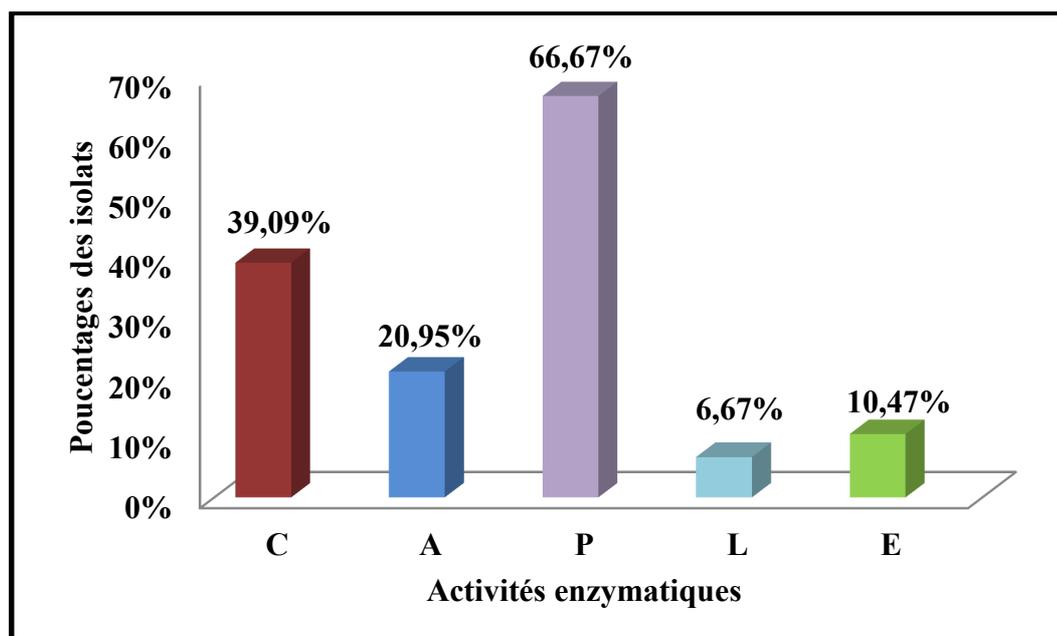


Figure 19: Pourcentages des isolats actifs isolés à partir de la rhizosphère de *R. officinalis*.

C: Cellulase; P: Protéase; A: Amylase; L: Lipase; E: Estérase

III.3.2 L'activité enzymatique des isolats de *Pseudomonas* spp.

Le tableau VII montre que la cellulose est le substrat le plus dégradé par les 26 isolats de *M. chamomilla* avec un pourcentage de 57,69%; suivi par l'amidon et la caséine avec 19,23 %, ensuite la Tween 80 et la Tween 20 avec 7,6% et 3,44 respectivement (Figure 20).

L'analyse statistique montre que sur les 15 isolats de *Pseudomonas* spp. de *M. chamomilla* ayant une activité cellulasique, les isolats PMCB1, PMCA9, PMCB4 ont manifestés une forte activité, avec des moyennes des index enzymatiques de 6, 5, 4,17 respectivement. Pour l'activité amylolytique l'isolat PMCB1 possède une grande activité avec une moyenne de 1,54. (Tableau VIII)

La plus grande activité protéolytique était observée chez 03 isolats (PMCA3, PMCA1, PMCA3) de *M. chamomilla* regroupés en 02 groupes avec des moyennes des index enzymatiques de 2,31 et 2 respectivement. (Tableau VIII)

La production de lipase et d'estérase était meilleure chez deux isolats différents (PMCB5, PMCB1) avec des moyennes des index enzymatiques de 1,33 et 5,45 respectivement. (Tableau VIII)

Tableau VII: Index enzymatiques des différentes activités enzymatiques chez les isolats de *Pseudomonas* spp. à partir de la rhizosphère de *M. chamomilla*.

Isolats	Index enzymatiques				
	Cellulase	Amylase	Protéase	Lipase	Estérase
PMCA1	1,33	-	2,31	-	-
PMCA2	-	-	1,33	-	-
PMCA3	2,00	-	2,00	-	-
PMCA4	2,00	-	-	-	-
PMCA5	-	-	-	-	-
PMCA6	-	-	-	-	-
PMCA7	2,67	-	-	-	-
PMCA8	2,69	-	-	-	-
PMCA9	5,00	-	-	-	-
PMCA10	-	-	-	-	-
PMCA11	-	-	-	-	-
PMCA12	-	-	-	-	-
PMCA13	-	-	-	-	-
PMCA14	-	-	-	-	-
PMCA15	-	-	-	-	-
PMCA16	2,50	0,89	-	-	-
PMCA17	3,69	1,13	-	-	-
PMCA18	2,00	-	-	-	-
PMCB1	6,00	1,54	1,50	-	5,45
PMCB2	1,75	-	1,25	-	-
PMCB3	-	-	-	-	-
PMCB4	4,17	-	-	-	1,00
PMCB5	1,17	1,00	-	1,33	-
PMCB6	-	-	-	-	-
PMCB7	1,15	-	-	-	-
PMCB8	3,50	1,00	-	-	-

PMCA: Les isolats de *Pseudomonas* spp. à partir de *M. chamomilla* sur King A.

PMCB: Les isolats de *Pseudomonas* spp. à partir de *M. chamomilla* sur King B.

Tableau VIII: Comparaison des moyennes des activités enzymatiques des souches de *Pseudomonas* spp. isolées à partir de la rhizosphère de *M. chamomilla*.

N	Cellulase		Amylase		Protéase		Lipase		Estérase	
	Isolat	MIE	Isolat	MIE	Isolat	MIE	Isolat	MIE	Isolat	MIE
1	PMCB1	6 _A	PMCB1	1,54 _A	PMCA1	2,31 _A	PMCB5	1,33 _A	PMCB1	5,45 _A
2	PMCA9	5 _B	PMCA17	1,13 _B	PMCA3	2 _B			PMCB4	1 _B
3	PMCB4	4,17 _C	PMCB8	1 _C	PMCB1	1,5 _C				
4	PMCA17	3,69 _D	PMCB8	1 _C	PMCA2	1,33 _D				
5	PMCB8	3,5 _E	PMCA16	0,89 _D	PMCB2	1,25 _E				
6	PMCA8	2,69 _F								
7	PMCA7	2,67 _G								
8	PMCA16	2,5 _H								
9	PMCA3	2 _I								
10	PMCA4	2 _I								
11	PMCA18	2 _I								
12	PMCB2	1,75 _K								
13	PMCA1	1,33 _L								
14	PMCB5	1,17 _M								
15	PMCB7	1,15 _N								

Les moyennes qui ont la même lettre ne sont pas significativement différentes.

MIE: Moyennes d'index enzymatique, **PMCA:** Les isolats de *Pseudomonas* spp. à partir de *M. chamomilla* sur King A, **PMCB:** Les isolats de *Pseudomonas* spp. à partir de *M. chamomilla* sur King B.

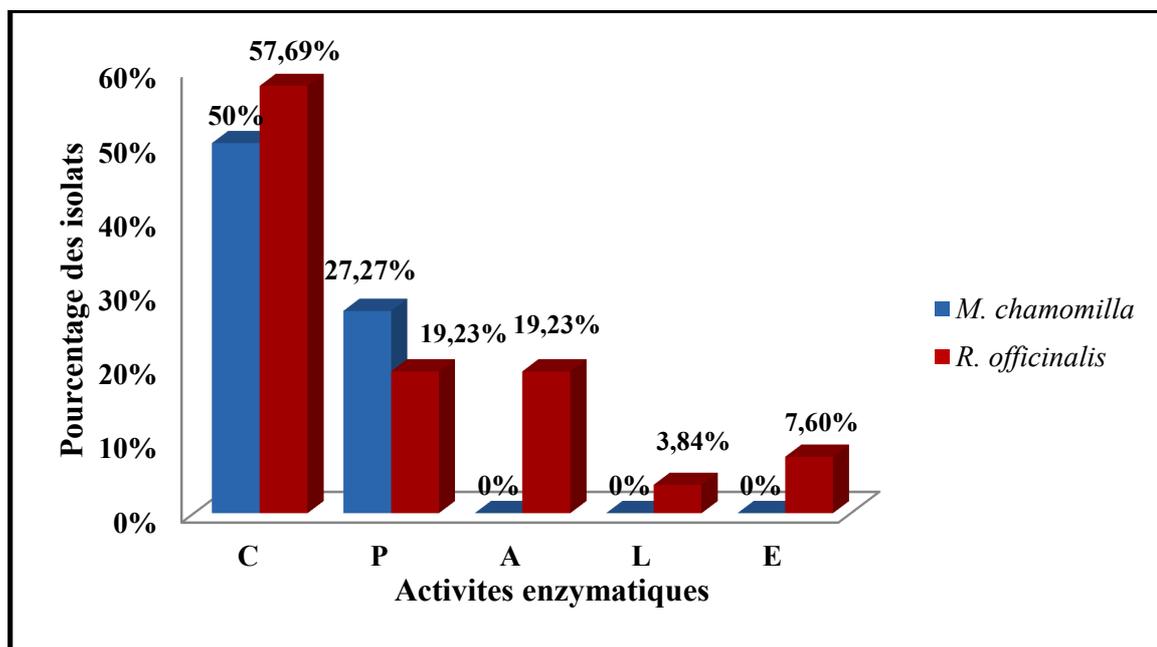


Figure 20: Pourcentages de *Pseudomonas* spp. actifs

C: Cellulase; P: Protéase; A: Amylase; L: Lipase; E: Estérase

Tableau IX: Index enzymatiques des différentes activités enzymatiques chez les isolats de *Pseudomonas* spp. à partir de la rhizosphère de *R. officinalis*

Isolats	Index enzymatiques				
	Cellulase	Amylase	Protéase	Lipase	Estérase
PROA1	6,00	-	2,13	-	-
PROA2	-	-	-	-	-
PROA3	-	-	-	-	-
PROA4	-	-	-	-	-
PROB1	1,92	-	3,50	-	-
PROB2	3,60	-	1,67	-	-
PROB3	5,83	-	1,56	-	-
PROB4	5,60	-	-	-	-
PROB5	1,57	-	-	-	-
PROB6	5,00	-	-	-	-
PROB7	-	-	-	-	-
PROB8	1,50	-	-	-	-
PROB9	-	-	1,57	-	-
PROB10	2,14	-	-	-	-
PROB11	2,88	-	-	-	-
PROB12	-	-	-	-	-
PROB13	-	-	-	-	-
PROB14	-	-	-	-	-
PROB15	-	-	1,88	-	-
PROB16	-	-	-	-	-
PROB17	-	-	-	-	-
PROB18	5,00	-	-	-	-

PROA: Les isolats de *Pseudomonas* spp. à partir de *R. officinalis* sur King A.

PROB: Les isolats de *Pseudomonas* spp. à partir de *R. officinalis* sur King B.

Pour les 22 isolats de *R. officinalis*, 50% sont capables de dégrader la cellulose. En deuxième position, on trouve la caséine avec un pourcentage de 27,27%, cependant ces isolats ne dégradent ni l'amidon, ni le Tween 80 ni le Tween 20 (Tableau IX, Figure 20).

Pour les *Pseudomonas* spp. isolés à partir de *R. officinalis*, l'activité cellulosique était meilleure chez 05 isolats qui sont : PROA1, PROB3, PROB4, PROB6 et PROB18 où les moyennes des index enzymatiques allaient de 5 à 6. (Tableau X)

Les isolats PROB1 et PROA1 ont manifestés une forte activité protéolytique avec des moyennes des index enzymatiques de 3,5 et 2,13 respectivement. (Tableau X)

Pour les activités amylolytique, lipolytique et estérasique elles étaient absentes chez tous les isolats.

Tableau X: Comparaison des moyennes des activités enzymatiques des souches de *Pseudomonas* spp. isolées à partir de la rhizosphère de *R. officinalis*.

N	Cellulase		Protéase	
	Isolats	MIE	Isolats	MIE
1	PROA1	6 _A	PROB1	3,5 _A
2	PROB3	5,83 _B	PROA1	2,13 _B
3	PROB4	5,6 _C	PROB15	1,88 _C
4	PROB6	5 _D	PROB2	1,67 _D
5	PROB18	5 _D	PROB9	1,57 _E
6	PROB2	3,6 _E	PROB3	1,56 _F
7	PROB11	2,88 _F		
8	PROB10	2,14 _G		
9	PROB1	1,92 _H		
10	PROB5	1,57 _I		
11	PROB8	1,5 _J		

Les moyennes qui ont la même lettre ne sont pas significativement différentes.

MIE: Moyennes des index enzymatiques, **PROA:** Les isolats de *Pseudomonas* spp. à partir de *R. officinalis* sur King A, **PROB:** Les isolats de *Pseudomonas* spp. à partir de *R. officinalis* sur King B.

Les *Pseudomonas* forment un large groupe colonisant le sol, les plantes et l'eau. Dans le sol, les *Pseudomonas* représentent une grande fraction de la communauté microbienne partageant leur milieu avec des commensaux appartenant principalement aux genres *Bacillus* et *Actinomyces*. On les retrouve un peu partout, particulièrement sur les systèmes racinaires des plantes. Les différentes espèces de *Pseudomonas* qui colonisent la rhizosphère possèdent plusieurs caractéristiques qui les rendent particulièrement intéressantes pour une utilisation comme agents de lutte biologique. Elles sont connues pour produire les composés antimicrobiens et les enzymes extracellulaires (lipase, estérase, xylanase, pectinase, amylase, protéase et cellulase) (Allaire, 2005).

Conclusion
et
perspectives

Conclusion et perspectives

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.

Dans cette étude, deux échantillons sont prélevés à partir de la rhizosphère de deux plantes médicinales dans la région de Hasnaoua de la wilaya de Bordj Bou Arreridj. Ces échantillons ont fait l'objet d'un isolement des bactéries d'intérêt industriel productrices de différentes enzymes hydrolytiques tels que la cellulase, amylase, protéase, lipase, et l'estérase.

92 isolats différents sont isolés à partir de *M. chamomilla*, et 105 à partir de *R. officinalis* sur le milieu PCA. En plus de 26 et 22 isolats de *Pseudomonas* spp. isolés à partir de *M. chamomilla* et *R. officinalis* respectivement sur les milieux King A et King B. Ces isolats ont été purifiés sur la base de leurs aspects visuels. La recherche des activités enzymatiques a montré que les bactéries étudiées lors de ce travail produisent la majorité des enzymes ciblées.

Pour les isolats de *M. chamomilla* l'activité cellulase représente l'activité la plus élevée avec un pourcentage de 51% suivie par l'activité protéolytique 43,47% puis l'activité amylolytique 27,17%. Cependant les activités lipolytique et estérasiqne ne dépassent pas les 20%.

Dans le deuxième échantillon de *R. officinalis*, l'activité protéolytique représente l'activité la plus élevée avec un pourcentage de 66,67% suivie par l'activité cellulase et amylolytique avec 39,09% et 20,95% respectivement. Tandis que les pourcentages les plus faibles sont représentés par les activités lipolytique et estérasiqne.

Concernant les isolats de *Pseudomonas* spp. la cellulose est le substrat le plus dégradé par les isolats de *M. chamomilla* avec un pourcentage de 57,69%; suivi par l'amidon et la caséine avec 19,23 % ensuite le Tween 80 et le Tween 20 avec 7,6% et 3,44 respectivement.

Pour les isolats de *Pseudomonas* spp. de *R. officinalis*, 50% sont capable de dégrader la cellulose. En deuxième position, on trouve la caséine avec un pourcentage de 27,27%, cependant ces isolats ne dégradent ni l'amidon, ni le Tween 80 ni le Tween 20.

D'après les résultats obtenus on conclue que les bactéries rizosphériques étudiées dans ce travail sont capables de produire de différentes enzymes hydrolytiques et possèdent une importance et une utilité dans des domaines industriels.

Le travail qu'on a effectué constitue une étape préliminaire pour des études plus larges, approfondies et accomplies incluant:

- Des testes supplémentaires pour la présence d'autres enzymes; Uréase et Phosphatase
- Une identification des espèces bactériennes isolées possédant des activités enzymatiques plus importantes
- Une étude quantitative et plus approfondie des activités enzymatiques de ces isolats
Une étude du pouvoir de stimulation de la croissance de ces bactéries des plantes à importance agronomique.
- Evaluation de l'activité antifongique contre les champignons phytopathogènes

Références
Bibliographiques

Références bibliographiques

- Achoub H., 2013:**In thèse Recherche et détermination structurale de métabolites secondaires de *Matricaria Chamomilla* (Asteraceae) Etude de la phase n- butanol. thèse Magister en Chimie Organique. Université *constantine* p07.
- Aguilar C. N., Gerardo G. S., PLilia A., Raul R. H., José M.H. and Juan C.E., 2008:** Perspectives of solid-state fermentation for production of food enzymes. *American Journal of Biochemistry and Biotechnology*, 4 (4): 354-366.
- Ahmad N., Shinwari Z.K., Bashir S. et Yasir M., 2013:**Function and Pylogenetic Characterization Of Rhizospheric Bacteria Associated With GM And Non GM Maize. *Pak. J. Bot.* 45, 1781-1788.
- Allaire M., 2005:** Diversité fonctionnelle des *Pseudomonas* producteurs d'antibiotiques dans les rhizosphères de conifères en pépinières et en milieu naturel. 90 : 4-12.
- Alloue M., Destain J., Ghalfi H., Thonart P., Aguedo M., Wathelet J.P. et Blecker C., 2008:**Les lipases immobilisées et leurs applications. *Biotechnol. Agron. Soc. Environ.* 12.
- Ando S., Ishia H., Kosugi Y., Ishikawa K., 2002:**Hyperthermostable Endoglucanase from *Pyrococcus horikoshii*. *Applied and Environmental Microbiology*. 68(1) p:430-433.
- Antoun H., Prévost D., 2005:** Ecology of plant growth promoting rhizobacteria, PGPR: *Biocontrol and biofertilization*. Springer, pp. 1-38.
- Arcand M. M., Schneider K.D., 2006:** Plant-and microbial-based mechanisms to improve the agronomic effectiveness of phosphate rock: a review. *Anais da Academia Brasileira de Ciências* 78, 791-807.
- Arpigny J. L. et Jaeger K. E., 1999:**Bacterial lipolytic enzymes: classification and properties. *Biochemical Journal*, 343 Pt 1: 177-83.
- Azrou S. et Guettafi N., 2014:** Recherche de caractères d'intérêt agricole chez certaines bactéries rhizosphériques. Université *Abderrahmane Mira de Bejaia*. p23
- Avinash T.S. et Rai R.V., 2014:**Antifungal Activity of Plant Growth Promoting Rhizobacteria against *Fusarium oxysporum* and *Phomasp.* Of Cucurbitaceae. In: R. N. Kharwar et al. (eds.), *Microbial Diversity and Biotechnology in Food Security*. Mysore, Karnataka. pp. 257-264.
- Bach H. J., Munch J. C., 2000:**Identification of bacterial sources of soil peptidases. *Biol Fertil Soils* 31: 219–224.
- Bakker P.A.H. M., Pieterse C.M.J. and Van Loon L.C., 2007:**Induced systemic resistance by fluorescent *Pseudomonas spp.* *Phytopathology*, 97 (2), 239-243.
- Barrett A. J., 1994:** Classification of Peptidases. *Methods in Enzymology*, 244, 1–15.
- Béguin P., 1990:**Molecular biology of cellulose degradation. *Annu. Rev. Microbiol.* 44 p 219-248.
- Belhadi F., Ait Meddour K., 2013:** Isolement et caractérisation des bactéries productrices d'enzymes à intérêt agricole à partir du sol et d'algues marines thèse de Master. Université *Abderrahmane Mira de Bejaia*. p41

Références bibliographiques

- 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*. 104p.
- Bensidhoum L., Rai A., Tabli N., Kahouadji N., Khaber M., et Nabti El-H., 2015:** Biological Control of Botrytis cinerea by *Bacillus* sp. Strain S7LiBe Under Abiotic Stress. *International Journal of Scientific Research in Science and Technology*. 6, 07-14.
- Bhat M. K., 2000:** Cellulases and related enzymes in Biotechnology. *Biotechnol Adv*. 18: 355-383.
- Boiron P., 1996:** Organisation et biologie des champignons. Nathan. Paris. P. 19-79.
- Bok J. D., Yrnool D. A., Eveleigh D.E., 1998:** Purification, characterisation and molecular analysis of thermostable cellulases Cel A and Cel B from *Thermotoga neapolitana*. *Applied and Environmental Microbiology*: 64 (12). p : 4774-4781.
- Bouix M. et Leveau J. Y., 1999:** Production des enzymes. In *Scriban R (Ed) : Biotechnologie Ed. Lavoisier*. 344-400.
- Bousseboua H., 2002:** Eléments de Microbiologie Générale. Programmes de graduation. Editions de l'Université *Mentouri. Constantine* Algeria p.230-231.
- Brineton B., 1991:** Pharmacognosie, phytochimie-plante médicinale. 3ème édition.
- Brissou J., 1971:** Technique d'enzymologie bactérienne. Edition Masson et CIE, Paris. p: 94.
- Burhan A., Nisa U., Gokhan C., Ömer C., Ashabil A. & Osman G., 2003:** Enzymatic properties of a novel thermostable, thermophilic, alkaline and chelator resistant amylase from an alkaliphilic *Bacillus* Sp. Isolate ANT-6. *Process Biochem*. 38, p: 1397-1403.
- Campbell R. et Greaves M. P., 1990:** Anatomy and community structure of the rhizosphere in The Rhizosphere (ed. J.M. Lynch), John Wiley & Sons, Ltd, Essex, pp. 11-34.
- Carrim A. J. I., Barbosa E. C. and 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 : 353-359.
- Casas- Godoy L., Duquesne. S., Bordes F., Sandoval G. et Marty A., 2012:** Lipases and Phospholipases: *Methods and Protocols. Meth. Mol. Bio*. 861.
- Chahinian H. & Sarda L., 2009:** Distinction between esterases and lipases: comparative biochemical properties of sequence-related carboxylesterases. *Protein. Pept. Lett*. 16: 1149-1161.
- Chao-Hsun Y. & Wen-Hsuing L., 2004:** Purification and properties of a maltotrioseproducing Alpha amylase from *Thermobifida fusca*, Institute of Microbiology and Biochemistry, *National Taiwan University; Enzyme and Microbial Technology*. (35):254-59.
- Chen C.M., Gritzali M., Stafford D. W., 1987:** Nucleotide sequence and deduced primary structure of cellobiohydrolase II from *Trichoderma reesei*. *Bio/Technology*. 5 p:274-278.

Références bibliographiques

- Chesson A., 1987:**Supplementary enzymes to improve the utilization of pigs and poultry diets. In: Hresign W, Cole DJA, editors. *Recent Advances in Animal Nutrition*. London, Butterworths, p. 71-89.
- Chin-A-Woeng T. F. C., Bloemberg G.V.& Lugtenberg B. J. J., 2003:** Phenazines and their role in biocontrol by *Pseudomonas* bacteria. *New Phytologist*. 157:503–523.
- Choudhary D.K., Prakash A., Wray V., and Johri B.N., 2009:** Insights of the *fluorescent Pseudomonads* in plant growth regulation. *Current Science*, 97, (2), pp170-179.
- Coral G., Arikan B., Ünalı M. N. & Güvenmez H., 2003:**Thermostable alkaline protease produced by an *Aspergillus niger* strain. *Annals of Microbiology*, 53 (4): 491-498.
- Couillerot O., Prigent-Combaret C., Caballero-Mellado J., Moënne-Loccoz Y., 2009:** *Pseudomonas fluorescens* and closely-related fluorescent *pseudomonads* as biocontrol agents of soil-borne phytopathogens *Letters in Applied Microbiology*, 48, (5), pp 505-512.
- Cousin D., Matagne A., Laemmli U. K. & Stewart D. J., 1982:** The purification of neutral bacterial proteases *Pseudomonas fluorescens* . *Biochem. Mol. Biol. Int.* 34: 1157-1166.
- Crete P., 1965:** Précis de botanique : systématique des angiospermes. Tome 1. 2ème éd. Paris : *Masson*. 429p.
- Davet P., 1996:**Vie microbienne du sol et production végétale. 1ère édition, *INRA*, Paris.
- Davies G., Henrissat B., 1995:**Structures and mechanisms of glycosyl hydrolases. *Structure*. 3: 853-859.
- Diby P., Saju K. A., Jisha J.P., Sarma Y. R., Kumar A., Anandaraj M., 2005:** Mycolytic Enzymes Produced by *Trichoderma* and *Pseudomonas fluorescens* spp. Against *Phytophthora capsici*, foot rot pathogen of the black pepper (*Piper nigrum* L.).*Annals of Microbiology*, 55, (2), pp 129-133.
- Dinesh R., Anandaraja M., Kumarb A., Binia Y. K., Subilaa K. P., Aravind R., 2015:** Isolation, characterization, and evaluation of multi-trait plant growth promoting rhizobacteria for their growth promoting and disease suppressing effects. *Microbiological Research*. 173, 34–43.
- Ekunsaumi T., 2002 :** Laboratory Production and Assay of Amylase by Fungi and Bacteria. (2002)
- Eyquem A., Alouf J., Montagnier L., 2000 :** Traité de microbiologie clinique: Deuxièmes mises à jour et compléments. *Piccin Nuova Libraria*, Italie, 238 p.
- Feillet P., 2000 :** Le grain de blé composition et utilisation .Editeur *INRA*, p : 125
- Fickers P., Destain J. & Thonart P., 2008:** Les lipases sont des hydrolases atypiques : Principales caractéristiques et application. *Biotechnol. Agron. Soc. Environ.* 12: 119-130.
- Fojan P., Jonson P. H., Petersen. M. T. & Petersen. S. B., 2000:** What distinguishes an esterase from a lipase: a novel structural approach. *Biochimie* 82: 1033-1041.
- Fossi B.T., Tavea F., & Ndjouenkeu R., 2005:**Production and partial characterization of a thermostable amylase from ascomycetes yeast strain isolated from starchy soils. *African Journal of Biotechnology*.
- Frazier W.C., 1967:** Food microbiology. Academic presse. London. P. 3-429

- Gao J., Weng H., Zhou D., Yuan M., Guan F., Xi Y., 2008:** Production and characterization of cellulolytic enzymes from the thermoacidophilic fungal *Aspergillus terreus* M11 under solid state cultivation of corn stover. *Bioresource Technol.* 99: 7623-7629.
- 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.
- Gilham D. & Lehner R., 2005: Techniques to measure lipase and esterase activity in vitro. Methods. 36:139-147.**
- Glick B. R., Cheng Z. et Czarny J., 2007 :** Promotion of plant growth by ACC deaminase-producing soil bacteria. *Eur. J. Plant Pathol.* 119, 329-339.
- Glick B. R. & Grichko V. P., 2001 :** Amelioration of flooding stress by ACC deaminase-containing plant growth-promoting bacteria. *Plant Physiol. Biochem.* 39: 11-17.
- Glick B. R. et Pasternak J. J., 1998:** Plant growth promoting bacteria in molecular biotechnology principles and applications of recombinant DNA. 2nd Ed. ,ASN press, Washington DC .glutamine synthetase expression and accumulation. *Environmental and Experimental Botany.* 60, 121-126.
- Gonita-Mishra I., Sapre S., Sharam A. et Tiwari S., 2016 :** Alleviation of Mercury Toxicity in Wheat by the Interaction of Mercury-Tolerant Plant Growth Promoting Rhizobacteria. *J Plant Growth Regul.* DOI
- Graber M., Combes D., 1989 :** Microbial α -amylases: Enzyme and Microbiol Technology.2:663-687.
- Gray E., Smith D., 2005:** Intracellular and extracellular PGPR: commonalities and distinctions in the plant–bacterium signaling processes. *Soil Biology and Biochemistry* 37, 395-412.
- Grisebath H., 1965:** chemistry and biochemistry of plant pigments, T. W.GOODWIN, Academic Press, New-York.
- Gunata Y.Z., Bayonove C.L., Arnaud A., Galzy P., 1990 :** Hydrolysis of grape monoterpenyl glycosides by *Candida molishiana* and *Candida wickerhamii* β glucosidases. *J.Sci. Food Agric.* 50. p: 499-509.
- Gupta R., Beg Q.K., and Lorenz P., 2002:** Bacterial alkaline proteases: molecular approaches and industrial applications. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 59: 15–32.
- Haas D., Défago G., 2005:** Biological control of soil-borne pathogens by *fluorescent pseudomonads*. *Nature Review of Microbiology*, 3, pp 307-319.
- Harbone J. B., 1977:** *Biol.Chem.Comp.* 1,359.
- Harjunpaa V., Teleman A., Koivula A., Ruohonen L., Teeri T. T., Teleman O., Drakendeg T., 1996:** Cello-oligosaccharides hydrolysis by cellobiohydrolase II from *Trichoderma reesei* – Association and rate constants derived from an analysis of progress curves. *Eur J Biochem.* 240: 584-591.
- Harman G. E., Shores M., 2007 :** The mechanisms and applications of symbiotic opportunistic plant symbionts, *Novel Biotechnologies for Biocontrol Agent Enhancement and Management.* Springer, pp. 131-155.

Références bibliographiques

- 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.
- Hasan F., Hameed A., 2006 :** Industrial applications of microbial lipases. *Enzyme Microb Technol* 2006, 39:235-251.
- Hasper A.A., Dekkers E., Mil M.V., Van de Vondervoort P. J. I., De Graaff L. H., 2002 :** Egl C, a new endoglucanase from *Aspergillus niger* with major activity towards xyloglucan. *Appl. Environ. Microbiol.* 68(4). p: 1556-1560.
- Haq H.I., Mukhtar H., Daudi S., Sikander A. & Quadeer M. A., 2003 :** Production of proteases by a locally isolated mould culture under lab conditions. *Biotechnology* 2 (1): 30- 36.
- Headon D. & Walsh G., 1994:** The industrial production of enzymes. *Biotechnology advances*, 12(4), 635-646.
- Hui et Howles., 2002:** Carboxyl ester lipase: structure-function relationship and physiological role in lipoprotein metabolism and atherosclerosis. Department of Pathology and Laboratory Medicine, University of Cincinnati College of Medicine, Cincinnati, OH, USA. *J Lipid Res.* 2002 Dec;43(12):2017-30
- Iserin P., Masson M. et Restellini J.P., 2007 :** Larousse des plantes médicinales. Identification, préparation, Soins .Ed Larousse, (2007) pp14.
- Jaeger K. E. & Eggert T., 2002 :** Lipases for biotechnology. *Current opinion in biotechnology.* 13:390-397.
- Jaeger K. E. and Reetz M. T., 1998 :** Microbial lipases form versatile tools for biotechnology. *Trends Biotechnol* 16: 396-403.
- Joshi F., Archana G., Desai A., 2006 :** Siderophore cross-utilization amongst rhizospheric bacteria and the role of their differential affinities for Fe³⁺ on growth stimulation under iron-limited conditions. *Current microbiology* 53, 141
- Kader A. J., Omar O., Feng L. S., 1999 :** Isolation of cellulolytic fungi from the Barrio Highlands, Sarawak. University of Kebangsaan, Malaysia. Review of *Biodiversity and Environmental Conservation*.
- Kanwar S.S., Gupta M., Kauchal R.K., Chimni S.S., 2006 :** Properties of hydrogel entrapped lipase of thermophilic *Pseudomonas aeruginosa* BTS-2. *Indian journal of biotechnology*, 5, 292-297.
- Kaymak H.C., 2010 :** Potential of PGPR in agricultural innovations, Plant growth and health promoting bacteria. Springer, pp. 45-79.
- Kennedy A., DE Luna L., 2004:** Soil Biology: the Rhizosphere. *Encyclopedia of Soil Science*, 399-406.
- Khalid A., Arshad M. et Zahir Z. A., 2006:** Phytohormones: microbial production and applications. In: *Biological Approaches to Sustainable Soil Systems*. (Eds.): N. Uphoff, A.S. Ball, E. Fernandes, H. Herren, O. Husson, M. Laing, C. Palm, J. Pretty, P. Sanchez, N. Sanginga and J. Thies. Taylor & Francis/CRC, Boca Raton, Florida. p. 207-220.
- Kirk O., Borchert T. v. & Fuglsang C. C., 2002:** Industrial enzymes applications. *Current opinion in biotechnology* 13: 345-35.

Références bibliographiques

- 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. *Biochem J.* 302: 463-469.
- Kloepper. J. W., 1993:** Plant-growth-promoting rhizobacteria as biological control agents, In: *Soil Microbial Ecology*, (Ed.) F.B. Jr., Metting. Marcel Dekker inc., N.Y. p. 255-273.
- 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.
- Kresze G. B., 1991 :** Proteases during purification. *Bioprocess-technol.* 12 : 85-120.
- Latour X. et Lemanceau P., 1997 :** Métabolisme carboné et énergétique des *Pseudomonas* spp. *fluorescents* saprophytes à oxydase positive. *Agronomie*, 17, pp 427-423.
- Lawrence R. C., Fryer T. F. & Reiter B., 1967 :** The Production and Characterization of Lipases from a Micrococcus and a *Pseudomonad*. *J. gen. Microbial.* 48: 401-418.
- Lefrère J. J., et Rouger P., 2000 :** Transfusion sanguine: Une approche sécuritaire. John Libbey Eurotext, France. pp 175-177.
- Lekchiri S., Moueqqit M., Lekchiri A., 2006 :** Mise en évidence d'une activité cellulase chez *Fusarium oxysporum* f.sp albedinis induite par une nouvelle forme d'hydrocellulose purifiée. Faculté des Sciences, Département de Biologie, Faculté des Sciences, Université Mohamed Ier, Oujda, Maroc.
- Li J., Kremer R. J., 2000 :** Rhizobacteria associated with weed seedlings in different cropping systems. *Weed Science* 48, 734-741.
- Liua C. H., Chena C. Y., Wanga Y. W. et Changa J. S. 2011 :** Fermentation strategies for the production of lipase by an indigenous isolate Burkholderia sp. C20. *Bioch. Eng. J.* 58– 59: 96– 102.
- Lotti M., Tramontano A., Longhi S., Fusetti F., Brocca S., Pizzi E. et Alberghina L. (2002).** Variability within the *Candida rugosa* lipases family. *Protein Engineering*, 7(4): 531-5.
- Lugtenberg, B. J. J., Dekkers L. et G. V. Bloemberg 2002:** Molecular determinants of rhizosphere colonization by *Pseudomonas*. *Annu. Rev. Phytopathol.* 39:461–490
- Martínez-Viveros O., Jorquera M., Crowley D., Gajardo G., Mora M., 2010:** Mechanisms and practical considerations involved in plant growth promotion by rhizobacteria. *Journal of soil science and plant nutrition* 10, 293-319.
- MC Tigue., Kelley C.T., Doyle E. M. et Fogarty W. M., 1995 :** The alkaline amylase of the *alkalophilic Bacillus* sp. IMD 370. *Enzyme and Microbial Technology.* (17):570-573.
- Mehenna F., Mezhoud H., 2017:** Isolement de bactéries rhizosphériques résistantes aux métaux lourds. thèse de Master. Université *Abderrahmane Mira de Bejaia* .p11
- Mia. M.A.B., Shamsuddin Z.H., Wahab Z., Marziah M., 2005:** High-yielding and quality banana production through plant growth-promoting rhizobacterial (PGPR) inoculation. *Fruits* 60, 179-185.

Références bibliographiques

- Miah M.Y., Kanazawa S., Chiu C. Y., Hayashi H., Chino M., 2000:** Microbial distribution and function across wheat rhizosphere with oxamide and ammonium sulfate as N sources. *Soil science and plant nutrition* 46, 787-796
- Migula W., 1894 :** Über ein neues System der Bakterien. Arbeiten aus dem bakteriologischen Institut der technischen Hochschule zu Karlsruhe, 1, pp 235-238.
- Milner J. A., Martin D.J. et Smith A., 1997 :**Two-stage inoculate for the production of alpha amylase by *Bacillus amyloliquefaciens*. *Enzyme and Microbial Technology*. (21) :382– 386.
- Misko A. L., Germida-James J., 2002 :**Taxonomic and functional diversity of pseudomonads isolated from the roots of field-grown canola. *FEMS Microbiology Ecology*, 42, pp 399-407.
- Muthulakshmi C., Gomathi D., Kumar D. G., Ravikumar G., Kalaiselvi M. et Uma C., 2011:** Purification and Characterization of Protease by *Aspergillus flavus* under Solid State Fermentation. *Journal of Biological Sciences Production*. Volume 4, Number 3, 137 – 148.
- Nabti E., 2007 :** Restauration de la croissance de *Azospirillum brasilense* et de Blé dur et leur osmoprotection par *Ulva lactuca* en Milieux Salés. Thèse de Doctorat en Science Biologique. Université *Abderrahmane Mira de Bejaia*.147p.
- Nabti E. H., Bensidhoum L., Tabli N., Dahel D., Weiss A., Rothballer M., Schmid M., Hartmann A., 2014:** Growth stimulation of barley and biocontrol effect on plant pathogenic fungi by a *Cellulosi* microbium sp. Strain isolated from salt-affected rhizosphere soil in north western Algeria *European Journal of Soil Biology*. 61, 20-26.
- Najjar A., 2010:** Etude quantitative de la sécrétion de lipase, de la lipolyse et du stockage de lipides chez *Yarrowia lipolytica* lors de sa croissance en présence d'huile d'olive. Thèse. *Microbiologie et Biotechnologies*.
- Nehl D.B. et Knox OGG., 2006:** Significance of Bacteria in the Rhizosphère. In Mukerji K.G. C.Manoharachary, J.Singh (eds.), *Microbial Activity in the rhizosphère*. *Soil Biology*. 7, p.89-119.
- Ngoma L., Babalola O. O., Ahmad F.,2012:** Ecophysiology of plant growth promoting bacteria. *Scientific Research and Essays* 7, 4003-4013
- Ningthoujam D. S., Kshetri P., Sanasam S. & Nimaichand.S., 2009:**Screening, Identification of Best Producers and Optimization of Extracellular Proteases from Moderately Halophilic Alkalithermotolerant Indigenous Actinomycetes. *World Applied Sciences Journal* 7: 907-916.
- Nouadri T., 2011:**L' α -amylase de *Penicillium camemberti* PL21:Production, Purification, Caractérisation et Immobilisation .Mémoire de Magister. Université *Mentouri*. *Constantine*. 160p.
- Odier E., Rouau X., 1985:**Les cellulases et les enzymes de dépolymérisation de la lignine.p :199-214. . Edition Gauthier-Villard, Paris. Okada G.(1976). *J. Biochem*, 80,p: 913-922.
- Okon Y., Kapulnik Y., 1986:** Development and function of *Azospirillum*-inoculated roots. *Plant and soil* 90, 3-16.

- 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 Biotechnol.* 4 (1): 26-30.
- Pabai F., 1997:** Production, Purification, Characterization of selected microbial lipases and their application for interesterification of better fat. Department of food science & agricultural chemistry. McGill University, Montréal, Canada. Applied image. INC. PP: 179.
- Palma J. M., Sandalio L. M., Corpas F. J., Romero-Puertas M. C., McCarthy I., Del Rio L. A., 2002:**Plant proteases, protein degradation, and oxidative stress: role of peroxisomes. *Plant Physiology and Biochemistry*, 40:521–30.
- Palmer T. A., 1975:**Glucose syrups in food and drink. *Process Biochemistry*.
- Pandey A., Benjamin S., Soccol C.R., Nigam P., Krieger N. and Soccol V.T., 1999:** The realm of microbial lipases in biotechnology. *Biotechnol Appl Biochem* 29: 119-31.
- Petit J. and Jobin P., 2005:** La fertilisation organique des cultures Les bases. *Fédération d'agriculture biologique du Québec*
- Ramette A., Moënne-Loccoz Y., Défago G., 2006:**Genetic diversity and biocontrol potential of *fluorescent pseudomonads* producing phloroglucinols and hydrogen cyanide from Swiss soils naturally suppressive or conducive to *Thielaviopsis basicola*-mediated black root rot of tobacco. *FEMS Microbiology Ecology* 55, 369-381.
- Ramnath L., Sithole B., and Govinden R., 2016:**Classification of lipolytic enzymes and their biotechnological applications in the pulping industry
- Rao M.B., Tanksale A.M., Ghatge M. S. and Deshpande V. V., 1998:** Molecular and biotechnological aspects of microbial proteases. *Microbiol. Molecular Biology Review*, 62 (3): 597- 635.
- Rao. S. M., Reddy G., Venkateswara. Rao. G. & Sambasiva .Rao K. R.S., 2004:** Studies on the extraction and characterisation of thermostable -amylase from pericarp of *Borassus indica*. *African Journal of Biotechnology.*, 4, p: 289-291.
- Rawat S. & Mushtaq A., 2015:** Plant growth promoting rhizobacteria, a formula for sustainable agriculture: A review. *Asian Journal of Plant Science and Research*, 2015, 5(4):43-46
- Reis P., Holmberg K., Watzke H., Leser M. E., Miller R., 2009:** Lipases at interfaces: A review. *Advances in Colloid and Interface Science*, 147-148(C), 237–250.
- Rezzonico F., Zala M., Keel C., Duffy B., Moënne-Loccoz Y., Défago G., 2007:** Is the ability of biocontrol *fluorescent pseudomonads* to produce the antifungal metabolite 2, 4-diacetylphloroglucinol really synonymous with higher plant protection? *New Phytologist* 173, 861-872.
- Rodríguez, H., Fraga R., 1999:**Phosphate solubilizing bacteria and their role in plant growth promotion. *Biotechnology advances* 17, 319-339.

Références bibliographiques

- Saharan B. S. et Nehra V., 2011:** Plant Growth Promoting Rhizobacteria: A Critical Review. *Life Sci. Med. Res.* 21: 1-30.
- Salihu A., Alam M.D. Z., Abdulkarim M. I. et Salleh H., 2012:** Lipase production: An insight in the utilization of renewable agricultural residues. *Res. Cons. Recy.* 58: 36-44.
- Samrat C., Abhijit K., Chandrakant K., Kakasaheb M. & Balasaheb C., 2009:** Isolation and characterization of novel α -amylase from marine *Streptomyces* sp. D1 *Journal of Molecular Catalysis. B, Enzymatic.* 2009. 58, 1-4, 17-23.
- Sandhya C., Sumantha A., Szakacs G. & Pandey A., 2005:** Comparative evaluation of neutral protease production by *Aspergillus oryzae* in submerged and solid-state fermentation. *Process Biochemistry*, 40: 2689-2694.
- Sayed R. Z. et Patel P. R., 2011:** Biocontrol Potentiel of Sidérophore Producing Heavy Métal Resistant *Alcaligenes* sp and *Pseudomonas aeruginosa* RZS3 vis-a vis Organophosphorus Fungicide .*India J. Microbiol.* 51(3): 266-272.
- Schamburg D., Salzman M. G. B. F., 1991:** Cellulase. In: Enzyme Handbook, Vol IV. Springer-Verlag Berlin, p: 1-11.
- Schlechtermeier A., Walter S., Schroder J., Moorman M., Schrempf H., 1992:** The gene encoding the cellulase (Avicelase) Cel 1 from *Streptomyces reticuli* and analysis of protein domains. *Mol. Microbiol.* 6.p: 611-621.
- Schwarz W.H., 2001:** The cellulosome and cellulose degradation by anaerobic bacteria. *Appl Microbiol Biotechnol.* 56, p: 634-649.
- Scriban R., 1993:** Biotechnologie. 4^{ème} édition. Technique et Documentation – Lavoisier, Paris. P: 40.
- Scriban R., 1999:** Biotechnologie. p:149-156-157. 5^{ème} édition. Technique et documentation -Lavoisier (éd.)
- Sharma R., Chisti Y. & Banerjee U.C., 2001:** Production, purification, characterization, and applications of lipase . *Biotechnol Adv* 19: 627-662.
- Shoemaker S., Schweickart V., Ladner M., Gelfand D., Kwok S., Myamlo K., Innis M., 1983:** Molecular cloning of exo-cemllobiohydrolase derived from *Trichoderma reesei* strain L27. *bio/ Technology.* 1.p: 691-695.
- Siddiqui I. A., Shahid Shaukat S., Imtiaz hussain S., Khan A., 2006:** Role of cyanide production by *Pseudomonas fluorescens* CHA0 in the suppression of root- knot nematode, *Meloidogyne javanica* in tomato. *World journal of microbiology & biotechnology* , 22 (6), pp 641-650.
- Sierra G.A., 1957:** A simple method for the detection of lypolytic activity of microorganisms and some observations on the influence of the contact between cells and fatty substracts. *Antonine van Leeuwenhoeck*, 28, 15-22.
- Tabli N., NabtIE. H., Dahel D., Mokrane N., Manyani H., Dary M. et Megias M. G., 2013 :** Impact of diazotrophic bacteria on germination and growth of tomato, with bio-control effect, isolated from Algerian soil. *J. Eco. Heal. Env.* Vol. 1, No. 1, 19-25.

Références bibliographiques

- Teeri T.T., 1997:** Crystalline cellulose dégradation : new insight into the function of cellobiohydrolases. *Tibtech*. 15: 160-165.
- Tripathi R. D., Srivastava S., Mishra S., Singh N., Tuli R., Gupta D. K., Maathuis F. J., 2007:** Arsenic hazards: strategies for tolerance and remediation by plants. *TRENDS in Biotechnology* 25, 158-165.
- Treichel H., Oliveira D., Mazutti M.A., Luccio M. D. et Oliveira J.V., 2010:** A Review on Microbial Lipases Production. *Food Biop. Technol.* 3:182–196.
- Tokala R. K., J. L. Strap C.M., Jung D.L., Crawford H., Salove L. A., Deobald F. J., Bailey. et M.J. Morra., 2002 :** Novel plant microbe rhizosphere interaction involving *S.lydicus* WYEC108 and the pea plant (*Pisum sativum*). *Appl. Environ. Microbiol.*68: 2161-2171.
- Ulrich Bergmeyer H., 1979 :** principe de l'analyse enzymatique, Ed. Technique & Documentation, *lavoisier France*.
- Van Loon L.C., Bakker P.A. H. M.&Pieterse C.M.J., 1998:** Systemic resistance induced by rhizosphere bacteria. *Annu. rev. phytopathol*, 36, pp 453-483.
- Van Loon L. C., 2007:** Plant responses to plant growth –promoting rhizobacteria. *Eur J Plant Pathol.*119, 243-254.
- Vessey J.K., 2003:** Plant growth promoting rhizobacteria as biofertilizers. *Plant and soil* 255, 571-586.
- Vidaud C.,1984:** Contribution à l'étude de l'introduction du système cellulosique de *Trichoderma sp* par utilisation d' analogue de substrat thiosaccharidique. Thèse de 3eme Cycle. Université de *Grenoble*.
- Vinoth Raj S., Kanikkai Raja A., Babu Vimalanathan A., Manoj G., Tyagi NamanHirenkumar Shah., Johnson Amala Justin N.A., Infant Santhose B. & SathiyaseelanK., 2009:** Studyof starch degrading bacteria from kitchen waste soil in the production of amylase by using paddy straw. *Recent Research in Science and Technology* 1(1): 008–013
- Warren R.A. J.,1996:**Microbial hydrolysis of polysaccharides. *Annu Rev Microbiol.* 50: 183-212.
- Weller D.M.,Raaijmakers J.M., Gardener B. B., Mc Spadden., Thomashow L. S., 2002:** Microbial populations responsible for specific soil suppressiveness to pathogens. *Annu. Rev. Phytopathol.* 40, pp 309-348.
- Weller D.M., 2007:** The Nature and Application of Biocontrol Microbes III: *Pseudomonas* spp., *Pseudomonas* Biocontrol Agents of Soilborne Pathogens: Looking Back Over 30 Years. *Phytopathology*, 97, (2), pp, 250-256.
- Weyens N., Truyens S., Dupae J., Newman L., Taghavi S., Van Der LelieD., Carleer R., Vangronsveld J., 2010:** Potential of the TCE-degrading endophyte *Pseudomonas putida* W619-TCE to improve plant growth and reduce TCE phytotoxicity and evapotranspiration in poplar cuttings. *Environmental Pollution* 158, 2915-2919.
- Whipps J.M., 2001:** Microbial interactions and biocontrol in the rhizosphere. *Journal of experimental botany* 52, 487-511.
- Wild A., 1993:** Soils and the Environment .*Cambridge University Press*. 300p

Références bibliographiques

Woo S.L., Lorito M., 2007: Exploiting the interactions between fungal antagonists, pathogens and the plant for biocontrol, Novel biotechnologies for biocontrol agent enhancement and management. Springer, pp. 107-130.

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, Uppsala University, Sweden.

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*. *Euro J Biochem.* 267: 4970-4977.

Zahir Z.A., Arshad M. et Frankenberger WTJ.,2000: Plant growth promoting rhizobacteria : application and perspectives in agriculture. *Adv. Agro.* 81, 97-198.

<http://www.chem.qmul.ac.uk/iubmb/>

www.bccresearch.com

Annexes

1- Milieux de culture**PCA (Plate Count Agar)**

Caséine	5 g
Extrait de levure	2.5 g
Glucose	1 g
Agar.....	15 g
Eau distillée.....	1 L
pH	07

King A

Peptone	20 g
Glycérol	10 g
Sulfate de potassium	10 g
Chlorure de magnésium.....	1.4 g
Agar	12 g
Eau distillée	1 L
pH	7.2

King B

Peptone	20 g
Glycérol	10 g
Phosphate dipotassique.....	1.5 g
Sulfate de magnésium, 7 H ₂ O.....	1.5 g
Agar	15 g
Eau distillée.....	1L
pH	7.2

Bouillon Nutritif (BN)

Peptone	10 g
Extrait de viande	5 g
Na Cl	5 g
Eau distillée.....	1L
pH	7.3

Eau physiologie

Chlorure de sodium (Na cl)	9 g
Eau distillée.....	1L

Lugol

Iode.....	5 g
Iodure de potassium	10 g
Eau distillée	100 ml

2- Matériels lourds

Tout le matériel lourd utilisé durant cette étude est présenté dans le tableau ci-dessous :

Matériels	Marques	Origines
Hotte microbiologique	STERIL-GEMINI	Italy
Compteur de colonies	J.P.SELECTA,s.a	Spain
Etuves à 30°C	memmert	Germany
Microscope optique	OPTIKA B-350	Italy
Autoclave	SANOCLAV LaM-3-20-ECZ-J	/
Balance de précision	KERN ALS 220-4N	/
Balance électrique	/	Germany
Four Pasteur	memmert type UNB400	Germany
Bain marie	memmert	Germany
pH mètre	Inolab pH730	Germany
Distillateur	BuchI Distillation Unit K-350	Switzer land
Réfrigérateur/Congélateur	CONDOR	Algeria
Agitateur magnétique (plaque chauffante)	AGIMATIC-E	/
Vortex	Fisher Scientific FB 15024	/
Bec Bunsen	INTEGRA Biosciences®, model FIREBOY eco, bec Bunsen	/