



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

Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique

جامعة محمد البشير الإبراهيمي برج بو عريريج

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

كلية علوم الطبيعة والحياة وعلوم 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

## Mémoire

En vue de l'obtention du Diplôme de Master  
Domaine Des Sciences de la Nature et de la Vie

Filière : Sciences Biologiques

Spécialité : Microbiologie appliquée

### Thème

***Bacillus* sp. : Effet antagoniste et stimulation de la  
croissance des plantes**

Présenté par : Houfaf Abdel maoula  
Amour Youcef

Président : M<sup>me</sup> SOUAGUI Yasmine MCB (Univ de BBA)  
Encadrant : M<sup>r</sup> Nouari SADRATI MAA (Univ de BBA)  
Examineur 1 : M<sup>me</sup> ABED Hanane MCB (Univ de BBA)

Année universitaire : 2019/2020

## *Remerciements*

*Nous rendons avant toute chose grâce à dieu le tout puissant et le miséricordieux.*

*Nos remerciements les plus chaleureux au notre encadrant M<sup>r</sup> Nouari SADRATI Maître-assistant classe A (Université de BBA) pour l'orientation, la confiance, la patience qui ont constitué un apport considérable et par sa disponibilité, et ses conseils qui nous ont permis de réaliser ce travail.*

*Nos sincères remerciements s'adressent aussi à M<sup>me</sup> SOUAGUI Yasmine Maître de conférence classe B (Université de BBA) de nous avoir fait l'honneur de présider le jury de ce mémoire.*

*Nous exprimons nos vifs remerciements à M<sup>me</sup> ABED Hanane Maître de conférence classe B (Université de BBA) d'avoir accepté d'examiner ce travail et d'être parmi le jury.*

*Nous tenons à remercier vivement tous ce qui, de près ou de loin a participé à la rédaction de ce mémoire.*

## *Dédicaces*

*Je dédie ce travail premièrement à A ma très chère mère  
qu'elle trouve ici toute ma gratitude pour leur aide  
précieuse et leur soutien.*

*A la mémoire de mon père  
Puisse ton âme repose en paix. Que Dieu t'accueille dans  
son éternel paradis.*

*A mes très chères Frères, et sœurs  
J'importe Dieu a vous apporte bonheur et vous aide à  
réaliser vos vœux,*

*A tous mes oncles et tantes  
Ce travail et aussi le fruit de vos encouragements et de vos  
bénédictions,*

*A mon binôme Abdel maoula Merci pour tous les moments  
qu'on a partagés...*

*Youcef.*

## *Dédicaces*

*C'est avec une profonde émotion que je dédie ce  
mémoire :*

*A mes chers parents, pour tous leurs sacrifices, leur  
amour, leur tendresse, leur soutien et leurs prières tout au  
long de mes études,*

*A mes chères sœurs pour leurs encouragements  
permanents, et leur soutien moral,  
A mes chers frères, pour leur appui et leur  
encouragement,*

*A toute ma famille pour leur soutien tout au long de  
mon parcours universitaire,*

*A mon binôme Yousef Merci pour tous les moments qu'on  
a partagés...*

*Abdelmaoula.*

## الملخص

تساهم البكتيريا المعادية في إدارة أمراض النبات من خلال تحفيز الدفاعات الطبيعية في العائل و / أو عن طريق ضمان مكافحة الحيوية المباشرة للآفات والأمراض ، ومن المعروف أن بعض البكتيريا من التربة لها خصائص مفيدة معينة للنباتات في كل من مستوى السيطرة على مسببات الأمراض وزيادة النمو. تحفز البكتيريا الجذرية التي تعزز نمو النبات ، والمعروفة باسم PGPR ، نمو النبات بشكل مباشر عن طريق زيادة امتصاص العناصر الغذائية من التربة ، وتحفيز وإنتاج منظمات نمو النبات وتفعيل آليات المقاومة المستحثة في النباتات. تعمل PGPRs (*Bacillus sp.*) بشكل غير مباشر على تحفيز نمو النباتات من خلال تأثيرها العدائي على البكتيريا الدقيقة التي تضر بها. التأثيرات العدائية لـ *Bacillus sp.* تنطوي على إنتاج المضادات الحيوية والمنافسة التغذوية مع مسببات الأمراض النباتية. من الممكن استخدام PGPRs كمساعد لنمو النبات بدلاً من الأسمدة الكيماوية أو بالاشتراك معها كما أظهرت العديد من الدراسات. وفقاً للدراسة النظرية، فقد ثبت أن سلالات العصيات المستخدمة نشطة للغاية في المختبر من خلال اختبارات التضاد، مما أدى إلى انخفاض في مسببات الأمراض وانخفاض في تطور أعراض العديد من الأمراض التي تسببها العوامل الممرضة للنبات و تحفيز نمو النبات. كلمات مفتاحية: العداء؛ *Bacillus sp.*; ممرضة للنبات. مكافحة الحيوية. PGPR ؛ الجذور. سماد حيوي. تضاد.

## Résumé

Les bactéries antagonistes contribuent à la gestion des maladies des plantes en stimulant les défenses naturelles chez l'hôte et/ou en assurant le bio contrôle direct des bio agresseurs, Certaines bactéries provenant du sol sont reconnues pour posséder certaines caractéristiques bénéfiques pour les plantes tant au niveau du contrôle des pathogènes qu'au niveau de l'augmentation de croissance. Les rhizobactéries qui favorisent la croissance des plantes, connues sous le terme PGPR, stimulent directement la croissance de celles-ci en augmentant le prélèvement des éléments nutritifs du sol, en induisant et produisant des régulateurs de croissance végétale et en activant les mécanismes de résistance induite chez les végétaux. Les PGPR (*Bacillus sp.*) stimulent indirectement la croissance des végétaux par leur effet antagoniste sur la microflore qui leur est néfaste. Les effets antagonistes des *Bacillus sp.* impliquent la production d'antibiotiques et la compétition nutritionnelle avec les pathogènes végétaux. Il est possible d'utiliser les PGPR comme aide à la croissance des plantes à la place de fertilisants chimiques ou en combinaison avec ces derniers comme ça a été démontré plusieurs études.

D'après l'étude bibliographique, les souches de *Bacillus* utilisées se sont montrées très actives in vitro via les tests d'antagonismes, conduisant à une réduction des agents pathogènes et une diminution du développement des symptômes de plusieurs maladies provoquées par les agents phytopathogènes et stimulent la croissance des plantes.

**Mots clés :** Antagonisme ; *Bacillus sp.*; phytopathogène; biocontrôle; PGPR; rhizobactéries; biofertilisant; Antibiose.

**Liste des abréviations**

<b>PGPR</b>	Plant Growth Promoting Rhizobacteria
<b>PGP</b>	Plant Growth Promoting
<b>PSB</b>	Bactérie Solubilisant le Phosphate
<b>AIA</b>	Acide indole 3-acétique
<b>PCA</b>	Plate Count Agar
<b>mM</b>	milli-Molaire
<b>PDA</b>	Potato Dextrose Agar.
<b>ATB</b>	Antibiotique
<b>GN</b>	Gélose nutritif
<b>GB</b>	Gibbérelline
<b>Fe<sup>3+</sup></b>	Fer ferrique
<b>MH</b>	Mueller Hinton
<b>BN</b>	Bouillions Nutritif
<b>TGEA</b>	Tryptone Glucose Extract Agare
<b>Bt</b>	<i>Bacillus thuringiensis</i>
<b>ISR</b>	Résistance Systémique Induite
<b>TSA</b>	Tryptic Soy Agar
<b>PDA</b>	Potato Dextrose Agar
<b>TSB</b>	Tryptone Soy Broth
<b>Al</b>	Aluminium
<b>Pb</b>	Plumbum
<b>Zn</b>	Zinc
<b>PGPR</b>	Plant Growth Promoting Rhizobacteria
<b>PGP</b>	Plant Growth Promoting
<b>PSB</b>	Bactérie Solubilisant le Phosphate

## Liste des figures

<b>Figure 1 :</b>	Cycle de la matière organique : minéralisation et humification.	04
<b>Figure 2 :</b>	Facteurs écologiques influençant le processus d'exsudation racinaire	06
<b>Figure 3 :</b>	Représentation de la rhizosphère.	07
<b>Figure 4 :</b>	Présentation schématique des organismes du sol	09
<b>Figure 5 :</b>	Observation par microscope électronique d'une souche de <i>Bacillus</i> .	11
<b>Figure 6 :</b>	Les <i>firmicutes</i> .	11
<b>Figure 7 :</b>	Coupe longitudinale de <i>Bacillus thuringiensis</i> en fin de sporulation.	12
<b>Figure 8 :</b>	Promotion de la croissance des plantes par les PGPR .	16
<b>Figure 9 :</b>	Mouvement de phosphate dans le sol	18
<b>Figure 10 :</b>	Rôle de l'acide indole acétique dans l'amélioration de la croissance végétale	19
<b>Figure 11 :</b>	Production de sidérophores et assimilation de fer.	21
<b>Figure 12 :</b>	Les fonctions biologiques des sidérophores.	21
<b>Figure 13 :</b>	Effet de diverses concentrations salines (en mM de NaCl) sur le pourcentage de levée des plantes traitées par <i>Bacillus cereus</i> en fonction des jours après semis.	23
<b>Figure 14 :</b>	Model montre l'activation de la résistance induite (RI) par les microorganismes bénéfiques.	25
<b>Figure 15 :</b>	La résistance systémique induite chez les plantes par des rhizobactéries.	26
<b>Figure 16 :</b>	Méthode d'échantillonnage.	27
<b>Figure 17 :</b>	Détection des sidérophores sécrétés par un micro-organisme cultivé sur milieu gélosé CAS .	31
<b>Figure 18 :</b>	Test de l'activité antagoniste des bactéries contre les champignons pathogènes.	32
<b>Figure 19 :</b>	Test de l'activité antagoniste des bactéries contre les champignons pathogènes	32
<b>Figure 20 :</b>	Méthode de diffusion par cylindres d'agar de <i>Bacillus</i> sp	33
<b>Figure 21:</b>	Antagoniste activité par la méthode des stries perpendiculaires	34
<b>Figure 22 :</b>	Antagoniste activité par la méthode de double couche.	34

- Figure 23:** Dépistage des activités antimicrobiennes par la méthode de sélection des colonies. 35
- Figure 24:** (A) méthode de diffusion sur disque d'extrait microbien utilisant *C. albicans* comme micro - organisme d'essai . 36
- Figure 25 :** méthode de diffusion par les puits d'agar . 36

**Liste des tableaux**

<b>Tableau 1 :</b>	Distribution des microorganismes en fonction du sol	05
<b>Tableau 2 :</b>	Classification de <i>Bacillus</i> sp.	13
<b>Tableau 3 :</b>	Activité antibiotique de certaines souches <i>Bacillus</i>	24

## Sommaire

Introduction .....	1
Chapitre I : Le sol et les microflores rhizosphériques .....	3
I. Le sol et les microflores rhizosphériques .....	3
I.1. Définition.....	3
I.2. Présence microbienne dans le sol .....	3
I.3. La rhizosphère .....	5
I.3.1 Définition .....	5
I.3.2 Rôle de la rhizosphère.....	5
I.3.3 Facteurs déterminant la richesse et l'activité de la rhizosphère.....	6
I.3.4 Les différentes interactions microbiennes dans la rhizosphère.....	7
I.3.4.1 Commensalisme .....	7
I.3.4.2 Parasitisme .....	7
I.3.4.3 Symbiose .....	7
I.3.4.4 Antagonisme .....	8
I.4 L'effet bénéfique des bactéries du sol et de la rhizosphère .....	8
I.4.1 Généralité.....	8
I.5.1 Les PGPR phytostimulatrices .....	9
I.6 Diversités taxonomique des PGPR.....	10
I.6.1 <i>Firmicutes</i> .....	11
I.6.1.1 Le genre <i>Bacillus</i> .....	11
I.6.1.1.2 Classification .....	13
I.6.1.1.3 Caractéristiques bactériologiques du genre <i>Bacillus</i> .....	13
I.6.1.1.4 Caractéristiques physiologiques du genre <i>Bacillus</i> .....	14
I.6.1.1.5 Utilisation des PGPR ( <i>Bacillus</i> sp.).....	14
Chapitre II : Rôle de <i>Bacillus</i> sp. dans l'antagonisme et dans la croissance des plantes ...	16
II. Rôle de <i>Bacillus</i> sp. dans l'antagonisme et dans la croissance des plantes .....	16
II.1. Les modes d'actions de <i>Bacillus</i> sp. ....	16
II.1.1. Mode d'action direct (l'effet phytostimulateur) .....	16
II.1.1.1 Fixation de l'azote.....	17
II.1.1.2 Solubilisation de phosphate .....	17
II.1.1.3 Production de phytohormone .....	19
II.1.1.3.1 Acide indole acétique (AIA) .....	19
II.1.1.3.2 Les gibbérellines .....	20
II.1.1.3.3 Les cytokinines.....	20

---

II.1.1.4 La production de sidérophores.....	20
II.1.1.5 Protection contre le stress salin.....	22
II.1.1.6 Compétition pour l'espace et les nutriments.....	23
II.1.2 Mécanismes indirectes (antagonisme).....	23
II.1.2.1 Antibiose.....	24
II.1.2.1.1 Activité antifongique et/ ou antibactérienne.....	24
II.1.2.2 Résistance systémique induite (ISR).....	24
Chapitre III : Méthodes d'études les <i>Bacillus</i> potentiellement PGPR.....	27
III. Méthodes d'études les <i>Bacillus</i> potentiellement PGPR.....	27
III. 1. Echantillonnage.....	27
III.2. Isolement du genre <i>Bacillus</i> .....	27
III.3. Conservation des isolats.....	28
III.4. Identifications du genre <i>Bacillus</i> .....	28
III.5. Etude du pouvoir PGP <i>in vitro</i> .....	28
III.5.1. La production des enzymes.....	28
III.5.1.1. L'activité protéolytique.....	28
III.5.1.2 L'activité amylolytique.....	28
III.5.2 La production de l'acide indole acétique.....	29
III.5.3 La solubilisation du phosphate.....	29
III.5.4 La production de sidérophores sur milieu liquide et solide.....	29
III.5.4.1 Production de sidérophores sur milieu liquide.....	29
III.5.4.2 Production de sidérophores sur milieu solide.....	30
III.6 Activité antagoniste (Activité antifongique et/ou activité antibactérienne).....	31
III.6.1 Méthode double culture.....	31
III.6.2 Méthode de diffusion par cylindres d'agar.....	32
III.6.3 Méthode des stries perpendiculaires.....	33
III.6.4 Technique double couche.....	34
III.6.5 Méthode de sélection des colonies.....	34
III.6.6 Méthode de diffusion de disque en milieu solide.....	35
III.6.7 Méthode de diffusion sur puits d'agar.....	36
Conclusion.....	37
Références.....	38

# **Introduction**

## Introduction

Le sol est un système vivant, complexe et un réservoir de microorganismes. Il contient tous les types microbiens, eucaryotes (champignons, algues et protozoaires), et procaryotes (bactéries et cyanobactéries), en termes de diversité et de densité, sol est un milieu riche et il n'est pas simplement le support dans lequel les plantes s'enracinent et puisent les éléments nutritifs indispensables à leur développement, dans ces sols riches en ressources alimentaires nécessaires, il existe de nombreux micro-organismes qui peuvent provoquer des maladies qui empêchent la croissance normale des plantes, parmi ces maladies par exemple La galle du collet, Ce dernier est l'une des maladies bactériennes grave qui peut engendrer des pertes économiques considérables pouvant aller jusqu'à 70% de la totalité de la production (**Djellout et al., 2019**). Elle est causée par plusieurs espèces d'*Agrobacterium* spp. qui constituent de dangereux parasites des végétaux et des cultures, car une fois les plantes infectées, aucune pratique de lutte n'est efficace, ces espèces provoquent la maladie du crown gall qui se manifeste par des tumeurs au niveau des racines et du collet des plantes, Ceci est un exemple des nombreuses maladies qui peuvent être causées par les différents microorganismes pathogènes présents dans le sol qui partagent le même environnement que les plantes. La prophylaxie est le seul moyen pour prévenir l'installation de cette maladie (**Jourdan et al., 2008**).

L'utilisation des agents microbiens de lutte biologique constitue une approche écologique très prometteuse. Beaucoup de recherche sur les micro-organismes a été effectuée durant le siècle dernier afin de comprendre, de développer et d'utiliser leurs actions bénéfiques tant au niveau médical, industriel qu'agricole. L'agriculture durable a été l'objet de beaucoup de recherche étant donné que l'agriculture traditionnelle engendre des coûts de production de plus en plus élevés, une diminution de la production et même parfois les deux (**Adesemoye et Kloepper, 2009**). L'utilisation de pesticides et d'engrais chimiques dans l'agriculture peut être nocive pour l'environnement. Les grandes quantités de fertilisants chimiques utilisées représentent un coût élevé et sont liées à la pollution de l'environnement par son utilisation excessive. Une étude a démontré que l'utilisation d'engrais chimique peut graduellement augmenter l'acidité du sol, ce qui peut limiter la croissance des plantes, c'est pourquoi le besoin de trouver des alternatives respectueuses de l'environnement se fait pressant (**Barak et al., 1997**).

La rhizosphère est la région du sol située sous les racines des plantes. De nombreuses interactions sont observées entre la plante, le sol et les microorganismes au

niveau des racines. Parmi les micro-organismes bénéfiques aux plantes, la flore PGPR (Plant Growth Promoting Rhizobacteria) exerce de nombreuses fonctions, améliorant la croissance des plantes que ce soit directement, par l'augmentation de la fertilité du sol, ou indirectement on lui conférant une meilleure résistance aux agents pathogènes ainsi qu'aux stress environnementaux (**Beauchamp, 1993**).

Les microorganismes antagonistes colonisent les tissus de la plante et ont été décrits par ailleurs, comme stimulateurs de croissance sur l'hôte, ces souches antagonistes peuvent être facilement appliqués dans les pratiques des pépinières par l'immersion des racines des jeunes plants et boutures dans les inoculas bactériens avant la plantation (**Djellout et al., 2019**). Certaines souches bactériennes ont montré leurs effets protecteurs envers une large gamme de microorganismes phytopathogènes. Deux genres bactériens telluriques et endophytiques, *Bacillus* et *Pseudomonas* comprennent la majorité des bactéries utilisées comme antagonistes. Ils sont connus par leur diversité de mécanismes d'action et de métabolites impliqués dans la protection des végétaux face aux différentes maladies (**Cherif, 2014**).

De plus, les *Bacillus* offrent un avantage par rapport aux autres bactéries, en raison de leur capacité à former des endospores résistantes au changement des conditions du milieu offrant ainsi un avantage pour la formulation du produit (**Maksimov et Khairullin, 2016**). L'objectif de cette étude consiste à mettre en évidence le pouvoir antagoniste in vitro aux genres *Bacillus* initialement isolées du sol vis-à-vis des différentes souches pathogènes présentes dans ce sol, donc quelles sont les techniques utilisées par les *Bacillus* sp. pour contribuer à leur croissance et leur protection contre les phytopathogènes ?

# **Chapitre I : Le sol et les microflores rhizosphériques**

## I. Le sol et les microflores rhizosphériques

### I.1. Définition

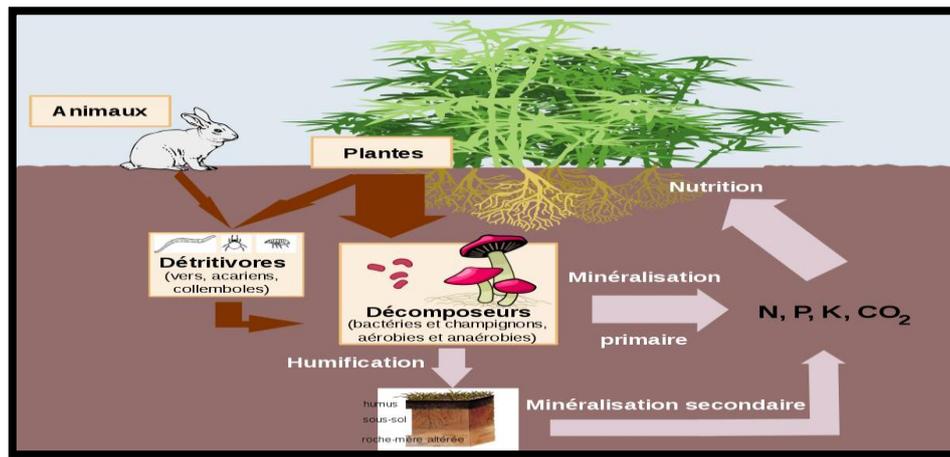
Le sol se situe dans la biosphère à l'interface de la lithosphère et de l'atmosphère. Il est le résultat de la dégradation de la matière organique (d'origine végétale et animale) provenant de la surface et de la matière minérale, dérivant directement de la décomposition de roches mères ou d'autres matériaux inorganiques (Coineau, 1995). Les cinq principaux facteurs impliqués dans la formation du sol sont la roche mère, le climat, la topographie, l'activité biologique et le temps (Atlas et Bartha, 1992). Le sol a de nombreuses fonctions, il est un milieu biologique dans et sur lequel se développent des organismes vivants, Il est le lieu de transferts de flux : eau, air, énergie et vie. Ce développement dépend de la qualité de ce sol ou fertilité (quantité de carbone, d'azote, capacité d'échange ionique, etc.) (Quénéa, 2004).

Le sol contient une multitude de cellules microbiennes actives, plus de 1 milliard souvent par gramme à côté de ses constituants minéraux sable, argile, limon et des résidus organiques morts (Benhacene et al., 2016).

### I.2. Présence microbienne dans le sol

Les microorganismes représentent une biomasse de 1% à 4% de la masse du carbone organique du sol et de 75% à 90% de la biomasse vivante, cette proportion étant souvent plus grande pour les sols prairie que pour les sols cultivés. La biodiversité microbienne des sols est décrite à l'aide de plusieurs méthodes, que ce soient par les méthodes classiques (l'isolement et l'identification), ou par les méthodes récemment développées (l'extraction quantitative de l'ADN) (Benhacene et al., 2016).

L'abondance des microorganismes diminue avec la profondeur, surtout pour les bactéries, et se diffèrent selon leur localisation. Dans le sol, une grande partie des microorganismes se trouve au voisinage des racines, dans la rhizosphère, où les substances nutritives sont abondantes (Benhacene et al., 2016). Les bactéries et les champignons constituent les microorganismes les plus représentés dans les sols où ils sont les principaux responsables de la minéralisation des matières organiques (Figure 1), grâce à la diversité de leurs capacités métaboliques, elles sont capables de décomposer et de minéraliser quasiment toutes les molécules organiques d'origine naturelle et certaines peuvent même dégrader des molécules organiques de synthèse comme les pesticides (Quénéa, 2004).



**Figure 1** : Cycle de la matière organique : minéralisation et humification (Ghitri, 2018).

Ils participent aussi à un processus appelé humification (Figure 1) qui conduit à la formation de l'humus, ces dernières constituent une phase colloïdale stabilisée, d'aspect brunâtre, formé de deux éléments : les produits de la dégradation partielle de la matière organique, essentiellement végétales, et les produits des biosynthèses et de la dégradation des microorganismes (Paul et Clark, 1996). Qui est un composé complexe et majeur du cycle de la matière organique tellurique et de la fertilité du sol. Leur abondance et leur nature dépendent du type de sol, de la végétation, du climat et des diverses actions anthropiques et de leurs variations (Calvet, 2003). Les bactéries représentant plus de 1000 espèces, sont responsables de nombreux processus : libération des éléments nutritifs à partir de la matière organique et des minéraux du sol. Oxydation de l'ammonium en nitrates (nitrification - bactéries nitrosomonas et nitrobacters). Production d'hormones de croissance qui favorisent le développement des racines. Compétition avec les microorganismes pathogènes limitant ainsi les risques de maladie (Anonyme 1).

La profondeur est une variable écologique qui affecte significativement la survie des microorganismes. Dans les zones tempérées, si une grande partie d'entre eux se concentre dans le premier mètre de la couche superficielle, ce sont en fait les premiers centimètres qui en contiennent le plus grand nombre. L'activité microbienne principale des sols se localise dans les couches superficielles riches en matière organiques auxquelles se fixent massivement les microorganismes, dans l'humus et, surtout, dans la rhizosphère formée à la périphérie des racines végétales (Tableau 1) (Noumeur, 2018).

**Tableau 1** : Distribution des microorganismes en fonction du sol (**Alexandre, 1994**).

Profondeur (cm)	Organismes/g de sol $\times 10^3$				
	Bactéries aérobies	Bactéries anaérobies	Actinomycètes	Champignons	Algues
3-8	7800	1950	2080	119	25
20-25	1800	379	245	50	5
35-40	472	98	49	14	0,5
65-75	10	1	5	6	0,1
135-145	1	0,4	-	3	-

### I.3. La rhizosphère

#### I.3.1 Définition

Le concept de rhizosphère a été développé par le microbiologiste visionnaire Hiltner qui perçut dès 1904 (**Khakipour et al., 2008**). « **rhizo** » vient du grec « **rhiza** » signifiant racine, « **sphère** » vient du latin « **sfaire** » signifiant balle, ballon ou globe. La sphère définit le champ d'influence du système racinaire. La rhizosphère est le volume de terre directement soumis à l'action des racines. La richesse de cette zone la rend favorable à la colonisation par des microorganismes dont leur activité, modifie sa composition et son activité chimique (**Benhacene et al., 2016**). Elle correspond aux surfaces d'échanges entre les racines et les minéraux de la terre ainsi qu'entre les racines et les microorganismes, c'est une zone où les relations entre plantes et microorganismes sont particulièrement actifs. Elle constitue une continuité entre le milieu biologique et le milieu physique (**Benhacene et al., 2016**).

#### I.3.2 Rôle de la rhizosphère

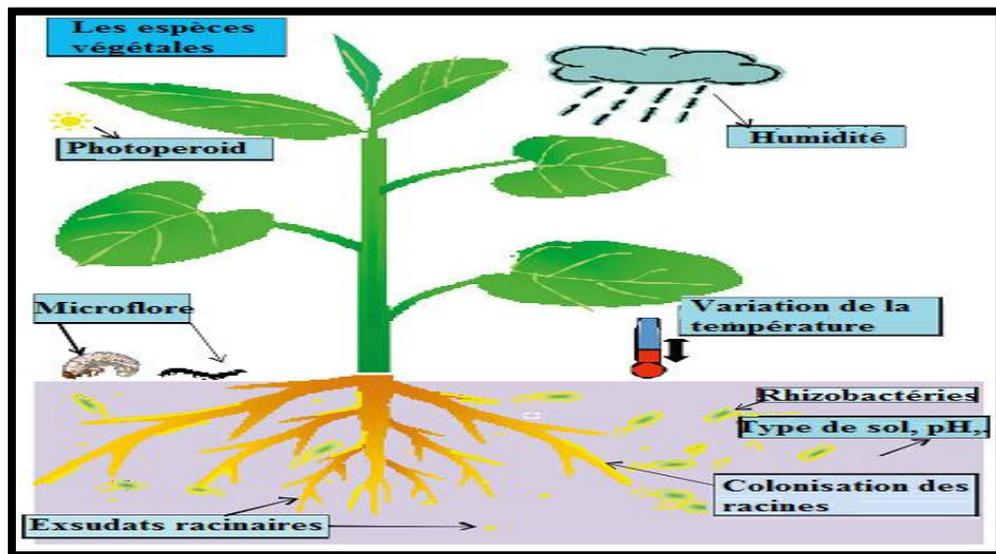
Le rôle de la rhizosphère peut être résumé dans les points suivants :

- La rhizosphère joue un rôle essentiel dans les processus de phytoremédiation (**Maalem et Sansri, 2014**).
- La rhizosphère rendue compte de la stimulation de la croissance et de l'activité des communautés microbiennes autour des racines (**Grayston et al., 1997**).
- Elle contribue à modifier les propriétés des sols : propriétés biologiques, biodiversités et activités microbiennes, fertilité et qualité du sol (**Gobat et al., 2010**).

### I.3.3 Facteurs déterminant la richesse et l'activité de la rhizosphère

D'une façon générale, l'activité microbienne dans la rhizosphère est affectée :

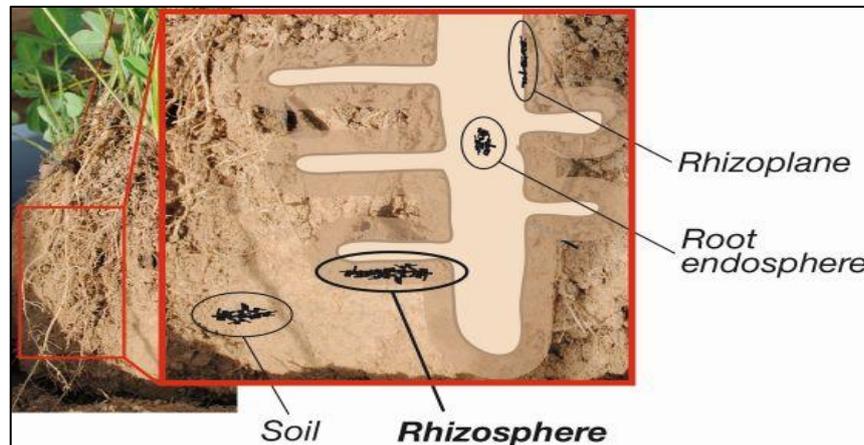
- Par des facteurs de l'environnement climatique, notamment : l'humidité de l'air, température, radiation solaire.
- Par des facteurs de l'environnement édaphique, notamment : Teneur du sol en eau et en oxygène, température du sol, teneur du sol en éléments assimilables par les plantes, présence de composés phytotoxiques.
- Par des échanges de « molécules signal entre les racines des plantes et les microorganismes qui leur sont associés » (champignons, bactéries, cyanobactéries...). Mais quand il y a par exemple une symbiose associative entre les PGPR et une plante, le rôle et l'importance de ces molécules est encore mal connu. Les signaux rhizosphériques influent sur l'expression génique « épigénétique ». Ils sont souvent « phytobénéfiques » en améliorant par exemple l'architecture, la croissance et le fonctionnement du système racinaire (Gobat *et al.*, 2010) (Figure 2).



**Figure 2 :** Facteurs écologiques influençant le processus d'exsudation racinaire (Nihorimbere *et al.*, 2011).

### I.3.4 Les différentes interactions microbiennes dans la rhizosphère

Dans la rhizosphère on distingue trois zones : l'endorhizosphère, le rhizoplan et l'ectorhizosphère (Figure 3). Les microorganismes qui se trouvent dans cette zone, nous appelons les « Rhizobactéries ». Dans cet environnement, il y a des interactions entre les racines des plantes, les microbes, et le sol (**Ghitri, 2018**).



**Figure 3** : Représentation de la rhizosphère (**Anonyme 2**).

Au niveau de la rhizosphère, les microorganismes peuvent être associés à d'autres organismes de multiples façons :

#### I.3.4.1 Commensalisme

Définit une interaction bénéfique pour l'un des partenaires, permet à un partenaire de tirer profit sans dommage pour le second (**Quénéa, 2004**).

#### I.3.4.2 Parasitisme

Est l'attaque directe d'un microorganisme par un autre dans un but nutritionnel où un partenaire vit aux dépens de l'autre en lui occasionnant un dommage. La rhizosphère qui héberge une large variété de populations microbiennes, constitue un milieu favorable pour l'apparition du parasitisme (**Anonyme 3**).

#### I.3.4.3 Symbiose

La symbiose est une association réciproquement bénéfique entre deux organismes, qui souvent s'établit entre un partenaire autotrophe et un partenaire hétérotrophe (**Anonyme 4**). Le fonctionnement de symbiose repose sur l'interaction étroite entre les trois composantes qui sont le sol, les microorganismes du sol et la plante. Le sol détermine les conditions physico-chimiques, dont certaines sont indispensables à l'établissement de la symbiose. Les symbioses fixatrices d'azote les plus connues font intervenir la famille des Légumineuses avec ses symbiontes bactériens, les *Rhizobia*. D'autres bactéries fixatrices

d'azote sont capables d'interagir avec les plantes, comme les actinomycètes. Dans les deux cas, la symbiose avec les bactéries aboutit à la formation d'un nouvel organe au niveau des racines (et/ou tiges), le nodule fixateur d'azote. Dans les nodules, les bactéries, protégées et nourries par la plante, lui fournissent en échange de l'azote fixé (**Gobat et al., 2010**).

#### **I.3.4.4 Antagonisme**

En écologie, le terme d'antagonisme désigne une inhibition ou une action défavorable d'un organisme sur la virulence d'agents phytopathogènes se conservant dans le sol ou bien vis-à-vis d'un autre à l'intérieur d'une population microbienne mixte. L'antagonisme se manifeste généralement soit par une compétition, un hyper parasitisme, une production de sidérophores ou par une antibiose (**Djellout et al., 2019**).

### **I.4 L'effet bénéfique des bactéries du sol et de la rhizosphère**

#### **I.4.1 Généralités**

Un grand nombre de microorganismes vivent dans le sol (Figure 4). On compte les virus, les bactéries, les champignons, les protozoaires et les algues (**Paul et Clark, 1996**). Les bactéries sont les organismes les plus nombreux et représentent en moyenne  $6 \cdot 10^8$  cellules par gramme de sol. La rhizosphère est la zone de sol qui est sous l'influence des exsudats racinaires. Dans cette zone se trouve un groupe particulier de bactéries, les rhizobactéries. Celles-ci sont généralement des souches très compétitives capables de coloniser le système racinaire riche en éléments nutritifs, tout au long du cycle de développement de la plante (**Kloepper, 1993**). Durant les dernières années, l'étude de la biologie de la rhizosphère a mis en évidence un groupe spécial de micro-organismes bénéfiques qui colonisent les racines des plantes, stimulent leur croissance et les protègent contre certains pathogènes. Elles représentent environ 2-5% des bactéries vivant dans la rhizosphère (**Khan et al., 2009**).

Les rhizobactéries stimulatrices de la croissance des plantes (PGPR : Plant growth promoting rhizobacteria) sont les bactéries du sol qui colonisent les racines des plantes et améliorent leur croissance directement ou indirectement ; et à leur tour les racines des plantes sécrètent des métabolites qui peuvent être utilisés comme éléments nutritifs. La stimulation directe peut inclure la fixation de l'azote atmosphérique, synthèse de diverses phytohormones et des enzymes, ainsi que la solubilisation des minéraux du sol. Tandis que la stimulation indirecte qui comprend l'inhibition des phytopathogènes via trois types

d'interactions, la compétition, l'antagonisme et l'induction de la défense de la plante (la résistance systémique induit : IRS) (Ghitri, 2018).

Les PGPR les plus fréquemment identifiées sont des *pseudomonades fluorescentes*, des *Azospirillum*, des *Azotobacter*, des *Klebsiella*, des *Enterobacter*, des *Rhizobium*, des *Serratia* spp. mais comptent aussi des *Bacillus*, et en particulier le genre *Bacillus* qui forme des spores qui lui donne une certaine résistance à la température, et à la concentrations élevées des produits chimiques, impliquant un potentiel PGPR particulier (Kumar et al., 2012).

Le genre *Bacillus* présente des capacités remarquables, peut synthétiser une vaste gamme de substances bénéfiques (Ghitri, 2018). Ce dernier stimule la croissance végétale par différents processus tels que la production d'IAA, la solubilisation du phosphate, fixation de l'azote, et les attributs de la lutte biologique comme la production de sidérophore, enzymes hydrolytiques et les antibiotiques (Kumar et al., 2012).

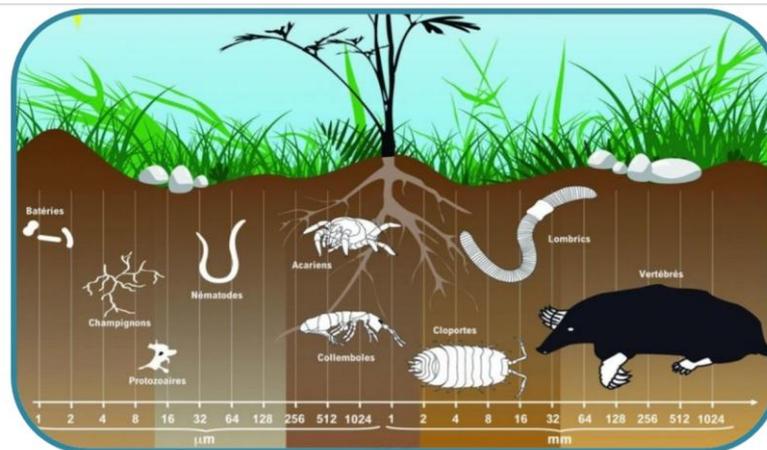


Figure 4 : Présentation schématique des organismes du sol (Benhacene et al., 2016).

## I.5 Les différents groupes des bactéries PGPR

On distingue deux grands groupes de PGPR : les phytostimulatrices et les phytoprotectrices.

### I.5.1 Les PGPR phytostimulatrices

Elles influencent la croissance des plantes en :

- Améliorant la biodisponibilité de certains nutriments par la fixation de l'azote atmosphérique, ou par solubilisation du phosphate.

- Synthétisant des phytohormones comme des auxines, cytokinines, gibbérellines.
- Facilitant la mise en place ou le fonctionnement des symbioses mutualistes entre les racines et les bactéries fixatrices d'azote ou les champignons mycorhiziens.
- Par leur action enzymatique, elles solubilisent les éléments nutritifs présents dans les réserves organiques et minérales du sol tels que : le phosphate, l'azote et le fer (**Curl et Truelove, 1986**).

### I.5.2 Les PGPR phytoprotectrices

Les PGPR se trouvent dans des environnements hautement compétitifs. En conséquence, elles ont développé plusieurs moyens offensifs pour cette compétition intra et interspécifiques, elles favorisent la croissance des plantes en réduisant le niveau de certaines maladies. Pour cela, elles peuvent agir :

- Par interférence avec des signaux, en détruisant les molécules signal des pathogènes.
- En activant la résistance systémique induite de type ISR des plantes, qui augmentera la résistance des plantes à l'attaque des pathogènes.
- Par antagonisme en produisant des antibiotiques délétères pour les pathogènes et des substances antibiotiques, des enzymes bactériolytiques et des toxines de nature protéique communément connues sous le terme de bactériocines. Ces toxines sont capables de tuer les bactéries compétitives étroitement liées sans pour autant affecter la bactérie productrice (**Beneduzi et al., 2008**).
- En contrôlant la croissance des pathogènes par la compétition pour les éléments nutritifs, comme par exemple, la compétition pour le carbone et la compétition pour le fer dont la biodisponibilité dans le sol est très faible, ces bactéries bénéfiques peuvent donc influencer l'acquisition des nutriments et aussi moduler les taux d'hormones et atténuer les impacts négatifs des facteurs biotiques et abiotiques (**Curl et Truelove, 1986**).

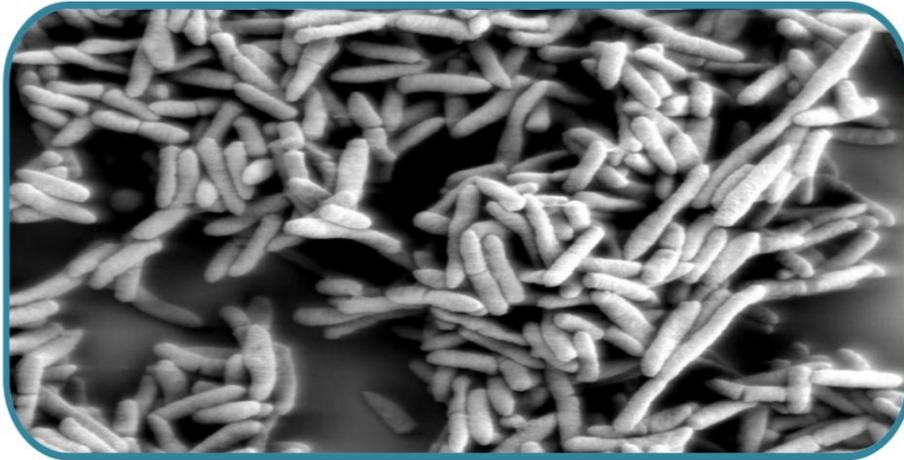
### I.6 Diversités taxonomique des PGPR

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

*Proteobacteries*, *Actinobacteries*, *Bacteroidetes* et *Firmicutes* (Hugenholtz, 2002). Ce dernier représente le point principal de cette mémoire.

### I.6.1 *Firmicutes*

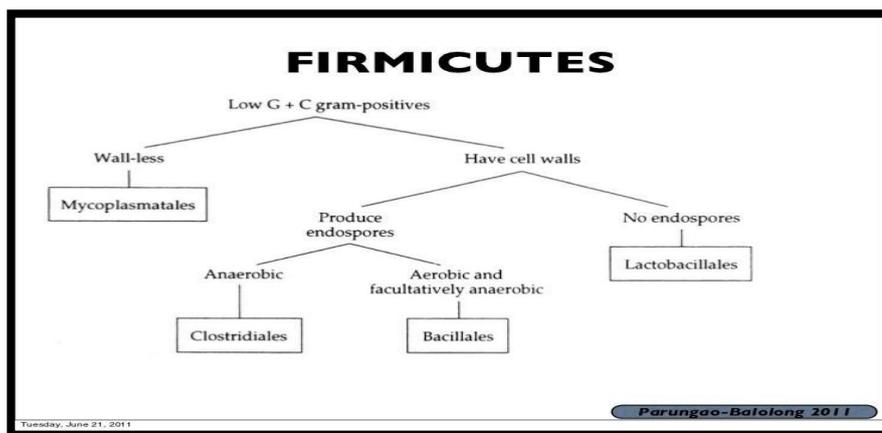
Parmi les bactéries telluriques à Gram positif, les *Bacillus* (Figure 5) sont les types les plus communs et les plus prédominants, ils représentent 95% de la flore isolée.



**Figure 5** : Observation par microscope électronique d'une souche de *Bacillus* (Silini, 2012).

#### I.6.1.1 Le genre *Bacillus*

C'est un genre très diversifié, particulièrement hétérogènes, saprophytes et ubiquitaires. Il existe des espèces acidophiles et d'autres basophiles, mésophiles ou encore thermophiles. Le genre bactérien *Bacillus* pourrait être intéressant à utiliser comme PGPR. Ce genre bactérien appartient à la famille des *Bacillaceae* de l'ordre des *Bacillales* dans l'embranchement des *Firmicutes* (Figure 6).



**Figure 6** : Les *firmicutes* (Anonyme 5).

Les caractéristiques distinctives entre les membres du genre *Bacillus* et les autres bacilles sporulant sont la nature aérobie stricte ou facultative, la forme bacillaire et la production de catalase. Les *Bacillus* sont connues comme producteurs d'antibiotiques avec une activité antagoniste contre les champignons et quelques bactéries pathogènes (Cherif, 2014).

Elles sont potentiellement utiles comme agents de lutte biologique par exemple : La lutte biologique avec *Bacillus thuringiensis* (Figure 7), il est capable de solubiliser le phosphate, produire de l'AIA, sidérophore et des antifongiques (Cherif, 2014).

Ces bactéries sont fréquemment retrouvées au voisinage des racines des plantes ou certaines espèces ont un rôle dans la fixation d'azote. Certaines espèces de ce groupe sont des diazotrophes, notamment *B. subtilis*, isolée à partir des rhizosphères de diverses plantes à des concentrations supérieures à  $10^7$  bactéries par gramme de sol rhizosphérique (Aitbelkacem et Belgrade, 2017).



**Figure 7** : Coupe longitudinale de *Bacillus thuringiensis* en fin de sporulation (Aitbelkacem et Belgrade, 2017).

#### I.6.1.1.1 Habitat

Ce genre regroupe un grand nombre d'espèces très répandues dans la nature. Leur habitat principal est le sol, dans ce dernier, les *Bacillus* représentent une grande fraction de la communauté microbienne partageant leur milieu avec des commensaux

représentant principalement les genres *Pseudomonas* et *Actinomyces* où ils joueraient un rôle dans les cycles du carbone et de l'azote, dans lequel la variété de la flore en *Bacillus* sera en fonction de la richesse en matières organiques (*B. subtilis*, *B. licheniformis*, *B. cereus* pour les sols les plus pauvres) (Anonyme 5).

#### I.6.1.1.2 Classification

Selon la classification de **Bergey (2001)**, la classification de *Bacillus* et comme suit (Tableau 2).

**Tableau 2** : Classification de *Bacillus* sp. (Lechevalier, 1981).

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

On classe les *Bacillus* selon la capacité à former des spores ainsi que sur la morphologie de la spore et en fonction d'autres critères (thermophile, caractère respiratoire et fermentaire etc ....) (**Bergey, 2001**).

#### I.6.1.1.3 Caractéristiques bactériologiques du genre *Bacillus*

Le genre *Bacillus* représente un groupe hétérogène de bactéries en forme de bâtonnets droit ou légèrement recourbé que l'on retrouve seul ou en pair, parfois en chaîne et occasionnellement en long filament, à gram positif avec des extrémités arrondies, à l'exception des membres du *Bacillus cereus* qui possède des extrémités carrées, d'une longueur de 0.9 à 10.0µm, généralement mobiles grâce à une ciliature péritriche (*B. anthracis* et *mycoides* sont immobiles et pour les espèces mobiles, la mobilité est variable selon les souches), parfois capsulés (*B. anthracis*, *licheniformis*, *megaterium* et *subtilis* peuvent élaborer une capsule formée d'un polymère d'acide glutamique), aérobies ou anaérobies facultatives, mais certaines espèces peuvent être anaérobies strictes, le plus souvent catalase positive, donnant une réponse variable au test de l'oxydase (**Bouras, 2018**).

Elles sont capables de former des endospores résistantes à différentes conditions telles que la température, les radiations, les désinfections et la dessiccation... (**Cherif, 2014**). La production d'endospore en condition aérobie représente le caractère définissant les

*Bacillus* depuis 1920, les endospores sont formées de façon intracellulaire à la fin de la phase exponentielle de croissance, et une seule endospore par cellule sera formée et leur position dans la cellule est aussi caractéristique (**Bergey, 2001**).

#### **I.6.1.1.4 Caractéristiques physiologiques du genre *Bacillus***

Les espèces du genre de *Bacillus* possèdent une diversité physiologique, Ils peuvent dégrader la plupart de la matière organique animale ou végétale (cellulose, amidon, protéines, hydrocarbures...) par la production d'enzymes extracellulaires, sont des producteurs d'antibiotiques, des nitrificateurs hétérotrophes, sont capable de dénitrification, de fixation d'azote, des précipitateurs de fer, des oxydants de sélénium, des oxydants et réducteurs de manganèse, possèdent des capacités étonnantes qui leur permettent de survivre dans des habitats extrêmes, elles peuvent être thermophiles, psychrophiles, acidophiles, alcalophiles, halotolérants ou halophiles (**Cherif, 2014**) et sont capables de croître à des valeurs de pH, de température et de concentrations de sel où peu d'autres organismes peuvent survivre. A cause de cette variabilité physiologique, nos connaissances sur l'écologie du *Bacillus* sont très insignifiantes (**Bouras, 2018**).

#### **I.6.1.1.5 Utilisation des PGPR (*Bacillus* sp.)**

La plupart des espèces du genre *Bacillus* sont utilisées avec succès dans le domaine de l'agriculture et l'industrie fine ainsi que dans le domaine médical et pharmaceutique. *Bacillus* est l'un des microorganismes les plus connues et les plus utilisées dans le domaine de la lutte biologique contre plusieurs insectes ravageurs de culture et agents phytopathogènes (**Djellout et al., 2019**).

Certaines souches de *Bacillus* (*B. licheniformis*, *B. halodurans*, *B. subtilis*, *B. amyloliquefaciens* et *B. clausii*) sont utilisées au niveau industriel. Il est estimé que les enzymes produites par *Bacillus* représentent 50 % des enzymes sur le marché, les différentes enzymes (amylase, protéase, glucanase, etc.) produites par les *Bacillus* sont utilisées dans différents procédés industriels. On les retrouve dans les détergents (protéase alcaline), pour la cuisson (amylase) et les boissons (amylase, glucanase), il y a quatre espèces qui possèdent le potentiel d'être utilisées comme insecticide (**Bergey, 2001**).

Parmi celles-ci, l'espèce *Bacillus thuringiensis*, dont la principale caractéristique est de synthétiser, pendant la sporulation, une inclusion cristalline composée de protéines ayant des propriétés insecticides. En agriculture, il permet de lutter contre de nombreux ravageurs de cultures, essentiellement des larves de lépidoptères et de coléoptères. En santé

humaine, il permet de contrôler efficacement les populations de plusieurs diptères vecteurs de maladies, les autres espèces pouvant servir comme insecticide sont *B. sphaericus*, *B. popilliae* (Sanchis et al., 1995).

## **Chapitre II : Rôle de *Bacillus* sp. dans l'antagonisme et dans la croissance des plantes**

## II. Rôle de *Bacillus* sp. dans l'antagonisme et dans la croissance des plantes

### II.1. Les modes d'actions de *Bacillus* sp.

Les effets bénéfiques des rhizobactéries sur la croissance végétale résultent de différents mécanismes exercés par les PGPR dont les modes d'action sont directs ou indirects. Bien que la différence entre les deux ne soit pas toujours évidente. Les mécanismes directs sont ceux agissant à l'intérieur des plantes et affectent directement leur métabolisme tandis que les mécanismes indirects, en général, sont ceux qui se produisent en dehors des plantes. Sur la base de leur activités (Somers *et al.*, 2004). Sont classés les PGPR comme biofertilisants (augmentant la disponibilité des éléments nutritifs aux plantes), phytostimulateurs (améliorant la croissance des plantes, habituellement par la production de phytohormones), rhizoremédiateurs (dégradants les polluants organiques) et biopesticides (lutte contre les maladies, principalement par la production de métabolites antibiotiques et antifongiques) (Figure 8).

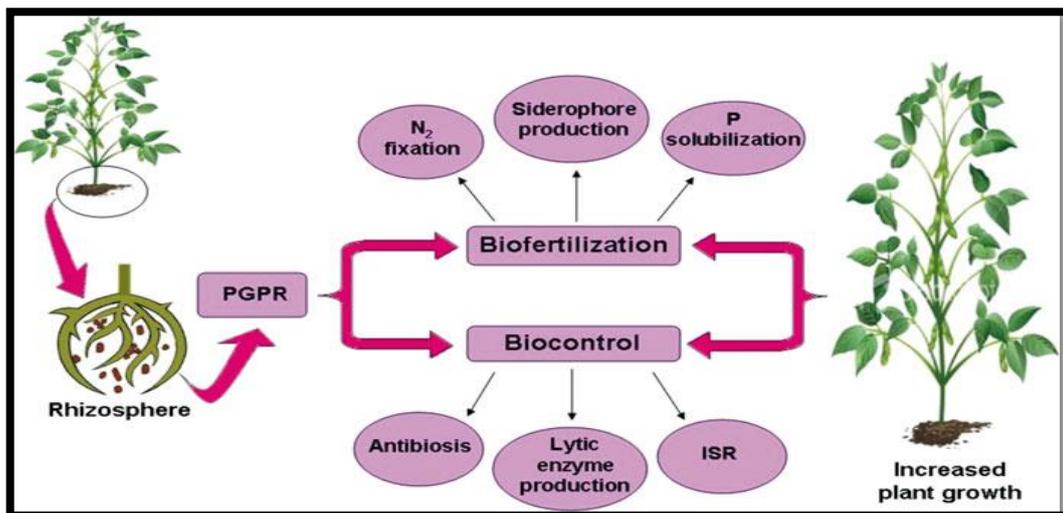


Figure 8 : Promotion de la croissance des plantes par les PGPR (Khan *et al.*, 2009).

#### II.1.1. Mode d'action direct (l'effet phytostimulateur)

Certaines PGPR stimulent la croissance des plantes en l'absence de pathogènes. Ces effets directs regroupent les accroissements de la masse aérienne et racinaire, les elongations racinaires, et les levées accélérées des plantules. Ces augmentations s'expliquent généralement par :

## *Chapitre II Rôle de Bacillus sp. dans l'antagonisme et dans la croissance des plantes*

---

- De meilleurs prélèvements et assimilation des éléments nutritifs par la plante, la production de phytohormones et le développement de résistance induite chez les plantes.
- Une meilleure nutrition azotée est assurée par *Bacillus*-céréales.
- Diverses bactéries ont la capacité de solubiliser le phosphore organique par l'action de phosphatase, ou le phosphore inorganique par la libération d'acides organiques (**Kloepper et al., 1993**).

### **II.1.1.1 Fixation de l'azote**

L'azote est un élément chimique très disponible dans la nature et indispensable pour le fonctionnement des organismes. L'atmosphère est constituée d'environ 80% de gaz N<sub>2</sub>. Mais la plupart des végétaux ne peuvent l'utiliser sous cette forme inerte. Les plantes absorbent seulement les formes ioniques solubles dans l'eau qui se trouvent sous les formes nitriques ou nitrates (NO<sub>3</sub><sup>-</sup>) et ammoniacales ou ammonium (NH<sub>4</sub><sup>+</sup>), au niveau des racines (**Anonyme 7**). Les rhizobactéries fixatrice de l'azote sont importantes pour une bonne fertilisation du sol et un système agricole durable (**MacMillan, 2001**). Les microorganismes à associations symbiotiques produisent 80% de l'azote et le reste provient des systèmes libres ou associés, la fixation de l'azote non symbiotique a une grande importance agronomique, dont certains espèces de *Bacillus* peuvent fixer l'azote y compris *B.coagulans*, *B.polymyxa*, *B.azototoxifiant* et *B.macerans*, représentent jusqu' à 18.8% du nombre totale de bactéries sporogènes dans le sol (**Saxena et Tilak, 1998**).

### **II.1.1.2 Solubilisation de phosphate**

Le phosphore est le deuxième élément nutritif le plus important pour les plantes, après l'azote, et il représente environ 0,2% du poids sec d'une plante. Le phosphate existe dans le sol sous forme de sels minéraux ou incorporé dans des composés organiques (Figure 9). Bien que ces composés du phosphore soient abondants dans les sols agricoles, la majorité d'entre eux se présente sous une forme insoluble (**Cherif, 2014**).

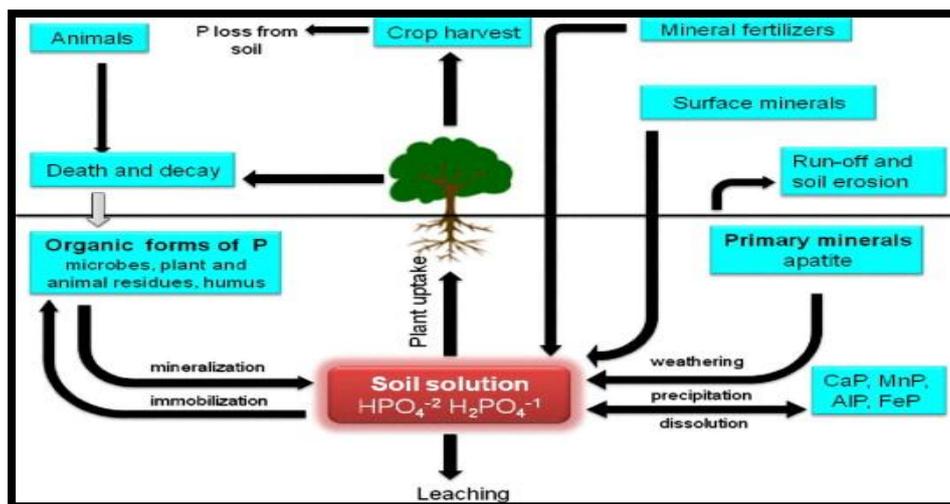


Figure 9 : Mouvement de phosphate dans le sol (Cherif, 2014).

Les espèces de *Bacillus* solubilisatrices du phosphate jouent un rôle pour la nutrition des plantes puisqu'elles ont la capacité à convertir phosphate insoluble au phosphate soluble en produisant des acides organiques, la chélation et l'échange d'ions ce qui augmente la fertilité du sol. De plus, les sols contiennent des acides organiques de bas poids moléculaire avec un ou plusieurs groupes carboxyliques et certains acides. Le rôle des acides organiques dans la solubilisation du phosphate dépend fortement du sol (Maksimov et Khairullin, 2016).

Les bactéries rhizosphériques solubilisant le phosphate (**PSB**) pourraient donc constituer une source prometteuse comme agent biofertilisants dans l'agriculture. La solubilisation de phosphates est le résultat de l'acidification, de la chélation, des réactions d'échange d'ions et de production d'acides organiques de faible poids moléculaire. Le principal mécanisme de solubilisation des phosphates est la production d'acides organiques.

Les acides gluconiques et 2-cétogluconique sont les plus fréquemment rencontrés. La libération de ces acides mobilisant le phosphore par l'intermédiaire d'interactions ioniques avec les cations du sel, de phosphate conduit à l'acidification des cellules microbiennes et de leur environnement et par conséquent la libération du phosphate sous forme ionique. La libération des groupements phosphates liés à la matière organique est assurée par l'action des phosphatases (Kumar et al., 2012). Parmi les communautés bactériennes du sol, les espèces de *Bacillus*, *Enterobacter*, *Erwinia* et *Pseudomonas* spp. dont *B. megaterium*, *B. polymyxa*, *B. circulans*, *B. coagulans*, *B. subtilis* et *B. sircalmous* sont les plus performantes dans la solubilisation des phosphates (Cherif, 2014).

### II.1.1.3 Production de phytohormone

Les hormones végétales sont des messagers chimiques qui affectent la capacité de la plante à réagir à son environnement. Sans compter qu'elles jouent un rôle important dans la réponse de la plante aux stress biotiques et abiotiques. De nombreux travaux indiquent que l'utilisation des hormones en tant que molécule-signal ne sont pas destinées seulement aux plantes mais participent également à la communication entre les bactéries et d'autres microorganismes ou ISR. Il existe cinq principaux groupes d'hormones : les auxines, les gibbérellines, l'éthylène, les cytokinines et l'acide abscissique (Ghitri, 2018).

#### II.1.1.3.1 Acide indole acétique (AIA)

L'AIA est le plus important du groupe des auxines et quantitativement le plus produit par les PGPR. Il fonctionne comme une molécule signal importante dans la régulation du développement des plantes, agissant sur l'organogenèse, les réponses trophiques, les réponses cellulaires telles que l'expansion des cellules, la division, la différenciation et la régulation des gènes (Ryu et Patten, 2008).

L'AIA et ses analogues actifs dans la plupart des plantes sont synthétisés à partir du tryptophane principal précurseur. Les exsudats des racines sont la source principale du tryptophane dans le sol, le groupe *B. cereus* est capable de produire des quantités physiologiquement actives d'auxines (AIA), le rôle de l'AIA dans la stimulation de la croissance est obtenu en imitant l'effet de la bactérie par l'application directe de l'AIA sur les racines. Il favorise la survie des bactéries dans la rhizosphère (Figure 10) (Spaenpen et al., 2007).

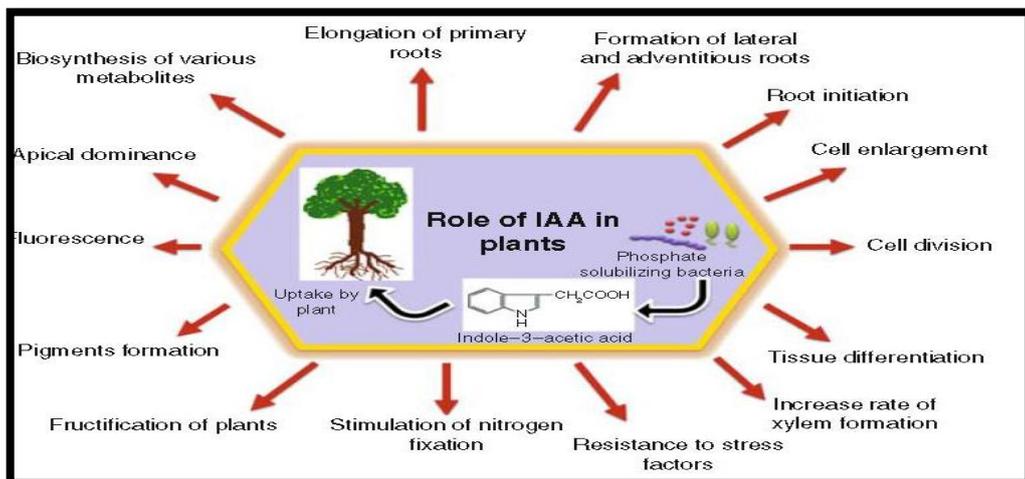


Figure 10 : Rôle de l'acide indole acétique dans l'amélioration de la croissance végétale (Khan et al., 2009).

## Chapitre II Rôle de *Bacillus sp.* dans l'antagonisme et dans la croissance des plantes

### II.1.1.3.2 Les gibbérellines

- Les gibbérellines sont synthétisées par les plantes supérieures, les champignons et les bactéries ; ce sont des acides diterpénoïques constitués de résidus isopréniques. Un nombre important (136) de gibbérellines différentes sont identifiées et caractérisées (**MacMillan, 2001**). Elles affectent la division et l'allongement cellulaires et sont impliquées dans plusieurs processus de développement tels que la germination des graines, la floraison, la fructification et le retard de la sénescence dans de nombreux organes d'une large gamme d'espèces végétales (**MacMillan, 2001**). Les gibbérellines sont également impliquées dans la promotion de la croissance de la racine car elles régulent l'abondance des poils racinaires, la capacité des bactéries à synthétiser des substances de gibbérellines a été initialement décrite chez *Azospirillum brasilense* (**Tien et al., 1997**) et *Rhizobium* (**Williams et Sicardi, 1982**) puis chez différents genres bactériens qui peuplent le système racinaire de la plante, y compris *Azotobacter*, *Arthrobacter*, *Azospirillum*, *Pseudomonas*, *Bacillus*, *Acinetobacter*, *Flavobacterium*, *Micrococcus*, *Agrobacterium*, *Clostridium*, *Burkholderia*, et *Xanthomonas* (**Mitter et al., 2002**). La promotion de la croissance des plantes par les PGPR productrices de gibbérellines est rapportée par plusieurs travaux et cet effet positif sur la biomasse végétale est souvent associé à une teneur accrue en gibbérellines dans les tissus végétaux, certaines souches de bactéries *Bacillus* sont capables de synthétiser cette hormone, comme *B. cereus*, *B. subtilis* et *B. licheniformis* (**Benhacene et al., 2016**).

### II.1.1.3.3 Les cytokinines

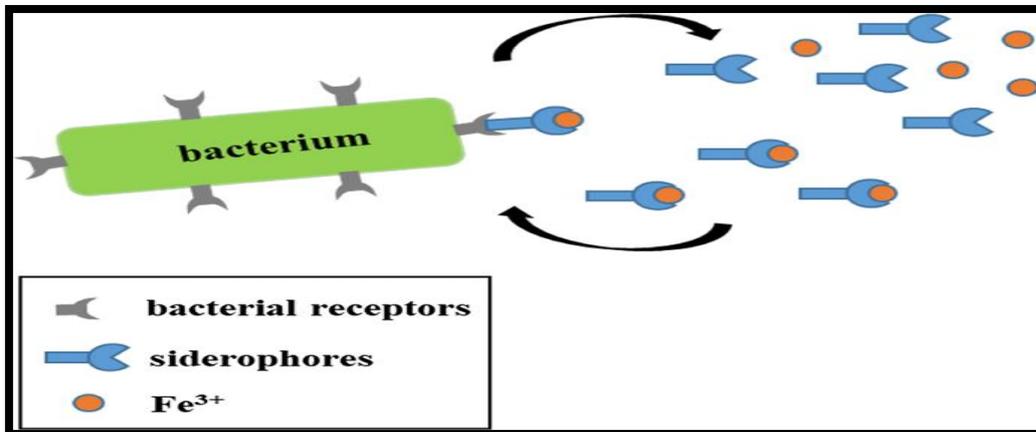
Les cytokinines sont des aminopurines N6-substituées qui jouent un rôle-clé dans un grand nombre de processus physiologiques tels que la division cellulaire des plantes, l'interruption de la quiescence des bourgeons dormants, l'activation de la germination des graines, la promotion de la ramification, la croissance des racines, l'accumulation de la chlorophylle, l'expansion des feuilles et le retard de la sénescence (**Salisbury et Ross, 1992**). Certaines souches de *Bacillus* spp. sont capables de synthétiser des cytokinines par exemple la souche *Bacillus Subtilis* IB-22 (**Ghitri et al., 2018**).

### II.1.1.4 La production de sidérophores

Le fer est l'un des micronutriments les plus importants pour la croissance microbienne dans divers environnements. Bien que le fer soit présent sur terre en grande quantité, il est insoluble. Les bactéries capables de synthétiser des sidérophores sont : *Bacillus*, *Pseudomonas* et *Azotobacter* (**Benhacene et al., 2016**). On retrouve comme

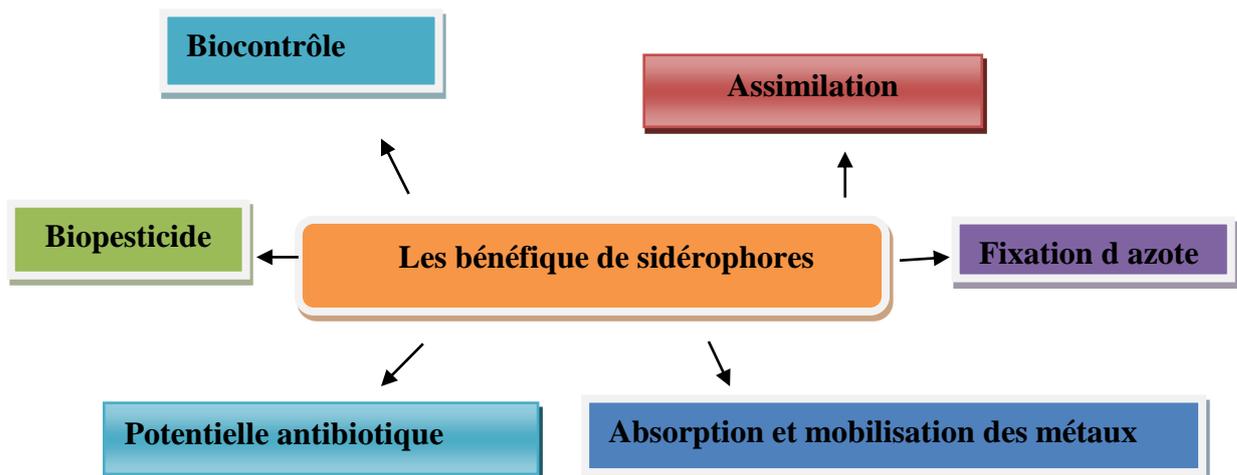
## Chapitre II Rôle de *Bacillus* sp. dans l'antagonisme et dans la croissance des plantes

sidérophore chez *Bacillus* la bacilibactine, l'anthrobactine, l'acide itoïque, le citrate, la pétrobactine et la schizokinene pour n'en nommer que quelques-uns, Il y a plus de 500 sortes de sidérophores connues à ce jour. Il est possible pour les bactéries d'utiliser des sidérophores exogènes pour combler leur besoin en fer (Figure 11).



**Figure 11** : Production de sidérophores et assimilation de fer (Cherif, 2014).

La synthèse des sidérophores dans les bactéries, par le faible niveau de Fe<sup>3+</sup> et par la diminution de l'acidité des sols. Bien que les sidérophores soient principalement spécifiques du fer, ils peuvent aussi complexer d'autres métaux lourds toxiques tel que Al, Cd, Pb et Zn, ainsi qu'avec des radionucléides, en augmentant leur solubilité. En outre, ils contribuent à la production des biopesticides et des agents de biocontrôle et favorisent la solubilisation des phosphates. Enfin, ils ont d'autres fonctions biologiques telles que l'amélioration de la fixation d'azote et l'augmentation de la nodulation (Figure 12) (Benhacene et al., 2016).



**Figure 12** : Les fonctions biologiques des sidérophores (Boulanger, 2009).

#### **II.1.1.5 Protection contre le stress salin**

Le stress salin est l'un des graves problèmes environnementaux qui causent le stress osmotique, est un véritable stress abiotique qui limite la croissance et la productivité des plantes (**Kumar et al., 2012**). La salinité du sol diminue l'activité photosynthétique et la croissance des plantes à cause d'un déséquilibre nutritionnel.

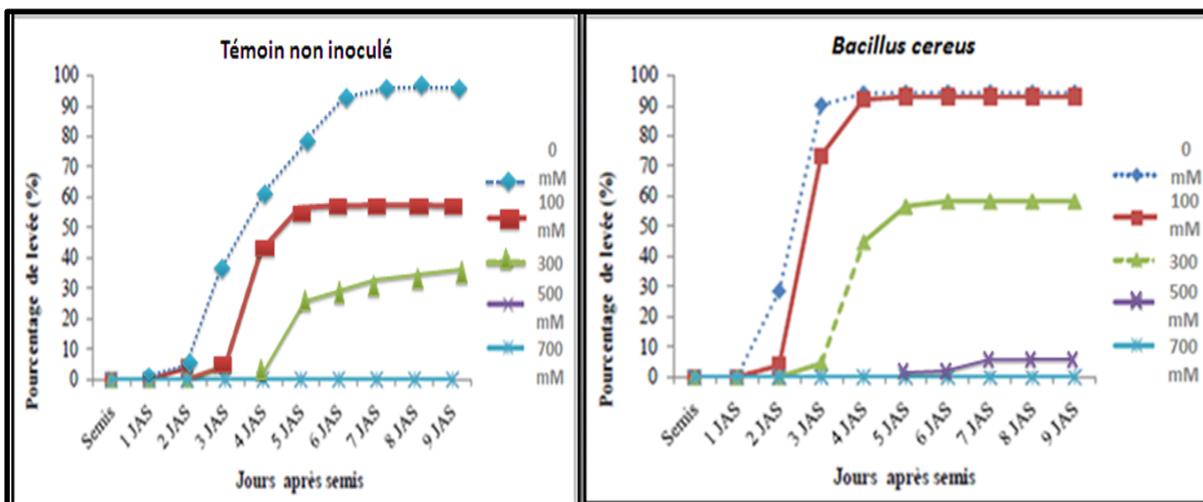
Les rhizobactéries favorisant la croissance des plantes comme *Bacillus* sp. peuvent induire la tolérance à la salinité par la production de diverses hormones et par l'amélioration de la disponibilité des nutriments à partir de la matrice du sol cela traduit par la régulation de différents paramètres altérés par le stress salin comme par exemple :

- ❖ La diminution de la concentration en chlorophylle (**Abdel-Ghaffar et al., 1981**).
- ❖ L'augmentation de la synthèse des prolines qui consomment une grande quantité d'azote (**De la Rosa-Ibrira et Maiti, 1995**).
- ❖ Modification de la pression osmotique diminue la croissance des glycophytes (**Greenway et Munns, 1980**).

L'exemple ci-dessous (Figure 13) montre évidemment le rôle essentiel de PGPR (*Bacillus*) dans la résistance des plantes dans les sols salins.

- A 100 mM : une différence significative (de l'ordre de 40%) de la levée a été enregistrée chez les plantes traitées par *B. cereus*, par rapport aux plantes témoins.
- A 300 mM : un pourcentage de levée de l'ordre de 58%, par rapport aux plantes témoins.
- A 500 mM : un pourcentage de levée de l'ordre de 9%, par rapport aux plantes témoin qui ont été totalement inhibées.
- $\geq 700$  mM la levée des plantes traitées par *B. cereus* était complètement inhibée.

L'inoculation des plantes par *B. cereus* en milieu salin influence positivement les paramètres morphologiques et les paramètres de croissance de la plante en comparaison avec le témoin non inoculé (**Moustain et al., 2019**).



**Figure 13 :** Effet de diverses concentrations salines (en mM de NaCl) sur le pourcentage de levée des plantes traitées par *Bacillus cereus* en fonction des jours après semis (Moustain et al., 2019).

#### II.1.1.6 Compétition pour l'espace et les nutriments

La compétition pour l'espace et les nutriments est un mécanisme biologique utilisé par les PGPR pour éliminer les phytopathogènes. Une réduction de la maladie peut être associée à une colonisation importante des racines par les bactéries bénéfiques, ce qui réduit le nombre de sites habitables pour les micro-organismes pathogènes et, par conséquent, leur croissance (Dommergues et Mangenet, 1970). Donc la vitesse de croissance a un rôle majeur, il y a aussi autres propriétés renforçant le potentiel colonisateur d'une souche tel que la mobilité (présence d'un flagelle), le chimiotactisme et la faculté d'utilisation des composés excrétés par les racines en tant que sources de carbone et d'azote (Berggren et al., 2001).

#### II.1.2 Mécanismes indirectes (antagonisme)

Certaines PGPR produisent des effets bénéfiques sur la croissance des plantes en présence d'un pathogène ou d'un *rhizobia*. Ces modes d'action indirects sont généralement attribuables à la compétition, à la production d'antibiotiques et à la détoxification du milieu ; chez les légumineuses, les PGPR mènent à l'accroissement du nombre de nodosités produites par les *rhizobia* (Charif, 2014).

Les PGPR autochtones du sol et la rhizosphère jouent un rôle majeur dans la lutte biologique contre les agents pathogènes des plantes. Elles peuvent supprimer un large spectre de maladies bactériennes, fongiques et parasitaires. Les PGPR peuvent aussi

## Chapitre II Rôle de *Bacillus* sp. dans l'antagonisme et dans la croissance des plantes

procurer une protection contre les maladies virales. De nombreux travaux présentent la diversité des agents microbiens impliqués dans la lutte biologique (**Siddiqui, 2005**).

### II.1.2.1 Antibiose

L'antibiose est définie comme l'inhibition d'un organisme par le produit métabolique d'un autre organisme, il est probablement le mécanisme le plus connu et peut-être le plus important utilisé par les PGPR pour limiter l'invasion des pathogènes dans les tissus de la plante hôte (**Whipps, 2001**). Ces mécanismes se traduisent essentiellement par deux activités antibactérienne et antifongique (**Benhamou et Picard, 1999**).

#### II.1.2.1.1 Activité antifongique et/ ou antibactérienne

De nombreux *Bacillus* spp. comme *B. licheniformis*, *B. amyloliquefaciens*, *B. subtilis*, *B. cereus*, *B. megaterium* et *Bacillus mycoides* sont connus comme très producteurs efficaces de molécules antibiotiques (Tableau 3), ceux-ci incluent la bacillomycine, la mycobacilline, la fongistatine, iturine, phengicine, plipastatine, surfactine et bacilizine (**Whipps, 2001**).

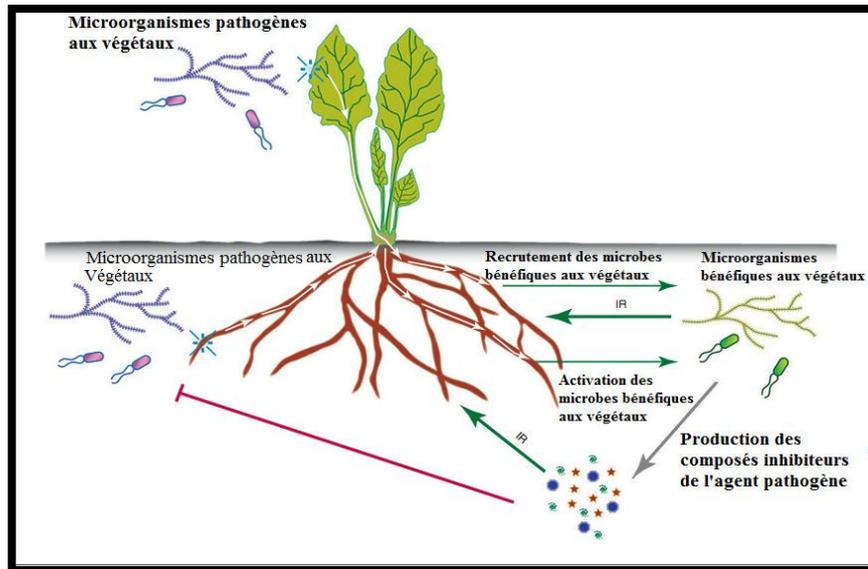
**Tableau 3 :** Activité antibiotique de certaines souches *Bacillus* (**Maksimov et Khairullin, 2016**).

Espece ou souche de <i>bacillus</i>		ATB ou Antifongique	La maladie ou le pathogène sensible
<i>Bacillus</i> sp.		polymyxine, circuline, colistine....etc.	-bacteries pathogenes ; G(+) G(-) -champignons pathogènes ; <i>Alternariasolani</i> , <i>Aspergillus flavus</i> , ...etc.
<i>B. Subtilis</i>	<i>CPA-8</i>	Fengycine	- la pourriture brune du pêcher.
	<i>ATCC 6633</i>	La rhizotocine	-antifongique et nématocides.
<i>B.brevis</i> et <i>B. polymyxa</i> .		GramicidineS et polymyxine B.	-Inhibent les spores de <i>B. cinerea</i> Et activent contre Moisissure grise ( <i>botrytis</i> ) de fraise.

#### II.1.2.2 Résistance systémique induite (ISR)

Lors du phénomène appelé « résistance systémique induite » (ISR), des rhizobactéries non pathogènes notamment certaines espèces de *Bacillus* peuvent conférer à la plante un certain degré de protection à des attaques ultérieures par un phytopathogène via la stimulation de mécanismes de défense systémique (Figure 14, 15).

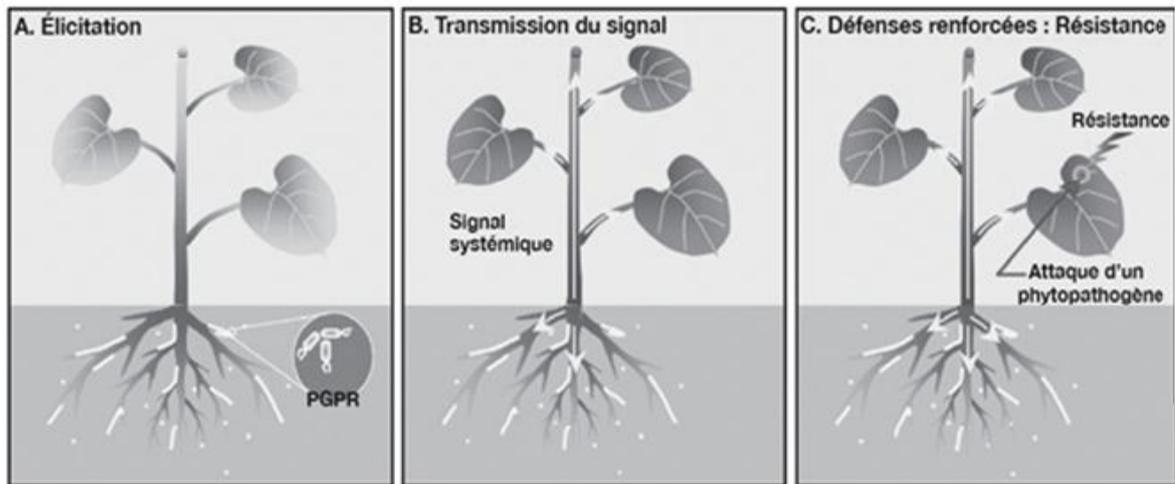
Cette « immunité » s'initie suite à la perception par la plante de molécules dites « élicitrices » produites par le microorganisme bénéficiaire. Parmi les microorganismes non pathogènes capables d'induire l'ISR, les espèces du genre *Bacillus* comme *B. pumilus*, *mycooides*, *subtilis*, *amyloliquefaciens*, *pasteurii*, *thuringiensis* ou *cereus* (Kloepper, 1993).



**Figure 14 :** Model montre l'activation de la résistance induite (RI) par les microorganismes bénéfiques (Berendsen et al., 2012).

L'expression phénotypique du phénomène de l'ISR peut être divisée en trois étapes principales (Kloepper, 1993).

- La perception par la plante des molécules bactériennes responsables de l'élicitation du phénomène.
- La transmission du signal nécessaire à la systémisation du phénomène dans la plante.
- L'expression du ou des mécanisme(s) de défense sensu stricto induits permettant de limiter voire inhiber la pénétration du pathogène dans les tissus de l'hôte végétal.



**Figure 15 :** La résistance systémique induite chez les plantes par des rhizobactéries. **A :** l'élicitation : les rhizobactéries ou PGPR (Plant Growth Promoting Rhizobacteria) interagissent avec les racines de l'hôte et produisent des éliciteurs qui sont perçus par la plante. **B :** après la reconnaissance des déterminants, un signal est véhiculé dans l'ensemble de la plante afin de l'alerter. **C :** enfin, lors d'une éventuelle attaque par un agent phytopathogène, la plante sera en mesure de répondre plus efficacement à l'agression, lui conférant ainsi une résistance (Jourdan et al., 2008).

## **Chapitre III : Méthodes d'études les *Bacillus* potentiellement PGPR**

### III. Méthodes d'études les *Bacillus* potentiellement PGPR

#### III. 1. Echantillonnage

Le sol rhizosphérique est collecté à environ 3 cm des racines principales et le sol de la rhizosphère adjacent aux racines est délicatement arraché. Le sol adjacent aux racines et le sol rhizosphérique ont été mélangés ensemble. Tous les échantillons sont placés dans des sacs en plastique stériles et transférés au laboratoire et conservés à 4 ° C avant traitement (figure 16) (Fan *et al.*, 2016).



Figure 16 : Méthode d'échantillonnage (personnel, Rabta 2020).

#### III.2. Isolement du genre *Bacillus*

L'isolement du genre *Bacillus* à partir des échantillons de sol rhizosphérique prélevés se fait en utilisant la méthode de dilutions et ensemencement sur le milieu de culture PCA. Un gramme d'échantillon de sol sont suspendu dans 9 ml d'eau physiologique (solution mère), les échantillons sont laissés dans un bain-marie à 80°C pendant 10 minutes, pour l'élimination de toute forme végétative (Choc thermique). Ensuite des dilutions appropriées sont faites par dilution décimale ( $10^{-1}$ ,  $10^{-2}$ ,  $10^{-3}$  .....  $10^{-7}$ ). 100  $\mu$ L sont utilisés pour ensemencer des géloses de PCA. Après incubation pendant 24 heures à 30°C, les colonies obtenues sont ensuite purifiées et conservées (Bouras, 2018).

### III.3. Conservation des isolats

Les colonies pures, isolées, doivent être conservées dans des tubes à essai inclinés de Gélose nutritif (GN), ensemencées sur la pente des tubes par la méthode des stries, incubées à une température de 30°C pendant 24 à 48 heures. Une conservation des tubes qui manifestent une croissance bactérienne à une température de 4°C, pour un intervalle de temps de 4-6 semaines. Concernant la conservation à longue durée, les souches isolées sont conservées dans un bouillon nutritif glycérolé à une concentration de 20 %, à une température de -20°C (environ 1 an) (Bouras, 2018).

### III.4. Identifications du genre *Bacillus*

Une identification morphologiquement et physiologiquement des colonies purifiées obtenues. Les critères recherchés et jugés suffisants selon Bouali et al (2016) sont vérifiés pour affirmer l'appartenance au genre *Bacillus* comme ; l'aspect macroscopique des colonies sur la gélose, la réaction positive à la coloration de Gram, la mobilité, la réaction positive de la catalase, et la présence des spores à l'intérieure des cellules bactériennes (Ghitri, 2018).

### III.5. Etude du pouvoir PGP *in vitro*

Les propriétés stimulatrices de la croissance comprennent la production d'enzymes extracellulaires (protéases et amylase), la production d'hormone de croissance (acide indole acétique), la solubilisation du phosphate, l'activité antagoniste et le pouvoir de colonisation du système racinaire par l'évaluation de la formation de biofilm (Cherif, 2014).

#### III.5.1. La production des enzymes

##### III.5.1.1. L'activité protéolytique

Les enzymes protéolytiques sont des hydrolases formées d'une ou plusieurs chaînes polypeptidiques. Les protéases catalysent le clivage des liaisons peptidiques de toute molécule protéique. L'activité protéolytique doit être réalisée sur gélose nutritive contenant 5% de lait écrémé. Après 48 heures d'incubation à 30°C, la présence de cette activité est détectée par un halo clair autour de la strie indiquant l'hydrolyse de la caséine, par contre un résultat négatif ne montre aucune zone d'hydrolyse autour de la culture (Ghitri, 2018).

##### III.5.1.2 L'activité amylolytique

Le test qui indique l'activité amylolytique doit être réalisé sur gélose à base d'amidon. Après incubation à 30°C pendant 48 à 72h, une solution de lugol est dispersée sur toute la surface du milieu. Après quelques minutes de contact, l'excès de lugol est éliminé et les boîtes

lavées à l'eau distillée. La présence de l'amidon dans le milieu donnera une couleur bleue noirâtre, ceci implique une absence d'activité amylasique. En revanche, si l'amidon est hydrolysé, une zone claire apparaîtrait autour des colonies. Ce qui traduit une présence d'activité amylasique chez les isolats (**Benhacene et al., 2016**).

### **III.5.2 La production de l'acide indole acétique**

La production de l'acide indole acétique est mise en évidence sur milieu TSB additionné de 1g/l du tryptophane comme seule source de carbone, selon la technique de (**Etesami et al., 2015**). L'inoculation du milieu par 100 µl d'une culture bactérienne de 24h et incubé pendant 72h à 30°C. Après incubation, une centrifugation de culture à 5000 rpm/ 20 min. Un volume de 1ml de surnageant mélangé à 1ml du réactif de Salkowski (50 ml, 35% de l'acide sulfurique H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, 1 ml de la solution du chlorure ferrique 0.5 M FeCl<sub>3</sub>). La présence de l'acide indole acétique est indiquée par l'apparition de la couleur rose (**Goswami et al., 2014**).

### **III.5.3 La solubilisation du phosphate**

La capacité de solubilisation des phosphates selon la technique décrite par (**Beneduzi et al., 2008**) sur milieu glucose TGEA (tryptone glucose extractagare). Les deux autres solutions préparées séparément ; il fait dissoudre d'abord 5 g de K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> dans 50 ml d'eau distillée et ensuite 10 g de CaCl<sub>2</sub> dans 100 ml d'eau distillée. Ces deux solutions ajoutées à 1 L de TGEA. Un volume de 10µl de chaque culture bactérienne de 24h est déposé à la surface du milieu puis incubé à 30°C pendant 5 à 7 jours. La solubilisation des phosphates se traduit par un halo clair autour de la colonie (**Bouali et al., 2016**).

### **III.5.4 La production de sidérophores sur milieu liquide et solide**

La production de sidérophores peut être testée en milieu Chrome Azurol S (CAS) sous ses formes solide et liquide (**Shwyn et Neilands, 1987**).

#### **III.5.4.1 Production de sidérophores sur milieu liquide**

Le milieu King B liquide, étant donné sa composition exempte de fer, est préconisé pour mettre en évidence la production de sidérophores. L'ensemencement du milieu par 100 µl des cultures et incubé à 30°C / 3 jours. Ensuite les cultures sont centrifugées à 5000 rpm /20min puis 500 µl du surnageant sont mélangés à 500 µl de la solution CAS incubé

30 min à l'obscurité. La couleur virera du bleu à l'orange selon le taux de production des sidérophores. La DO est mesurée par spectrophotométrie à 630 nm.

Le pourcentage des sidérophores est calculé selon la formule suivante (**Pal et Gokarn, 2010**) :

$$\text{St-Se/St} \times 100$$

St : DO de la solution CAS de couleur bleue intense (témoin).

Se : DO de la solution de l'échantillon de couleur moins bleue à orange selon l'intensité de production.

### III.5.4.2 Production de sidérophores sur milieu solide

La culture sur milieu gélosé contenant du chrome azurol S (CAS) permet de détecter la sécrétion de sidérophores par les microorganismes (**Schwyn et Neilands, 1987**). Le principe est que le milieu de culture possède initialement une couleur bleue due au complexe fer-CAShexadécyltriméthylammonium (complexe Fer/CAS/HDTMA) qui vire au rouge-orangé suite au déplacement du fer par le sidérophore produit par le microorganisme (**Bertrand, 2009**).

Le milieu préconisé pour la production des sidérophores sur milieu solide est le milieu King B, qui estensemencé par un spot de 2 µl de la culture bactérienne et incubé à 30°C/48 h. Après croissance, 15 ml de la gélose au CAS à 45°C (solution CAS + 0.9% agarose) coulés sur la culture bactérienne. Après contact de quelques heures, un changement de couleur du bleu à l'orange apparaît autour de la colonie productrice des sidérophores (Figure 17). Le changement de couleur est dû au transfert des ions ferriques du CAS vers les sidérophores. Le calcul du rapport  $\frac{\text{diamètre de halo}}{\text{diamètre de la colonie fongique ou bactérienne}}$  permet de comparer les différences de production entre les souches fongiques ou entre les souches bactériennes



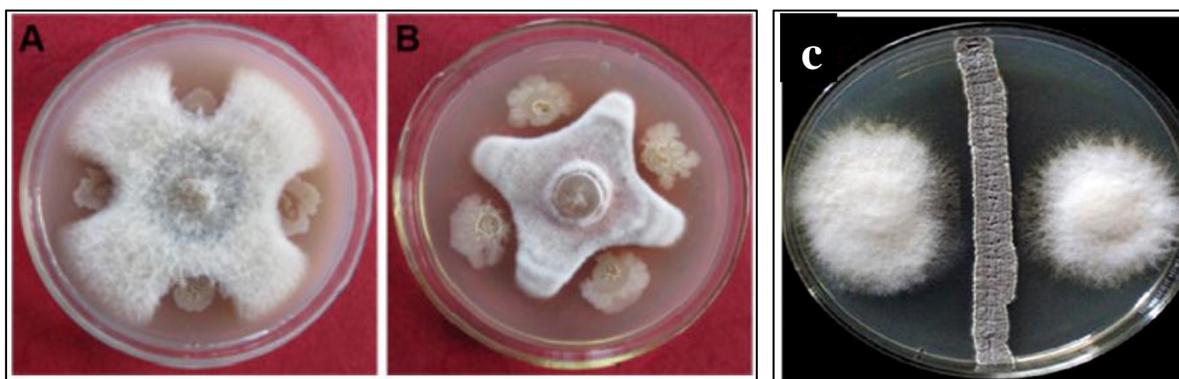
**Figure 17** : Détection des sidérophores sécrétés par un micro-organisme cultivé sur milieu gélosé CAS (**Bertrand, 2009**).

### III.6 Activité antagoniste (Activité antifongique et/ou activité antibactérienne)

#### III.6.1 Méthode double culture

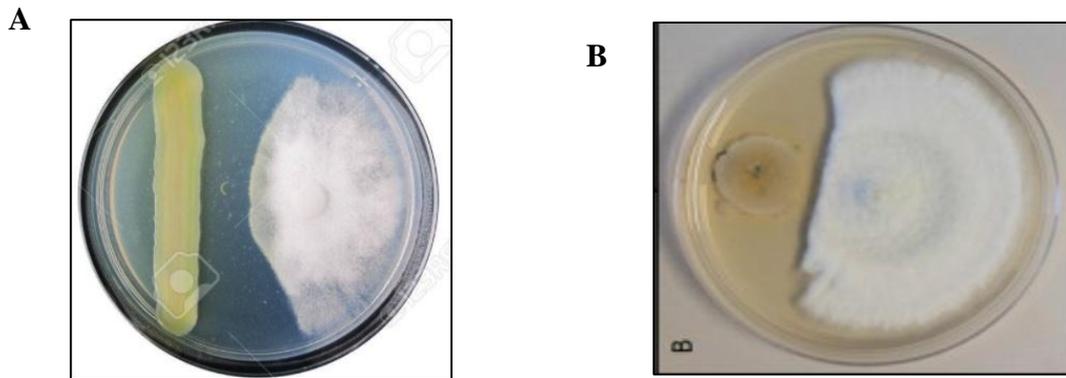
L'activité antifongique peut être criblée sur milieu PDA (Potato-Dextrose- Agar). Pour cela les souches de *Bacillus* spp sont ensemencées par un strie longitudinale sur le centre du milieu PDA. Après 48 h d'incubation deux disques du champignon phytopathogène de 5mm de diamètre âgé de 7 jours déposés sur les deux côtés de la strie de chaque bactérie a une distance de 2,5 cm. Des disques du champignon sont placés sur les boîtes témoins en absence de la bactérie antagoniste.

L'incubation des boîtes se fait 25°C pendant 7 à 10 jours. Les diamètres de la croissance des champignons sont ensuite mesurés et comparés par rapport au témoin (Figure 18 C) (Djellout et al., 2019), où un disque mycélien de 5 mm de champignon pathogène, prélevé à partir du bord de colonies en croissance active, est placé au centre des boîtes contenant du PDA. Ensuite, inoculation des isolats bactériennes autour du champignon cible à une distance de 3,0 cm (figure 18 A, B). Les boîtes sont ensuite incubées à 28 ° C et vérifiées toutes les 12 h après l'inoculation (Fan et al., 2016).



**Figure 18 :** Test de l'activité antagoniste des bactéries contre les champignons pathogènes (Dezfully et al., 2015 ; Fan et al., 2016).

On peut également réaliser l'activité antagoniste de *Bacillus* contre les champignons pathogènes par un autre test selon Silva et al (2016). Les bactéries striées (Figure 19 A) ou spotées (Figure 19 B) sur les extrémités des boîtes de Pétri (9 cm de diamètre) contenant du milieu Potato Dextrose Agar (PDA). Ensuite le champignon phytopathogène est inoculé sous forme de disque de gélose de 0,5 cm au centre des boîtes. Les boîtes sont ensuite incubées pendant 7 jours à 28 ° C.



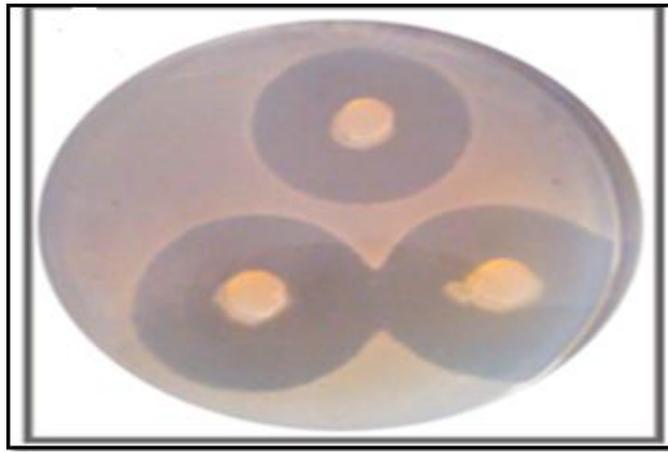
**Figure 19** : Test de l'activité antagoniste des bactéries contre les champignons pathogènes selon **Silva et al (2016)**.

Pour toutes les techniques ci-dessus et après incubation pendant 7 jours à 28 ° C, le pourcentage d'inhibition (PI%) est calculé selon la formule suivante :  $1 - \left(\frac{a}{b}\right) * 100$ .

Où le **(a)** représente la croissance radiale du champignon dans la boîte contrôle et le **(b)** est la croissance radiale du champignon dans la boîte avec des bactéries.

### III.6.2 Méthode de diffusion par cylindres d'agar

Il s'agit de faire une culture de la souche d'intérêt sur son milieu de culture gélosé approprié par des stries serrées sur la surface de la boîte. Au cours de leur croissance, les cellules microbiennes sécrètent des molécules qui diffusent dans la gélose. Après incubation, un cylindre d'agar est coupé aseptiquement avec un perce-bouchon stérile et déposé sur la surface de l'agar d'une autre boîte de Muller Hinton préalablement inoculée par le micro-organisme pathogène. Les substances diffusent du disque au milieu gélosé. Ensuite, l'activité antimicrobienne des molécules microbiennes sécrétées est détectée par l'apparition d'une zone d'inhibition autour du disque de la gélose (Figure 20) (**Jourdan et al., 2008**), cette technique est valable pour tester l'activité antagoniste des *Bacillus* contre les bactéries pathogènes.



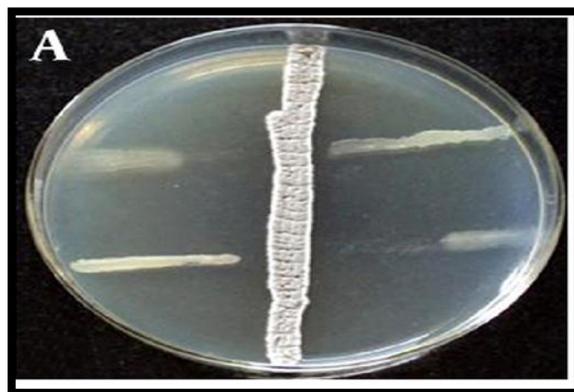
**Figure 20 :** Méthode de diffusion par cylindres d'agar de *Bacillus* sp. (Jourdan et al., 2008).

### III.6.3 Méthode des stries perpendiculaires

La méthode des stries croisées est une méthode simple et relativement rapide pour le dépistage des cultures à la recherche de nouveaux antibiotiques et antifongiques, mais l'inconvénient majeur était difficulté à obtenir des données quantitatives, car les marges de la zone d'inhibition étaient généralement très floues et indistinctes (Velho-Pereira et Kamat, 2011).

Le protocole de cette méthode passe par 3 étapes :

- ❖ Les Colonies (antagoniste) doivent striées au centre des boites et incubées à 28 °C pendant 4 à 5 jours.
- ❖ Les bactéries d'essai sont ensuite inoculées perpendiculairement à la souche antagoniste et la boîte est incubée à 37 °C pendant 24 heures pour les bactéries.
- ❖ La zone d'inhibition est déterminée à l'aide d'une échelle millimétrique (Figure 21).

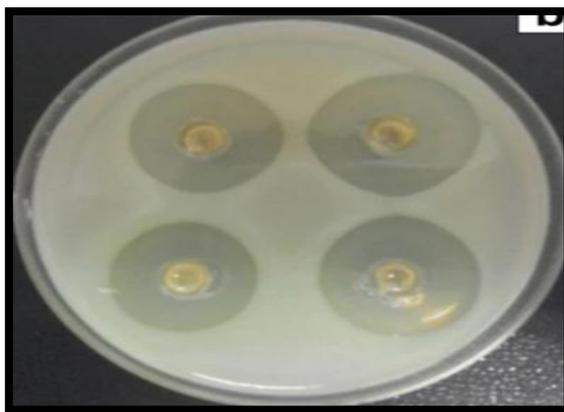


**Figure 21:** Antagoniste activité par la méthode des stries perpendiculaires (Dezfully et Ramanayaka, 2015).

### III.6.4 Technique double couche

L'activité antagoniste envers les bactéries pathogènes des espèces de *Bacillus* peut être menée selon la méthode modifiée de **Mougou et al (2018)**. Pour chaque isolat antagoniste, une suspension bactérienne ( $10^8$  CFU ml<sup>-1</sup>) est préparée dans de l'eau distillée stérile ; Des aliquotes de 20 µl ont été inoculées ponctuellement sur du milieu Luria-Bertani Agar (LB) et incubées à 25 °C pendant 48 h. Le même jour que l'inoculation ponctuelle, les bactéries pathogènes sont inoculées sur du milieu solide PCA et incubées pendant 2 jours à 25 °C. Les bactéries antagonistes sont ensuite exposées à la vapeur de chloroforme pendant 30 min, et les boîtes laissées ouvertes pendant 15 min sous la hotte microbiologique.

Un millilitre de chaque suspension bactérienne pathogène ( $10^8$  CFU ml<sup>-1</sup>) est mélangé avec 3 ml de milieu LB (0,6% d'agar) à 45 °C. Cette solution est ensuite rapidement superposée sur des boîtes contenant les antagonistes. Les boîtes sont incubées à 25 °C et vérifiées après 24 à 48 h pour l'apparition des halos d'inhibition entourant les points antagonistes (Figure 22).

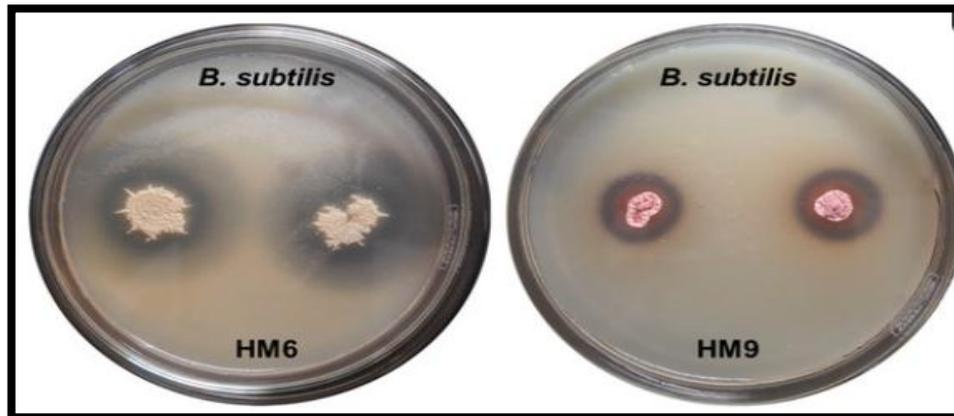


**Figure 22 :** Antagoniste activité par la méthode de double couche (**Mougou et al., 2018**).

### III.6.5 Méthode de sélection des colonies

Le dépistage primaire de l'activité antagoniste, peut se faire par la méthode de sélection des colonies selon **Pham et al., (2020)** avec une légère modification (Figure 23). En bref, les souches pathogènes sont préparées dans 4 ml de bouillon nutritif et incubées à température ambiante environ 37 °C pendant 18 à 24 h. Ensuite, 100 µl de chaque souche d'essai ( $10^8$  CFU / mL) sont étalées sur des boîtes de gélose Mueller Hinton, puis un prélèvement des souches antagonistes à partir une colonie de culture de 3 jours sur le milieu PCA et spotées sur des boîtes. Finalement une incubation à 37 °C pendant 48 h.

L'apparition d'une zone claire autour des souches cibles a démontré l'inhibition des antagonistes contre les souches d'essai.

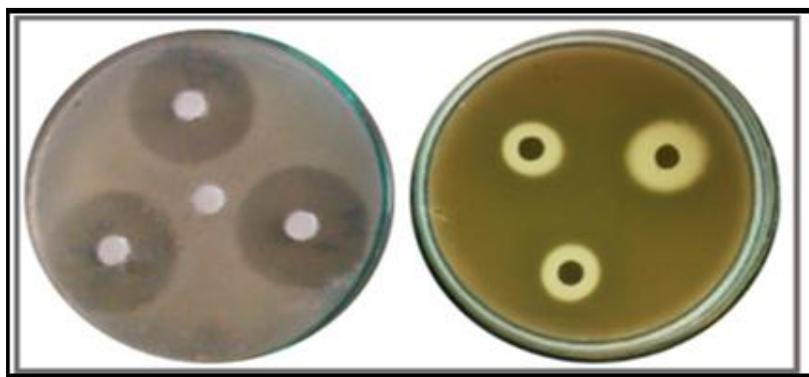


**Figure 23** : Dépistage des activités antimicrobiennes par la méthode de sélection des colonies (Pham *et al.*, 2020).

### III.6.6 Méthode de diffusion de disque en milieu solide

Le test de diffusion de disque en milieu solide est la méthode officielle utilisée dans de nombreux laboratoires de microbiologie clinique pour les tests de sensibilité aux antimicrobiens de routine. Dans cette procédure, les boîtes de gélose inoculées avec un inoculum normalisé du micro-organisme d'essai. Ensuite, des disques de papier filtre (d'environ 6 mm de diamètre), contenant le composé à tester à la concentration souhaitée, sont placés sur la surface de la gélose. Les boîtes de Pétri sont incubées dans des conditions appropriées.

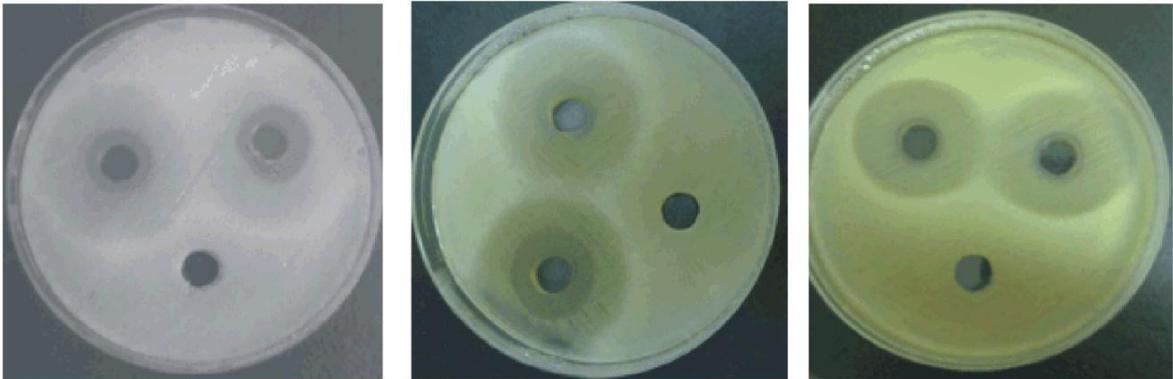
Généralement, l'agent antimicrobien diffuse dans la gélose et inhibe la germination et la croissance du micro-organisme testé, puis les diamètres des zones de croissance d'inhibition sont mesurés (Figure 24) (Jourdan *et al.*, 2008).



**Figure 24**: méthode de diffusion sur disque d'extrait microbien utilisant *C. albicans* comme micro-organisme d'essai (Jourdan *et al.*, 2008).

### III.6.7 Méthode de diffusion sur puits d'agar

Dans cette technique, les boîtes sont ensemencées par étalement avec l'inoculum microbien. Ensuite, un puit d'un diamètre de 6 à 8 mm est percé de manière aseptique avec un perce-bouchon stérile et un volume (20–100  $\mu\text{L}$ ) de l'agent antimicrobien ou de la solution d'extrait à la concentration souhaitée est introduit dans les puits. L'incubation des boîtes de géloses dans des conditions appropriées en fonction du micro-organisme testé. L'agent antimicrobien diffuse dans le milieu gélose et inhibe la croissance de la souche microbienne testée (Figure 25) (Jourdan *et al.*, 2008).



**Figure 25** : Méthode de diffusion sur puits d'agar (Gweirif *et al.*, 2015).

## **Conclusion**

## Conclusion

Les rhizobactéries qui favorisent la croissance des plantes, connues sous le terme PGPR, stimulent directement la croissance de celles-ci en augmentant le prélèvement des éléments nutritifs du sol, en induisant et produisant des régulateurs de croissance végétale et en activant les mécanismes de résistance induite chez les végétaux. Les PGPR stimulent indirectement la croissance des végétaux par leur effet antagoniste sur la microflore qui leur est néfaste, en transformant les métabolites toxiques et une meilleure nutrition azotée est assurée par *Bacillus*-céréales (**Ghitri, 2018**).

Les effets antagonistes des PGPR impliquent la production d'antibiotiques et la compétition nutritionnelle avec les pathogènes végétaux. L'établissement de l'association PGPR-plante est primordial pour l'expression des effets bénéfiques aux plantes. Parmi Les PGPR les plus fréquemment identifiées sont des *Pseudomonas fluorescentes*, des *Rhizobium*, mais comptent aussi des *Bacilles*, et en particulier le genre *Bacillus*. Ce genre bactérien appartient à la famille des *Bacillaceae* de l'ordre des Bacillales dans l'embranchement des *Firmicutes* (**Silini, 2012**). Le genre *Bacillus* présente des capacités remarquables, peut synthétiser une vaste gamme de substances bénéfiques. Il stimule la croissance végétale par différents processus tels que la production d'IAA, la solubilisation du phosphate, fixation de l'azote, et les attributs de la lutte biologique (*Bacillus thuringiensis*) par la production de sidérophore, enzymes hydrolytiques et les antibiotiques, donc en raison des grands avantages de cette bactérie, elle l'a rendue attractive pour un grand nombre d'investisseurs dans divers domaines (**Jourdan et al., 2008**). Certaines souches de *Bacillus* (*B. licheniformis*, *B. halodurans*, *B. subtilis*, *B. amyloliquefaciens* et *B. clausii*) sont utilisées au niveau industriel, et certaines d'autres possèdent le potentiel d'être utilisées comme insecticide, parmi celles-ci, l'espèce *Bacillus thuringiensis*, il permet de lutter contre de nombreux ravageurs de cultures, essentiellement des larves de lépidoptères, il permet aussi de contrôler efficacement les populations de plusieurs diptères vecteurs de maladies, ce qui en fait un genre intéressant à utiliser comme PGPR (**Maksimov et Khairullin, 2016**).

Enfin, on peut dire que *Bacillus* est l'un des microorganismes les plus connues et les plus utilisées dans le domaine de la lutte biologiques contre plusieurs insectes ravageurs de culture et agents phytopathogènes. La plupart des espèces du genre *Bacillus* sont utilisées avec succès dans le domaine de l'agriculture et l'industrie fine ainsi que dans le domaine médical et pharmaceutique (**Djellout et al., 2019**).

## **Références bibliographiques**

Références

**Adesemoye AO., Kloepper JW.** Plant–microbes interactions in enhanced fertilizer-use efficiency. *Applied Microbiology and biotechnology*. 2009; 85: 1-12.

**Abdel- Ghaffar AS., El-Attar HA., El-Halfawi MH., et Abdel-Salam AA.** Effects of nodulation, nitrogen fertilizer, salinity and water stress on symbiotic N<sub>2</sub> fixation by *Vicia faba* and *Phaseolus vulgaris* L. In *Graham, Peter H.; Harris, Susan C.(eds.)*. Biological nitrogen fixation technology for tropical agriculture: Papers presented at workshop held at CIAT.1981.

**Atlas RM., Bartha R.** Microbial ecology. Fundamentals and applications. 3 rd edition. The Benjamin/Cummings Publishing Company. San Francisco, California (USA). 1992; 563.

**Alexander M.** Biodegradation and bioremediation. Gulf Professional Publishing.1999.

**Aitbelkacem C ., Belgrade AN.** Extraction et caractérisation de quelques molécules bioactives à partir des souches de *Pseudomonas* fluorescents et *Bacillus* sp. (Master dissertation, Université M’hamed bougara de boumerdes).2017.

**Beauchamp CJ.** Mode d’action des rhizobactéries favorisant la croissance des plantes et potentiel de leur utilisation comme agent de lutte biologique. *Phytoprotection* . 1993; 74(1), 19-27.

**Boulanger A.** Analyse d'un nouveau système CUT impliqué dans l'acquisition et l'utilisation du N-acétylglucosamine par *Xanthomonas campestris pathovar campestris* (Doctoral dissertation, Université de Toulouse, Université Toulouse III-Paul Sabatier).2009.

**Bergey DP.** Bergey's Taxonomic Outline.Bergey's Manual of systematic bacteriology, second edition.http: //141.150.157/bergey soutline/tankyout.htm.Biocontrol agents. Antonie van Leeuwenhoek. 2001; 81:537-547.

**Bertrand S.** Les sidérophores de *Scedosporium apiospermum*: identification, synthèse et applications (Doctoral dissertation). 2009.

**Berendsen RL., Pieterse CM et Bakker PA.** The rhizosphere microbiome and plant health. *Trends in plant science*. 2012 ; 17(8), 478-486.

**Barak P., Jobe BO., Krueger AR., Peterson LA et Laird DA.** Effects of long-term soil acidification due to nitrogen fertilizer inputs in Wisconsin. *Plant and soil*.1997; 197(1), 61-69.

**Bouali W., Malek F., Sahin F et Abdelouahid DE.** Morphological, physiological and biochemical characterizations of some soil isolates of *Bacillus cereus* group from Algeria. *African Journal of Microbiology Research*. 2016; 10(29), 1094-1103.

**Berggren I., Van Vuurde J W et Mårtensson AM.** Factors influencing the effect of deleterious *Pseudomonas putida* rhizobacteria on initial infection of pea roots by *Rhizobium leguminosarum* bv. viceae. *Applied Soil Ecology*. 2001; 17(2), 97-106.

**Benhacene Z., Messiad I et Slimane BL.** Évaluation et taxonomie numérique des bactéries promotrices des plantes isolées de rhizosphère du *Capsicum annuum* (Master dissertation, Université 8 Mai 1945 Guelma Université). 2016.

**Beneduzi A., Peres D., Vargas LK., Bodanese-Zanettini MH et Passaglia LM.** Evaluation of genetic diversity and plant growth promoting activities of nitrogen-fixing bacilli isolated from rice fields in South Brazil. *Applied Soil Ecology*. 2008 ; 39(3), 311-320.

**Bouras FZ.** Isolement et caractérisation des microorganismes stimulateurs de la croissance de lentille (*lens culinaris*) (Doctoral dissertation, Université Djillali Liabès de Sidi Bal Abbès). 2018.

**Benhamou N., Picard K.** La résistance induite : une nouvelle stratégie de défense des plantes contre les agents pathogènes. *Phytoprotection*. 1999; 80(3), 137–168.

**Beauchamp CJ.** Mode d'action des rhizobactéries favorisant la croissance des plantes et potentiel de leur utilisation comme agent de lutte biologique. *Phytoprotection*. 1993 ; 74(1), 19-27.

**Calvet R.** Le sol: propriétés et fonctions. Constitution, structure, phénomènes aux interfaces (Vol. 1). France Agricole Editions. 2003.

**Cherif H.** Amélioration de la croissance du blé dur en milieu salin par inoculation avec *Bacillus* sp. et *pantoea agglomerans* isolées de sols (Doctoral dissertation, Université Ferhat Abbas Sétif 1) 2014.

**Coineau Y.** Le sol: un milieu de vie. Fondation pour la nature et l'homme Repères pour l'éducation à l'environnement. 1995; 2, 02p.

**Curl EA., Truelove B.** The rhizosphere, Advanced series in agriculture sciences. Springer-Verlag Berlin Heidelberg. 1986; 288p.

**Dezfully NK., Ramanayaka JG.** Isolation, identification and evaluation of antimicrobial activity of *Streptomyces flavogriseus*, strain ACTK2 from soil sample of Kodagu, Karnataka State (India). *Jundishapur journal of microbiology*. 2015; 8(2).

**De La Rosa-Ibarra M., Maiti RK.** Biochemical mechanism in glossy sorghum lines for resistance to salinity stress. *Journal of Plant Physiology*. 1995; 146(4), 515-519.

**Djellout H., Mekheldi D., Belkacem KK., Raio A et Krimi Z.** Evaluation de potentiel de souche antagoniste de *Bacillus* spp. et de *pseudomonas* spp. Dans le contrôle d'*agrobacterium* spp. Pathogène impliqué dans la maladie de galle de collet. *Revue Agrobiologia*. 2019 ; 9(1): 1267-1283.

**Dommergues Y., Mangenot F.** Ecologie microbienne du sol (No. 631.46). Masson. 1970.

**Etesami H., Alikhani HA., Hosseini HM.** Indole-3-acetic acid (IAA) production trait, a useful screening to select endophytic and rhizosphere competent bacteria for rice growth promoting agents. *MethodsX*. 2015; 2, 72-78.

**Fan ZY., Miao CP., Qiao XG., Zheng YK., Chen HH., Chen YW., Guan HL.** Diversity, distribution, and antagonistic activities of rhizobacteria of *Panax notoginseng*. *Journal of ginseng research*. 2016; 40(2), 97-104.

**Greenway H., Munns R.** Mechanisms of salt tolerance in nonhalophytes. *Annual review of plant physiology* 1980 ; 31(1), 149-190.

**Ghitri I.** Caractérisation du potentiel PGP de la flore *Bacillus cereus* isolée du sol. (Master dissertation, Université de Tlemcen). 2018.

**Gweirif S., Ahmed N., Elmhdwi M., Altayar M et Attitalla, I.** Antibacterial Activity of Eucalyptus Honey of Libyan Against Multi Drug Resistant Bacteria (MDR). *International Journal of Microbiological Research*. 2015; 6, 240-244.

**Goswami D., Dhandhukia P., Patel P., Thakker JN.** Screening of PGPR from saline desert of Kutch: growth promotion in *Arachis hypogea* by *Bacillus licheniformis* A2. *Microbiological research*. 2014; 169(1), 66-75.

**Gweirif S., Ahmed N., Elmhdwi M., Altayar M et Attitalla I.** Antibacterial Activity of Eucalyptus Honey of Libyan Against Multi Drug Resistant Bacteria (MDR). *International Journal of Microbiological Research*. 2015 ; 6, 240-244.

**Gobat JM., Aragno M., Matthey W.** Le sol vivant: bases de pédologie, biologie des sols (Vol. 14). PPUR Presses polytechniques.2010.

**Hugenholtz P.** Exploring prokaryotic diversity in the genomic era. *Genome biology*. reviews0003-1. 2002; 3(2),

**Jourdan E., Ongena M., Thonart P.** Caractéristiques moléculaires de l'immunité des plantes induite par les rhizobactéries non pathogènes. *BASE* 2008.

**Kumar P., Dubey RC., Maheshwari DK.** *Bacillus* strains isolated from rhizosphere showed plant growth promoting and antagonistic activity against phytopathogens. *Microbiological research*. 2012; 167(8), 493-499.

**Khakipour N., Khavazi K., Mojallali H., Pazira E et Asadirahmani H.** Production of auxin hormone by *fluorescent pseudomonas*. *Am Eurasian J Agric Environ Sci*. 2008; 4(6), 687-692.

**Khan MS., Zaidi A et Musarrat J.** Microbial strategies for crop improvement. Berlin: Springer. 2009.

**Kloepper JW.** Plant-growth-promoting rhizobacteria as biological control agents, In: *Soil Microbial Ecology*, (Ed.) F.B. Jr., Metting. Marcel Dekker inc., N.Y. 1993; p. 255-273.

**Lechevalier HA.** Introduction to the order Actinomycetales. *The prokaryotes*, 1981; 1015-1922.

**MacMillan J.** Occurrence of gibberellins in vascular plants, fungi, and bacteria. *Journal of plant growth regulation*. 2001; 20(4), 387-442.

**Maalem A., Sansri D.** Activité anti-phytopathogènes de quelques souches rhizosphériques appartenant aux groupes des *actinomycètes* filamenteux et des

*Pseudomonas* spp *fluorescents*. (Master dissertation, Université 8 Mai 1945 Guelma). 2018 ; 22p.

**Maksimov IV., Khairullin RM.** The role of *Bacillus bacterium* in formation of plant defense: Mechanism and reaction. The Handbook of Microbial Bioresources; Gupta, VK, Sharma, GD, Tuohy, MG, Gaur, R., Eds. 2016; 56-80.

**Mitter N., Srivastava AC., Ahamad S., Sarbhoy AK et Agarwal DK.** Characterization of gibberellin producing strains of *Fusarium moniliforme* based on DNA polymorphism. Mycopathologia. 2002; 153(4), 187.

**Moustain M et Elkahkahi RA. Benbouazza.** Beneficial effects of plant growth promoting rhizobacteria (pgpr) in improving the growth of salt- grown soft wheat in Morocco. Rev. Microbiol. Ind. San et Environn. 2019; Vol 13, N°1, p : 39 -51.

**Mougou I., Boughalleb-M'hamdi N.** Biocontrol of *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* affecting citrus orchards in Tunisia by using indigenous *Bacillus spp.* and garlic extract. Egyptian Journal of Biological Pest Control. 2018 ; 28(1), 1-11.

**Nihorimbere V., Ongena M., Smargiassi M et Thonart P.** Beneficial effect of the rhizosphere microbial community for plant growth and health. Biotechnologie, Agronomie, Société et Environnement. 2011; 15(2), 327-337.

**Noumeur SR.** Biodégradation du 2,4-dichlorophénol par le microbiote tellurique de la région de Hamla (Batna). (Magister dissertation, Université du Mentouri Constantine) 2018.

**Pal RB., Gokarn K.** Siderophores and pathogenecity of microorganisms. J. Biosci. Tech. 2010; 1(3), 127-134.

**Pham TM., Dao VH., Hoang XB., Bin C., Lan L et Phan M-T.** Antimicrobial Activities of Sponge-Derived Microorganisms from Coastal Waters of Central Vietnam. J. Mar. Sci. Eng. 2020, 8(8), 594.

**Paul EA., Clark FE.** Soil microbiology and biochemistry. 2nd edition. Academic Press. San Diego, California (USA) 1996; 340.

**Quénéa K.** Étude structurale et dynamique des fractions lipidiques et organiques réfractaires de sols d'une chronoséquence forêt/maïs (Cestas, sud-ouest de la France) (Doctoral dissertation, Université de Paris 6 France) 2004.

**Ryu RJ., Patten CL.** Aromatic amino acid-dependent expression of indole-3-pyruvate decarboxylase is regulated by TyrR in *Enterobacter cloacae* UW5. Journal of bacteriology. 2008; 190(21), 7200-7208.

**Schwyn B., Neilands JB.** Universal chemical assay for the detection and determination of sidérophores. Analytical Biochemistry. 1987; 160(1); 47-56.

**Silva MCS., Polonio JC., Quecine MC., Almeida TT., Bogas AC., PamphileJA., Azevedo JL.** Endophytic cultivable bacterial community obtained from *the Paullinia cupana* seed in Amazonas and Bahia regions and its antagonistic effects against *Colletotrichum gloeosporioides*. *Microbial pathogenesis*. 2016; 98, 16-22.

**Sanchis V., Chaufaux J et Lereclus D.** Utilisation de " *Bacillus thuringiensis*" en protection des cultures et résistance des insectes. *Cahiers Agricultures*. 1995 ; 4(6), 405-416.

**Silini S.** Contribution à l'étude de la biodégradation de la méthyléthylcétone en réacteur batch par les actinomycètes isolés à partir des boues activées de la station d'épuration d'El-Atmania. (Magister dissertation, Université du Mentouri Constantine) 2012.

**Spaepen S., Vanderleyden J et Remans R.** Indole-3-acetic acid in microbial and microorganism-plant signalling. *FEMS Microbiol. Rev.* 2007;31 (4): 425-448.

**Siddiqui ZA.** PGPR: prospective biocontrol agents of plant pathogens. In *PGPR: biocontrol and biofertilization* (pp. 111-142). Springer, Dordrecht. 2005.

**Saxena AK., Tilak KV.** Free-living nitrogen fixers: Its role in crop production. *Microbes for Health, Wealth and Sustainable Environment*, Malhotra Publ Co, New Delhi. Edited by Verma AK. 1998; 25-64.

**Somers E., Vanderleyden J et Srinivasan M.** Rhizosphere bacterial signalling: a love parade beneath our feet. *Critical reviews in microbiology*. 2004; 30(4), 205-240.

**Salisbury FB., Ross CW.** *Plant Physiology*, Wadsworth Pub. Com.,Inc., Belmont, California-USA. 1992.

**Tien TM., Gaskins MH et Hubbell D.** Plant growth substances produced by *Azospirillum brasilense* and their effect on the growth of pearl millet (*Pennisetum americanum* L.). *Applied and environmental microbiology*. 1997; 37(5), 1016-1024.

**Velho-Pereira S., Kamat NM.** Antimicrobial screening of actinobacteria using a modified cross-streak method. *Indian journal of pharmaceutical sciences*. 2011; 73(2), 223.

**Williams PM., Sicardi M.** Abscisic acid and gibberellin-like substances in roots and root nodules of *Glycine max*. *Plant and Soil*. 1982 ; 65(1), 19-26.

**Whipps JM.** Microbial interactions and biocontrol in the rhizosphere. *Journal of experimental Botany*, 52(suppl\_1). 2001 ; 487-511.

### Les sites Web

**Anonyme 1:** [symbiotech.over-blog.com](http://symbiotech.over-blog.com).

**Anonyme2:** <https://www.agroscope.admin.ch/agroscope/fr/home/themes/environnement-ressources/sol-eaux-elements-nutritifs/ecologie-de-la-rhizosphere.html>

**Anonyme3:**[http://www.suds-en-ligne.ird.fr/agriculture/les-defis-de-lagriculture familiale/preserverlenvironnement/reduire-le-recours-aux-engrais-chimiques](http://www.suds-en-ligne.ird.fr/agriculture/les-defis-de-lagriculture-familiale/preserverlenvironnement/reduire-le-recours-aux-engrais-chimiques).

**Anonyme 4:** [https://www.univ-usto.dz/images/coursenligne/as\\_sym\\_SN.pdf](https://www.univ-usto.dz/images/coursenligne/as_sym_SN.pdf)

**Anonyme 5:** <http://catalogue.bnf.fr/ark:/12148/cb15097536s>.

**Anonyme 6:** <https://www.eurekaalert.org/multimedia/pub/89300.php>

**Anonyme 7:** [http://www.biophyt.ch/documents/cours\\_paris.pdf](http://www.biophyt.ch/documents/cours_paris.pdf).