



الجمهورية الجزائرية الديمقراطية الشعبية
République Algérienne Démocratique Et Populaire
وزارة التعليم العالي والبحث العلمي
Ministère De L'enseignement Supérieur Et De La Recherche Scientifique



Université Constantine 1 Frères Mentouri
Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie

جامعة قسنطينة 1 الإخوة منتوري
كلية علوم الطبيعة والحياة

Département : Biologie Appliquée

قسم : البيولوجيا التطبيقية

Mémoire présenté en vue de l'obtention du Diplôme de Master

Domaine : Sciences de la Nature et de la Vie

Filière : Biotechnologies

Spécialité : Biotechnologie et Biothérapie

N° d'ordre :

N° de série :

Intitulé :

Recherche de nouvelles potentialités antimicrobienne endophytes et rhizosphériques à partir d'une plantule médicinale « *Asphodelus microcarpus* »

Présenté par : Roubache Roufia

Le : 11/06/2024

Mouas Messaouda

Jury d'évaluation :

Président: Djellid Hadjer (Dr –UFMC1).

Encadrant : MILET ASMA (Dr –UFMC1).

Examineur(s): Adoui Mounira (Dr –UFMC1).

Année universitaire
2023 - 2024

REMERCIEMENTS

Au nom d'Allah, le Tout Miséricordieux, le Très Miséricordieux. Nous

Nous arrivons à la dernière page de ce chapitre de notre vie, celui de notre fin d'études. Nous saisissons cette occasion pour exprimer notre sincère gratitude envers tous ceux qui nous ont soutenus et accompagnés tout au long de ce parcours enrichissant.

Avant tout, nous remercions Allah, le Miséricordieux, de nous avoir guidés tout au long de cette aventure intellectuelle. Sa grâce infinie a été notre moteur et Sa lumière nous a éclairés dans les moments de doute et de difficulté. Nous le remercions humblement pour Sa bénédiction et Sa guidance.

Nos plus vifs remerciements à Prof. KACEM CHAOUCHE Nouredine directeur du département biologie appliquée, directeur de LaMyBAM et professeur à l'université Frères Mentouri Constantine 1, de nous avoir donné l'opportunité d'intégrer ce master, pour la qualité de son enseignement, ses conseils durant ces années et son intérêt incontestable qu'il porte à tous les étudiants.

Nous tenons à remercier également notre encadrant Dr. MILLET Asma de l'université Frères Mentouri Constantine 1, pour nous avoir guidées tout au long de ce modeste travail et pour avoir joué un rôle crucial dans la réussite de ce mémoire. Ses précieux conseils, son suivi attentif et sa patience ont été d'une importance capitale.

Nos vifs remerciements vont également aux membres de jury de ce mémoire qui ont accepté de juger ce travail :

Un merci particulier à notre présidente de jury, Dr. DJELLID Hadjer, de nous avoir fait l'honneur d'accepter la présidence du jury de notre mémoire.

Un merci particulier à l'examinatrice de ce mémoire, Dr. ADOUI Mounira, pour avoir accepté d'examiner et évaluer notre mémoire.

Un grand merci aux ingénieurs des laboratoires pour leur précieuse aide lors de nos expérimentations. Leur expertise et leur soutien indéfectible ont été essentiels pour ce mémoire. Leur savoir et leur inspiration nous ont guidés tout au long de notre parcours.

Nous tenons à remercier chaleureusement nos enseignants qui nous ont guidés et inspirés durant notre formation. Leur passion pour l'enseignement, leur dévouement et leur volonté de partager leur savoir ont été une source inépuisable de motivation pour nous.

Que la paix, la miséricorde et les bénédictions d'Allah soient sur vous tous.

Dédicaces

A l'aide d'ALLAH tout puissant, qui m'a tracé le chemin de ma vie, j'ai pu réaliser

Ce travail que je dédie :

Ma mère

Ma joie de vivre, ma reine, mon paradis tu as toujours été la femme qui m'a donnée l'amour, la tendresse, l'attention et le courage. Grâce à toi je suis devenue la fille que je suis aujourd'hui. Je tiens à te remercier de tout mon cœur pour tes prières, ton amour, ta générosité et ta patience. Je t'aime.

Mon père

A l'esprit de mon père qui ne m'a pas vu être couronné sur cette scène, combien j'aurais aimé que tu sois à mes côtés, en ce moment merveilleux de ma vie, mais je te promets papa, je te rendrai toujours fier. Je t'aime.

A mon cher frère HALIM qui a toujours été à mes côtés, ainsi qu'à son épouse

MIMI pour ses encouragements et leurs enfants, mes anges SADJA et CHAHD.

A mes chères sœurs, WASSILA, NASSIMA et HOUDA, et leurs enfants pour votre soutien et amour.

A ma cousine RIMA, pour son soutien, ses encouragements et son amour.

Sans oublier mon amie MINA, qui a toujours été à mes côtés.

A mon binôme ROUFLA pour sa patience, son soutien moral et sa compréhension

Tout au long de ce travail.

A toutes les personnes précieuses que j'aime et qui sont une grande source de soutien moral

Tout au long de mon parcours.

Messaouda

Dédicaces

A ma mère « Saliha »

Pour votre amour et vos prières et pour tous les sacrifices inconditionnels que vous faites pour moi, je ne serais pas là sans votre soutien constant, peu importe ce que je dis, je ne vous rendrais pas justice ; Merci comme c'est dû. Votre tendresse me couvre, votre bienveillance me guide, vos prières me protègent, et votre présence à mes côtés a toujours été ma source de force pour affronter les différents obstacles. Elle a fait plus qu'une mère ne peut faire pour que ses enfants suivent le bon chemin dans leur vie et leurs études. J'ai toujours été la mère parfaite.

A mon père « Boudjema »

Tu as toujours été pour moi un exemple de père respectueux, honnête, de personne méticuleuse. Toi qui as travaillé dur et enduré des difficultés pour arriver là où je suis aujourd'hui, toi qui m'as aidé à avancer dans la vie. Sans toi, je ne le ferais pas certes, elle a su m'inculquer le sens des responsabilités, l'optimisme et l'espoir. Confiance en soi face aux difficultés de la vie. Je te dois ce que je suis aujourd'hui et ce que je deviendrai. Demain et je ferai toujours de mon mieux pour rester ta fierté et ne jamais te décevoir.

A mes chers frères

« Saïd », « Ridha », « Saddam » et « Achraf »

A mes chères soeur

« Moufida » et « Warda »

A mon binôme « Nawal »

au nom de l'amitié qui nous réunit et au nom de nos souvenirs inoubliables, merci pour votre patience infinie. Merci pour les moments de joie tout au long de notre

A tous mes amis(es)

sans exception chaque 'une par ses noms.

Roufia

Table de matières

1-Introduction	
2- Revue bibliographique	
2.1- Généralité sur <i>Asphodelus microcarpus</i>	
2.1.1- Origine et description botanique.....	
2.1.2- Taxonomie.....	
2.1.3- Utilisations traditionnelles	
2.2- Les souches pathogènes	
2.2.1- <i>Candida albicans</i>	
2.2.1.1- Généralité.....	
2.2.1.2- Caractères bactériologiques.....	
• Caractères morphologiques	
• Caractères cultureux.....	
2.2.1.3- Pathogénicité.....	
2.2.2- <i>Escherichia. Coli</i>	
2.2.2.1- Généralité.....	
2.2.2.2- Caractères bactériologiques.....	
• Caractères morphologiques	
• Caractères cultureux.....	
2.2.2.3- Pathogénicité.....	
2.2.3- <i>Bacillus sp</i>	
2.2.3.1- Généralité.....	
2.2.3.2- Caractères bactériologiques.....	
• Caractères morphologiques	
• Caractères cultureux.....	
2.2.3.3- Pathogénicité.....	
2.2.4- <i>Pseudomonas sp</i>	
2.2.4.1- Généralité.....	
2.2.4.2- - Caractères bactériologiques	

- Caractères morphologiques
- Caractères cultureux

2.2.4.3- Pathogénicité.....

2.2.5- *Staphylococcus sp.*.....

2.2.5.1- Généralité.....

2.2.5.2- Caractères bactériologiques.....

- Caractères morphologiques.....
- Caractères cultureux.....

2.2.5.3- Pathogénicité.....

2.2.6- *Salmonella sp.*.....

2.2.6.1- Généralité.....

2.2.6.2- Caractères bactériologiques.....

- Caractères morphologiques.....
- Caractères cultureux.....

2.2.6.3- Pathogénicité.....

2.3- La lutte biologique.....

2.3.1- Genre *Bacillus*.....

2.3.1.1- Caractéristiques générales.....

2.3.1.2- Activité antimicrobienne et application.....

2.3.2- Genre *Aspergillus*.....

2.3.2.1- Classification.....

2.3.2.2- Caractéristiques générales.....

2.3.2.3- Taxonomie.....

2.3.3- Genre *Fusarium*.....

2.3.3.1- Description morphologique et caractéristique générales.....

2.3.3.2- Application biotechnologiques et industrielles.....

2.4- Les microorganismes endophytes.....

2.4.1- Définition.....

2.4.2- Communautés microbiennes.....

2.4.2.1- Les bactéries.....

2.4.2.2- Les champignons.....

2.4.3- Relation plante-endophytes.....

2.4.4- Rôle des endophytes.....

2.5- Sol de la rhizosphère.....

2.5.1- Généralité.....

2.5.2- Définition.....

2.5.3- Interactions microorganismes-plantes.....

3- Matériel et méthodes.....

3.1- Agents pathogènes.....

3.2- Agents antagonistes.....

3.2.1- Echantillonnage.....

3.2.2- Etude microbiologique.....

3.2.2.1- Isolement de microorganismes du sol de la rhizosphère.....

3.2.2.2- Isolement de microorganismes endophytes.....

3.3- Test antagoniste.....

3.3.1- Test antibactérien.....

3.3.2- Test antifongique.....

3.4- Identification d'isolats antimicrobiens.....

3.4.1- Observation macroscopique.....

- Isolats bactériens.....
- Isolats fongiques.....

3.4.2- Observation microscopique.....

- Isolats bactériens.....
- Isolats fongiques.....

3.4.3- Tests biochimiques.....

- Nitrate réductase.....
- Test d'oxydase.....
- Test de catalase.....
- Test de mannitol mobilité.....

3.5- Détection des enzymes.....

3.5.1- Activité lipolytique.....

3.5.2- Activité protéolytique.....

3.5.3- Activité amylolytique.....	
3.6- Tolérance à la température.....	
3.7- Fermentation.....	
3.7.1- Préparation de la pré-culture.....	
3.7.2- Préparation de milieu alternatif.....	
3.7.3- Inoculation de milieu de fermentation.....	
3.7.4- Mesure de la densité optique.....	
3.8- Conservation des souches sélectionnées.....	
3.8.1- Conservation sur gélose incliné (GN).....	
3.8.2- Conservation sur glycérol.....	
3.8.3- Conservation sur l'eau physiologique et le bouillon nutritif.....	
3.8.4- Lyophilisation.....	
4- Résultat.....	
4.1- Agents pathogènes.....	
4.2- Agents antagonistes.....	
4.2.1- Isolement de microorganismes de la rhizosphère et les microorganismes endophytes.....	
4.3- Test antagoniste.....	
4.3.1- Test antibactérien.....	
4.3.2- Test antifongique.....	
4.4- Identification des microorganismes antagonistes.....	
4.4.1- Observation macroscopique.....	
• Isolats bactériens.....	
• Isolats fongiques.....	
4.4.2- Observation microscopique.....	
• Isolats bactériens.....	
• Isolats fongiques.....	
4.5- Les tests biochimiques.....	
• Recherche du nitrate réductase.....	
• Test de l'oxydase.....	
• Test de la catalase.....	
• Test de Mannitol mobilité.....	
4.6- Détection des enzymes.....	

- Test de l'activité lipolytique.....
- Test de l'activité protéolytique.....
- Test de l'activité amylolytique.....

4.7- Tolérance à la température.....
4.8- Fermentation.....
4.8.1- Pré-culture
4.8.2- Après filtration
4.9- Conservation des souches sélectionnées.....
4.9.1- Conservation sur gélose incliné (GN).....
4.9.2- Conservation sur glycérol.....
4.9.4- Lyophilisation.....
5- Discussion.....
6- Conclusion et perspectives.....
7- Résumé.....
8- Abstract.....
9- ملخص.....
10- Références bibliographiques.....
11- Annexe.....

Liste des figures

N°	Titre des figures	Page
Figure 1	Principaux caractères morphologiques des <i>Aspergillus</i> (Raper et Fennell, 1965).	14
Figure 2	Schéma représente l'interaction entre les plantes et les microorganismes dans la rhizosphère (khan <i>et al.</i> , 2009).	20
Figure 3	Localisation géographique de la région de Tafrant située à Djebel El Ouahch de Constantine.	22
Figure 4	Site d'échantillonnage : Sol de la rhizosphère d'une plante médicinale <i>Asphodelus microcarpus</i> de la région de Tafrant de Djebel El Ouahch (جبل الوحش- تا فرنت) (Constantine).	22
Figure 5	La technique de dilution.	23
Figure 6	Méthode de dilution à partir du sol de la zone de la rhizosphère de plantule « <i>Asphodelus microcarpus</i> ».	24
Figure 7	Aspect macroscopique de l'isolat bactérien RB1.	36
Figure 8	Aspect macroscopique de l'isolat bactérien RB9.	36
Figure 9	Aspect macroscopique de l'isolat bactérien RB8.	37
Figure 10	Aspect macroscopique de l'isolat bactérien RB5.	37
Figure 11	Aspect macroscopique de l'isolat bactérien RB3.	38
Figure 12	Aspect macroscopique de l'isolat bactérien RB2.	38
Figure 13	Aspect macroscopique de l'isolat bactérien RB4.	39
Figure 14	Aspect macroscopique de l'isolat fongique RM4 (recto, verso) sur gélose PDA.	40
Figure 15	Aspect macroscopique de l'isolat fongique RM6 (recto, verso) sur gélose PDA.	40
Figure 16	Aspect macroscopique de l'isolat fongique RM2 (recto, verso) sur gélose PDA.	41
Figure 17	Aspect macroscopique de l'isolat fongique RM1 (recto, verso) sur gélose PDA.	41
Figure 18	Observation microscopique de l'isolat bactérien RB1 par l'utilisation de coloration de Gram (GX40).	42

Figure 19	Observation microscopique de l'isolat bactérien RB2 par l'utilisation de coloration de Gram (GX40).	43
Figure 20	Observation microscopique de l'isolat bactérien RB3 par l'utilisation de coloration de Gram (GX40).	43
Figure 21	Observation microscopique de l'isolat bactérien RB4 par l'utilisation de coloration de Gram (GX40).	44
Figure 22	Observation microscopique de l'isolat bactérien RB9 par l'utilisation de coloration de Gram (GX40).	44
Figure 23	Observation microscopique de l'isolat bactérien RB5 par l'utilisation de coloration de Gram (GX40).	45
Figure 24	Observation microscopique de l'isolat bactérien RB8 par l'utilisation de coloration de Gram (GX40).	45
Figure 25	Aspect microscopique de l'isolat filamenteux RM1 (X40).	46
Figure 26	Aspect microscopique de l'isolat filamenteux RM2 (X40).	47
Figure 27	Aspect microscopique de l'isolat filamenteux RM4 (X40).	47
Figure 28	Aspect microscopique de l'isolat filamenteux RM6 (X40).	48
Figure 29	Résultat positif de nitrate réductase.	49
Figure 30	Résultat positif de test d'oxydase.	49
Figure 31	Résultats positifs du test de catalase.	50
Figure 32	Résultat du test de mannitol mobilité.	50
Figure 33	Les courbes de croissances de la souche Bacillus sp4 sur différents milieux de culture (optimum : MO et milieu alternatif à base d'azolla : MAZ) pendant 72 heures d'incubation à 30°C.	52
Figure 34	La courbe de production des métabolites de la souche Bacillus sp4 sur différents milieux de culture (optimum : MO et milieu alternatif à base d'azolla : MAZ) pendant 72 heures d'incubation à 30°C.	52

Liste des tableaux

N°	Titre des tableaux	Page
Tableau 1	Taxonomie d' <i>Asphodelus microcarpus</i> .	03
Tableau 2	Principaux caractères microscopiques des <i>Candida albicans</i> (Bouchara <i>et al.</i> , 2010).	05
Tableau 3	Isolats microbiens obtenus à partir du sol de la rhizosphérique et de différentes parties de la plantule « <i>Asphodelus microcarpus</i> »	03
Tableau 4	Inhibition de la croissance des bactéries pathogènes <i>Escherichia coli</i> , <i>Pseudomonas</i> , <i>Staphylococcus</i> et <i>Bacillus</i> , <i>Salmonella</i> sous l'effet des isolats bactériens obtenus.	04
Tableau 5	Inhibition de la croissance de <i>Candida albicans</i> , sous l'effet des isolats fongiques et des isolats bactériens obtenus.	05

Liste des abréviations

PDA: Potato Dextrose Agar

P: pourcentage.

PH: potentiel d'Hydrogène.

rpm: tour par minute.

H₂O₂: peroxyde d'hydrogène.

mL : Millilitre.

L : Litre.

°C : degré Celsius.

Cm : Centimètre.

G : Gramme.

GN : Gélose Nutritive.

Opt : optimum.

NR : Nitrate reductase.

Introduction

1. Introduction

Depuis les débuts de l'humanité, nous avons toujours été confrontés à la propagation des agents pathogènes responsables de nombreuses maladies animales et humaines, ainsi qu'à la difficulté de leur traitement. Grâce aux observations et aux travaux de nombreux chercheurs, tels que Louis Pasteur, Joseph Joubert et Ernest Duchesne, la quête pour trouver des substances antibactériennes et antifongiques a abouti. Depuis cette découverte, les substances antimicrobiennes sont devenues une source précieuse dans le domaine pharmaceutique pour traiter diverses maladies (Moroh, 2013). La capacité de microbes à développer une résistance à une large gamme de molécules antimicrobiennes évolue progressivement. De nos jours, cela concerne tous les microbes pathogènes, tels que *Bacillus*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas*, *Staphylococcus*, *Candida albicans*, *Salmonella*, etc. D'où la nécessité de développer de nouvelles alternatives pour lutter contre ces infections et contrôler la propagation des agents pathogènes résistants (Signoretto *et al.*, 2012). Les champignons ont un énorme potentiel pour produire des métabolites secondaires avec un pouvoir antibactérien et antifongique très élevé. Ces molécules bioactives jouent un rôle crucial dans le monde microbien (Pasqualotto, 2009).

Parmi les plantes médicinales répandues en Algérie, on trouve *l'Asphodelus microcarpus*. La composition variée de ses différentes parties (feuilles, racines, tiges, etc) permet son utilisation dans les secteurs industriels et pharmaceutiques. Les extraits de cette plante sont reconnus pour leurs activités antimicrobiennes, antifongiques et antivirales (El-Ghaly, 2017), ainsi que pour leurs propriétés antioxydants, attribuées à leur teneur en composés phénoliques (Di Petrillo *et al.*, 2016 ; Kitaz, 2017).

Les endophytes sont de petits organismes, comme des bactéries ou des champignons, qui vivent à l'intérieur des tissus de plantes sans leur causer de dommages apparents. Certains endophytes sont capables de produire des composés bioactifs qui ressemblent ou sont identiques à ceux produits par la plante hôte, comme des agents antibactériens, antifongiques, antiviraux ou cytostatiques (Radic & Štrukelj, 2012 ; Aly *et al.*, 2013).

Les microorganismes endophytes sont souvent considérés comme un groupe largement négligé et insuffisamment exploré en raison de leur caractère cryptique au sein des tissus végétaux (Suryanarayanan, 2013).

La région du sol qui entoure les racines des plantes, connue sous le nom de rhizosphère, constitue un écosystème florissant abritant une diversité de microorganismes bénéfiques

(Mendes *et al.*, 2011). Ces micro-organismes interagissent de manière étroite avec les racines des plantes, formant des communautés microbiennes dynamiques (Berendsen *et al.*, 2012). Leur rôle est crucial dans plusieurs processus, tels que la stimulation de la croissance des plantes, la libération de nutriments essentiels et la protection contre les pathogènes nuisibles (Gouda *et al.*, 2018).

Les microorganismes présents dans la rhizosphère sont également producteurs d'une gamme de métabolites secondaires dotés de propriétés antimicrobiennes. Ces métabolites exercent leur action de diverses manières, notamment par la sécrétion d'enzymes antibactériennes, la synthèse de composés toxiques, ou encore par la compétition pour les ressources essentielles avec les pathogènes.

Par conséquent, l'exploration des microorganismes présents dans la rhizosphère peut ouvrir de nouvelles perspectives pour découvrir des agents antimicrobiens efficaces contre les infections bactériennes résistantes aux antibiotiques (Hardoim *et al.*, 2008 ; Lugtenberg *et al.*, 2009).

Cette étude vise à explorer l'activité antibactérienne des souches isolées des régions endophytes de l'*Asphodelus microcarpus*, ainsi que l'isolement de souches antibactériennes à partir du sol de la rhizosphère de ces plantes. Pour ce faire, l'approche expérimentale comprend l'isolement et la purification de microorganismes, puis la sélection et l'identification préliminaire (basée sur des critères morphologiques et biochimiques) des isolats présentant une activité antimicrobienne en l'occurrence : deux souches bactériennes Gram positives (*Staphylococcus sp* et *Bacillus sp*) et trois souches bactériennes Gram négatives (*Escherichia coli*, *Pseudomonas* et *Salmonella sp*) et une levure (*Candida albicans*). Ensuite, les souches les plus prometteuses sont caractérisées pour leur capacité à produire des enzymes hydrolytiques (protéase, lipase et amylase) et leur tolérance à différentes températures (45°C, 50°C). Enfin, la dernière partie de l'étude est dédiée à la production de biomasse par fermentation.

Revue
Bibliographique

2- Revue bibliographique

2.1- Généralité sur *Asphodelus microcarpus*

L'asphodèle est une plante vivace et médicinale appartenant à un genre regroupant environ 20 espèces. Elle se distingue par une grande tolérance écologique, ce qui lui permet de résister dans des écosystèmes perturbés et fragiles (Bouazza *et al.*, 2001).

2.1.1- Origine et description botanique

Cette plante est d'origine en Afrique ainsi que sur la majeure partie de la côte méditerranéenne. On la trouve naturellement le long des littoraux atlantiques de Macaronésie (Açores, Canaries, Madère), du Portugal et du Pays basque, jusqu'à la péninsule arabe (Arabie Saoudite), en passant par une grande partie du pourtour méditerranéen, du sud de l'Europe (de l'Espagne à la Turquie), au nord de l'Afrique (Maroc et Algérie), et également en Asie mineure (de la Turquie au Sinaï).

Le genre *Asphodelus* comprend plus de 20 espèces largement répandues dans la région méditerranéenne (Fournier, 1947). *Asphodelus microcarpus*, connu sous le nom de "Berouag" dans l'Est de l'Algérie, fait partie de cette famille. C'est une plante vivace qui prend la forme d'un petit arbuste d'environ 1 mètre de haut. Ses feuilles sont longues et étroites, mesurant entre 1 et 4 cm de largeur et entre 50 et 60 cm de longueur, avec une forme de gouttière triangulaire être groupées en rosettes à la base de la tige. Ses fleurs ont un diamètre d'environ 35 mm, avec 6 pétales blancs allongés, composés de filaments blancs et d'une anthère orange, entourant un ovaire central et supérieur enfermé dans une capsule de couleur orange saumon. *Asphodelus microcarpus* produit des fruits sous forme de petites capsules légèrement rétrécies à la base, avec des valves minces, elliptiques et à bords plats. Ses racines se caractérisent par des tubercules cylindriques fortement renflés (Kaddem, 1990).

2.1.2- Taxonomie

La taxonomie d'*Asphodelus microcarpus* selon Ghaleb (1987) est présentée dans le tableau 1 ;

Tableau 1 Taxonomie d'*Asphodelus microcarpus*.

Embranchement	Spermaphytes
Sous-embranchement	Angiospermes
Classe	Monocotylédones
Ordre	Liliiflorae

Famille	Liliaceae
Genre	Asphodelus
Espèce	Asphodelus microcarpus salzm and viv
Synonyme	Asphodelus aestivus Brot Asphodelus microcarpus Viv Asphodelus ramosus L
Nom commun	Asphodèle
Noms vernaculaires	Berouag (dans l'est algérien) Balouaz (dans le centre algérien) Ighri (chez les berbères)

2.1.3- Utilisations traditionnelles

L'Asphodèle occupe une place importante dans la pharmacopée traditionnelle (Fournier, 1948). Au Maroc, une décoction des racines est utilisée pour traiter toutes les formes d'abcès, tandis qu'une décoction de feuilles en cataplasmes est employée contre les rhumatismes (Baba Aissa, 1991). En Inde, Kotb (1983) rapporte que *l'Asphodèle* est utilisé pour traiter l'ulcère gastrique chez l'homme, en absorbant la poudre de la plante séchée dans un verre de lait. En Algérie, les racines fraîches de *L'Asphodèle* macérées dans de l'huile sont utilisées pour traiter les otites. La poudre sèche de ces racines est appliquée en cataplasmes pour soulager les douleurs humatismales. Mélangée avec de l'orge, la poudre *d'Asphodèle* est recommandée comme diurétique (Ghileb, 1987). La propriété curative la plus certaine et confirmée par de nombreux travaux (Bouke, 1988 ; Ghileb, 1987 ; Baba Aissa, 1991) est L'utilisation du suc de la racine de *l'Asphodèle* dans le traitement des mycoses cutanées.

2.2- Les souches pathogènes

2.2.1- *Candida albicans*

2.2.1.1- Généralité

Candida albicans est un champignon opportuniste pathogène qui existe généralement de manière inoffensive en tant que commensal dans les voies gastro-intestinales et génito-urinaires d'environ 70 % des individus. Toutefois, il peut devenir pathogène chez les patients immunodéprimés ceux dont le système immunitaire est affaibli, ainsi que chez certaines personnes en bonne santé. Les infections provoquées par *Candida albicans* sont communément

désignées sous le terme de candidose. Cette maladie peut être divisée en deux catégories en fonction de sa gravité : les candidoses superficielles ou cutanéomuqueuses, et les candidoses systémiques ou Candi-démies (Anaul Kabir *et al.*, 2012).

2.2.1.2- Caractères bactériologiques

- *Caractères morphologiques*

Tableau 2 Principaux caractères microscopiques des *Candida albicans* (Bouchara *et al.*, 2010)

	<i>Candida albicans</i>
Multiplication	Végétative
Blastospores	ovoïdes, de 6 à 10 µm de long sur 4 à 7 µm de large, associées à des filaments mycéliens et du pseudomycélium
Production de chlamydospores	Positive

- *Caractères cultureux*

Colonies blanches, crémeuses, lisses à bords nets De forme ovoïde, cylindrique (Bouchara *et al.*, 2010)

2.2.1.3 – Pathogénicité

Candida albicans est fréquemment impliqué dans les infections à *Candida* chez l'homme (Warnock, 2007). Sa pathogénicité résulte de divers facteurs. Elle se propage généralement de manière endogène à partir du tube digestif vers les voies génitales, respiratoires, cutanées, ou via la circulation sanguine vers d'autres organes. Les infections dues à cette espèce sont souvent liées au mode de vie individuel, à la prise fréquente de certains médicaments tels que les immunodépresseurs, les contraceptifs synthétiques ou les corticoïdes, qui affaiblissent le système immunitaire (Neofytos *et al.*, 2010 ; Bustamante *et al.*, 2011 ; Taieb *et al.*, 2011).

2.2.2- *Escherichia. Coli*

2.2.2.1- Généralité

Escherichia coli, appartenant à la famille des Enterobacteriaceae au sein de la classe des Gammaproteobacteria, est un habitant commun du microbiote intestinal chez les vertébrés, agissant en tant que commensal. Cependant, il peut devenir un pathogène opportuniste chez les

mammifères et les oiseaux. Dans le microbiote intestinal humain, *E. coli* est la bactérie aérobie la plus abondante, avec une prévalence dépassant souvent les 90%. Les concentrations dans les selles varient généralement entre 10^7 et 10^9 unités formant des colonies par gramme. Les souches *d'E. Coli* peuvent provoquer diverses affections, à la fois extra-intestinales telles que les infections des voies urinaires, les infections intra-abdominales, les infections pulmonaires, cutanées et des tissus mous, ainsi que les méningites néonatales et les bactériémies. Elles peuvent également entraîner des pathologies intestinales, y compris différents types de diarrhée, notamment le syndrome hémolytique et urémique. Ces infections peuvent être fréquentes, comme dans le cas des infections des voies urinaires, et sont associées à des taux élevés de morbidité, tels que l'insuffisance rénale dans le syndrome hémolytique et urémique chez les enfants, ainsi que des séquelles neurologiques dans les méningites néonatales. Dans certains cas, elles peuvent également présenter une mortalité élevée (Liu *et al.*, 2020 ; Denamur *et al.*, 2021).

2.2.2.2- Caractères bactériologiques

- ***Caractères morphologiques***

La plupart des souches *d'E. Coli* sont des bacilles à Gram négatif. Elles présentent généralement une mobilité grâce à des flagelles péritriches ou sont équipées de pili et de fimbriae qui agissent comme des adhésines. Cependant, certaines souches sont immobiles (Berche *et al.*, 1989).

- ***Caractères cultureux***

E. Coli croit après 24 h à 37°C en donnant des colonies de 2 à 3 mm de diamètre (Berche *et al.*, 1989).

2.2.2.3- Pathogénicité

Il existe plusieurs types d'infections à *E. Coli*, certaines se localisant dans le système digestif et d'autres dans les voies urinaires. Dans le cas des infections digestives, on distingue cinq pathogènes différents. *E. Coli* entéropathogène, qui est associé aux diarrhées infantiles, *E. Coli* entérotoxigène, responsable de la turista ou diarrhée du voyageur, *E. Coli* entéroinvasif, qui envahit les cellules intestinales, *E. Coli* entérohémorragique, provoquant des diarrhées sanglantes, *E. Coli* entéroadhérent, également lié à la diarrhée du voyageur. Ces infections entraînent généralement des diarrhées aqueuses, parfois accompagnées de glaires ou de sang, ainsi que de la fièvre et des douleurs abdominales.

D'autre part, les infections urinaires à *E. Coli* se manifestent principalement sous forme de cystites. Les symptômes typiques incluent une sensation de brûlure en urinant (dysurie), un besoin fréquent d'uriner (pollakiurie) et une fièvre légère (Berche *et al.*, 1989).

2.2.3- *Bacillus* sp

2.2.3.1- Généralité

Les *Bacillus* sont des bactéries omniprésentes, présentes dans divers milieux tels que les sols, les plantes, les environnements extrêmes comme les événements hydrothermaux, ainsi que dans l'eau de mer, entre autres (Hamdache *et al.*, 2013). Ces bactéries, appartenant au genre des *Bacillus*, sont directement liées aux plantes et aux sols. Le genre *Bacillus* comprend environ 140 espèces et se caractérise par des bactéries à Gram positif, sous forme de bâtonnets avec formation d'endospores, et qui peuvent être aérobies ou anaérobies facultatives (Peter *et al.*, 2015).

2.2.3.2- Caractères bactériologiques

2.2.3.2.1- Caractères morphologiques

Les bactéries appartenant au genre *Bacillus* sont des bacilles à Gram positif de taille relativement grande, mesurant généralement entre 3 et 5 µm de longueur sur 1.25 µm de diamètre. Elles présentent souvent des extrémités carrées et peuvent se regrouper en courtes chaînettes dans les échantillons pathologiques. La plupart des espèces de *Bacillus* sont mobiles grâce à une ciliature péritriche, à l'exception de *B. anthracis*, qui reste immobile (Denis *et al.*, 2011).

2.2. 3.2.2- Caractères cultureux

Ces bactéries sont aérobies ou facultativement anaérobies, se développant sur des milieux de culture standards. Leurs colonies sont généralement de grande taille, présentant un contour irrégulier et une texture mate (Grosjean *et al.*, 2011).

2.2.3.3- Pathogénicité

Après avoir consommé des aliments contaminés, les symptômes peuvent se manifester rapidement, dans un délai allant de 0,5 à 5 heures, en cas d'ingestion de toxine préformée. Dans le cas où la production d'entérotoxines se produit *in vivo* après la prolifération des bactéries ingérées en grande quantité (entre 10^7 et 10^9 bactéries par gramme d'aliment), les symptômes peuvent survenir plus tardivement, entre 8 et 16 heures après l'ingestion. Ces symptômes comprennent des vomissements, des douleurs abdominales, des diarrhées et des nausées. Divers

aliments peuvent être incriminés, allant des viandes au riz, en passant par les pommes de terre déshydratées et les sauces tomates instantanées (Denis *et al.*, 2011).

2.1.4-*Pseudomonas aeruginosa*

2.1.4.1- Généralité

Pseudomonas aeruginosa est une bactérie à Gram négatif, qui a une forme allongée et ne produit pas de spores. Elle est caractérisée par la présence d'un unique flagelle. Elle a une apparence irisée et dégage une odeur rappelant celle du raisin ou de la tortilla. Cette bactérie prospère idéalement à des températures comprises entre 25°C et 37°C, mais sa capacité à survivre et à se multiplier à 42°C la distingue des autres espèces de *Pseudomonas*. On la trouve largement répandue dans l'environnement (Wu *et al.*, 2015 ; Azam & Khan, 2019).

Pseudomonas aeruginosa produit plusieurs pigments, dont la pyocyanine qui lui donne une teinte bleu-vert, la pyoverdine qui est jaune-vert et fluorescente, et la pyorubine qui a une couleur rouge-brun (Wu *et al.*, 2005). Elle possède un unique flagelle polaire composé de flagellines, qui joue un rôle crucial dans divers processus biologiques comme l'adhérence, la motilité et la formation de biofilms (Wu *et al.*, 2015 ; Azam & Khan, 2019).

2.2.4.2- Caractères bactériologiques

- ***Caractères morphologiques***

Pseudomonas aeruginosa est une bactérie fine de 1,5 à 3 µm de longueur et de 0,5 à 0,8 µm de largeur (Chaker H, 2012). C'est un bacille à Gram positif, non sporulé, strictement aérobie et mobile grâce à ses multiples flagelles polaires (Berche *et al.*, 1989).

- ***Caractères cultureux***

Après 24 heures d'incubation sur gélose nutritive, les colonies sont de grande taille (1 à 3 mm), avec des bords irréguliers et un aspect d'œuf au plat. D'autres colonies, très petites (1 à 2 mm), sont lisses et bombées. Certaines souches provenant d'infections chroniques présentent un aspect muqueux, produisant alors des colonies très visqueuses (Berche *et al.*, 1989).

2.2.4.3- Pathogénicité

Pseudomonas aeruginosa est souvent identifiée comme l'agent pathogène principal dans les cas d'infections respiratoires aiguës chez les patients sous ventilation ou immunodéprimés, ainsi que dans les infections respiratoires chroniques chez les patients atteints de fibrose kystique (Chastre & Trouillet, 2000 ; Chastre & Fagon, 2002).

Elle est également associée à une mortalité élevée dans les cas de pneumonie associée à la ventilation mécanique (VAP) (Brewer *et al.*, 1996 ; Rello *et al.*, 1997).

2.2.5- *Staphylococcus sp*

2.2.5.1- Généralité

Les bactéries du genre *staphylococcus* sont des cocci à gram positif, regroupées en amas semblables à des grappes de raisin. Elles sont immobiles, non sporulées, catalase positive et oxydase négative. Parmi les 27 espèces recensées dans ce genre, les principales sont : *staphylococcus aureus*, *S.epidermidis* et *S. saprophyticus* (Pierre et Marie Curie, 2003).

Ces bactéries sont largement présentes sur la peau et les muqueuses, et peuvent causer une variété d'infections superficielles ou profondes, ainsi que des intoxications alimentaires et des infections urinaires (Paul singleton, 1999).

2.2.5.2- Caractères bactériologiques

- *Caractères morphologiques*

Les *staphylocoques* sont des bactéries de forme sphérique, appelées cocci, qui apparaissent violettes lorsqu'elles sont colorées selon la méthode de Gram, indiquant qu'elles sont Gram positif. Leur taille varie généralement de 0.8 à 1 micron de diamètre. Ces bactéries ont tendance à se regrouper en paires (diplocoque) ou en petits amas ressemblant à une grappe de raisin.

Contrairement à certaines autres bactéries, les *staphylocoques* ne sont généralement pas mobiles et ne forment pas de spores. De plus, sous un microscope optique, ils ne possèdent habituellement pas de capsule visible, sauf dans de très rares cas, comme l'ont noté (Berche *et al.*, 1989).

- **Caractères cultureux**

Les *staphylocoques* sont facilement cultivables sur des milieux de culture standard en seulement 24 heures. Lorsqu'ils sont isolés sur des milieux sélectifs tels que le milieu hypersalé de Chapman, les colonies de *Staphylococcus aureus* présentent une apparence convexe et lisse, mesurant généralement entre 1 et 4 mm de diamètre. De plus, elles peuvent produire un pigment

jaune doré ou citrin, qui reste confiné à la colonie sans se diffuser dans le milieu environnant, comme observé par (Berche *et al.*, 1989).

2.2.5.3- Pathogénicité

Les infections *staphylococciques* sont observées dans divers contextes cliniques, tant dans la pathologie communautaire que nosocomiale. Lorsqu'une zone cutanée ou muqueuse contaminée subit un traumatisme accidentel ou chirurgical,. En plus des infections cutanées ou sous-cutanées, les bactériémies à *staphylocoque* peuvent conduire à des infections métastatiques, comme celles de l'endocarde, de l'appareil ostéoarticulaire, des poumons, etc.

Plusieurs facteurs pathogéniques ont été identifiés chez *S. aureus*, notamment des phénomènes d'adhésion, de formation de biofilm, d'évasion de la réponse immunitaire et de production de toxines. Les infections provoquées par les staphylocoques à coagulase négative sont généralement plus insidieuses et souvent associées à la présence d'un corps étranger. Leur physiopathologie, moins bien comprise, implique principalement la formation de biofilm et l'évasion du système immunitaire (Batard *et al.*, 2007).

2.2.6- Salmonella sp

2.2.6.1-Généralité

Salmonella est une des principales causes de toxi-infections alimentaires collectives (TIAC) (Korsak *et al.*, 2004). Ce sont des pathogènes intestinaux (DuPont, 2007), retrouvés dans les intestins humains et animaux, constituant ainsi leur réservoir principal. Après une contamination fécale, elles peuvent survivre dans l'environnement pendant plusieurs mois (Korsak *et al.*, 2004), et leur ubiquité se manifeste à travers un large éventail de réservoirs, humains (Todd et Greig, 2008) et animaux, tels que les mammifères (Dechet et Scallan, 2008), les volailles, les reptiles et les crustacés (Butt et Aldridge, 2004).

Leur capacité de survie dans divers environnements leur permet de se propager à l'échelle mondiale. Elles peuvent survivre à des températures allant de 7 à 45°C et résister à la

congélation et à la dessiccation (Griffith et al., 2006). Cependant, elles sont inactivées par la chaleur, le phénol, le chlore et les désinfectants à base d'iode. Leur survie est réduite en présence d'un pH inférieur à 5 (Henry *et al.*, 1983).

Dans les pays en développement, les gastroentérites à *Salmonella* sont une cause majeure de mortalité infantile, principalement dues aux sérotypes non typhiques (OMS, 2015), tels qu'Abortus ovis chez les ovins, Gallinarum chez les volailles, Dublin chez les bovins, et Choleraesuis et Typhisuis chez les porcins (Weill, 2008). La plupart des souches de *Salmonellas* ont ubiquistes et peuvent se transmettre de l'animal à l'homme et vice versa. Elles sont potentiellement pathogènes pour l'homme à divers degrés (Jones et Ingram, 2008) et sont souvent présentes chez l'animal sans causer de symptômes (Korsak *et al.*, 2004).

2.2.6.2- Caractères microbiologiques

- *Caractères morphologiques*

Salmonella sp est un bacille à Gram négatif, de 2 à 3 µm de longueur et 0,6 µm de large, mobile grâce à ciliature péritriche (Berche *et al.*, 1989).

- *Caractères culturaux*

Salmonella est une bactérie aéroanaérobie qui se cultive facilement sur milieu ordinaire en 24 heures. Après 24 heures d'incubation à 37 °C, ses colonies, de type lisses, mesurent de 2 à 3 mm et ont des bords réguliers (Berche *et al.*, 1989). Sur le milieu S-S, les colonies Apparaissent incolores avec un centre noir, car elles ne fermentent pas le lactose et produisent du H₂S (Berche *et al.*, 1989).

2.2.6.3- Pathogénicité

Les *salmonelles* non typhiques sont parmi les principales causes des syndromes gastro-entéritiques, essentiellement dus à des toxi-infections alimentaires, souvent en collectivité. La contamination humaine se fait principalement par la consommation d'aliments infectés. Actuellement, les infections sont principalement causées par quelques sérovars, notamment *Salmonella enteritidis* et *Salmonella typhimurium*. Elles provoquent une fièvre de 39°C à 40°C, des douleurs abdominales, des nausées, des vomissements et une diarrhée caractérisée par des selles liquides et fétides. L'évolution est généralement spontanée et favorable en 3 à 5 jours, mais chez les sujets fragilisés (jeunes enfants, immunodéprimés), ces bactéries peuvent entraîner des bactériémies avec des localisations secondaires (Berche *et al.*, 1989)

2.3- La lutte biologique

La lutte biologique vise à contrôler les parasites, les maladies et autres ravageurs des cultures en réduisant leur impact sans recourir aux pesticides. Elle repose sur l'utilisation d'organismes auxiliaires (Suty, 2010), qui agissent régulièrement pour réguler ces nuisibles. Bien que nécessitant plus de connaissances et d'observations (Jourdeuil *et al.*, 1991). La lutte biologique offre à long terme des avantages considérables sur le plan environnemental et économique, même si son efficacité peut varier (Toussaint, 2007).

2.3.1- *Bacillus*

2.3.1.1- Caractéristiques générales

Le genre *Bacillus*, initialement décrit par Cohn en 1872, englobe plus de 200 espèces et sous-espèces appartenant au phylum Firmicutes. Ces bactéries se présentent généralement sous forme de bâtonnets Gram-positifs, aérobies ou facultativement anaérobies, et sont caractérisées par une activité catalase positive (Logan & De Vos, 2009). En raison de leur diversité physiologique et de leur capacité à former des endospores, les différentes espèces de *Bacillus* montrent une résistance exceptionnelle aux conditions environnementales défavorables. Elles sont largement répandues dans divers habitats, en particulier dans le sol, où elles constituent une composante majeure des populations bactériennes Gram-positives du sol et de la rhizosphère, représentant jusqu'à 95 % de ces populations (Prashar *et al.*, 2014). De plus, les bactéries du genre *Bacillus* sont couramment trouvées en tant que bactéries endophytes dans divers environnements (De Silva *et al.*, 2019).

Dans l'ensemble, la plupart des espèces de *Bacillus*, ainsi que les produits dérivés, sont considérées comme sans danger pour une utilisation prévue dans l'environnement (Bhattacharyya *et al.*, 2016).

2.3.1.2- Activité antimicrobienne et application

Les *Bacillus spp.* sont souvent reconnus pour leurs activités antagonistes grâce à la production de métabolites secondaires possédant des propriétés antibiotiques. Ces métabolites comprennent principalement des peptides à faible poids moléculaire synthétisés de manière ribosomique (bactériocines) ou non ribosomique (lipopeptides, peptides, polykétides) (Zou *et al.*, 2018).

Les bactéries confèrent aux *Bacillus spp.* une activité antibactérienne étendue contre un large spectre de microorganismes (Salazar *et al.*, 2017). L'isolement et la caractérisation de ces

bactériocines peuvent être des outils précieux dans la lutte contre les bactéries pathogènes. En particulier, les *Bacillus spp.* Surtout ceux capables de produire des lipopeptides et des peptides synthétisés de manière non ribosomique, se démarquent par leur activité antimicrobienne remarquable. Ces composés présentent une efficacité accrue, renforçant ainsi leur potentiel en tant qu'agents de contrôle biologique (Fira *et al.*, 2018).

Les *Bacillus spp.* Produisent diverses familles importantes de lipopeptides cycliques, tels que la surfactine, l'iturine et le fengycine, qui jouent un rôle significatif dans leurs propriétés biologiques et leurs activités antimicrobiennes. Par exemple, la surfactine est connue pour ses propriétés tensioactives et sa capacité à former des biofilms, tandis que les iturines présentent des propriétés antifongiques et antibactériennes, et les fengycines démontrent une activité contre les champignons et certaines bactéries. Ces lipopeptides cycliques représentent des cibles prometteuses pour la recherche dans le domaine de la biotechnologie et du développement de nouveaux agents antimicrobiens (Stein, 2005).

De nombreuses études ont mis en évidence l'effet antimicrobien étendu des *Bacillus spp.* produisant des lipopeptides (Ongena *et al.*, 2005 ; Melo *et al.*, 2009 ; Zalila-Kolsi *et al.*, 2016). Cette activité antimicrobienne peut également être attribuée à la capacité des *Bacillus spp.* à produire des enzymes hydrolytiques telles que des chitinases, des chitosanases, des glucanases, des cellulases, des lipases et des protéases. Ces enzymes sont hautement efficaces pour dégrader les composants principaux des parois cellulaires des champignons et des bactéries, renforçant ainsi l'efficacité antimicrobienne des *Bacillus spp.* (Mijakovic *et al.*, 2020).

2.3.2- *Aspergillus*

2.3.2.1- La classification

En effet, selon Botton *et al.*, (1990) et Guiraud (1998), la classification des *Aspergillus* est comme suit :

Règne: Fungi

Division: Eumycota

Classe: Deuteromycetes

Ordre: Moniliales

Famille: Moniliaceae

Genre: *Aspergillus*

2.3.2.2-Caractéristiques générales

Les champignons filamenteux du genre *Aspergillus sp.* Sont des saprophytes cosmopolites et opportunistes. Ils se caractérisent par un thalle végétatif constitué de filaments mycéliens hyalins, de diamètre fin et régulier, septés et ramifiés. L'identification du genre *Aspergillus* repose sur l'observation des têtes aspergillaires au microscope, après la culture des colonies issues du prélèvement (Figure 1) (Judith FILLAUX, 2013).

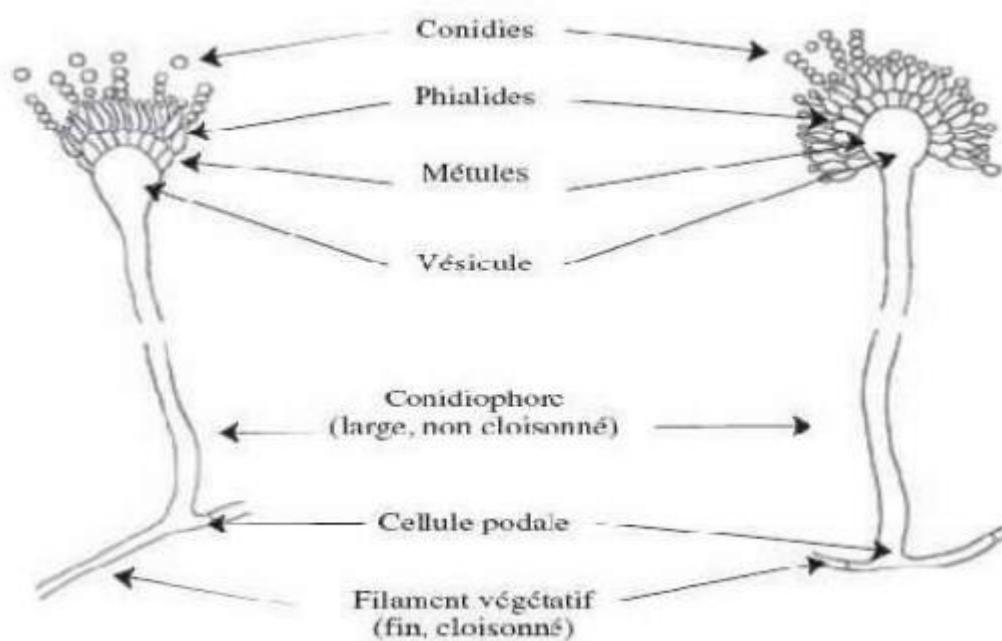


Figure 1 Principaux caractères morphologiques des *Aspergillus* (Raper et Fennell, 1965).

2. 3.2.3-Taxonomie

Les espèces du genre *Aspergillus* appartiennent au règne des Fungi et à L'embranchement des Ascomycota. Cet embranchement regroupe des champignons à mycélium cloisonné (champignons septomycètes) qui se reproduisent sexuellement par la formation d'asques contenant des ascospores. Les *Aspergillus* sont classés dans le sous-embranchement des Pezizomycotina, la classe des Eurotiomycetes, la sous-classe des Eurotiomycetidae et l'ordre des Eurotiales. Cet ordre se caractérise par des asques contenus dans des ascocarpes de type cléistothèce ou, plus rarement, gymnothèce, et par une multiplication asexuée via des phialides produisant des phalos conidies (Hibbett *et al.*, 2007; Bennett, 2010).

2.3.3-*Fusarium*

2.3.3.1- Description morphologique et caractéristiques générales

Fusarium est un champignon filamenteux appartenant à la classe des Ascomycètes et à la famille des Hypocréacées (Pitt *et al.*, 1994). Il est largement répandu dans le sol à l'échelle mondiale. Certaines espèces de *Fusarium* sont spécifiques aux zones tropicales, tandis que d'autres se retrouvent principalement dans les régions tempérées. Il existe également des espèces adaptées à des environnements désertiques, alpins et arctiques caractérisés par des conditions climatiques extrêmes (Summerell *et al.*, 1995).

La capacité des champignons du genre *Fusarium* à croître sur divers substrats et à disperser efficacement leurs spores contribue à leur large répartition géographique (Nelson, 1991). En 2011, plus de 20 espèces de *Fusarium* étaient répertoriées dans le genre (Wang *et al.*, 2011). Les espèces les plus communes comprennent *Fusarium solani*, *F. oxysporum*, *F. equiseti* et *F. chlamydosporum* (Chimbekujwo, 2000).

Les caractéristiques observables à l'œil nu et au microscope, telles que la couleur de la colonie, la taille et la forme des macroconidies, ainsi que le nombre, la forme et l'agencement des microconidies, et la présence ou l'absence de chlamydospores, sont des critères essentiels pour différencier les diverses espèces de *Fusarium* (De Hoog *et al.*, 2000).

Les cultures des espèces de *Fusarium* cultivées sur gélose Sabouraud Dextrose à 25°C développent des colonies duveteuses, cotonneuses, plates ou étalées (Larone, 1995 ; Mui-Yun, 2003). La couleur de la colonie vue de dessus peut varier du blanc, crème, beige, saumon, cannelle, jaune, rouge, violet, rose au pourpre. Sous la colonie, la couleur peut être beige, rouge, violet foncé, brun, voire incolore (Nelson *et al.*, 1994).

2.3.3.2- Application biotechnologiques et industrielles

Récemment, des études ont mis en lumière la production d'enzymes à partir d'espèces de *Fusarium* dans un but biotechnologique. Des stratégies, impliquant la conception expérimentale et l'optimisation des paramètres du processus, sont déployées pour maximiser l'activité enzymatique obtenue (Yusuf *et al.*, 2013 ; De Almeida *et al.*, 2014 ; Soni *et al.*, 2017).

2.4- Les microorganismes endophytes

2.4.1-Définition

Wilson, (1995) a suggéré que le terme « endophyte » pourrait simplement désigner l'emplacement de l'organisme, indiquant qu'un endophyte est un organisme qui vit à l'intérieure d'une plante. Les organismes généralement associés à ce terme sont les champignons et les bactéries, et je limiterai à utiliser ce terme pour ces types d'organismes. Ainsi, tout champignon ou bactérie trouvés dans les tissus végétaux serait considéré comme un endophyte.

Le concept a évolué au fil du temps :

- « Les endophytes sont des microorganismes qui colonisent les tissus sains des plantes hôtes sans causer de symptômes, même s'ils peuvent éventuellement entraîner des maladies ».
- Les champignons et les bactéries appelés endophytes infections les tissus végétaux de manière asymptomatique, restant souvent inaperçues pendant une partie ou la totalité de leur cycle de vie.

2.4.2- Communautés microbiennes

2.4.2.1- Les bactéries endophytes

Les bactéries endophytes sont généralement définies comme des micro-organismes pouvant être isolés à partir de la surface des végétaux désinfectés (Hardoim *et al.* , 2008).

En agronomie, cette définition a été élargie concept a été élargie pour inclure toutes les bactéries isolées des tissus végétaux stérilisés qui ne causent pas de dommages visibles aux plantes hôtes (Hallmann *et al.*, 1997).

Selon leur mode de vie, on distingue les bactéries endophytes sont classées comme « obligatoire » ou « facultatif ».

Les bactéries endophytes obligatoires dépendent strictement de la plante hôte pour leur croissance et leur survie la transmission, se transmettant verticalement ou via des vecteurs.

Quant aux bactéries endophytes facultatives elles ont au moins un stade de leur cycle de vie ou elles existent en dehors des plantes hôtes (Baldani *et al.*, 1997).

2.4.2.2- Les champignons endophytes

Les champignons endophytes sont des micro-organismes qui habitent les tissus internes des plantes sans causer de symptômes apparents chez leurs hôtes, (Porrás-Alfaro et Bayman, 2011) ils se trouvent dans quasiment toutes les plantes, (Wang et Dai, 2011) et affichent une grande diversité, principalement issue du phylum Ascomycota (Arnold, 2007).

Ces champignons peuvent être transmis aux plantes soit verticalement, soit horizontalement, en fonction des conditions environnementales comme l'humidité et hydratation du sol (Tintjer *et al.*, 2008).

_ La transmission verticale se produit lorsque l'organisme hérite de matériel génétique de son ancêtre. Elle se manifeste par la colonisation d'un nouvel hôte, qui est la descendance de l'hôte principal infecté. Les hyphes des champignons endophytes pénètrent dans les graines de pollen ou les propagules de la plante hôte. Par conséquent. Ainsi, il permet de contaminer la descendance de l'hôte principal tout en conservant leur génétiquement initiale, grâce à une dissémination par reproduction asexuée (Miral, 2018).

_La transmission horizontale se manifeste par la colonisation d'un nouvel hôte qui n'est généralement pas lié à l'hôte initial, grâce à la dissémination de spores par un vecteur de dispersion. Une fois germées, les hyphes pénètrent et colonisent le nouvel hôte, soit par les stomates, soit en traversant directement l'épiderme (Clay et Schardl, 2002).

2.4.3- Relation plante-endophyte

Les endophytes adoptent différents styles de vie en fonction du type de champignons et les plantes hôtes, la relation pouvant varier de l'antagonisme au mutualisme. Cette diversité d'interactions est souvent décrite comme un continuum. Zabalgogazcoa, (2008). Les recherches suggèrent que la dispersion horizontale (non systématique) des cellules internes par les spores est plus susceptible de favoriser l'échange avec des cellules hôtes antagonistes que la dispersion verticale (systémique) par les graines. (Schardl *et al.*, 2004; Saikkonen *et al.*, 1998). Les pathogènes latents sont des endophytes isolés à partir des plantes. (Mostert *et al.*, 2000), mais ils ne représentent pas une part significative des endophytes. La plupart de ces endophytes n'induisent pas de symptômes chez leur plantes hôtes. (Zabalgogazcoa, 2008).

2.4.4- Rôle des endophytes

Les endophytes jouent un rôle crucial dans l'adaptation des plants aux environnements pollués et peuvent améliorer la phytoremédiation en dégradant ou en immobilisant les contaminants du sol. Ils favorisent la croissance des plantes, réduisent la phytotoxicité et renforcent la tolérance aux métaux, entre autres bénéfiques (Eid *et al.*, 2019). Les champignons endophytes améliorent également l'absorption des nutriments et la solubilité des phosphates, ainsi que celle du potassium, de l'azote et du fer. De plus, ils contribuent à la fixation biologique de l'azote, rendant cet élément disponible pour les plantes hôtes. Les phytohormones, comme l'acide indole-3-acétique (IAA), les cytokinines et les gibbérellines, jouent un rôle clé dans divers processus de développement des plantes, tels que la croissance cellulaire, la dominance apicale et la résistance au stress. En tant qu'habitants naturels des plantes, les endophytes peuvent être utilisés comme bio-engrais et agents de lutte biologique pour promouvoir une agriculture durable.

2.5- Sol de la rhizosphère

2.5.1-Généralité

La rhizosphère désigne la région du sol influencée par les substances sécrétées par les racines. Cet environnement abrite une diversité particulière de bactéries appelées rhizobactéries. Ces microorganismes sont capables de se développer et de rivaliser avec d'autres organismes pour occuper cette zone riche en éléments nutritifs. Leur relation avec les plantes, ainsi que leur impact sur leur croissance, dépendent de leur capacité à s'établir avec succès dans la rhizosphère ; ils peuvent avoir des effets bénéfiques, néfastes ou neutres sur le développement des plantes. Plus de 5% des rhizobactéries favorisent la croissance des plantes et les protègent contre les pathogènes tels que les bactéries, les champignons et les némathodes (Anoua *et al.*, 1997 ; Valencia, 2008 ; Kloepper *et al.* , 1992) .

2.5.2- Définition

Le mot "Rhizosphère" a été introduit par Lorenz Hiltner (1904), "Rhizo" provient du grec "rhiza," signifiant "racine", "Sphère" désigne le champ d'action ou d'influence. De nos jours, la rhizosphère est définie comme le volume de sol influencé par l'activité racinaire' (Darrah, 1993). Ce volume dépend de facteurs tels que la nature des plantes, la densité racinaire et les propriétés du sol (Abhilash and Singh, 2009). La rhizosphère lui-même (ectorhizosphère), la surface de la racine (rhizoplan) et la racine interne (endorhizosphère). Cette zone est influencée par les racines qui libèrent de substrats modifiant l'activité microbienne. Les micro-

organismes endophytes peuvent également coloniser les tissus internes de la racine (Bowen et Rovira, 1999).

La rhizosphère et la rhizoplane sont des termes actuellement utilisés pour décrire la zone externe des racines (Botelho et Mendoca-hagler, 2006). Les plantes, tout comme la plupart des organismes vivants, sont constamment en contact avec nombreux microorganismes. Ce contact débute dès la chute de la graine au sol, s'intensifie lors de la germination et de la croissance de la plante, et se termine à sa mort. Ce lien est si étroit que l'on peut trouver plus de 10⁶ bactéries/g de feuille et de 10⁹ /g de racine (Gobat *et al.*, 2003).

La rhizosphère abrite une multitude d'organismes microscopiques tels que les bactéries, les protozoaires et les algues. Les bactéries y sont prédominantes et jouent probablement un rôle significatif dans la physiologie de la plante.

2.5.3- Les interactions microorganismes-plantes

Il est généralement accepté que tout groupe microbien peut jouer des rôles importantes dans un écosystème (Giri *et al.*, 2005). Cependant, la plupart des études sur la microbiologie de la rhizosphère, en particulier celles traitant des interactions synergiques entre les plantes et les microorganismes, se concentrent principalement sur les bactéries et les champignons. Cette revue se focalisera donc sur ces deux types de microorganismes. Les bactéries et les champignons ont des modes de nutrition et de vie différents, et divers types de relations saprophytes ou symbiotiques, qu'elles soient nuisibles (pathogènes) ou bénéfiques (mutuelles), ont été documentés (Kobayashi et Crouch, 2009). Les micro-organismes pathogènes comprennent les principaux agents pathogènes des plantes ainsi que les parasites et non-parasites nuisibles de la rhizosphère. Les bactéries et les champignons saprophytes bénéfiques favorisent la croissance et la santé des plantes. Parmi les symbioses bénéfiques pour les plantes, on retrouve les bactéries fixatrices d'azote et les champignons mycorhiziens (figure 2) (Barea *et al.*, 2005).

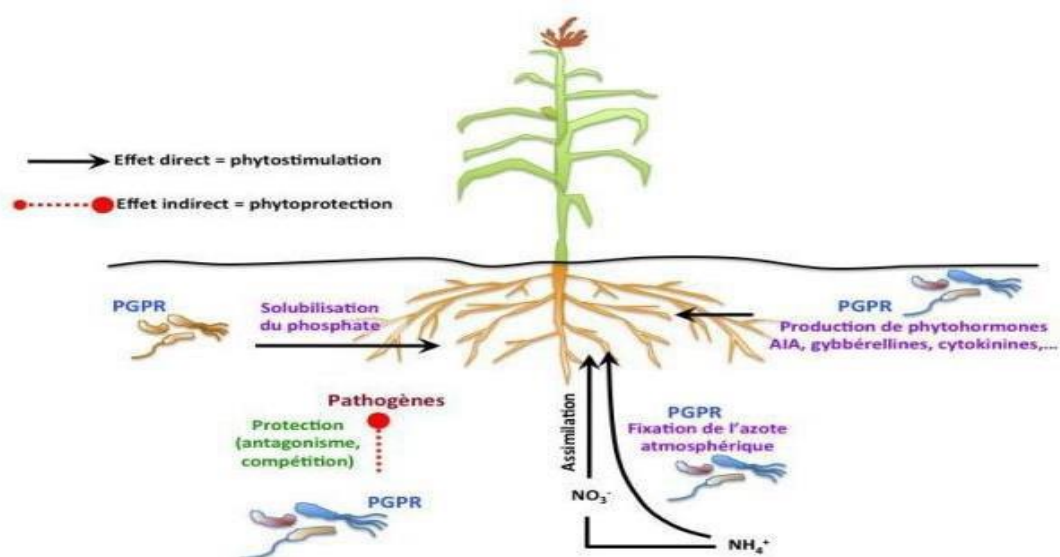


Figure 2 Schéma représente l'interaction entre les plantes et les microorganismes dans la rhizosphère (khan *et al.*, 2009)

Matériel
et
Méthodes

3. Matériel et méthodes

Le présent travail porte sur l'isolement de microorganismes (endophytes et rhizosphérique) à partir du sol de la rhizosphère et de différentes parties de plante, à savoir : feuilles, fruits et racines, développant une activité antimicrobienne et la mise en évidence de la capacité de ces isolats à produire des substances bioactives vis-à-vis des bactéries Gram positives à savoir : (*Staphylococcus aureus* ATCC 25923 et *Bacillus* ATCC 6633) et des bactérie Gram négatives (*Escherichia coli* ATCC 25922, *Pseudomonas* ATCC 27853 et *Salmonella typhimurium* ATCC 14028) et une souche levurienne (*Candida albicans* ATCC 10231) Connus comme étant pathogènes, présentant un danger potentiel sur la santé humaine.

Les microorganismes utilisés dans ce travail sont fournis par le laboratoire de Mycologie, Biotechnologie et de l'Activité Microbienne « LaMyBAM », Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie, Université Frères Mentouri Constantine 1.

3.1- Agents pathogènes

Cinq souches bactériennes ont été utilisées dans cette étude, en l'occurrence : deux souches Gram positifs (*Staphylococcus* et *Bacillus*) et trois souches Gram négatifs (*Escherichia coli*, *Pseudomonas* et *Salmonella*) et une souche levurienne (*Candida albicans*). En effet, chaque souche bactérienne a été réactivée dans un milieu gélosé GN (Annexe 1) suivi d'une incubation à 30°C pendant 24 heures (Devaraju et Satish, 2011). Cependant, La réactivation de la levure a été effectuée sur le milieu PDA (Potato Dextrose Agar) (Annexe1) et les boîtesensemencées ont été incubées à 30°C pendant 48 heures. Les cultures ont ensuite été examinées pour confirmer leur pureté et leur conformité aux critères de sélection, notamment en ce qui concerne la taille et la forme et la couleur de colonies bactériennes. En fait, les microorganismes réactivés ont ensuite utilisées pour mener des tests d'antagonisme.

3.2- Agents antagonistes

Les agents antagonistes ont été isolés à partir du sol de la rhizosphère d'une plante médicinale (*Asphodelus microcarpus*) et de différentes parties de cet plante (feuilles, fruits et racines).

3.2.1- Echantillonnage

Le prélèvement des échantillons a été effectué le 03 mars 2024 à partir de Tafrant de la région de Djebel El Ouahche de Constantine (figure 3, 4).



Figure 3 Localisation géographique de la région de Tafrant située à Djebel El Ouahch de Constantine.

Le prélèvement a été réalisé à l'aide d'une spatule stérile à une profondeur de 15 à 25 cm pour arracher entièrement la plantule « *Asphodelus microcarpus* » saine avec le sol adhérent aux racines. Les échantillons ont été placés dans des sacs stériles et transportés au laboratoire.



Figure 4 Site d'échantillonnage : Plantule médicinale *Asphodelus microcarpus* de la région de Tafrant de Djebel El Ouahch (جبل الوحش- تافرنت) Constantine.

3.2.2-Etude microbiologique

3.2.2.1- Isolement de microorganismes du sol de la rhizosphère

L'isolement a été effectué sur gélose nutritif GN (Annexe 1) pour sélectionner les bactéries et sur milieu PDA (potato dextrose agar, Annexe 1) pour sélectionner les moisissures (Guiraud, 1998). En effet, La technique de dilution a été utilisée (figure 5, 6). De ce fait, Un gramme de chaque échantillon du sol prélevé, a été dilué dans 9 mL d'eau physiologique stérile (Annexe 1). Le mélange d'eau physiologique et du sol a été agité pendant 2 à 3 minutes pour détacher au maximum les microorganismes attachés aux particules du sol, puis des dilutions décimales jusqu'à 10^{-4} ont été réalisées. 0.1 mL de dilutions décimales ont été ensemencés à la surface des milieux (GN et PDA) et les boîtes ont été ensuite incubées à 30 °C pendant 24h à 72h jusqu'à l'apparition de microorganismes (Gerhardt, 1994). Enfin, les isolats ont été purifiés.

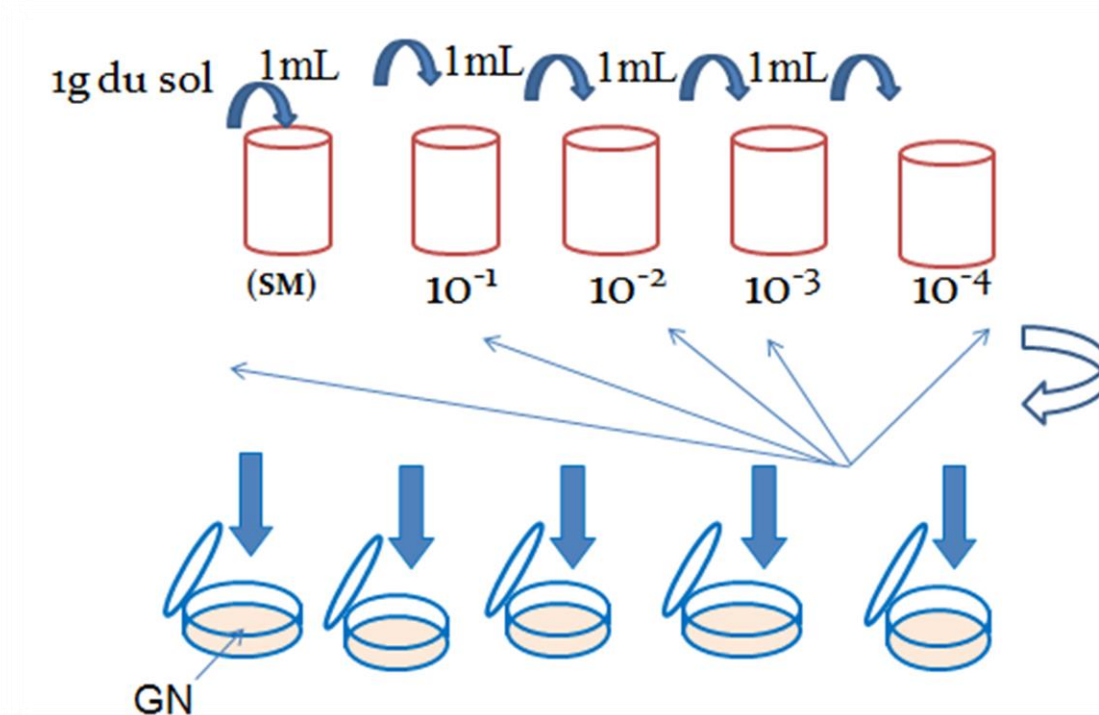


Figure 5 La technique de dilution.



Figure 6 Méthode de dilution à partir du sol de la zone de la rhizosphère de plantule « *Asphodelus microcarpus* »

Cependant, les solutions obtenues ont été soumises à un traitement thermique à 80°C pendant 10 minutes pour obtenir des bactéries sporulantes. En fait, ce processus thermique a été utilisé pour éliminer toutes les formes végétatives et de restaurer la flore de spores. De ce fait, 100 µL de chaque dilution traitée ont été ensemencés à la surface du milieu GN. L'incubation des boîtes a été effectuée à 30°C pendant 24 heures afin de permettre la récupération de toutes les flores de spores, aérobies (Vijaya lakshmi *et al.*, 2012).

3.2.2.2- Isolement de microorganismes endophytes

L'isolement de microorganismes endophytes a été basé sur le procédé et la description décrite par (Hallman *et al.*, 2007).

La méthode la plus fréquemment utilisée pour détecter et quantifier les champignons et les bactéries endophytes implique l'isolement à partir de tissus de la plante hôte stérilisés en surface (Zhang *et al.*, 2006). Les tissus végétaux sont soumis à une série de stérilisation de surface afin d'éliminer tous les organismes et propagules fongiques contaminants, facilement détachables de la surface (Huang, 2008). Les fragments de la plantule « *Asphodelus microcarpus* » ont été rincés sous l'eau du robinet pendant une dizaine de minutes pour débarrasser les impuretés et les débris de la surface (Guo *et al.*, 2011). Ensuite, les fragments de racines, fruits et feuilles ont été séparés et stérilisés dans l'éthanol à 70% pendant 1 minute, puis dans l'hypochlorite de sodium à 3% pendant 4 minutes. Ils ont ensuite été remis dans l'éthanol à 70% durant 30 secondes (Pimentel *et al.*, 2006) et rincés trois

fois avec de l'eau distillée stérile pendant 1 minute chaque fois et séchés sur du papier filtre stérile (Khan *et al.*, 2010).

Après la stérilisation superficielle des échantillons, les fragments ont été coupés en morceaux de 5 à 7 mm et transférés aseptiquement dans des boîtes de Pétri contenant le milieu PDA (Arivudainambi, 2011). L'incubation a été effectuée à l'obscurité dans une étuve à $26\pm 2^\circ\text{C}$ (Sadрати *et al.*, 2013) pendant 48 heures.

3.3- Test antagoniste

Le test antagoniste a été réalisé pour sélectionner des microorganismes antibactériens à savoir des bactéries Gram positif : *Bacillus et Staphylococcus* et des bactéries Gram négatif (*Pseudomonas, E. coli et Salmonella*) et d'obtenir des microorganismes antifongiques à savoir la levure *Candida albicans*.

3.3.1- Test antibactérien

Le test antibactérien a été réalisé en utilisant des cultures de bactéries âgées de 18 à 24 heures. Les souches bactériennes ont été ensemencées dans des boîtes de Pétri contenant la gélose nutritive. L'incubation a été effectuée à 30°C pendant 24 heures (Orele et Adejumo, 2009).

Des colonies prélevées à partir de cultures jeunes de bactéries pathogènes ont été inoculées dans des tubes contenant de l'eau physiologique stérile, puis légèrement agitées. Les suspensions obtenues ont ensuite été standardisées à une concentration de 10^8 UFC/ml. Cette standardisation a été réalisée en utilisant un spectrophotomètre à une longueur d'onde de 620 nm pour les bactéries et une cellule de THOMA observée sous microscope photonique. En fait, une absorbance optique (DO) comprise entre 0,08 et 0,1 correspond à une concentration de 10^7 à 10^8 germes/ml (Devaraju et Satish, 2011).

Des boîtes de Pétri contenant du milieu MH (Muller Hinton) ont été préparées, et des suspensions de chaque bactérie pathogène ont été ensemencées à l'aide d'un écouvillon stérile sur la surface des boîtes. Ensuite, des disques de 7 mm de diamètre, contenant les isolats bactériens et fongiques obtenus à partir de la région de Tafrant de Djebel El Ouahch ont été disposés sur la préparation. Ensuite, l'incubation des boîtes a été effectuée à 30°C pendant 24 à 48 heures. Une zone d'inhibition autour des disques après incubation indiquerait une activité inhibitrice. Les diamètres des zones d'inhibition ont été mesurés pour évaluer la capacité d'inhibition (Errakhi *et al.*, 2007). Les microorganismes ayant montré un effet antibactérien significatif ont été sélectionnés pour l'identification.

3.3.2- Test antifongique

Le test antifongique a été réalisé sur milieu YPG (Annexe 1). L'ensemencement des boîtes de Pétri s'effectue par écouvillonnage. Cela implique de tremper un écouvillon stérile dans une suspension de souche levurienne « *Candida albicans* » (à une concentration de 4.10^4 cellule/mL), d'éliminer l'excès de liquide en l'essorant contre la paroi du tube, puis de frotter l'écouvillon trois fois sur toute la surface de la gélose. À chaque passage, la boîte de Pétri est tournée de 60° pour garantir une répartition uniforme de l'inoculum, comme décrit par (Rasooli et Mirmostafa 2003 et Mazari *et al.*, 2010). Après séchage de la surface pendant environ 5 minutes, des disques de 7 mm de diamètre provenant d'isolats purs et jeunes des microorganismes obtenus à partir de la région de Tafrant de Djebel El Ouahch sont déposés sur la gélose ensemencée. Ensuite, l'incubation des boîtes a été effectuée à 30°C pendant 48 heures. Une zone d'inhibition autour des disques après incubation indiquerait une activité inhibitrice.

Les diamètres des zones d'inhibition sont mesurés avec précision au millimètre près, conformément aux méthodes décrites par Prescott (1995) et Madigan *et al.* (1997).

3.4- Identification d'isolats antagonistes

L'identification des isolats fongiques obtenus se base essentiellement sur l'analyse de caractères macroscopiques et microscopiques. Cependant, l'identification d'isolats bactériens sélectionnés a été réalisée par observation macroscopique et microscopique en s'appuyant aussi sur des tests biochimiques en l'occurrence : (test de la catalase ; test du mannitol mobilité ; nitrate réductase ; test oxydase).

3.4.1- Observation macroscopique

C'est une méthode directe et rapide pour évaluer les caractéristiques visuelles de chaque micro-organisme cultivé dans une boîte de Pétri.

✓ Isolats bactériens

Une étude a été menée pour analyser les attributs des bactéries, incluant leur forme, leur texture, leur couleur, leur bordure, leur élévation et leur opacité (Tassadaq *et al.*, 2013).

✓ Isolats fongiques

Dans le cas de moisissures, plusieurs caractéristiques ont été notées, montrant une gamme variée de couleurs pour les colonies fongiques, incluant le blanc, jaune, vert, violet et brun. De plus, la texture des colonies peut présenter une diversité allant du duveteux, poudreux, crémeux, visqueux au

cotonneux. De surcroît, la taille et la forme des colonies peuvent fournir des indications cruciales pour l'identification des espèces fongiques (Pitt & Hocking, 2009).

3.4.2- Observation microscopique

✓ Isolats bactériens

Cette étude a été menée en utilisant deux méthodes principales : l'examen à l'état frais et la coloration de Gram. Nous avons pris en compte la taille, la forme et l'arrangement des cellules, ainsi que le type de paroi cellulaire.

➤ Observation à l'état frais

Elle permet d'examiner des bactéries en vie et d'identifier leur forme, leur manière de se regrouper, et surtout, si elles sont mobiles. La technique implique de placer une goutte d'eau distillée ou d'eau physiologique stérile sur une lamelle, puis d'y ajouter et de disperser un échantillon bactérien prélevé sur la colonie à observer. Ensuite, une lame creuse recouvre la lamelle pour former une goutte suspendue, et l'examen se fait à différents niveaux de grossissement (40X puis avec immersion) (Singleton, 2005).

➤ Coloration différentielle (Gram)

La coloration différentielle est une méthode de coloration bactérienne employée pour examiner la morphologie et le mode de regroupement ainsi que pour différencier et classer la majorité des bactéries en deux grands groupes (Gram positif et Gram négatif), selon la différence de la composition de leur paroi cellulaire et selon leur aptitude à fixer ou non un colorant.

Des frottis ont été préparés par dépôt d'une goutte d'eau physiologique stérile sur une lame, avec une fraction d'une colonie jeune de 18 à 24h prélevée à l'aide d'une anse de platine stérilisée. La préparation a été fixée par flamage au bec bunsen, puis recouvert de violet de gentiane (Annexe 2) pendant 1 minute. Ensuite, le colorant est éliminé en ajoutant du lugol (Annexe 2) pendant 1 minute. Les frottis sont décolorés avec de l'éthanol (environ 30 secondes). Enfin, une contre-coloration est réalisée avec de la fuchsine (Annexe 2) (Madigan et Martinko, 2007 avec quelque modification).

L'observation de la préparation colorée a été effectuée au microscope optique en utilisant l'objectif X40 puis à immersion X100 après l'ajout d'une goutte d'huile d'immersion sur la lame.

✓ **Isolats fongiques**

L'identification des isolats fongiques a révélé plusieurs caractéristiques telles que la structure du mycélium (présence de cloisons), le type de conidiospores, la forme et la couleur des conidies, etc.

➤ **Coloration simple**

Pour observer les moisissures au microscope, une coloration simple a été effectuée en utilisant du bleu de méthylène. Un petit échantillon de moisissure a été déposé sur une lame propre. Ensuite, quelques gouttes de bleu de méthylène ont été ajoutées sur l'échantillon, en veillant à une couverture uniforme. À l'aide d'une pince fine, l'échantillon a été délicatement étalé dans le bleu de méthylène. Une lamelle en verre a été placée sur l'échantillon, alignée avec précaution, puis légèrement pressée pour écraser l'échantillon et étaler les structures fongiques. Enfin, la lame a été observée au microscope à des grossissements de 40X et 100X pour examiner les structures fongiques (Barnett & Hunter, 1998).

Ensuite les observations issues des études macroscopiques et microscopiques mentionnées précédemment nous ont dirigés vers la possibilité de caractériser des bactéries formant des endospores, ce qui motive la nécessité de procéder aux tests biochimiques suivants:

3.4.3- Tests biochimiques

Les tests biochimiques sont utilisés pour compléter l'identification morphologique et déterminer certaines caractéristiques du métabolisme des isolats bactériens obtenus.

✓ **Nitrate réductase**

Le nitrate réductase est une enzyme trouvée chez les bactéries qui est cruciale dans la conversion des nitrates (NO_3^-) en nitrites (NO_2^-), une étape clé dans le processus de dénitrification.

Sept tubes contenant du bouillon nitraté ont été incubés pendant 24 à 48 heures à une température de 30°C en présence d'une culture bactérienne. Ensuite, cinq gouttes de Nit 1 et Nit 2 ont été ajoutées aux échantillons. Après agitation, les résultats ont été immédiatement examinés.

Si le milieu se colore en jaune ou en rouge, cela indique une réduction des nitrates, ce qui est associé à un résultat positif pour la présence de nitrate réductase (NR+). Si le milieu reste incolore, la poudre de zinc est introduite en tant qu'agent réducteur des nitrates. Après cinq minutes, les tubes sont à nouveau observés. Si le milieu prend une teinte rose ou rouge, cela indique la présence continue de nitrates, suggérant un résultat négatif pour le nitrate réductase (NR-). Si le milieu reste incolore, cela signifie l'absence de nitrates, ce qui suggère que les bactéries les ont réduits au-delà

du stade des nitrites, correspondant à un résultat positif pour la présence de nitrate réductase (NR+) (Tortora *et al.*, 2003).

✓ **Test d'oxydase**

Le test de l'oxydase est effectué sur des colonies pures et bien isolées. Il vise à détecter la présence d'une chaîne respiratoire qui utilise le cytochrome C membranaire, également connu sous le nom de cytochrome oxydase. Ce test est particulièrement utile pour identifier les bactéries à Gram négatif. Il s'agit d'une réaction colorée qualitative utilisée pour détecter la présence de la phénylène diamine oxydase chez les bactéries. Il est réalisé à partir de cultures cultivées sur milieu gélosé. Cette enzyme a la capacité d'oxyder le réactif N-diméthylparaphénylène diamine, qui est incolore en l'absence d'oxydation. L'oxydation se traduit par l'apparition d'une coloration violette (Prescott *et al.*, 2013).

De ce fait, la méthode consiste à déposer stérilement le disque d'oxydase au centre d'une lame de verre propre. Puis, l'humidification du disque oxydase a été effectuée par une goutte d'eau physiologique. Ensuite, le prélèvement d'un fragment de la colonie bactérienne a été réalisé à l'aide d'une anse de platine stérile et l'étalement a été effectué au centre du disque. Le résultat positif est immédiatement indiqué par l'apparition de la coloration violette.

✓ **Test de catalase**

Le test catalase a été employé pour détecter la présence de l'enzyme catalase chez les bactéries. Cette enzyme a la capacité de décomposer le peroxyde d'hydrogène en eau et en oxygène, et elle revêt une importance capitale pour la survie des bactéries dans des milieux riches en oxygène.

Pour effectuer le test de la catalase, deux gouttes de solution d'eau oxygénée (H₂O₂) ont été déposées sur une lame en verre propre. Ensuite, la culture bactérienne a été introduite sur la lame à l'aide d'une anse bactérienne.

Si la bactérie possède l'enzyme catalase, une réaction se déclenche immédiatement, entraînant la libération d'oxygène. Cela se traduit par la formation de bulles ou d'une mousse à la surface de la lame. Cette réaction peut être soit instantanée (rapide) soit retardée (avec un certain délai). En revanche, si la bactérie ne possède pas l'enzyme catalase, aucune réaction visible ne se produira (Ilboudo *et al.*, 2016).

✓ **Test de mannitol mobilité**

Le milieu de mannitol-mobilité est utilisé pour repérer la fermentation du mannitol et la mobilité des bactéries examinées.

Ce test a été réalisé en ensementant le milieu mannitol par une piqûre centrale. L'incubation a été effectuée à 37°C pendant 24 heures.

Les résultats ont été évalués en se basant sur la présence de l'indicateur de pH, le rouge de phénol (Koua *et al.*, 2018).

3.5- Détection des enzymes

La détection des enzymes a été réalisée par l'évaluation de l'activité amylolytique, protéolytique et lipolytique de chaque bactérie.

3.5.1- Activité lipolytique

Un milieu gélosé contenant de la tributyrine a été préparé selon la méthode décrite par Larpent & Larpent en 1985 (Annexe 1). Les cultures bactériennes sélectionnées ont été placées sous forme de disques de 7 mm dans des boîtes de Pétri contenant ce milieu gélosé. L'activité lipolytique des souches a été évaluée en observant la présence d'une zone de lyse autour des colonies, conformément au protocole décrit par El Marrakchi *et al.* 1988.

3.5.2- Activité protéolytique

Les souches sélectionnées ont été testées pour leur capacité à hydrolyser la caséine, une protéine dominante dans le lait et une source majeure d'azote. Pour ce faire, des disques de 7 mm de diamètre contenant ces souches ont été placés au centre de boîtes de culture contenant un milieu gélosé à base de lait (Annexe 1). Les boîtes ont été incubées à 30°C et les résultats ont été observés quotidiennement pendant 72 heures. La présence d'une activité enzymatique a été mise en évidence par la formation d'un halo clair autour des cultures, indiquant la dégradation de la caséine. En revanche, l'absence de tout halo a été interprétée comme un résultat négatif, signifiant l'absence d'hydrolyse de la caséine (De Vos *et al.*, 2009).

3.5.3- Activité amylolytique

L'amidon, une grande molécule glucidique constituée d'une séquence de glucose, est ciblé par l'amylase, une enzyme qui peut le décomposer. Pour évaluer l'activité de l'amylase, un milieu gélosé contenant de l'amidon (Annexe 1) est utilisé comme milieu de culture. Des cultures bactériennes sont prélevées sous forme de disques 7 mm et placées individuellement sur ce milieu. L'incubation a été effectuée à 37°C pendant 1 à 5 jours (Prescott *et al.*, 2003). Après incubation, la présence d'amylase est détectée par une zone d'hydrolyse autour des disques, indiquant la dégradation de l'amidon et donc la présence de l'enzyme.

3.6-Tolérance à la température

Des boîtes de Pétri contenant les milieux (GN pour les bactéries et PDA pour les moisissures) ont été inoculées par des colonies de bactéries et de moisissures ayant des propriétés antimicrobiennes. Ces boîtes ont ensuite été placées dans des incubateurs réglés à des températures de 45°C et 50°C et 55°C respectivement. Le processus de développement des colonies bactériennes et fongiques a été observé jusqu'à l'apparition de colonies visibles.

3.7- Fermentation

3.7.1- Préparation de la pré-culture

La méthode de préparation de l'inoculum est basée sur le protocole établi par Dulmage en 1990. Tout d'abord, un erlenmeyer de 250 mL contenant 50 mL de milieu optimum (Annexe 1), un autre erlenmeyer de 250 mL contenant 50 mL de milieu alternatif à base d'Azolla (Annexe 1) est inoculé avec quelques colonies bactériennes de manière stérile. Après une incubation de 72 heures à une vitesse d'agitation de 130 rpm, constituant ainsi l'étape de fermentation (Akpa, 2001).

3.7.2- Préparation de milieu alternatif à base d'Azolla

Avant de lancer la fermentation, une préparation de milieu alternatif a été réalisée en utilisant Azolla comme source de carbone et d'azote. Pour ce faire, Azolla a été cultivée dans des étangs recouverts de plastique, avec 2 cm de terre et de terreau, et 5 cm d'eau. Après 2 à 3 semaines, des tapis denses de la plante ont été formés. Ensuite, la plante a été récoltée, séchée à l'air libre pendant 72h après avoir été placée dans un tissu propre. Ensuite, 40 g de matière sèche ont été broyés et transférés dans un bécher contenant 1000 mL d'eau distillée.

3.7.3- Inoculation de milieu de fermentation

Pour initier la fermentation, 1 mL de pré-culture a été transféré pour inoculer un autre erlenmeyer de 250 mL contenant 50 mL de milieu Azolla et un autre erlenmeyer de 250 mL contenant 50 mL de milieu optimum. Ce mélange sera incubé dans des conditions similaires à celles de la pré-culture pendant 72 heures, constituant ainsi l'étape de fermentation.

3.7.4- Mesure de la densité optique

La mesure de la densité optique de la suspension bactérienne a été réalisée à l'aide d'un spectrophotomètre fonctionnant à une longueur d'onde de 600 nm, Le milieu de culture stérile a été utilisé comme référence pour cette mesure.

3.8- Conservation des souches sélectionnées

Les souches démontrant une forte activité antagoniste ont été sélectionnées pour la conservation.

3.8.1- Conservation sur gélose inclinée (GN)

Des microorganismes présentant un fort effet antagoniste ont été introduits de manière aseptique dans des tubes contenant un milieu de culture incliné, spécifiquement de la gélose nutritive (GN). Ces tubes ont ensuite été incubés à une température de 30°C pendant 24 heures. En fait, les tubes ont été stockés au réfrigérateur à une température de 4°C selon les recommandations de (Prescott *et al.*, 2010).

3.8.2- Conservation sur glycérol

Les microorganismes présentant une forte activité antagoniste ont été aseptiquement inoculés dans des tubes contenant une solution de 30% de glycérol et les congeler à -20°C (Botton *et al.*, 1990).

3.8.3- Conservation dans l'eau physiologique et le bouillon nutritif

Les microorganismes présentant une forte activité antagoniste ont été aseptiquement inoculés dans des tubes contenant l'eau physiologique et le bouillon nutritif. Ensuite, les tubes ont été placés au réfrigérateur et maintenus à une température de 4°C.

3.8.4-Lyophilisation

La lyophilisation est une technique employée pour conserver diverses substances, y compris des cellules microbiennes, des produits alimentaires et pharmaceutiques. Elle implique une congélation rapide suivie d'une déshydratation complète du matériau concerné, qui est ensuite préservé sous vide à température ambiante. Par exemple, la biomasse obtenue après une fermentation de trois jours a été lyophilisée et transformée en poudre à l'aide d'un lyophilisateur.

Resultat

4. Résultat

Le but de ce travail est d'effectuer l'isolement et l'identification de microorganismes endophytes et rhizosphériques présentant des propriétés antimicrobiennes à partir d'une plantule médicinale « *Asphodelus microcarpus* » située à Djebel Ouehch de la wilaya de Constantine d'Algérie.

4.1- Agents pathogènes

Staphylococcus aureus ATCC 25923, *Bacillus* ATCC 6633, *Escherichia coli* ATCC 25922, *Pseudomonas* ATCC 27853 et *Salmonella typhimurium* ATCC 14028 et *Candida albicans* ATCC 10231 ont été réactivées pour réaliser le test de l'activité anti-microbienne.

4.2- Agents antagonistes

L'isolement de microorganismes à partir d'une plantule médicinale « *Asphodelus microcarpus* » a permis l'obtention de 19 microorganismes. En effet, neuf isolats bactériens ont été obtenus; Par ailleurs, dix isolats fongiques ont été isolés et purifiés.

4.2.1- Isolement de microorganismes rhizosphériques et endophytes

Un total de dix-neuf isolats microbiens a été obtenu à partir du sol de la rhizosphère et de différentes parties de la plante telles que les feuilles, les fruits et les racines (tableau 3). Les prélèvements à partir du sol de la rhizosphère ont conduit à l'obtention de six isolats, comprenant trois bactéries et trois champignons. En effet, l'isolement après un choc thermique a révélé la présence de quatre isolats bactériens et 2 isolats fongiques. Enfin, les prélèvements effectués à partir de différentes parties de la plante ont montré la présence de deux isolats bactériens et 5 isolats fongiques.

Tableau 3 Isolats microbiens obtenus à partir du sol de la rhizosphérique
Et de différentes parties de la plantule « *Asphodelus microcarpus* »

Site d'isolements	Microorganismes isolés	
	Bactéries	Moisissures
Sol de la rhizosphère	3	3
Choc thermique	4	2
Microorganismes endophytes	2	5

4.3- Test antagoniste

Parmi les dix neuf isolats microbiens testés, sept bactéries et quatre moisissures possèdent un effet anti-microbien vis à vis les bactéries testées (*Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Bacillus* ATCC 6633, *Escherichia coli* ATCC 25922, *Pseudomonas* ATCC 27853 et *Salmonella typhimurium* ATCC 14028) et la levure : *Candida albicans* ATCC 10231.

4.3.1- Test antibactérien

Un test antagoniste a été réalisé pour sélectionner des isolats démontrant des propriétés antibactériennes contre plusieurs souches pathogènes, notamment *Staphylococcus*, *Bacillus*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas* et *Salmonella*. Parmi les dix-neuf isolats testés, sept bactéries (RB1, RB2, RB3, RB4, RB5, RB8 et RB9) et quatre moisissures (RM1, RM2, RM4, RM6) ont présenté un effet antibactérien significatif. Les zones d'inhibition de croissance des bactéries pathogènes ont été mesurées et sont présentées dans le tableau 4, Annexe 3.

Les résultats de ce test ont révélé des valeurs variant entre 1,3 et 2,3 cm selon l'isolat testé. Les isolats bactériens (RB1, RB2) et fongiques (RB3, RB4 et RM2, RM6) ont démontré les effets inhibiteurs les plus efficaces sur les bactéries Gram positives et Gram négatives, et la bactérie RB4 a démontré l'effet inhibiteur le plus efficace par rapport aux autres isolats. En revanche, les isolats bactériens RB9, RB5, RB8 et les isolats fongiques RM1, RM4 ont montré des effets antagonistes moins marqués, avec des valeurs variant entre 1,2 et 1,6 cm. (Tableau 4, Annexe 3).

Tableau 4 Inhibition de la croissance des bactéries pathogènes *Escherichia coli*, *Pseudomonas*, *Staphylococcus*, *Bacillus* et *Salmonella* sous l'effet des isolats bactériens obtenus.

Les isolats	<i>Escherichia coli</i>	<i>Pseudomonas</i>	<i>Staphylococcus</i>	<i>Salmonella</i>	<i>Bacillus</i>
RB1	++	++	/	+	+
RB2	/	/	+++	+++	+
RB3	/	/	+++	++	+++
RB4	/	/	++	+++	+++
RB5	/	/	/	/	+
RB8	/	+	/	/	++
RB9	+	/	/	++	+
RM1	/	/	/	+	++
RM2	+	+	/	/	+++
RM4	/	/	+	+	/
RM6	+	/	+++	/	/

+++Effet de lyse très important, ++ effet de lyse important, + effet de lyse faible

4.3.2- Test anti antifongique

Un test antagoniste a été réalisé pour sélectionner des isolats démontrant des propriétés antifongiques contre *Candida albicans*, Parmi les dix-neuf isolats testés, sept bactéries (RB1, RB2, RB3, RB4, RB5, RB8 et RB9) et quatre moisissures (RM1, RM2, RM4, RM6) ont présenté un effet antifongique significatif.

Les zones d'inhibition de croissance de *Candida albicans* ont été mesurées et sont présentées dans le tableau 5. Les résultats de ce test ont révélé des valeurs variant entre 1,3 et 2,4 cm selon l'isolat testé. Les isolats RB1, RB2 et RB3, RB4 (isolat bactérien), et les isolats fongique RM2, RM4 ont démontré les effets inhibiteurs les plus efficaces sur *Candida albicans*. En revanche, les isolats bactériens RB9, RB5, RB8 et les isolats fongiques RM1, RM4 ont montré des effets antagonistes moins marqués, avec des valeurs variant entre 1,2 et 1,5 cm (Tableau 5, Annexe 3).

Tableau 5 Inhibition de la croissance de *Candida albicans*, sous l'effet des isolats fongiques et des isolats bactériens obtenus.

Les isolats microbiens	RB1	RB2	RB3	RB4	RB5	RB8	RB9	RM1	RM2	RM4	RM6
<i>Candida albicans</i>	+++	+	+	++	/	/	/	+	+++	++	/

+++ Effet de lyse très important, ++ effet de lyse important, + effet de lyse faible

4.4- Identification de microorganismes antagonistes

Les isolats bactériens et fongiques sont principalement identifiés en utilisant des guides de détermination décrits dans des publications telles que celles de (Botton *et al.*,1990 ; Guiraud, 1998). Cette méthode d'identification repose sur l'observation des caractéristiques macroscopiques et microscopiques des colonies.

4.4.1- Observation macroscopique

L'aspect des isolats bactériens et fongique est évalué à l'œil nu.

✓ *Isolats bactériens*

Les isolats bactériens sélectionnés, RB1, RB2, RB3, RB4, RB5 et RB8 et RB9 ont été cultivés sur gélose nutritive (GN) pour étudier leur développement macroscopique, révélant différents aspects morphologiques tels que la forme, la couleur, la taille, l'élévation, le contour, la surface, l'opacité et le relief.

Lors de l'observation macroscopique, l'isolat bactérien RB1 a été remarqué pour former des colonies circulaires, cependant, elles étaient plates avec une texture légèrement rugueuse, parfois accompagnée d'une légère sécrétion. Ces colonies exhibaient une gamme de couleurs allant du beige au jaune (figure 7).



Figure 7 Aspect macroscopique de l'isolat bactérien RB1

L'isolat bactérien RB9 a formé des colonies circulaires, convexes et lisses. Elle présentait une texture lisse et une surface brillante, avec une couleur allant du beige au jaune (figure 8).

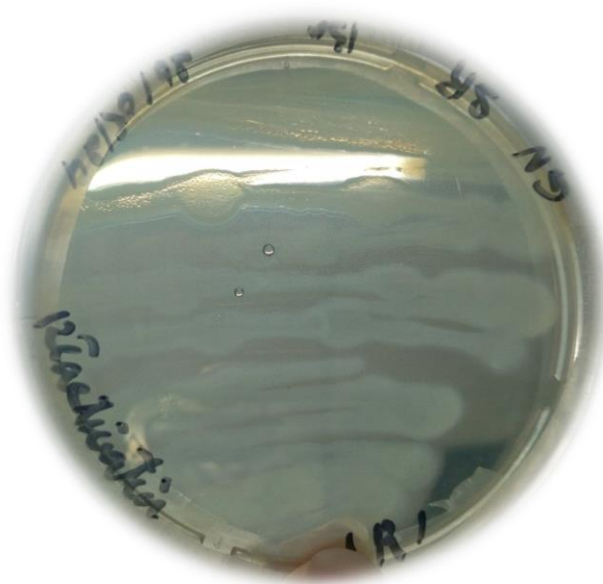


Figure 8 Aspect macroscopique de l'isolat bactérien RB9

L'isolat RB8 présentait des colonies irrégulières, plates et ondulées. Leur texture était plane, avec des bords parfois irréguliers, et la coloration des colonies allait du blanc au crème (figure 9).

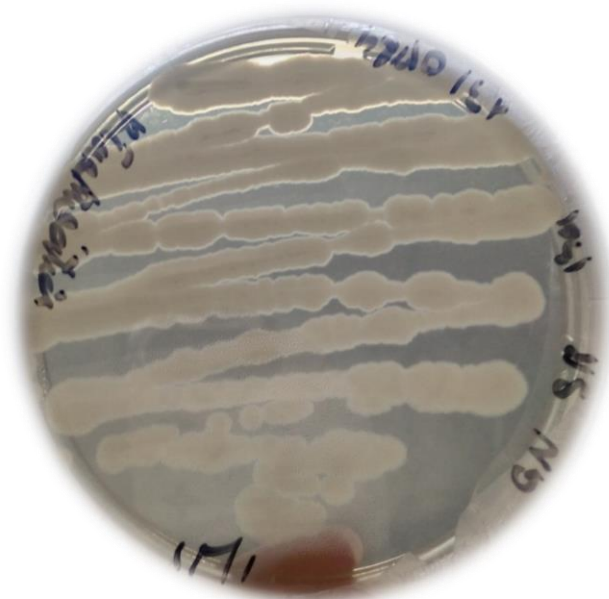


Figure 9 Aspect macroscopique de l'isolat bactérien RB8

L'isolat bactérien RB5 a donné naissance à des colonies rondes, ovales et légèrement bombées qui étaient lisses au toucher. Leur texture était lisse et leur apparence brillante, arborant une teinte blanc-crème bien définie (figure 10).

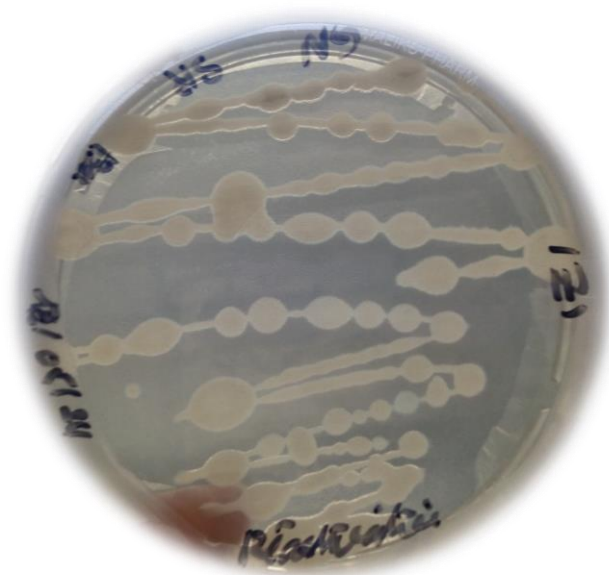


Figure 10 Aspect macroscopique de l'isolat bactérien RB5

Les colonies provenant de l'isolat bactérien RB3 étaient de forme ronde à ovale, présentant une surface plane mais rugueuse, légèrement ridée au toucher. Elles exhibaient une gamme de couleurs allant du beige au jaune (figure 11).

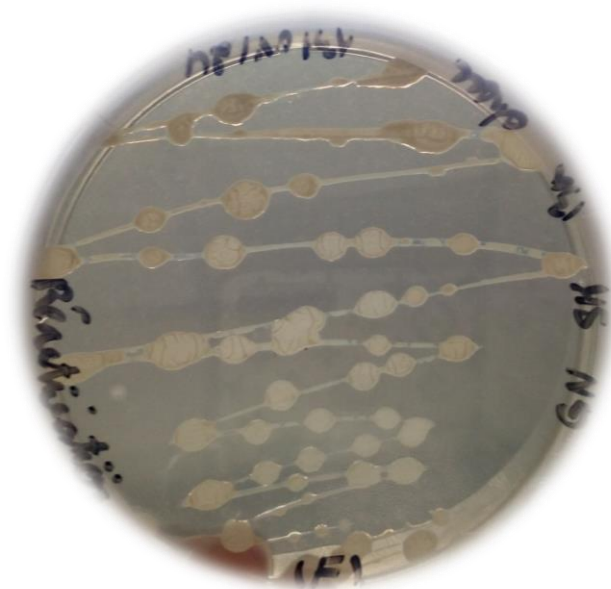


Figure 11 Aspect macroscopique de l'isolat bactérien RB3

Les colonies provenant de l'isolat bactérien RB2 étaient de forme ronde à ovale, présentant une surface plane mais rugueuse, légèrement ridée au toucher. Elles exhibaient une gamme de couleurs allant du beige au jaune (figure 12).

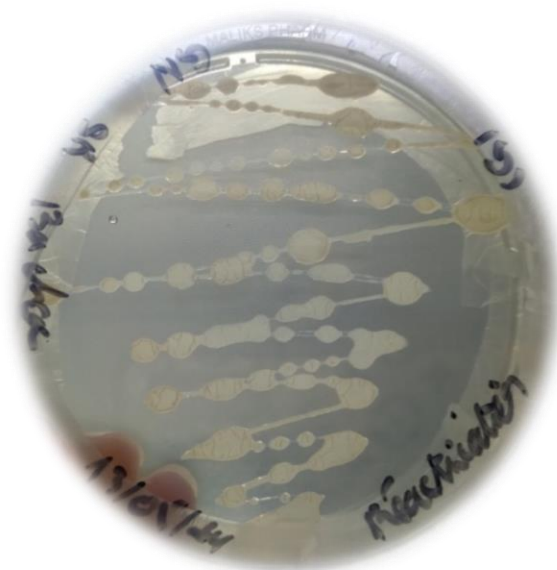


Figure 12 Aspect macroscopique de l'isolat bactérien RB2

L'isolat RB4 présentait des colonies irrégulières, plates et ondulées. Leur texture était plane, avec des bords parfois irréguliers, et la coloration des colonies allaient du blanc au crème (figure 13).

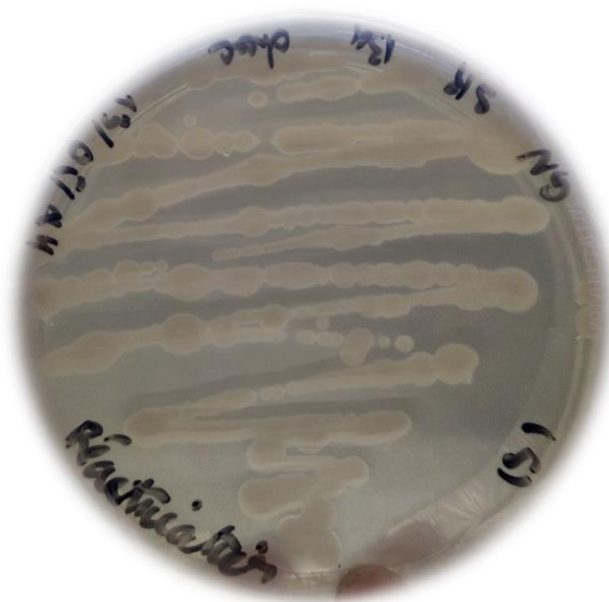


Figure 13 Aspect macroscopique de l'isolat bactérien RB4

Les sept isolats bactériens ont montré une vitesse de développement rapide, avec des colonies visibles dès les premières 24 heures d'incubation sur GN.

✓ *Isolats fongiques*

Les caractéristiques macroscopiques des différents isolats fongiques ont été analysées sur le milieu PDA, couramment utilisé à cet effet (Botton, 1990). Cette étude portait sur l'aspect du mycélium des isolats, la couleur de leur surface et de leur revers, ainsi que la présence ou l'absence de pigments spécifiques à chaque isolat. L'examen morphologique des isolats fongiques en développement sur milieu PDA a révélé les observations suivantes:

La colonie de l'isolat RM4 affiche une croissance rapide et une texture cotonneuse ou floconneuse. Sa couleur peut varier, mais elle se situe généralement dans des tons allant du blanc au rose pâle. De plus, certains isolats peuvent produire des pigments roses, rouges ou violets, visibles soit sur la colonie elle-même, soit dans le milieu de culture (figure 14).

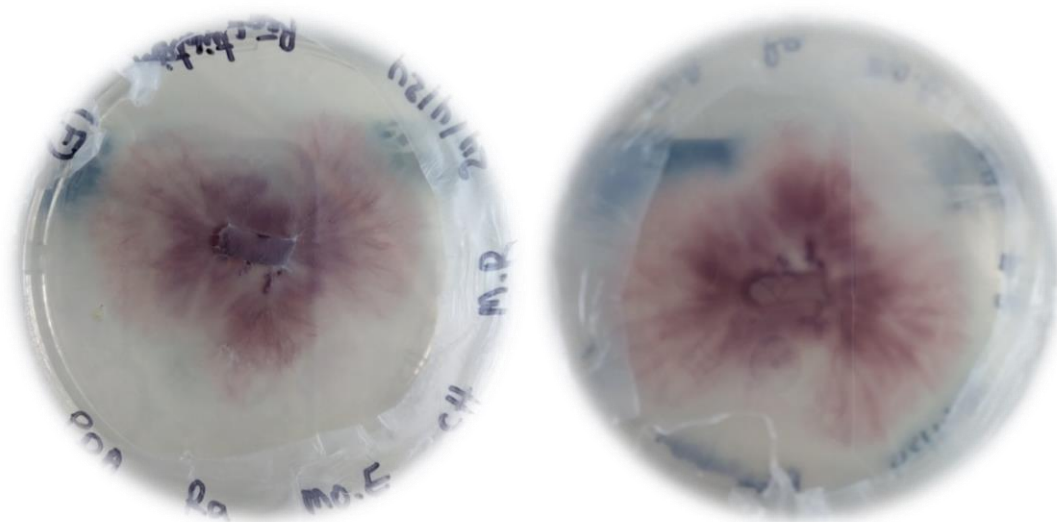


Figure 14 Aspect macroscopique de l'isolat fongique RM4 (recto, verso) sur gélose PDA

La colonie de l'isolat RM6 augmente rapidement. La structure de la colonie peut être soit duveteuse soit poudreuse. La couleur RM6 de la colonie de l'isolat RM4 tend généralement vers le jaune pâle à jaune crème, bien que cette couleur puisse varier selon les conditions de culture. Une caractéristique notable est la présence d'une poudre de spores de teinte verdâtre à jaune clair sur la surface de la colonie (figure 15).

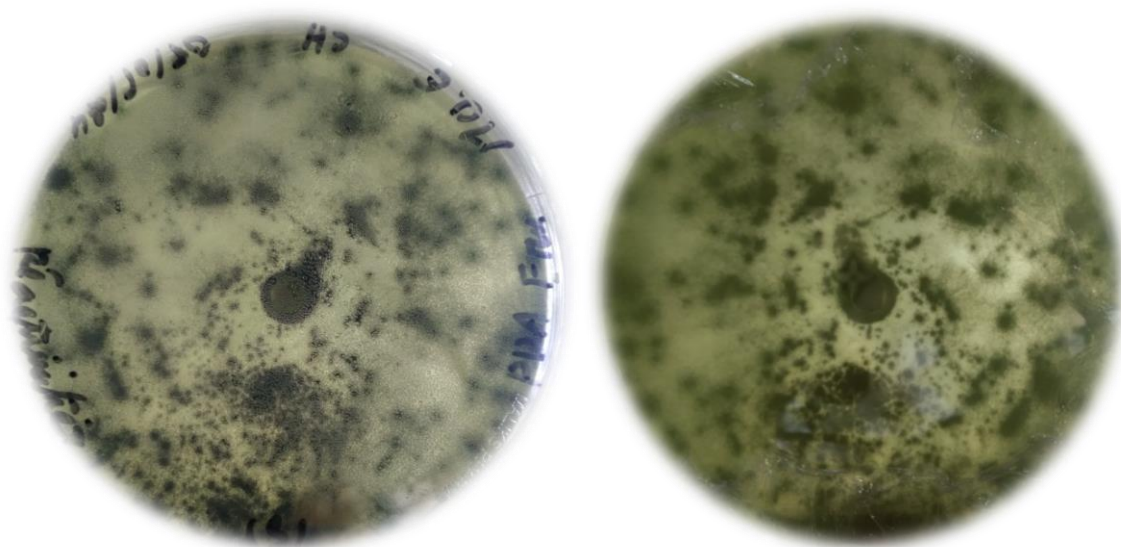


Figure 15 Aspect macroscopique de l'isolat fongique RM6 (recto, verso) sur gélose PDA

La colonie de l'isolat RM2 affiche une croissance très rapide et une texture cotonneuse ou floconneuse. Sa couleur au recto blanche-grisâtre au verso marron au centre crème à la périphérie (figure 16).

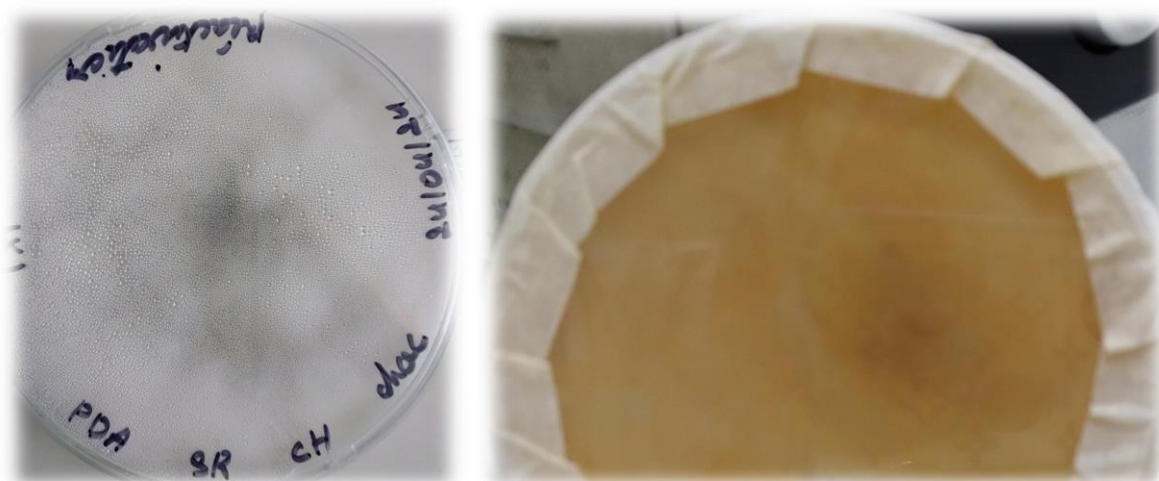


Figure 16 Aspect macroscopique de l'isolat fongique RM2 (recto, verso) sur gélose PDA

La colonie de l'isolat RM1 affiche une croissance rapide et une texture cotonneuse et bombé. Sa couleur au recto blanche au centre et à la périphérie, au verso halo à la périphérie blanc au centre et à la périphérie (figure 17).

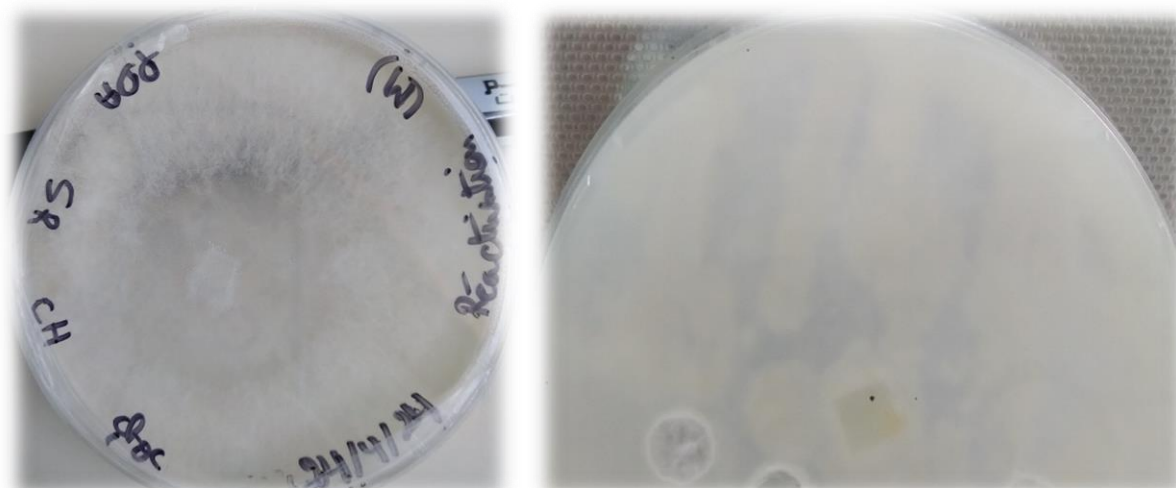


Figure 17 Aspect macroscopique de l'isolat fongique RM1 (recto, verso) sur gélose PDA

4.4.2- Observation microscopique

L'analyse microscopique se concentre sur l'observation des caractéristiques microscopiques des sept isolats bactériens (RB1, RB2, RB3, RB4, RB5, RB8 et RB9) et des quatre isolats filamenteux (RM1, RM2, RM4 et RM6), notamment la mobilité, la taille, la configuration groupée et le type de paroi pour les bactéries, ainsi que le type de mycélium, les conidies et les conidiophores pour les moisissures.

✓ *Isolats bactériens*

L'examen microscopique des isolats bactériens est réalisé en utilisant la coloration de Gram à des grossissements de 40X et 100X. Les résultats suggèrent que les isolats appartiennent au genre *Bacillus*, bien qu'une analyse plus détaillée soit nécessaire pour parvenir à une identification précise jusqu'au niveau de l'espèce. L'observation microscopique de sept isolats bactériens (RB1, RB2, RB3, RB4, RB5, RB8 et RB9) a mis en évidence la présence de bacilles présentant des tailles variables.

Les observations microscopiques de l'isolat bactérien RB1 ont révélé la présence de bacilles de petite taille, qui étaient généralement plus minces et plus courts que la normale. Lors de la coloration de Gram, ces bacilles ont été classés comme des bacilles Gram positifs, ce qui indique qu'ils ont été teints en violet (figure 18).

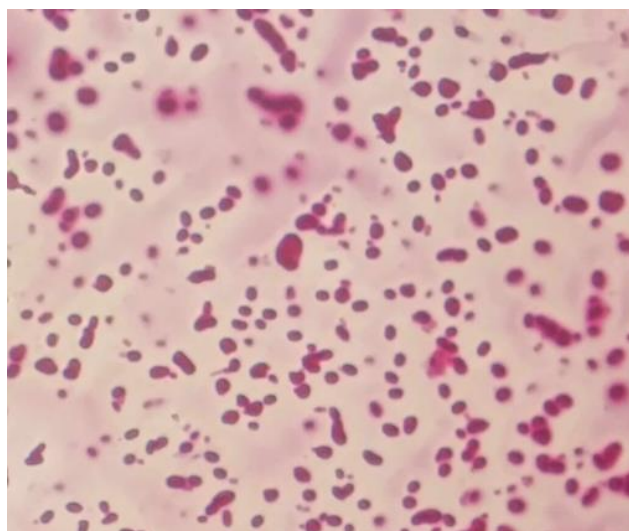


Figure 18 Observation microscopique de l'isolat bactérien RB1 par l'utilisation de coloration de Gram (GX40).

L'isolat bactérien RB2 se caractérisait par la présence de bacilles de taille moyenne, qui étaient longs que ceux de la souche RB1. Lors de la coloration de Gram, ces bacilles ont été identifiés comme étant des bacilles Gram positifs, avec une coloration en violet foncé (figure 19)

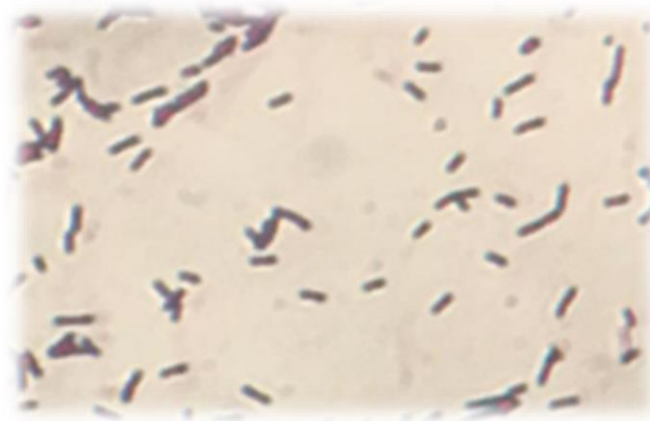


Figure 19 Observation microscopique de l'isolat bactérien RB2 par l'utilisation de coloration de Gram (GX40).

L'isolat bactérien RB3 se caractérisait par la présence de bacilles de petite taille. Lors de la coloration de Gram, ces bacilles ont été identifiés comme étant des bacilles Gram positifs, avec une coloration en violet foncé (figure 20)



Figure 20 Observation microscopique de l'isolat bactérien RB3 par l'utilisation de coloration de Gram (GX40).

L'isolat bactérien RB4 se caractérisait par la présence de bacilles de taille moyenne à grande, qui étaient plus longs que ceux de la souche RB3. Lors de la coloration de Gram, ces bacilles ont été

identifiés comme étant des bacilles Gram positifs, avec une coloration en violet foncé ou bleu-violet (figure 21).

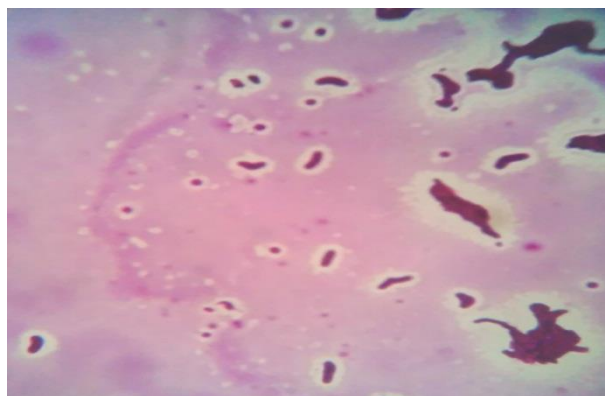


Figure 21 Observation microscopique de l'isolat bactérien RB4 par l'utilisation de coloration de Gram (GX40).

Les observations microscopiques de l'isolat bactérien RB9 ont révélé la présence de bacilles de petite taille, qui étaient généralement plus minces et plus courts que la normale. Lors de la coloration de Gram, ces bacilles ont été classés comme des bacilles Gram positifs, ce qui indique qu'ils ont été teints en violet (figure 22).



Figure 22 Observation microscopique de l'isolat bactérien RB9 par l'utilisation de coloration de Gram (GX40).

L'isolat bactérien RB5 se caractérisait par la présence de bacilles de taille moyenne à grande. Lors de la coloration de Gram, ces bacilles ont été identifiés comme étant des bacilles Gram positifs, avec une coloration en violet foncé ou bleu-violet (figure 23).



Figure 23 Observation microscopique de l'isolat bactérien RB5 par l'utilisation de coloration de Gram (GX40).

L'isolat bactérien RB8 se caractérisait par la présence de bacilles de taille moyenne à grande, qui étaient court que ceux de la souche RB5. Lors de la coloration de Gram, ces bacilles ont été identifiés comme étant des bacilles Gram positifs, avec une coloration en violet foncé (figure 24).

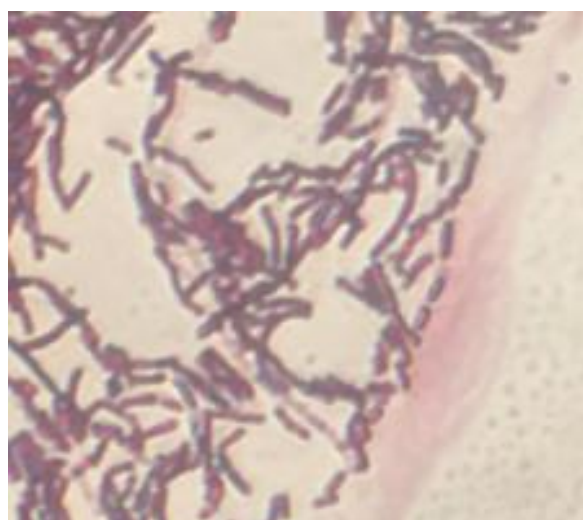


Figure 24 Observation microscopique de l'isolat bactérien RB8 par l'utilisation de coloration de Gram (GX40).

✓ *Isolats fongiques*

Les moisissures (RM1), (RM2), (RM4), (RM6) ont été examinées au microscope pour identifier leurs caractéristiques microscopiques, telles que la structure du mycélium, la forme de spores ou conidies, ainsi que la morphologie des organes de fructification. Les observations microscopiques ont permis de dégager les propriétés suivantes de moisissures :

L'isolat RM1 présentait un mycélium cloisonné, conidiophore simple et court, les microconidies nombreuses, ovoïdes ou claviformes, Les phialides (monophialides) sont longs et fins (figure 25).

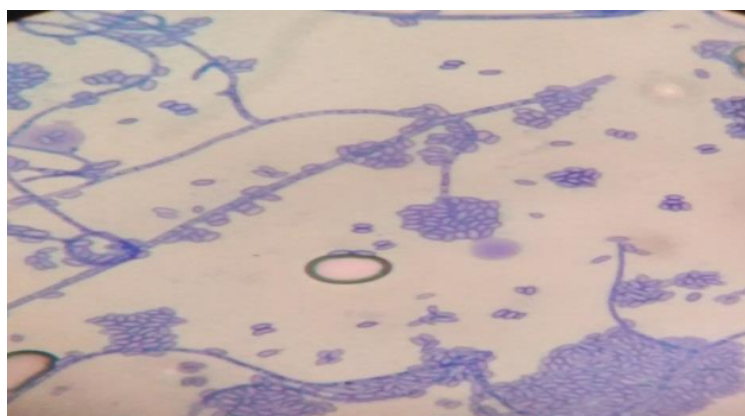
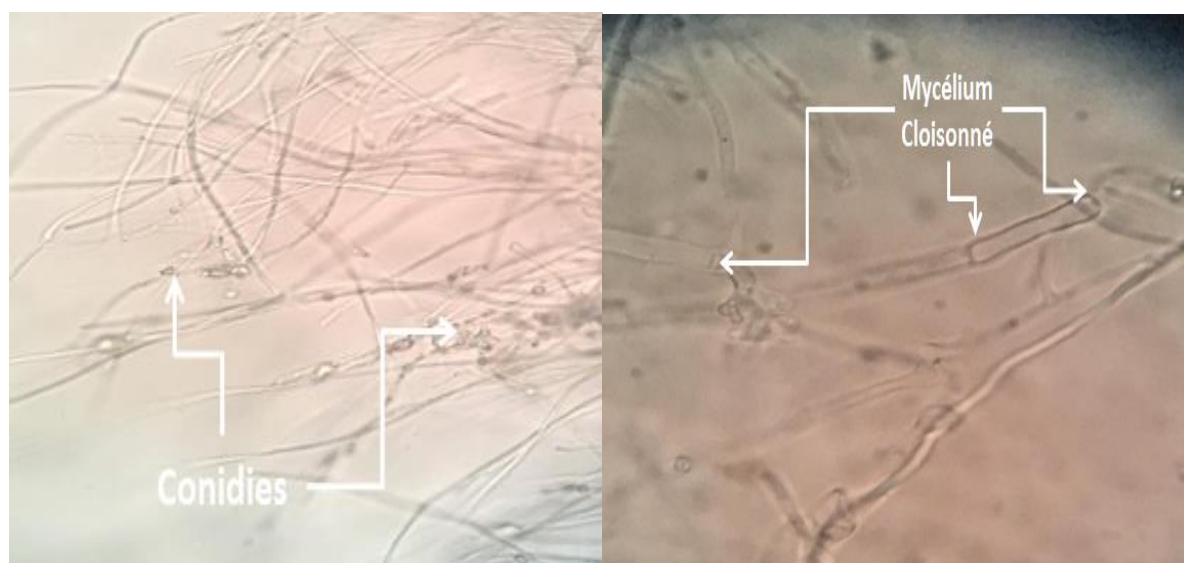


Figure 25 Aspect microscopique de l'isolat filamenteux RM1 (X40).

L'isolat RM2 présentait un mycélium cloisonné, macroconidies libres, des microconidies ovales et sphériques abondantes libres, absence de chlamydospores, des phialides longues (monophialides cylindriques) (figure 26).

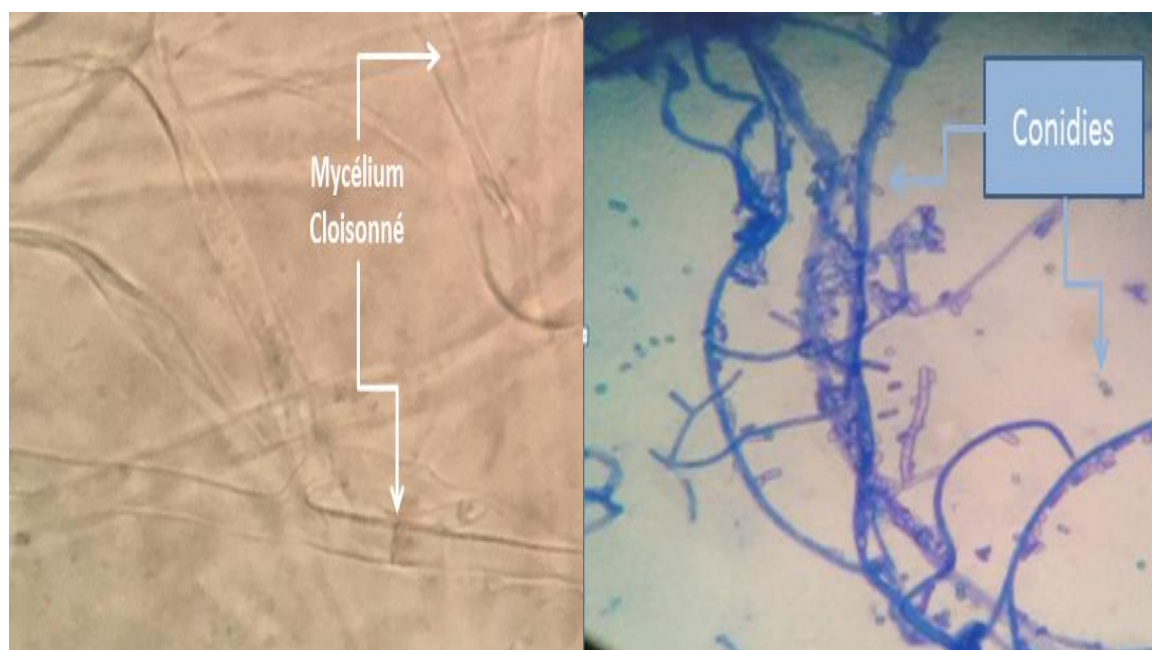
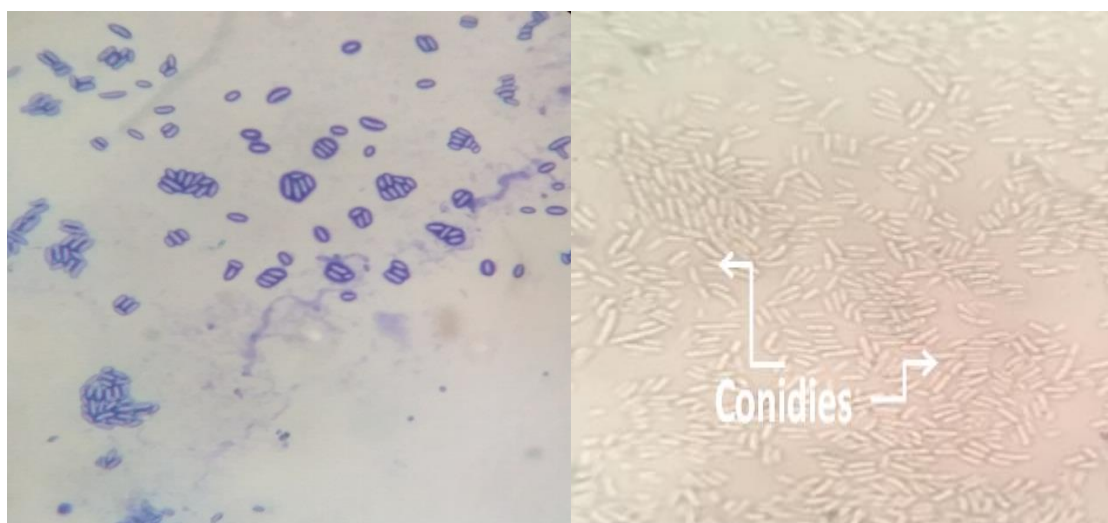


Figure 26 Aspect microscopique de l'isolat filamenteux RM2 (X40).

L'isolat RM4 présentait des hyphes fins, ramifiés et septés qui formaient un réseau dense dans le substrat. Des conidiospores allongées et légèrement courbées, dotées d'extrémités pointues, étaient également observées, regroupées en grappes ou en chaînes le long des conidiophores (figure 27).



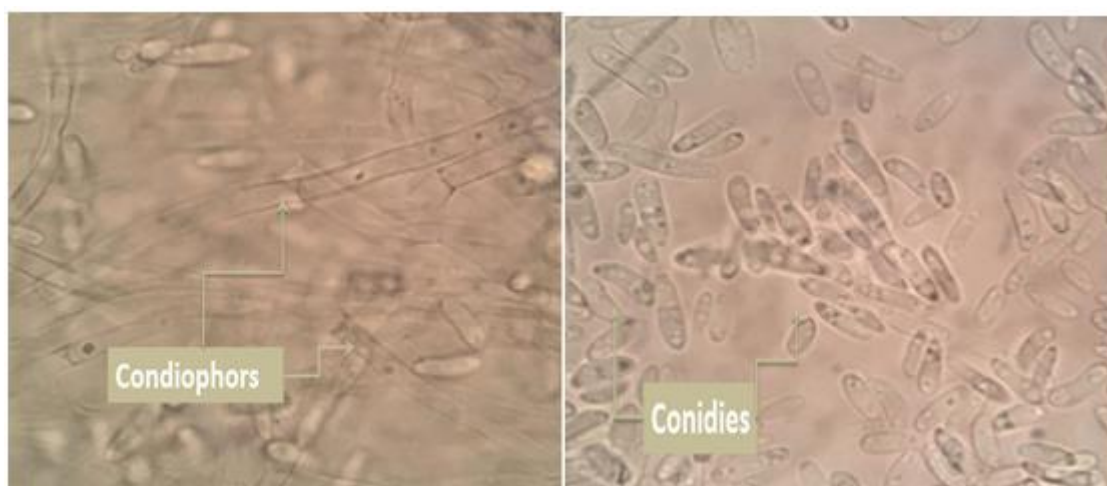


Figure 27 Aspect microscopique de l'isolat filamenteux RM4 (X40).

L'isolat RM6 a montré la présence de thalle a mycélium cloisonné portant de nombreux conidiophores non ramifiés, terminés en vésicules; des phialides portées par des métules insérées sur la partie supérieure de la vésicule; des têtes conidienne rayonnante, les conidies en chaînes unicellulaires (figure 28).

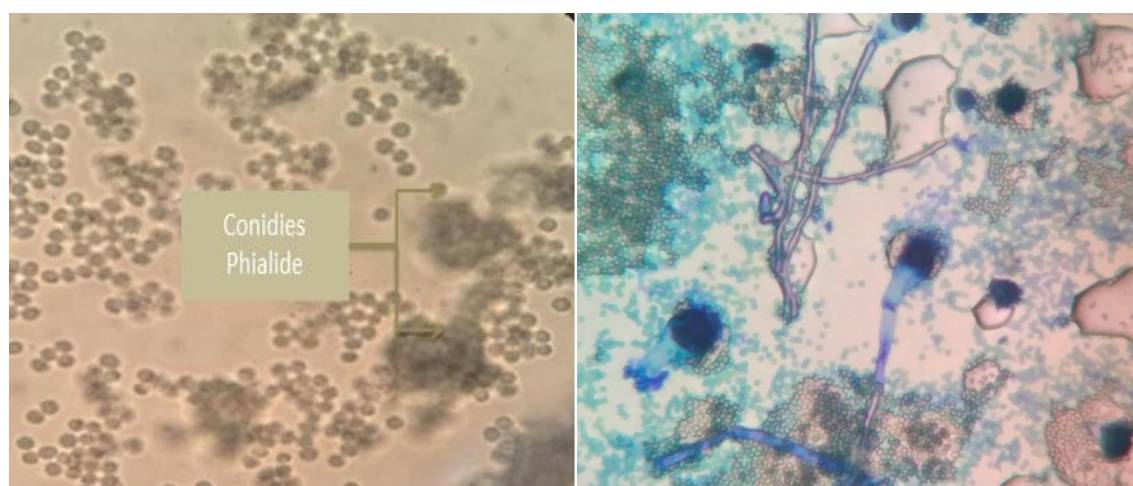


Figure 28 Aspect microscopique de l'isolat filamenteux RM6 (X40).

Les résultats des observations macroscopiques et microscopiques ont montré que les isolats filamenteux ont été identifiés comme suit : *Aspergillus sp* (RM6), *Fusarium sp1*(RM1), *Fusarium sp 2* (RM2), *Fusarium sp 3* (RM4).

4.5- Les tests biochimiques

✓ Recherche du nitrate réductase

Ce test montre que les isolats RB2, RB3, RB4 et RB5, RB8 sont positifs pour la réduction de nitrates (NO_3^-) en nitrites (NO_2^-), sans exception (figure 29). Seules deux souches RB1 et RB9 n'ont pas montré de coloration rose, et après l'ajout de poudre de zinc, la couleur n'a pas changé, indiquant que les nitrates ont été réduits en azote gazeux.



Figure 29 résultats positifs de nitrate réductase

✓ Test de l'oxydase

Le résultat de ce test montre que les isolats bactériens RB1, RB2, RB3, RB4 et RB5, RB8, RB9 sont oxydase positive (figure 30).

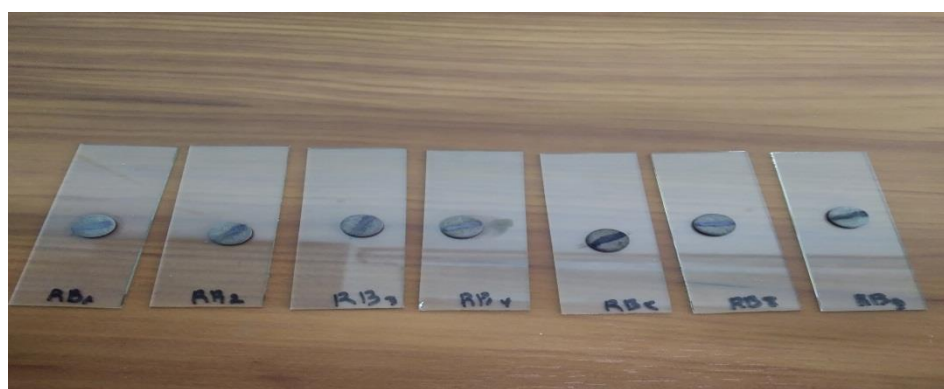


Figure 30 résultats positifs de test d'oxydase

✓ **Test de la catalase**

Les isolats bactériens testés RB1, RB3, RB4 et RB5, RB9 montrèrent une réaction positive au test de catalase, confirmant ainsi la présence de l'enzyme catalase (figure 31) et RB2, RB8 montrèrent une réaction négative, confirmant l'absence de l'enzyme catalase.

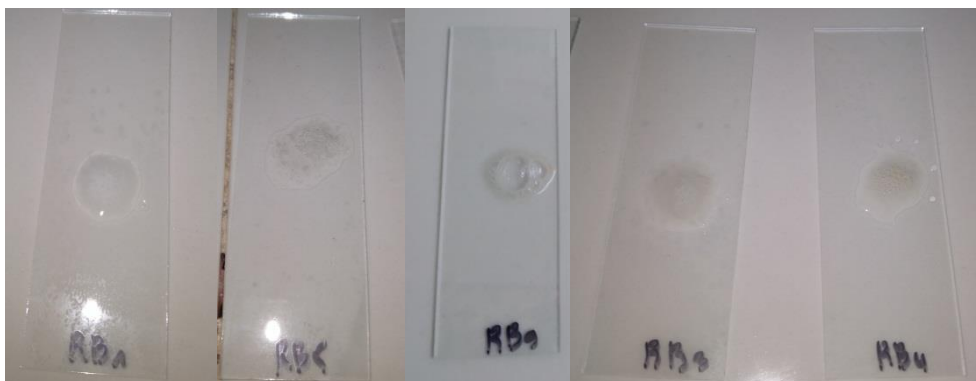


Figure 31 résultats positifs du test de catalase.

✓ **Test de Mannitol mobilité**

L'isolat bactérien RB4 montre un résultat positif indiquant qu'il y a une acidification du milieu, et la bactérie est mobile. Cependant, les isolats RB1, RB2, RB3, RB5, RB8 et RB9 ont montré un résultat négatif (figure 32).

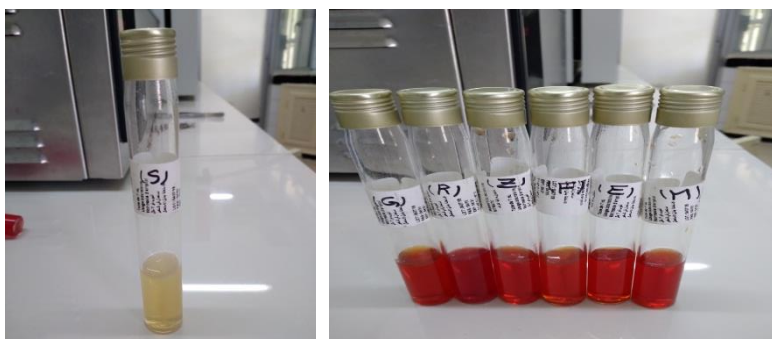


Figure 32 Test de mannitol mobilité, à gauche : positif. À droite : résultat négatif.

Les résultats obtenus à partir des observations macroscopiques, microscopiques et des tests biochimiques laissent prédire que les isolats bactériens appartiennent, éventuellement, au genre *Bacillus*. En fait, RB1 a été désigné comme *Bacillus* sp. 1, RB2 (*Bacillus* sp. 2), RB3 (*Bacillus* sp. 3), RB4 (*Bacillus* sp. 4), RB5 (*Bacillus* sp. 5), RB8 (*Bacillus* sp. 8), et RB9 (*Bacillus* sp. 9).

Cette efficacité laisse entrevoir la possibilité d'utiliser ces microorganismes dans la lutte biologique contre les agents pathogènes.

4.6- Détection des enzymes

Les tests enzymatiques ont été effectués afin d'évaluer la capacité de la souche obtenue à produire les enzymes requises pour dégrader la paroi cellulaire des bactéries et des champignons, notamment protéase, lipase et l'amylase.

✓ Test de l'activité lipolytique

Le résultat de ce test montre que les bactéries obtenues sont incapable de produire la lipase.

✓ Test de l'activité protéolytique

Les résultats de ce test montrent que les bactéries obtenues sont capable de produire la protéase. Cette conclusion est appuyée par l'observation d'un halo clair autour de disques. Ce halo est un indicateur de la dégradation de protéine par l'enzyme protéase produite par les bactéries.

✓ Test de l'activité amylolytique

Les résultats du test d'activité amylolytique ont été positifs pour les *Bacillus* sp 1 (RB1), *Bacillus* sp 2, *Bacillus* sp 3, *Bacillus* sp 4, *Bacillus* sp 5, *Bacillus* sp 8, *Bacillus* sp 9. L'observation a révélé que ces bactéries avaient la capacité de produire et de libérer une amylase active. En conséquence, il a été remarqué une dégradation de l'amidon dans le milieu de culture, illustrée par la présence d'un halo clair autour de disques.

4.7- Tolérance à la température

Les sept souches bactériennes *Bacillus* sp 1, *Bacillus* sp 2, *Bacillus* sp 3, *Bacillus* sp 4, *Bacillus* sp 5, *Bacillus* sp 8, *Bacillus* sp 9, ont pu survivre et se développer efficacement à 45°C et 50°C. Les isolats n'ont pas montré de développement à 55°C, indiquant une sensibilité élevée à cette température élevée.

L'isolat RM6 identifié comme *Aspergillus fumigatus*, a été soumis à des tests de tolérance à différentes températures. Les résultats ont montré que RM6 a été capable de se développer à une température de 45°C et 50°C.

4.8- Fermentation

La quantité de biomasse obtenue à la fin de fermentation sur différents milieux par la souche *Bacillus* sp1 sont comprises entre 0,6 et 1 nm. On constate que la biomasse la plus importante a été obtenue par le milieu alternatif à base d'azola (MAZ) valeurs au bout de 72h d'incubation, par contre les valeurs minimales ont été obtenues par le milieu optimum (MO) (Figure 33).

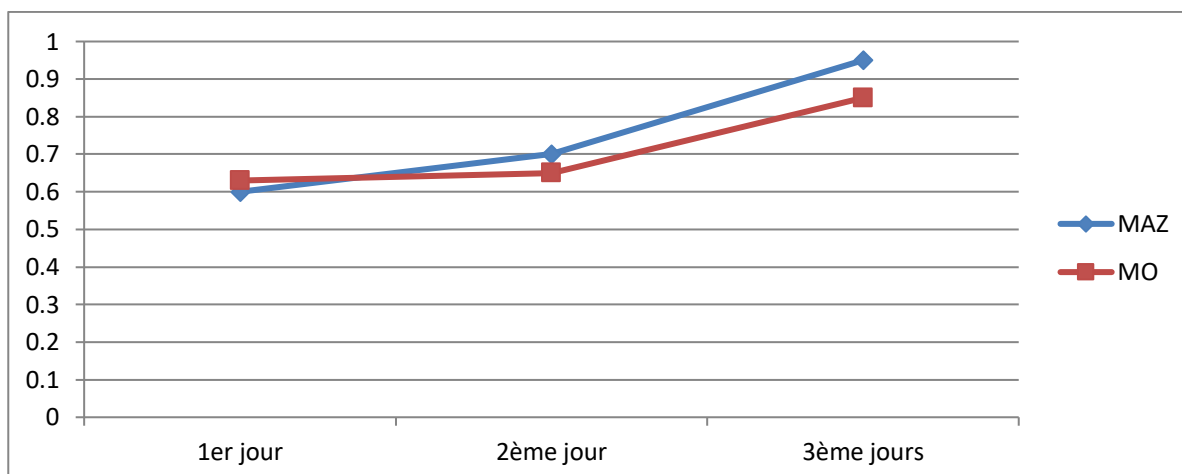


Figure 33 les courbes de croissances de la souche *Bacillus* sp4 sur différents milieux de culture (optimum : MO et milieu alternatif à base d'azola : MAZ) pendant 72 heures d'incubation à 30°C.

Les cultures ont été filtrées chaque jour au cours de fermentation afin de séparer la biomasse et les autres composants du milieu de culture. La densité des milieux a été mesurée par spectrophotomètre, et qui donne les valeurs suivantes (figure 34).

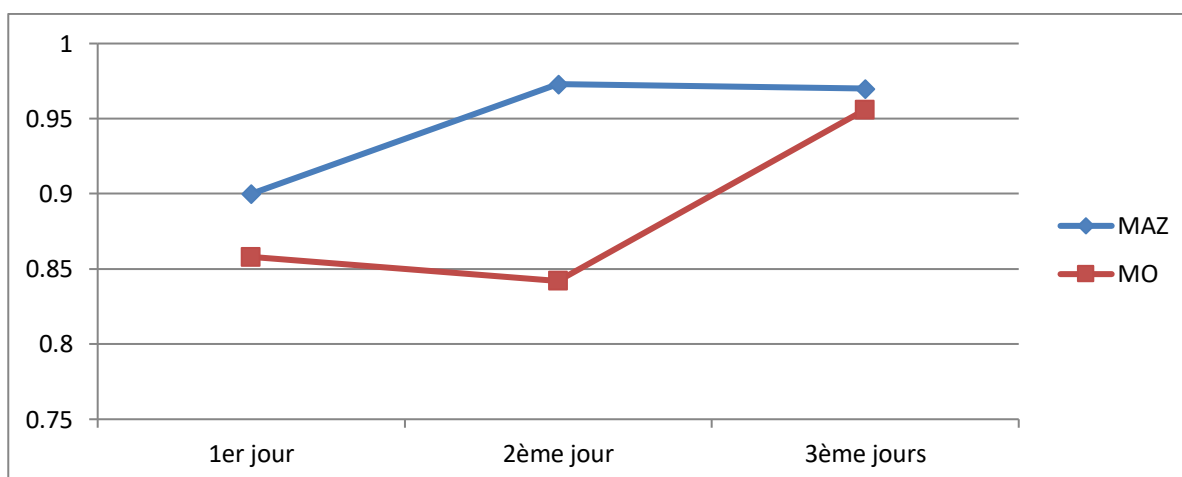


Figure 34 la courbe de production des métabolites de la souche *Bacillus* sp4 sur différents milieux de culture (optimum : MO et milieu alternatif à base d'azola : MAZ) pendant 72heures d'incubation à 30°C.

4.9- Conservation

4.9.1- Conservation sur gélose incliné

Les souches bactériennes sélectionnées ont été placées dans des tubes contenant la gélose inclinée pour une conservation à long terme. Elles ont été réparties uniformément sur la surface de milieu, puis incubées dans des conditions adaptées pendant 24 heures avant d'être stockées à une température de -20°C.

4.9.2- Conservation sur glycérol

Les souches antagonistes ont été conservées dans une solution contenant 70% d'eau distillé et 30% de Glycérol, puis on les a mis au réfrigérateur.

4.9.3- Lyophilisation

Après avoir cultivé les souches sélectionnées et terminé la fermentation, nous avons séparé la biomasse du milieu de culture. La biomasse a été récupérée en utilisant un papier filtre, puis elle a été soumise à un processus de lyophilisation. De même, le filtrat résultant de la fermentation a également été lyophilisé pour préserver les métabolites extracellulaires produits par les souches bactériennes.

La lyophilisation a été réalisée dans un lyophilisateur, où les échantillons ont été exposés à une température et une pression appropriées pour sublimer l'eau présente. Une fois ce processus terminé, les échantillons ont été stockés dans des flacons hermétiques à température ambiante.

Discussion

5- Discussion

Depuis des millénaires, les populations du monde entier se tournent vers les plantes médicinales pour soigner divers maux et promouvoir la santé. Leur utilisation remonte à l'Antiquité et persiste jusqu'à nos jours. Malgré les progrès de la médecine moderne, l'intérêt pour les plantes médicinales ne cesse de croître, offrant une alternative naturelle aux médicaments synthétiques (Vuorelaa *et al.*, 2004).

Autrefois, *Asphodelus microcarpus* était abondamment utilisée dans la pharmacopée traditionnelle, considérée comme un remède précieux. Elle était prisée pour ses propriétés émoullientes cutanées et adoucissantes, ainsi que pour son utilisation dans le traitement des maladies pulmonaires (Loi *et al.*, 2005). Les racines étaient spécifiquement utilisées pour traiter l'anémie et le diabète (El Alami *et al.*, 2016).

En phytothérapie algérienne, *A. microcarpus* est employée dans le traitement des otites, comme un calmant dentaire, un diurétique et pour soulager les symptômes du rhumatisme (Sarri *et al.*, 2014). De plus, les tubercules souterrains sont utilisés pour traiter les taches blanches sur la peau, tandis que leurs extraits méthanoliques sont recommandés pour le traitement des ulcères (Razik *et al.*, 2016).

Nous avons identifié un total de 19 micro-organismes à partir des échantillons de plantes *Asphodelus microcarpus*, nous avons récupéré 11 isolats microbiens.

L'étude de la caractérisation des bactéries du genre *Bacillus*, visant à évaluer leur capacité de promotion et de protection de plantes, a été menée *in vitro* et *in situ* sur des souches isolées de la rhizosphère et les endophytes (Beneduzi *et al.*, 2008). L'analyse morphologique des isolats bactériens démontrant un effet sur les agents pathogènes, a révélé les caractéristiques suivantes : des colonies de taille moyenne, une forme irrégulière, une couleur crémeuse et une texture muqueuse. En comparant avec les résultats de Youcef Ali (2014), on remarque que les caractéristiques macroscopiques sont presque identiques. L'observation microscopique à l'état frais a montré que les bactéries sont mobiles et présentent une forme de petits bacilles, en accord avec les résultats de Youcef Ali (2014) et Milet (2017). La coloration de Gram des isolats a révélé la présence de bacilles à Gram positif (G+). Les tests préliminaires d'identification morphologique et physiologique des isolats sélectionnés ont confirmé son appartenance au genre *Bacillus*.

Les isolats filamenteux RM1, RM2, RM4 présentent les caractéristiques typiques de *Fusarium*, avec une croissance rapide et une texture cotonneuse ou floconneuse. La couleur de la colonie peut varier, mais elle tend généralement vers des tons de blanc à rose pâle. Une particularité distinctive de *Fusarium* est la production de pigments. Certains isolats peuvent afficher une pigmentation rose, rouge ou violette, visible à la fois sur la colonie et dans le milieu de culture. Ces observations concordent avec les descriptions de (Larone 1995) et (Nelson *et al.*, 1994).

L'isolat RM6 démontre une croissance rapide et présente les caractéristiques typiques d'*Aspergillus*. La texture de sa colonie peut être duveteuse ou poudreuse. Sa couleur varie généralement du jaune pâle au jaune crème, bien que cette teinte puisse changer en fonction des conditions de culture, allant parfois du vert clair au jaune verdâtre. Ces observations sont en accord avec les descriptions fournies par (Barbès gaard *et al.*, 1992) et (Klich & Pitt 1988).

La souche de *Bacillus* présente une activité protéolytique, ce qui se manifeste par la détection de zones d'hydrolyse sur un milieu contenant de la protéase. Ce résultat positif est cohérent avec les études antérieures menées sur des souches similaires telles que *Bacillus mojavensis* et *Bacillus subtilis*, comme décrit par Ait kaki *et al.* (2013). De plus, la confirmation de ce test positif par d'autres études, telles que celles menées par Ayantnij *et al.* (2020) et Nanuny *et al.* (2021), renforce encore cette conclusion.

L'amylase est également testée, et dans notre étude, un résultat positif est obtenu, illustré par la présence d'une zone de lyse ou d'un halo, indiquant une dégradation, en accord avec les conclusions de (Marwan *et al.*, 2020).

Enfin, l'activité lipasique est évaluée, avec des résultats positifs selon (Saba Shamin *et al.*, 2020), confirmant nos propres observations de lipase positive. Les sept souches de bactéries isolées et sélectionnées ont démontré une tolérance thermique adéquate à des températures plus élevées de 45°C, la croissance des souches a été réduite, bien qu'elles aient pu néanmoins survivre et se développer. À une température encore plus élevée de 50°C, la croissance des souches a été limitée, mais elles ont démontré une certaine capacité à tolérer cette température élevée pendant une certaine période.

Ces résultats suggèrent que les souches examinées pourraient être considérées comme des bactéries thermophiles selon Barton (2005), ce qui signifie qu'elles sont capables de survivre et de se développer dans des environnements où les températures sont élevées.

Dans notre étude, nous avons réalisé la production de biomasse et de métabolites dans des fioles d'Erlenmeyer. De nombreuses recherches antérieures ont examiné l'effet de la composition du milieu de culture sur ces processus, notamment sur la biomasse et les métabolites (Akpa, 2001). Nous avons choisi de nous concentrer sur le milieu optimum, largement reconnu comme référence pour la production de biomasse de *Bacillus* et de métabolites. Nous l'avons comparé à un milieu alternatif à base d'*Azolla*, réputé pour sa richesse en protéines (19-30%) (Hasan *et al.*, 2009) et en minéraux (10-20%), pouvant servir de source de macro et de microéléments essentiels au métabolisme bactérien, tels que le sodium, le potassium, le calcium, le fer, le manganèse et le cuivre (Feedipedia, 2015).

Conclusion et perspectives

6- Conclusion et perspectives

En conclusion, cette étude souligne le potentiel de microorganismes endophytes et de la rhizosphère issus « *d'Asphodelus microcarpus* » en tant que sources de microorganismes présentant une activité antibactérienne contre diverses souches pathogènes. Les résultats ont mis en évidence une activité significative contre des bactéries telles que : *Escherichia coli*, *Pseudomonas*, *Staphylococcus*, *Salmonella*, *Bacillus*, et *Candida albicans*.

Ces découvertes ouvrent de nouvelles perspectives dans la recherche sur les agents antibactériens naturels. Les microorganismes endophytes et de la rhizosphère méritent d'être étudiés plus avant pour isoler et caractériser les composés actifs responsables de leur activité antibactérienne. Ces composés pourraient ensuite être exploités dans le développement de nouveaux médicaments ou agents antimicrobiens pour lutter contre les infections bactériennes.

De plus, il serait intéressant de poursuivre les recherches pour mieux comprendre le potentiel métabolique de ces microorganismes et pour identifier d'autres activités biologiques bénéfiques, comme leur capacité antifongique ou antivirale.

Enfin, l'optimisation des techniques de fermentation et de production de métabolites extracellulaires pourrait améliorer le rendement et la stabilité des composés antibactériens. Cela pourrait impliquer l'optimisation des conditions de culture, des paramètres de fermentation et des méthodes d'extraction.

En conclusion, cette étude met en lumière l'importance des microorganismes endophytes et de la rhizosphère en tant que réservoirs prometteurs de microorganismes et de métabolites présentant un potentiel antibactérien. L'exploration continue de ces ressources naturelles pourrait conduire à la découverte d'agents antibactériens efficaces et contribuer à la lutte contre les infections bactériennes résistantes aux antibiotiques.

Abstract

7- Abstract

This study focuses on the isolation, identification and selection of endophytic and rhizospheric microorganisms from *Asphodelus microcarpus* from the Tafrant region (Constantine). Indeed, the main objective of our work is to evaluate the antimicrobial activity of these microorganisms against 5 pathogenic bacteria such as *Staphylococcus aureus*, *Bacillus*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas*, *Salmonella* and *Candida albicans* yeast. Microorganisms were isolated from selected plants using specific isolation techniques, resulting in 9 bacterial isolates and 10 filamentous isolates. These isolates were then tested for their antagonistic activity against the mentioned pathogenic strains. The results showed inhibition values varying from 1.3 to 2.3 cm depending on the isolate. In particular, the bacterial isolates *Bacillus sp 1*, *Bacillus sp2* and *Bacillus sp 3* and the filamentous isolates *Fusarium sp 2* and *Aspergillus sp 6* showed the best inhibitory effects on Gram-positive and Gram-negative bacteria.

The bacterial isolates *Bacillus sp 4*, *Bacillus sp 5*, *Bacillus sp 8* and *Bacillus sp 9*, as well as the filamentous isolates *Fusarium sp 1* and *Fusarium sp 4* showed a less pronounced antagonistic effect on the two types of bacterial strains tested, with values inhibition varying between 1.2 and 1.6 cm. Then, isolates demonstrating promising antibacterial activity were identified using macroscopic and microscopic examinations, as well as biochemical tests. Seven bacterial strains of the *Bacillus* genus, namely: *Bacillus sp 1*, *Bacillus sp 2*, *Bacillus sp 3*, *Bacillus sp 4*, *Bacillus sp 5*, *Bacillus sp 8* and *Bacillus sp9* and four species of mold *Fusarium sp 1*, *Fusarium sp 2*, *Fusarium sp 4*, and *Aspergillus sp 6* were identified. Enzymatic tests revealed that the *Bacillus sp 4* strain was capable of producing protease and amylase and unable to produce lipase. Temperature tolerance showed that *Aspergillus* could grow at 45°C and 50°C, while all seven *Bacillus* bacterial strains were tolerant at 45°C and 50°C. Shake flask fermentation for 72 hours was carried out to produce extracellular metabolites. These metabolites were filtered and tested for their antagonistic effect against the pathogenic strains mentioned. The results showed that the extracellular metabolites secreted by *Bacillus sp 4* and had a significant inhibitory effect on *E. coli* and *Pseudomonas*, *Candida albicans*, *Staphylococcus*, *Bacillus*, *Salmonella*. This study highlights the potential of endophytic microorganisms and the rhizosphere of *Asphodelus microcarpus* as sources of microorganisms exhibiting antimicrobial activity against pathogenic strains. To preserve the biomass after fermentation, the selected strains were freeze-dried and transformed into powder using a freeze dryer.

Keywords: *Asphodelus microcarpus*, *Bacillus sp*, *Fusarium sp*, *Aspergillus sp*, rhizosphere, endophytic microorganisms, antimicrobial activity.

ملخص

8-الملخص

تركز هذه الدراسة على عزل وتحديد واختيار الكائنات الحية الدقيقة الداخلية والجذرية من *Asphodelus microcarpus* من منطقة تافرانة (قسنطينة). في الواقع، الهدف الرئيسي من عملنا هو تقييم النشاط المضاد للميكروبات لهذه الكائنات الحية الدقيقة ضد 5 أنواع من البكتيريا المسببة للأمراض مثل *Staphylococcus aureus*, *Bacillus*, *Escherichia*, *Pseudomonas*, *Salmonella*, *Candida albicans*.

تم عزل الكائنات الحية الدقيقة من نباتات مختارة باستخدام تقنيات عزل محددة، مما أدى إلى الحصول على 9 عزلات بكتيرية و10 عزلات خيطية. ثم تم اختبار هذه العزلات لمعرفة نشاطها التضادي ضد السلالات المسببة للأمراض المذكورة. أظهرت النتائج أن قيم التثبيط تراوحت من 1.3 إلى 2.3 سم حسب العزلة. وعلى وجه الخصوص، أظهرت العزلات البكتيرية *Bacillus sp 1* و *Bacillus sp 2* و *Bacillus sp 3* والعزلات الخيطية *Fusarium sp 2* و *Aspergillus sp 6* أفضل التأثيرات المثبطة على البكتيريا إيجابية الجرام وسالبة الجرام.

أظهرت العزلات البكتيرية *Bacillus sp 4* و *Bacillus sp 5* و *Bacillus sp 8* و *Bacillus sp 9* وكذلك العزلات الخيطية *Fusarium sp 1* و *Fusarium sp 4* تأثيرًا عاديًا أقل وضوحًا على نوعي السلالات البكتيرية المختبرة مع قيم تثبيط يتراوح بين 1.2 و 1.6 سم. بعد ذلك، تم تحديد العزلات التي أظهرت نشاطًا مضادًا للجراثيم باستخدام الفحوصات العيانية والمجهرية، فضلًا عن الاختبارات البيوكيميائية. سبع سلالات بكتيرية من جنس *Bacillus* وهي: *Bacillus sp 1*, *Bacillus sp 2*, *Bacillus sp 3*, *Bacillus sp 4*, *Bacillus sp 5*, *Bacillus sp 8* و *Bacillus sp 9* وأربعة أنواع من العفن *Fusarium sp 1*, *Fusarium sp 2*, *Fusarium sp 4* و *Aspergillus sp 6*. تم التعرف على *Aspergillus sp 6* و *Aspergillus sp 4*. كشفت الاختبارات الأنزيمية أن سلالة *Bacillus sp 4* كانت قادرة على إنتاج البروتيز والأميليز وغير قادرة على إنتاج الليباز. أظهر تحمل درجة الحرارة أن *Aspergillus sp 6* يمكن أن تنمو عند 45 درجة مئوية و50 درجة مئوية، في حين أن جميع سلالات البكتيريا العصوية السبعة كانت قادرة على النمو عند 45 درجة مئوية و50 درجة مئوية. تم إجراء تخمير لمدة 72 ساعة لإنتاج المستقلبات خارج الخلية. تم ترشيح هذه المستقلبات واختبار تأثيرها المضاد ضد السلالات المسببة للأمراض المذكورة. أظهرت النتائج أن المستقلبات خارج الخلية التي تفرزها *Bacillus sp 4* كان لها تأثير تثبيطي معنوي على *Staphylococcus aureus*, *Bacillus*, *Escherichia*, *Pseudomonas*, *Salmonella*, *Candida albicans*. تسلط هذه الدراسة الضوء على إمكانات الكائنات الحية الدقيقة الداخلية وجذور *Asphodelus microcarpus* كمصادر للكائنات الحية الدقيقة التي تظهر نشاطًا مضادًا للميكروبات ضد السلالات المسببة للأمراض. للحفاظ على الكتلة الحيوية بعد التخمر، تم تجفيف السلالات المختارة بالتجميد وتحويلها إلى مسحوق باستخدام مجفف التجميد.

الكلمات المفتاحية: *Asphodelus microcarpus*, *Bacillus sp*, *Fusarium sp*, *Aspergillus sp*، الجذور، الكائنات الحية الدقيقة الداخلية، النشاط المضاد للميكروبات.

Références

- 1- Abhilash P.C and Singh N. (2009). Seasonal variation of HCH isomers in open soil and
- 2- Ait kaki A. (2013). Recherche de nouvelles potentialités de bactéries du genre *Bacillus* pour l'agriculture et l'agroalimentaire.
- 3- Akpa E., Jacques P., Wathelet B., Paquot M., Fuchs R., Budzikiewicz H and Thonart P. (2001). Influence of Culture Conditions on Lipopeptide Production by *Bacillus subtilis*. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 91-93: 1-9: 551-562.
<https://doi.org/10.1385/abab:91-93:1-9:551>.
- 4- Alyah., Debbab A., Proksch P. (2013). Fungal endophytes – secret producers of bioactive plant metabolites. *Die Pharmazie - An International Journal of Pharmaceutical Sciences* 68: 499-505. <https://doi.org/10.1691/ph.2013.6517>
- 5- Anoua B., Jaillard B., Ruiz J., Bénet J.C et Cousin B. (1997). Couplage entre transfert de matière et réactions chimiques dans un sol. Partie 2: Application à la modélisation des transferts de matière dans la rhizosphère. *Entropie*. 33: 207.
- 6- Arivudainambi. (2011) Novel bioactive metabolites producing endophytic fungus *Colletotrichum gloeosporioides* against multidrug-resistant *Staphylococcus aureus*.
- 7- Arnold A.E. (2007). Understanding the diversity of foliar endophytic fungi: progress, challenges, and frontiers. *Fungal biology reviews*. 21: 51-66.
- 8- Ayantunji Y.J., Richard K.O., Folake O., Kehinden A. (2020). Optimisation of Alkaline protease production in submerged fermentation using *Bacillus cereus* isolated from an abattoir waste water in Ile-Ife. Nigeria, p. 4-8.
- 9- Azam M.W., Khan A.U. (2019). Updates on the pathogenicity status of *Pseudomonas aeruginosa*. *Drug Discovery Today* 24: 350-359. <https://doi.org/10.1016/j.drudis.2018.07.003>
- 10- Baba Aissa F. (1991). Les plantes médicinales en Algérie Coédition Bouchème et A Diwan, p. 69.
- 11- Baldani J.I., Baldani V.L., Goi S and Dobereiner J. (1997). Recent advances in BNF with non-legume plants. *Soil Biol. Biochem.* 29: 11-22.
- 12- Barbesgaard P., Heldt-Hansen H.P., Diderichsen B. (1992). On the safety of *Aspergillus oryzae*: a review. *Appl Microbiol Biotechnol* 36: 569-572. <https://doi.org/10.1007/BF00183230>
- 13- Barea J.M., Azcón R., Azcón-Aguilar C. (2005). Interactions between mycorrhizal fungi and bacteria to improve plant nutrient cycling and soil structure. In: Buscot F., Varma A., editors. *microorganisms in Soils: Roles in Genesis and Functions*. Berlin, Heidelberg: Springer-verlag, p. 195-212.
- 14- Barnett H.L and Hunter B.B. (1998). *Illustrated genera of imperfect fungi*. American Phytopathological Society. [ISBN: 978-0890541708]

- 15- Barton L.L. (Éd.). (2005). Physiological Basis for Growth in Extreme Environments, in: Structural and Functional Relationships in Prokaryotes. Springer, New York, NY. p. 348-393. https://doi.org/10.1007/0-387-27125-2_8
- 16- Batard E., El kouri D., Potel G. (2007). Infections à *staphylocoques* : aspects cliniques et bactériologiques. Em consult edition Elsevier masson SAS. 7: 416-787.
- 17- Berche P., Gaillard J., Simonet M. (1989). Les bactéries des infections humaines. 1 :100-101-102-123-236-274.
- 18- Berendsen R.L., Pieterse C.M.J., Bakker P.H.A.M. (2012). The rhizosphere microbiome and planthealth. Trends in Plant Science. 17: 478-486. <https://doi.org/10.1016/j.tplants.2012.04.001>
- 19- Bettelheim K.A. (1994). Biochemical characteristics of *Escherichia coli*.
- 20- Bhattacharyya P.N., Goswami M.P., Bhattacharyya L.H. (2016). Perspective of beneficial microbes in agriculture under changing climatic scenarios: A review. Journal of Phytology 8: 26-41.
- 21- Botelho G and Mendonca-Hagler L. (2006). Fluorescent *Pseudomonas* associated with the rhizosphere of crops- an overview. Brazilian journal of microbiology. 37: 401-416.
- 22- Botton B., Breton A., Fevre M., Gauthier S., Guy Ph., Larpent J.Ph., Reymond P., Sanglier J.J., Vayssier V. et Veau P. (1990). Moisissures utiles et nuisibles. Importance industrielle. 2ème édition. Masson. Paris, Milan, Barcelone et Mexico, p. 512.
- 23- Botton B., Breton A., Fevre M., Gauthier S., Guy P.H., Larpent J.P., Reymond P., Sanglier J.J., Vayssier Y., Veau P. (1990). Moisissures utiles et nuisibles d'importance industrielle. 2ème édition. Masson. Collection Biotechnologies, p. 34-428.
- 24- Brewer S.C., Wunderink R.G., Jones C.B., Leeper Jr K.V. (1996). Ventilator-associated pneumonia due to *Pseudomonas aeruginosa*. Chest. 109: 1019-1029.
- 25- Bouchara J.F., Pihet M., De Gentile L et Chabasse D. (2010). Les levures et levures. Cahier de bioformation Biologie médicale. N° (44): 14-34.
- 26- Boukef K., Ghileb G.M. (1988). Contribution à l'étude des plantes utilisées en médecine traditionnelle Maghrébine. Bull. Med. Pharma 2(1) p. 47-55.
- 27- Bowen G.D and Rovira A.D. (1999). The rhizosphere and its management to improve plant growth. Advances in Agronomy. 66: 1-102.
- 28- Bustamante J.N., Mahlaoui N., Casanova J.L., Blanche S. (2011). Infections fongiques et déficits immunitaires héréditaires. Arch Pédiat. 18: S8-S14.
- 29- Clay K and Schardl C. (2002). Evolutionary origins and ecological consequences of endophyte symbiosis with grasses. The American naturalist. 160: S99-S127.
- 30- Chastre J., Trouillet J.L. (2000). Problem pathogens (*Pseudomonas aeruginosa* and *Acinetobacter*), in: Seminars in respiratory infections, p. 287-298.

- 31- Chastre J., Fagon J.Y. (2002). Ventilator-associated pneumonia. American journal of respiratory and critical care medicine. 165: 867-903.
- 32- Chimbekujwo I.B. (2000). Frequency and pathogenicity of *Fusarium wilt* (*Fusarium Solani* and *Fusarium equiseti*) of cotton (*Gossypium hirsutum*) in Adamawa, in Nigeria. Revista de Biología Tropical. 48: 01-05.
- 33- Darrah P.R. (1993). The rhizosphere and plant nutrition: a quantitative approach. Plant and Soil. 155: 1-20.
- 34- De Almeida M.N., Guimarães V.M., Falkowski D.L., Paes G.B., Ribeiro J.I., Visser E.M., Alfenas R.F., Pereira O.L., de Rezende S.T. (2014). Optimization of endoglucanase and xylanase activities from *Fusarium verticillioides* for simultaneous saccharification and fermentation of sugarcane bagasse. Applied biochemistry and biotechnology. 172: 1332-1346.
- 35- Denamur E., Clermont O., Bonacorsi S., Gordon D. (2021). The population genetics of pathogenic *Escherichia coli*. Nat Rev Microbiol. 19: 37-54.
<https://doi.org/10.1038/s41579-020-0416-x>
- De Hoog G.S., Guarro J., Gene J., Figueras M.J. (2000). Atlas of Clinical Fungi, Centraal Bureau voor Schimmelcultures. Universitat Rovira i Virgili.
- 37- De Silva N.I., Brooks S., Lumyong S., Hyde K.D. (2019). Use of endophytes as biocontrol agents. Fungal Biology Reviews. 33: 133-148.
- 38- Devaraju R and Satish S. (2011). Endophytic mycoflora of *Mirabilis jalapa* L. and studies on antimicrobial activity of its endophytic *Fusarium sp.* Asian Journal of Experimental Sciences. 2: 75-79.
- 39- De Vos P., Garrity G.M., Jones D., Krieg N.R., Ludwig W., Rainey F.A., Schleifer K.H. and Whitman W.B. (2009). Bergey's Manual of Systematic Bacteriology, 2nd ed., The Firmicute. Springer. New York. Volume 3: 63-67.
- 40- Edwards P.R., Ewing W.H. (1962). Identification of enterobacteriaceae. Identification of Enterobacteriaceae.
- 41- El marrakchi A., Tantaoui-Elaraki A., Hamama A. et Grini A. (1988). La flore microbienne du smen marocain. Flore lipolytique et caséolytique. Le lait. 68: 333-348. De Vos P., Garrity G.M., Jones D., Krieg N.R., Ludwig W., Rainey F.A., Schleifer K.
- 42- Errakhi R., Bouteau F., Lebrihi A. and Barakate M. (2007). Evidences of biological control capacities of *Streptomyces spp.* Against *Sclerotium rolfsii* responsible for damping-off disease in sugar beet (*Beta 1608 Afr. J. Microbiol. Res. vulgaris L.*). World J. Microbiol. Biotechnol. 23: 1503-1509.
- 43- Fira D., Dimkić I., Berić T., Lozo J., Stanković S. (2018). Biological control of plant pathogens by *Bacillus* species. Journal of biotechnology. 285: 44-55.
- 44- Fournier P. (1947). Livre des plantes médicinales et vénéneuses de France. Tournon, Paris, p. 79.

- 45- Gerhardt P. (1994). *Methods for General and Molecular Bacteriology*. Washington, D.C. American Society for Microbiology.
- 46- Ghileb G.M. (1987). Les plantes dans la médecine traditionnelle Maghrébine. *Dip. D'études Comp. De phytothérapie Tunis*, p. 8-14-71-78.
- 47- Ghileb G.M. (1987). Les plantes dans la médecine traditionnelle Maghrébine. *Dip. Etudes Comp. De phytothérapie, Tunis*. p. 8-78.
- 48- Giri B., Giang P.H., Kumari R., Prasad R. (2005). Microbial diversity in soils. In: Buscot F., Varma A, editors. *Microorganisms in Soils: Roles in Genesis and Functions*. Heidelberg, Germany: Springer-Verlag. p. 195-212.
- 49- Gobat J.M.; Aragno M and Matthey W. (2003). *Le sol vivant : Bases de pédologie, Biologie des sols*. Presses polytechniques et universitaires romandes (Ed). p. 58.
- 50- Gouda S., Kerry R.G., Das G., Paramithiotis S., Shin H.S., Patra J.K. (2018). Revitalization of plant growth promoting rhizobacteria for sustainable development in agriculture. *Microbiological Research*. 206: 131-140.
<https://doi.org/10.1016/j.micres.2017.08.016>
- 51- Guiraud J.P. (1998). *Microbiologie alimentaire*. Ed. DUNOD. Paris. Vol (1). p. 136 et p. 141 Vol (2). p. 282 et p. 292.
- 52- Guo Z., Rima H., Yu., Xiaowen W., Haiqun C., Xuede L., Xiangwei W., Tang J. (2011). Screening and evaluation of anti phytopathogenic activity of endophytic fungi from live foliage of *Ginkgo biloba* L. *Anhui Provincial Laboratory of Agro-Food Safety, Resources and Environment College, Anhui Agricultural University, Hefei, Anhui, P.R.China*. p. 1.
- 53- Hallmann J., Quadt-Hallmann A., Mahaffee W.F and Kloepper J.W. (1997). Bacterial Endophytes in agricultural crops. *Canadian Journal of Microbiology*. 43: 895-914.
- 54- Hamdache A., Azaker R., Lamarti A., Aleu J and Collado L.G. (2013). Comparative genome analysis of *Bacillus spp.* and its relationship with bioactive nonribosomal peptide production. *Phytochem Rev*: 12: 685-716.
- 55- H. and Whitman W.B. (2009). *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*, 2nd ed., The Firmicute. Springer. New York. Vol. 3: 63-67.
- 56- Hardoim P.R., Overbeek L.S.V and Elsas J.D.V. (2008). Properties of bacterial endophytes and their proposed role in plant growth. *Trends in Microbiology* 16 (10): 463-471.
- 57- Hibbett D.S., Binder M., Bischoff J.F, *et al.* (2007). A higher level phylogenetic.
- 58- Horak., Engelbrecht G., Jansen van Rensburg P.J. and Claassens S. (2019). Microbial metabolomics: essential definitions and the importance of cultivation conditions for utilizing *Bacillus* species as bio nematicides. *Journal of Applied Microbiology* 127: 326-343©2019 The Society for Applied Microbiology.

- 59- Jourdheuil P., Grison P., Fraval A. (1991). La lutte biologique: un aperçu historique. Le Courrier de la cellule environnement de l'INRA. N° 15.
- 60- Journal Agronomy and Crop Science. Online Early Articles. Accepted.
- 61- Ilboudo J., Savadogo A., SamandouLouGou S., Abre M., Seydi M.G. et Traore A.S. (2016). Qualité bactériologique des carcasses de viandes porcines et bovines produites à l'abattoir de Ouagadougou, Burkina Faso. Rev. Microbiol. Ind. San et Environ. Vol 10, N° 1, p. 33-55.
- 62- Judith FILLAUX, mardi 17 décembre (2013).
- 63- Kabir M.A., Hussain M.A., Ahmad Z. (2012). *Candida albicans*: A model organism For studying fungal pathogens. ISRN Microbiology, p. 1-15.
- 64- Kaddem S.E. (1990). Les plantes médicinales en Algérie. In: Bouchene, Oued Zenati (Ed.).
- 65- Kerharo J., Adam J.G. (1974). La pharmacopée sénégalaise traditionnelle. Plantes médicinales et toxiques. Vigot frères Ed, Paris, p. 138.
- 66- Khan M.S., Zaidi A., Wani P.A. and Oves M. (2009). Role of plant growth promoting rhizobacteria in the remediation of metal contaminated soils. Environmental chemistry letters. 7 (1): 1-19.
- 67- Khan R., Shahzad S., Choudhary M.I., Khan S.A and Ahmad A. (2010). Communities of endophytic fungi in medicinal plant *Withania somnifera*. Pakistan Journal of Botany 42: 1281-1287.
- 68- Klich M.A., Pitt J.I. (1988). Differentiation of *Aspergillus flavus* from *A. parasiticus* and other closely related species. Transactions of the British Mycological Society. 91: 99-108.
- 69- Kloepper J.W. and Beauchamp C.J. (1992). A review of issues related to measuring colonization of plant roots by bacteria. Can, J. Microbiol. 38 (12): 1219- 1232.
- 70- Kobayashi D.Y., Crouch J.A. (2009). Bacterial/fungal interactions: from pathogens to mutualistic endosymbionts. Annu Rev Phytopathol. 47: 63-82.
- 71- Kotb F. (1983). Médicinal plant in Libya. Arabeencyclopédia House., Beirut Lebanon, p. 230.
- 72- Kunst F., Ogasawara N., Moszer I., Albertini A.M., Alloni G.O., Azevedo V., ... and Yoshikawa H. (1997). The complete genome sequence of the gram-positive bacterium *Bacillus subtilis*. Nature. 390 (6657): 249-256.
- 73- Larone D.H. (1995). Part II: detailed description. Medically important fungi: a guide to identification. 3rd ed. Washington, DC

- 74- Liu B., Furevi F., Perepelov A., Guo X., Cao H., Wang Q., Reeves P., Knirel Y., Wang L., Widmalm G. (2020). Structure and genetics of *Escherichia coli* O antigens. FEMS microbiology reviews 44. <https://doi.org/10.1093/femsre/fuz028>
- 75- Logan N.A., De Vos P. (2009). Genus I. *Bacillus*. Bergey's manual of systematic bacteriology. 3: 21-128.
- 76- Lugtenberg B., Kamilova F. (2009). Plant-growth-promoting rhizobacteria. Annual Review of microbiology. 63: 541-556. <https://doi.org/10.1146/annurev.micro.62.081307.162918>
- 77- Madigan M. and Martinko J. (2007). Biologie des microorganismes, (11th ed) Pearson Education. France.
- 78- Marwan J.M., Tzyanti I., Aidil A.H., Wan S.A. (2020). Optimization and production of alpha amylase from thermophilic *Bacillus spp.* and its application in food waste bio- degradable, p. 3-5.
- 79- Melo F.M.P. de., Fiore M.F., Moraes L.A.B. de., Silva-Stenico M.E., Scramin S., Teixeira M. de A., Melo I.S. de. (2009). Antifungal compound produced by the cassava endophyte *Bacillus*.
- 80- Mendes R., Kruijt M., De Bruijn I., Dekkers E., Van der Voort M., Schneider J.H.M., Piceno Y.M., De Santis T.Z., Andersen G.L., Bakker P.A.H.M., Raaijmakers J.M. (2011). Deciphering the Rhizosphere Microbiome for Disease-Suppressive Bacteria. Science. 332: 1097-1100. <https://doi.org/10.1126/science.1203980>
- 81- Milet A. (2017). Isolement de microorganismes à partir du sol des régions arides et sélection d'isolats à effet antagoniste sur l'agent de l'Alternariose.
- 82- Miljković D., Marinković J., Balešević-Tubić S. (2020). The Significance of *Bacillus spp.* In Disease Suppression and Growth Promotion of Field and Vegetable Crops. Microorganisms 8: 1037. <https://doi.org/10.3390/microorganisms8071037>
- 83- Miral A. (2018). *Helichrysum italicum* et ses micromycètes endophytes: diversité et biotransformations. Thèse de doctorat, Université Toulouse III-Paul Sabatier.
- 84- Mostert L., Crous P.W., & Petrino O. (2000). Endophytic fungi associated with shoots and leaves of *Vitis vinifera*, with specific reference to the *Phomopsis viticola* complex. Sydowia 54: 46-58.
- 85- Mui-Yun W. (2003). *Fusarium oxysporum f. sp. lycopersici* (Sacc.): pp. 728 Soil-borne Plant Pathogen Class Project. North Carolina State University.
- 86- Nelson E.B. (1991). Exudate molecules initiating fungal responses to seeds and roots, in: The rhizosphere and plant growth: Papers presented at a symposium held May 8-11, 1989, at the Beltsville Agricultural Research Center (BARC), Beltsville, Maryland Springer, p. 197-209.
- 87- Nelson P.E., Dignani M.C., Anaissie E.J. (1994). Taxonomy, biology, and clinical aspects of *Fusarium* species. Clinical microbiology reviews. 7: 479-504.

- 88- Ongena M., Jacques P., Touré Y., Destain J., Jabrane A., Thonart P. (2005). Involvement of fengycin-type lipopeptides in the multifaceted biocontrol potential of *Bacillus subtilis*. *Applied microbiology and biotechnology*. 69: 29-38.
- 89- Orole O.O and Adejumo T.O. (2009). Activity of fungal endophytes against four maize wilt pathogens. *African Journal of Microbiology Research*. 3: 969-973.
- 90- Paul S. (1999). *Bactériologie*, 4ème édition, Dunod, Paris.
- 91- Pimentel I.C., Glienke-Blanco C., Gabardo J., Stuart R.M and Azevedo J.L. (2006). Identification and colonization of endophytic fungi from soybean (*Glycine max* (L.Merril) under different environmental conditions. *Brazilian Archives Of Biology And Technology*. 49: 705-711.
- 92- Pitt J.I., Hocking A.D., Bhudhasamai K., Miscamble B.F., Wheeler K.A., Tanboon-Ek P. (1994). The normal mycoflora of commodities from Thailand. 2. Beans, rice, small grains and other commodities. *International Journal of Food Microbiology*. 23: 35-53.
- 93- Pitt J. I., & Hocking A.D. (2009). Fungi and food spoilage. doi:10.1007/978-0-387- 92207-2
- 94- Plant-rhizospheric soil system of a contaminated environment. *Environmental Science and Pollution Research*, 16: 727-740.
- 95- Porrás-Alfaro A and Bayman P. (2011). Hidden fungi, emergent properties: endophytes and microbiomes. *Annual review of phytopathology*. 49: 291-315.
- 96- Prashar P., Kapoor N., Sachdeva S. (2014). Rhizosphere: its structure, bacterial diversity and significance. *Reviews in Environmental Science and Bio/Technology*. 13: 63-77.
- 97- Prescott L.M., Harley J.P and Klein D.A. (2013). *Microbiologie*, 4ème édition. Éd. De Boeck, Bruxelles, pp. 1070.
- 98- Pierre et Marie Curie, << Bactériologie >> (2003).
- 99- Radić N., Štrukelj B. (2012). Endophytic fungi-The treasure chest of antibacterial substances. *Phytomedicine*. 19: 1270-1284.
<https://doi.org/10.1016/j.phymed.2012.09.007>
- 100- Rello J., Rue M., Jubert P., Muses G., Sonora R., Valles J., Niederman M.S. (1997). Survival in patients with nosocomial pneumonia: impact of the severity of illness and the etiologic agent. *Critical care medicine*. 25: 1862-1867.
- 101- Saba S., Aroosh S., Iftikhar A. (2020). Thermostable acidic lipase of *Bacillus glycinifermentans*- MK840989 isolated from contaminated environment ; its optimization, purification and exploring potential applications, p. 103-104.
- 102- Sadratiet N., Harzallah D., Zerroug A., Dahamna S., Bouharati S. (2013). Screening of

antimicrobial and antioxidant Secondary metabolites from endophyticfungi Isolated from wheat (*triticum durum*). Journal of plant protection research. Vol. 53(2).

103- Schardl C.L., Leuchtmann A and Spiering M.J. (2004). Symbioses of grasses with seedborne fungal endophytes. *Annu. Rev. Plant Biol.* 55: 315-340.

104- Saikkonen K., Faeth S.H., Helander M and Sullivan T.J. (1998). Fungal endophytes: a continuum of interactions with host plants. *Annual review of Ecology and Systematics.* 29(1): 319-343.

105- Singleton P. (2005). *Bactériologie pour la médecine, la biologie et les biotechnologies*, (6th edn) DUNOD. Paris.

106- Soni H., Rawat H.K., Ahirwar S., Kango N. (2017). Screening, statistical optimized production, and application of β -mannanase from some newly isolated fungi. *Engineering in Life Sciences.* 17: 392-401.

107- Summerell B.A., Rugg C.A., Burgess L.W. (1995). Characterization of *Fusarium babinda* sp. nov. *Mycological Research.* 99: 1345-1348.
[https://doi.org/10.1016/S0953-7562\(09\)81219-7](https://doi.org/10.1016/S0953-7562(09)81219-7).

108- Stein T. (2005). *Bacillus subtilis* antibiotics: structures, syntheses and specific functions. *Molecular microbiology.* 56: 845-857.

109- Salazar F., Ortiz A., Sansinenea E. (2017). Characterisation of two novel bacteriocinlike substances produced by *Bacillus amyloliquefaciens* ELI149 with broad-spectrum antimicrobial activity. *Journal of global antimicrobial resistance.* 11: 177-182.

110- Suryanarayanan T. (2013). Endophyte research: going beyond isolation and metabolite documentation. *Fungal Ecology.* 6: 561-568. <https://doi.org/10.1016/j.funeco.2013.09.007>

111- Suty L. (2010). La lutte biologique: Vers de nouveaux équilibres écologiques. *La lutte biologique.* 112: 1-328. Taieb F., Mechai F.; Lefort A., Lanternier F., Bougnoux M.E., Lortholary O., (2011). Management of candidemia and invasive candidiasis, *La Rev de Méd Int.* 32: 173-180.

113- Tintjer T., Leuchtmann A and Clay K. (2008). Variation in horizontal and vertical transmission of the endophyte *Epichloë elymi* infecting the grass *Elymus hystrix*. *New phytologist.* 179: 236-246.

114- Tassadaq H., Aneela R., Shehzad M., Iftikhar A., Jafar K., Veronique Edel H., Kil Yong K and Muhammad A. Biochemical characterization and identification of bacterial strains isolated from drinking water sources of Kohat, Pakistan. *African Journal of Microbiology Research.* Vol. 7(16), p. 1579-1590, 16 April, 2013 doi: 10.5897/AJMR12.2204.

115- Tortora J., Funk B.F and Case Ch.I. (2003). *Introduction à la microbiologie.*

116- Valencia L.G.H. (2008). Etudes des bases moléculaires de l'agrégation des sols par des exopolysaccharides bactériens, Université Joseph Fourier Grenoble 1,196: 22-23.

- 117- Vijayalakshmi *et al.*, K. S. (2012). Isolation and Characterization of *Bacillus Subtilis* KC3 for Amylolytic Activity. International Journal of Bioscience, Biochemistry and Bioinformatics. Vol (2).
- 118- Vuorelaa P., Leinonenb M., Saikkuc P., Tammela P., Rauhad J., Weinberger T., Vuorela H. (2004). Natural products in the process of finding new drug candidates. Current medicinal chemistry 11. <https://doi.org/10.2174/0929867043365116> Warnock D.W. (2007). Trends in the epidemiology of invasive fungal infections. Nippon Ishinkin Gakkai Zasshi. 48: 1-12.
- 119- Wang H., Xiao M., Kong F., Chen S., Dou H.T., Sorrell T., Li R.Y., Xu Y.C. (2011). Accurate and practical identification of 20 *Fusarium* species by seven-locus sequence analysis and reverse line blot hybridization, and an in vitro antifungal susceptibility study. Journal of clinical microbiology. 49: 1890-1898.
- 120- Wang Y and Dai C.C. (2011). Endophytes: A potential resource for biosynthesis, biotransformation, and biodegradation. Annals of microbiology. 61: 207-215.
- 121- Wilson D. (1995). Endophyte: the evolution of a term, and clarification of its use and definition. Oikos, p. 274-276.
- 122- Wu W., Jin Y., Bai F., Jin S. (2015). Chapter 41 - *Pseudomonas aeruginosa*, in: Tang Y.W., Sussman M., Liu D., Poxton I., Schwartzman J. (Éd.), Molecular Medical Microbiology (Second Edition). Academic Press, Boston, p. 753-767. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-397169-2.00041-X>
- 123- Yusuf F., Chaubey A., Jamwal U., Parshad R. (2013). A new isolate from *Fusarium proliferatum* (AUF-2) for efficient nitrilase production. Applied biochemistry and biotechnology. 171: 1022-1031.
- 124- Zabal Gogear Coa I. (2008). Fungal endophytes and their interaction with plant pathogens: a review. Spanish Journal of Agricultural Research. 6: 138-146.
- 125- Zalila-Kolsi I., Mahmoud A.B., Ali H., Sellami S., Nasfi Z., Tounsi S., Jamoussi K. (2016). Antagonist effects of *Bacillus spp.* strains against *Fusarium graminearum* for protection of durum wheat (*Triticum turgidum* L. subsp. durum). Microbiological research. 192: 148-158.
- 126- Zhang H.W., Song Y.C., Tan R.X. (2006). Biology and chemistry of endophytes. Natural Product Reports. 23: 753-771.
- 127- Zhang Y.Y.Z., Nan. (2006). Growth and anti-oxidative systems changes in *Elymus dahuricus* is affected by neotyphodium endophyte under contrasting water availability.
- 128- Zou J., Jiang H., Cheng H., Fang J., Huang G. (2018). Strategies for screening purification and characterization of bacteriocins. International journal of biological macromolecules. 117: 781-789.

Annexe

Annexe 1

Composition de milieux de cultures

1.1- Milieu GN (Gélose nutritive)

Gélose nutritive ou gélose nutritive ordinaire (GNO) ou encore gélose ordinaire, est un milieu d'isolement non-sélectif dont la composition chimique théorique en g/L d'eau purifiée est :

Peptone 10 g

Extrait de viande 5 g

Chlorure de sodium 5 g

Gélose 15 g

pH 7.2, autoclave 20 minutes à 120°C (Guiraud, 1998).

1.2- Milieu PDA (Potato Dextrose Agar)

Laver et couper en petits cubes 200 g de pommes de terre non pelées. Les mettre dans un litre d'eau distillée et portée à l'ébullition pendant une heure. Écraser, filtrer et compléter un litre.

Composition du milieu finale en g/L est :

Extrait de pomme de terre 1000 mL

Glucose 20 g

Agar 15 g

Stériliser 30 minutes à 110°C (Larpen, 1997).

1.3- Gélose Sabouraud

La gélose Sabouraud est un milieu recommandé pour la culture des champignons. La composition chimique théorique de ce milieu en g/L d'eau purifiée est :

Peptone de viande (bovin ou porcin) 3 g

Peptone de caséine (bovin) 3 g

Peptone de soja 3 g

Extrait de levure 2 g

Extrait de malt 1 g

Glucose 19 g

Phosphate monopotassique 0.5 g

Phosphate disodique 0.5 g

Agar 13 g

PH 6.4.

La présence de trois peptones et du glucose, ainsi que le pH acide du milieu favorisent la croissance des levures et des moisissures (Delarras, 2007).

1.4- Gélose YPG (yeast extract peptone)

Glucose 20 g

Extrait de levure 10g

Peptone 10 g

Agar 20 g

Eau distillée 1000 mL

PH 6.

1.5- Bouillon nutritive

Bouillon nutritive déshydratée 15 g

Eau distillée 1000 mL

Stériliser 15 minutes à 121 °C

1.6- Eau physiologique

Na Cl 9 g/L

Eau distillée 1000 mL

1.7- Milieu protéase

Poudre du lait 28 g

Peptone de caséine 5 g

Extrait de levure 2.5 g

Dextrose 1 g

Agar 1 g

Eau distillée 1000 mL

1.8- Milieu de culture solide à base d'amidon

Amidon soluble 10 g

Extrait de levure 5 g

Agar 20 g

Eau distillée 1000mL

pH 6.5

1.9- Milieu tributyrine

Peptone spéciale 5 g

Extrait de levure 3 g

Agar 12 g

Eau distillée 1000 mL

pH final 7.5 +- 0,2 à 37C°

1.10- Milieu optimum(g/l)

Saccharose 20

Peptone 30

Extrait de levure 7

KH₂PO₄ 1,9

Solution d'oligoéléments : (mg. l-1)

CuSO₄ 0,001

FeCl₃.6H₂O 0,005

Na₂MoO₄ 0,004

KI 0,002

ZnSO₄.7H₂O 0,014

H₃BO₃ 0,01

Acide citrique 10

Solution de Mn/Mg : (mg.l-1)

MnSO₄.H₂O 3,6

MgSO₄ 45

Annexe 2

Lugol: Le lugol est une solution iodée employée dans les domaines de la recherche en laboratoire et de la pratique médicale. Cette solution est composée de diiode (I_2) et d'iodure de potassium (KI) dilués dans de l'eau. On l'utilise fréquemment pour repérer la présence d'amidon dans les produits alimentaires ou pour effectuer des colorations sur des échantillons tissulaires en biologie.

Fuchsin: Le fuchsin est un colorant organique appartenant à la famille des phénazines. Il trouve fréquemment sa place dans les pratiques histologiques et microbiologiques pour teinter les échantillons tissulaires et bactériens. Différentes variantes de fuchsines existent, telles que la fuchsine acide et la fuchsine basique, chacune étant utilisée dans des applications spécifiques.

Violet de gentiane : Le violet de gentiane est une substance chimique colorante qui a surtout été utilisée dans l'industrie textile ou cosmétique (exemple : teintures capillaires), ou encore en microbiologie pour colorer certains milieux sélectifs (par exemple des géloses) et dans la coloration de Gram. Le violet de gentiane présente également des propriétés antiseptiques, bactériostatiques et antifongiques.

Blue coton : Le bleu coton est un colorant acide utilisé en mycologie pour l'observation microscopique en général, car il est sensible à la callose qui compose la paroi des hyphes de champignons, et notamment pour mettre en évidence l'ornementation spirale.

H_2O_2 : L'eau oxygénée, dont la formule chimique est H_2O_2 , est une solution liquide incolore qui est couramment utilisée comme agent oxydant, désinfectant et décolorant. Elle se décompose aisément en eau (H_2O) et en oxygène (O_2), libérant ainsi de l'oxygène actif qui peut être bénéfique dans une multitude d'applications.

Annexe 3

Test antagoniste

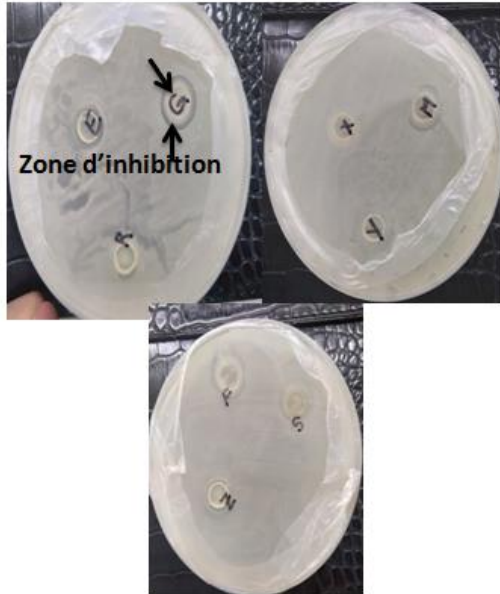


Figure inhibition de la croissance de bactérie *Bacillus*

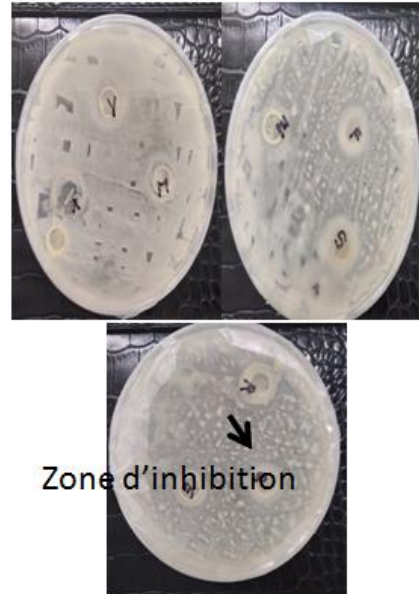


Figure inhibition de la croissance de bactérie *Salmonella*

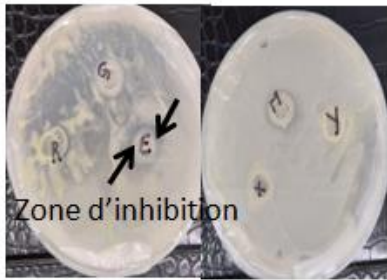


Figure inhibition de la croissance de bactérie *Pseudomonas*

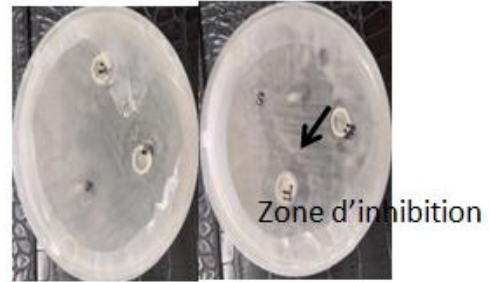


Figure inhibition de la croissance de bactérie *Staphylococcus*

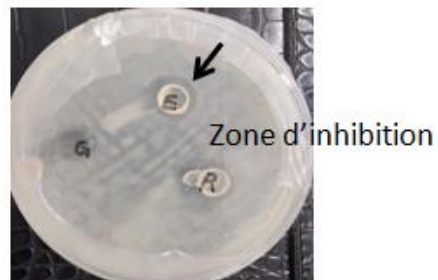


Figure inhibition de la croissance de bactérie *E. coli*

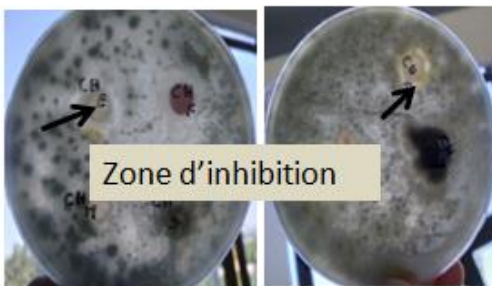


Figure inhibition de la croissance de *Salmonella*

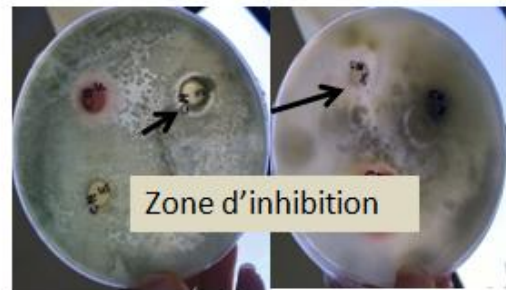


Figure inhibition de la croissance de *E. coli*

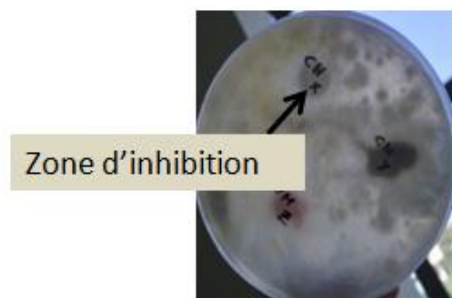


Figure inhibition de la croissance de *Pseudomonas*

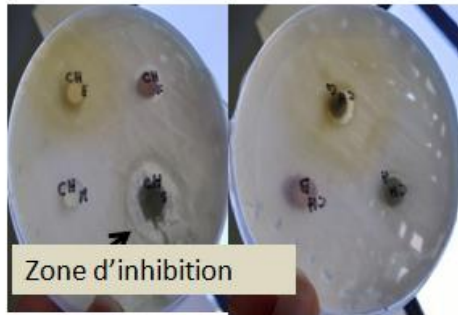


Figure inhibition de la croissance de *Staphylococcus*

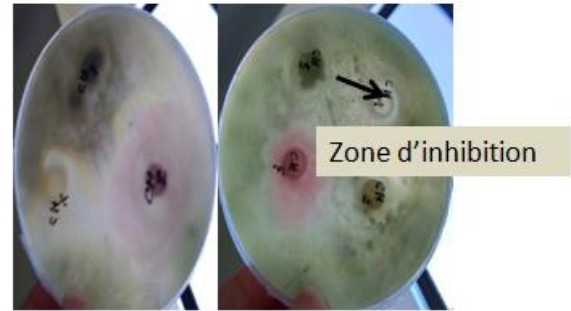


Figure inhibition de la croissance de *Bacillus*

Année universitaire : 2023-2024

Présenté par : Roubache Roufia
Mouas Messaouda

Recherche de nouvelles potentialités antimicrobienne endophytes et rhizosphériques à partir d'une plantule médicinale « *Asphodelus microcarpus* »

Mémoire pour l'obtention du diplôme de Master en Biotechnologie et Biothérapie

Cette étude se concentre sur l'isolement, l'identification et la sélection de microorganismes endophytes et de la rhizosphère issus d'*Asphodelus microcarpus* de la région de Tafrant (Constantine). En effet, l'objectif principal de notre travail est d'évaluer l'activité antimicrobienne de ces micro-organismes contre 5 bactéries pathogènes telles que *Staphylococcus aureus*, *Bacillus*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas*, *Salmonella* et une levure *Candida albicans*. Les microorganismes ont été isolés à partir de plantes sélectionnées à l'aide de techniques spécifiques d'isolement, aboutissant à 9 isolats bactériens et 10 isolats filamenteux. Ces isolats ont ensuite été testés pour leur activité antagoniste contre les souches pathogènes mentionnées. Les résultats ont montré des valeurs d'inhibition variant de 1,3 à 2,3 cm selon l'isolat. En particulier, les isolats bactériens *Bacillus sp 1*, *Bacillus sp2* et *Bacillus sp 3* et les isolats filamenteux *Fusarium sp 2* et *Aspergillus sp 6* ont montré les meilleurs effets inhibiteurs sur les bactéries Gram positif et Gram négatif.

Les isolats bactériens *Bacillus sp 4*, *Bacillus sp 5*, *Bacillus sp 8* et *Bacillus sp 9*, ainsi que les isolats filamenteux *Fusarium sp 1* et *Fusarium sp 4* ont montré un effet antagoniste moins prononcé sur les deux types de souches bactériennes testées, avec des valeurs d'inhibition variant entre 1,2 et 1,6 cm. Ensuite, les isolats démontrant une activité antibactérienne prometteuse ont été identifiés à l'aide des examens macroscopiques et microscopiques, ainsi que des tests biochimiques. Sept souches bactériennes du genre *Bacillus* à savoir : *Bacillus sp 1*, *Bacillus sp 2*, *Bacillus sp 3*, *Bacillus sp 4*, *Bacillus sp 5*, *Bacillus sp 8* et *Bacillus sp9* et quatre espèces de moisissures *Fusarium sp 1*, *Fusarium sp 2*, *Fusarium sp 4*, et *Aspergillus sp 6* ont été identifiées. Les tests enzymatiques ont révélé que la souche *Bacillus sp 4* était capable de produire la protase et l'amylase et incapable de produire la lipase. La tolérance à la température a montré qu'*Aspergillus* pouvait se développer à 45°C et 50°C, tandis que les sept souches bactériennes de *Bacillus* étaient tolérantes à 45°C et 50°C. Une fermentation en flacons agités pendant 72 heures a été réalisée pour produire des métabolites extracellulaires. Ces métabolites ont été filtrés et testés pour leur effet antagoniste contre les souches pathogènes mentionnées. Les résultats ont montré que les métabolites extracellulaires sécrétés par *Bacillus sp 4* et avaient un effet inhibiteur significatif sur *E. coli* et *Pseudomonas*, *Candida albicans*, *Staphylococcus*, *Bacillus*, *Salmonella*. Cette étude souligne le potentiel des microorganismes endophytes et de la rhizosphère d'*Asphodelus microcarpus* en tant que sources de microorganismes présentant une activité antimicrobienne contre des souches pathogènes. Pour conserver la biomasse après la fermentation, les souches sélectionnées ont été lyophilisées et transformées en poudre à l'aide d'un lyophilisateur

Mots-clefs : *Asphodelus microcarpus*, *Bacillus sp*, *Fusarium sp*, *Aspergillus sp*, rhizosphère, microorganismes endophytes, activité antimicrobienne.

Laboratoires de recherche : laboratoire de Mycologie, Biotechnologie et de l'Activité Microbienne « LaMyBAM », Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie, (U Constantine 1 Frères Mentouri).

Président du jury : Djellid Hadjer (Dr – UFM Constantine 1).

Encadrant : MILET ASMA (Dr - UFM Constantine 1).

Examineur(s) : Adoui Mounira (Dr - UFM Constantine 1),