

Université Constantine 1



Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie
Département de Microbiologie

Mémoire présenté

En vue de l'obtention du diplôme de Master en Microbiologie

Option : Biotechnologie des Mycètes, fermentation et production de substances
fongique.

Intitulé :

**Recherche de bactéries à activité antifongique à partir du sol
agricole et forestier de la région de Constantine**

Présenté par :

MOKRANI Oumnia

et

KICILI Samira

Jury d'évaluation:

Président de jury:

Mme. MOSBAH F.

M.A. Univ. Constantine 1

Rapporteur:

Mr. KACEM CHAOUCHE N.

Prof. Univ. Constantine 1

Tuteur:

Mlle. YOUCEF- ALI M.

Dr. Univ. Constantine 1

Examineur:

Mme. BOUCHERIT Z.

M.A. Univ. Constantine 1

Année universitaire

2013-2014

Dédicace

Je Dédie ce travail :

A la mémoire de mes grands-parents.

A ma très chère Mère

Affable, honorable, aimable : Tu représentes pour moi le symbole de la bonté par excellence, la source de tendresse et l'exemple du dévouement qui n'a pas cessé de m'encourager et de prier pour moi

A mon très chère Père

Aucune dédicace ne saurait exprimer l'amour, l'estime, le dévouement et le respect que j'ai toujours eu pour toi. Rien au monde ne vaut les efforts fournis jour et nuit pour mon éducation et mon bien être. Ce travail est le fruit de tes sacrifices que tu as consentis pour mon éducation et ma formation.

A ma chère grand-mère « Mémé »

Ta prière et ta bénédiction m'ont été d'un grand secours pour mener à bien mes études. Puisse Dieu, le tout puissant, te préserver et t'accorder santé, longue vie et bonheur.

A mon très cher frère « Islam »

Mon ange gardien. Je te dédie ce travail avec tous mes vœux de bonheur, de santé et de réussite.

A mon très cher frère « Ramzi »

Mon cher petit frère présent dans tous mes moments d'examens par son soutien moral et ses belles surprises sucrées. Je te souhaite un avenir plein de joie, de bonheur, de réussite et de sérénité. Je t'exprime à travers ce travail mes sentiments de fraternité et d'amour.

A mon très cher oncle « MEKROUD Abdeslem » et son adorable femme « tata Hayet » ; Vous avez toujours été présents pour les bons conseils. Votre affection et votre soutien m'ont été d'un grand secours. Veuillez trouver dans ce modeste travail ma reconnaissance pour tous vos efforts.

A mes très chères amies « CHERIET Hanen » et « OUBRAHEM Meriem »

Mes âmes sœur et la lumière de mon chemin. Ma vie à vos côtés est remplie de belles surprises.

A mon adorable cousine « SAIDI Hadjer »

Merci pour la joie que tu me procures, puisse Dieu tout puissant jouir ta vie, te combler d'avantage, t'apporter bonheur, et t'aider à réaliser tous tes vœux

A mes adorables camarades : MAHROUK Abdélkader, DJABAR Selmen, YOUSFI Billel, GELOUT Walid, DOUCOURE Ballah ; Merci pour les bons moments qu'on a passé ensemble, de votre soutien et de votre serviabilité. Que Dieu vous procure tout le bonheur que vous méritez.

A mes chers ami (e)s

Oumnia

Remerciements

Nous remercions le Tout Puissant de nous avoir aidés à bien mener ce travail.

Nous avons le plaisir d'exprimer notre reconnaissance à tous ceux qui ont contribué à la réalisation de ce travail :

Nous tenons tout d'abord à remercier notre encadreur Monsieur KACEM CHAOUCHE N., professeur à l'université Constantine 1 qui n'a épargné aucun effort pour que ce travail s'effectue dans les meilleures conditions. Nous voudrions exprimer notre profonde gratitude pour l'accueil bienveillant qu'il nous a réservé au sein de son équipe de recherche, son soutien s'est avéré déterminant pour mener ce travail à sa fin. Nous exprimons notre admiration pour ses qualités précieuses tant scientifiques qu'humaines.

Nous tenons à exprimer toute notre gratitude à Madame MOSBAH F. d'avoir accepté de présider ce jury, ainsi, nos vifs remerciements s'adressent à Madame BOUCHERIT Z. qui a accepté d'examiner et d'évaluer notre modeste travail.

Pour ses précieux conseils de tout ordre, sa disponibilité, sa patience et sa gentillesse nous remercions tout particulièrement Mademoiselle YUCEF-ALI M. qui nous a aidés énormément dans la réalisation de ce travail.

A tous ceux qui, de près ou de loin, ont contribué à la réalisation et à l'aboutissement de ce travail.

Sommaire

Sommaire

1-Introduction	1
2- Revue bibliographique	3
2.1- Le sol	3
2.1.1- Généralités	3
2.1.2- les microorganismes du sol	3
2.1.3- Propriétés du sol	3
2.1.4- Interactions dans le sol	4
2.2- Bactéries	4
2.2.1- Généralités	4
2.2.2- Cellule bactérienne	4
2.2.2.1- forme	4
2.2.2.2- Structure	5
2.2.3- Physiologie	5
2.2.3.1- Nutrition	5
2.2.3.2- Croissance	6
2.2.3.3- Reproduction	6
2.2.4- Classification bactérienne	6
2.2.5- activité métabolique	7
2.2.6- <i>Bacillus sp</i>	7
2.2.6.1- Généralités	7
2.2.6.2- Classifications	7
2.2.6.3- Métabolismes	8

Sommaire

2.3- Mycètes	8
2.3.1- Généralités	8
2.3.2- Organisation	8
2.3.2.1- Moisissures	8
2.3.2.2- Levures	9
2.3.2.3- La paroi	9
2.3.2.5- Autres	10
2.3.3- Physiologie	10
2.3.3.1-Nutrition	9
2.3.3.2- Habitat	9
2.3.3.3- Reproduction	9
2.3.3- Métabolismes	9
2.3.4- <i>Fusarium oxysporum</i>	9
2.3.4.1- Classification	10
2.3.4.2- Généralités	10
2.3.5- <i>Yarrowia lipolytica</i>	10
2.3.5.1- Classification	10
2.3.5.2- Généralités	10
2.4- activité antifongique	11
2.4.1- Généralités	11
2.5- Protoplastes	13
2.5.1-Généralités	13
2.5.2- Obtention	13
2.5.3-Utilisation	13

Sommaire

3 – Matériel et méthodes	15
3.1- Echantillonnage	15
3.2- Eude microbiologique	16
3.3.1- Isolement des bactéries	15
3.3.2- Conservation des souches bactériennes	15
3.3.3- Etude morphologique des Mycètes test	15
3.3.4- Sélection des isolats producteurs de substances antifongique	15
3.3.5- Identification des isolats bactériens sélectionnés	16
3.3.5.1- Etude macroscopique	16
3.3.5.2- Etude microscopique	16
• Observation à l'état frais	16
• Coloration de Gram	16
3.3.5.3- Caractères biochimiques	17
• Type respiratoire	17
• Test oxydase	17
• Test catalase	17
3.3.5.4- Traitement thermique	17
3.4- Activité antifongique et libération des protoplastes	18
3.4.1- Libération des protoplastes des moisissures	18
3.4.2- Libération des protoplastes des levures	19
3.4.3- Récupération des protoplastes	19
4- Résultats	21
4.1- Eude microbiologique	20
4.1.1- Isolement des bactéries	20
4.1.2- Etude morphologique des Mycètes test	21
4.1.2.1- Caractères morphologique de <i>F. oxysporum</i>	21
4.1.2.2- Caractères morphologiques de <i>Y. lipolytica</i>	21

Sommaire

4.1.3- Sélection des isolats producteurs de substances antifongiques	22
4.1.4- Identification des isolats bactériens sélectionnés	22
4.1.4.1- Etude macroscopique	22
4.1.4.2- Etude microscopique	23
• Observation à l'état frais	23
• Coloration de GRAM	23
4.1.4.3- Caractères biochimiques	23
• Type respiratoire	23
• Test oxydase	23
• Test catalase	23
4.1.4.4-Traitement thermique	24
4.2- Activité antifongique et libération des protoplastes	
4.2.1- Libération des protoplastesdes moisissures	27
4.2.2- Libération des protoplastes levure	30
4.3 - Récupération des protoplastes	33
5-Discussion	34
6- Conclusion et perspectives	38
7-Résumé	40
8-Références bibliographique	43
8-Annexe	

Liste des figures

Figure 1 Schéma d'une cellule bactérienne.....	5
Figure 2 Constitution de la paroi du champignon.....	10
Figure 3 Cibles des substances antifongiques.....	13
Figure 4 Photo satellite montrant la localisation géographique des sites de prélèvement.....	15
Figure 5 Technique d'observation microscopique des protoplastes.....	19
Figure 6 Aspects de la moisissure <i>F. oxysporium</i> : (a) sur gélose SAB ; (b) sous microscope optique au grossissement X 100.....	23
Figure 7 Aspects de la levure <i>Y. lipolytica</i> sur : (a) culture sur milieu GN ;(b) sous microscope (Grossissement X 100).....	23
Figure 8 Test d'antagonisme de la bactérie 13 sur la levure et la moisissure: (a) vis-à-vis <i>F.oxysporum</i> ; (b)vis-à-vis <i>Y.lipolytica</i>	24
Figure 9 Aspect de la colonie bactérienne n° 13 après purification sur GN.....	24
Figure 10 Coloration de Gram positive de la souche N°13 au grossissement X100.....	25
Figure 11 Caractères biochimique de la bactérie N°13 : (a) type respiratoire, aérobie ; (b) test d'oxydase, négatif ; (c) test de catalase, positif.	26
Figure 12 Croissance de la bactérie 13 après élimination de la forme végétative (culture sur GN après 24h d'incubation).....	26
Figure 13 Suivie microscopique de la libération des protoplastes de <i>F. oxysporum</i> en présence du milieu MEM au grossissement X100.....	28
Figure 14 Suivie microscopique de la libération des protoplastes de <i>F. oxysporum</i> en absence du milieu MEM au grossissement X100.....	29
Figure 15 Suivie microscopique de la libération des protoplastes de la levure <i>Y.lipolytica</i> en utilisant le MgSo ₄ comme stabilisateur osmotique au grossissement X100.....	31
Figure 16 Suivie microscopique de la libération des protoplastes de la levure <i>Y.lipolytica</i> en utilisant le Sucrose comme stabilisateur osmotique au grossissement X100.....	32
Figure 17 Récupération des protoplastes : (a) protoplastes de <i>F.oxysporum</i> ; (b) protoplastes de <i>Y.lipolytica</i> au grossissement X100.....	33

Liste des tableaux

Tableau 1 Isolats bactériens obtenus des échantillons du sol agricole et forestier...22

Tableau 2 Récapitulatif des résultats obtenus.....27

Liste des abréviations

GRAS : Generally Recognized As Safe

FDA : American Food and Drug Administration

5-FC : fluorocytosine

5-FU : fluorouracile

UTP : uracile triphosphate

LaMyBAM : Laboratoire de Mycologie, Biotechnologies et de l'Activité Microbienne

GN : gélose nutritive

SAB : gélose Sabouraud

PDA : Potatose Dextrose Agar

AAF : aérobie-anaérobie facultatif

AS : aérobie stricte

AnS : anaérobie stricte

YPG : Yeast Peptone Glucose

Rpm : rotation par minute

MEM : Extrait de levure Extrait de malt Dextrose

Introduction

1-Introduction

La biotechnologie microbienne recouvre toutes les interventions en laboratoire sur les organes, les tissus, les cellules ou l'ADN des microorganismes, soit pour mieux maîtriser ou accélérer leur production, soit pour améliorer leurs caractéristiques, au service de la recherche, ou de la production industrielle. Elle permet d'augmenter la diversité génétique naturelle par plusieurs mécanismes comme la fusion des protoplastes pour parvenir à l'obtention d'une recombinaison génétique nouvelle où aucune recombinaison sexuelle ne pouvait être réalisée *in vivo*.

Pour arriver à la fusion des protoplastes fongiques qui sont devenus un moyen de base indispensable pour la recherche. Il faut d'abord passer par leur libération, en dégradant la paroi par l'intermédiaire de molécules bioactives qui agissent directement sur la paroi des microorganismes.

La microflore du sol joue un rôle fondamental pour le bon déroulement de la vie sur terre (Bourguignon *et al.*, 2008). Les bactéries du sol, dans certaines conditions, produisent des substances antimicrobiennes, ce qui a conduit les chercheurs à s'intéresser à ces molécules et à leur éventuelle application dans plusieurs domaines. Parmi ces molécules, les antifongiques qui empêchent le développement des champignons et qui diffèrent selon leurs structures et leurs modes d'action (Prescott *et al.*, 2010).

De ce fait, l'objectif de ce travail se focalise sur l'isolement de bactéries, possédant une activité antifongique, à partir de sol agricole et forestier dans le but d'étudier leurs capacités à dégrader la paroi fongique et la libération des protoplastes, en vue d'une application biotechnologique servant à l'amélioration des souches par la fusion des protoplastes.

La stratégie de notre travail repose sur quatre axes principaux :

1. Isolement des bactéries à partir des sols agricoles et forestiers de la région de Constantine ;
2. Sélection et identification des souches bactériennes susceptibles de développer une bonne activité antifongique ;

Introduction

3. Caractérisation de cette activité, en se focalisant sur l'action des molécules antifongiques vis-à-vis de la paroi, et par conséquent la libération des protoplastes fongiques dans le milieu de culture ;
4. Récupération des protoplastes produits en présence d'un stabilisateur osmotique.

Ce travail comporte quatre parties. La première partie présente une revue de littérature qui donne une idée générale sur les microorganismes du sol, leurs interactions, l'activité antifongique et les protoplastes. La seconde partie est consacrée à la description du matériel et des méthodes utilisés pour cet objectif. La troisième et la quatrième partie rapportent, respectivement, les résultats obtenus et leur discussion par d'autres travaux scientifiques.

*Revue
bibliographique*

2- Revue bibliographique

2.1- Le sol

2.1.1- Généralités

Le sol est défini comme étant la partie supérieure et arable de l'écorce terrestre. C'est un point de rencontre du monde végétal, animal, microbien et minéral, un système dynamique qui naît (sol jeune), évolue (sol mûr) et meurt (sol dégradé). c'est un milieu polyphasique composé d'une phase solide (minérale et organique), une phase liquide, et d'une phase gazeuse (Calvet, 2003).

Un sol naît à partir d'une roche-mère qui sera peu à peu dégradée par les éléments climatiques (gel, dessiccation, vent, pluie...) mais aussi par des espèces microbiennes (bactéries, lichens, mousses, champignons...); des éléments abiotiques et biotiques qui se conjuguent pour réduire la roche en fines particules (Calvet, 2003).

2.1.2- Propriétés du sol

Les constituants du sol interagissent pour lui conférer ses propriétés. Les propriétés physiques, chimiques, ou biologique du sol sont en particulier les facteurs importants de contrôle des organismes du sol comme la texture, la température, le pH, l'apport en oxygène et le régime hydrique (Burgess *et al.*, 2012).

2.1.3- les microorganismes du sol

Le sol est un biotope extraordinaire pour de nombreux organismes; il héberge le gros de la biomasse vivante de la planète qui sont à la base de tous les processus biologiques (Bourguignon *et al.*, 2008). Les agents de la microflore du sol se divisent en quatre groupes : les algues, les mycètes, les actinomycètes et les bactéries; ils assurent des fonctions essentielles comme la biodégradation de la matière organique, la production de nutriments pour les plantes, la dégradation des polluants, et plaine d'autres fonctions (Calvet, 2003).

Les bactéries représentent le groupe le plus varié et le plus nombreux, puisque leur densité peut s'élever de dix millions à un milliard par gramme de sol contrairement aux champignons qui présentent les deux tiers de la biomasse microbienne du sol du fait de leur grande taille (Bourguignon *et al.*, 2008).

2.1.4- Interactions dans le sol

Il existe une diversité d'interactions dans le sol (symbiose, parasitismes, compétition, prédation). Ces relations entre les microorganismes et aussi avec les organismes eucaryotes comme les nématodes, les plantes et les animaux et avec les composants abiotiques de l'environnement constituent les moteurs des différents processus qui se déroulent dans le sol (Moreira *et al.*, 2012).

Les microorganismes en particuliers les bactéries sont fréquemment impliquées dans une multitude d'interactions avec d'autres microorganismes et qui sont souvent nutritionnelles. Ils peuvent être reconnues comme des interactions négatives (compétition, amensalisme), positives (commensalisme, synergique et mutualisme), ou positives pour l'un et négatives pour l'autre population (Davet, 1996).

2.2- Bactéries

2.2.1- Généralités

Une bactérie est un microorganisme procaryote unicellulaire extrêmement petit. Elles étaient parmi les premières formes de vie à apparaître sur Terre, et elles sont présentes dans la plupart des habitats sur la planète (Nauciel *et al.*, 2005).

Les bactéries pathogènes ne constituent qu'une partie de l'ensemble de la population bactérienne. Beaucoup de bactéries s'avèrent indéniablement utiles à l'homme. Par exemple, certaines entre elles produisent les antibiotique et d'autre fournissent les enzymes, il y en a qui servent d'insecticides et protègent les cultures, tandis que d'autres sont employées dans l'industrie alimentaire (Singleton, 2004). Mieux nous connaissons les bactéries, plus efficacement nous pourrons limiter leurs potentialités nocives et tirer avantage de leurs activités utiles (Prescott *et al.*, 2010).

2.2.2- Cellule bactérienne

2.2.2.1- forme

Les formes des bactéries sont variées, on trouve les *coques*, les *bacilles*, les *coccobacilles*. Elles sont sous forme de cellules séparées ou en groupements de cellules caractéristiques (Singleton, 2004).

2.2.2.2- Structure

La connaissance des différentes structures des bactéries est nécessaire pour comprendre leur métabolisme (figure 1). Certaines de ces structures sont permanentes, d'autres inconstantes (Singleton, 2004).

- La Paroi : La paroi détermine la forme de la bactérie, et la protège, elle est présente chez toutes les espèces bactériennes à l'exception des mycoplasmes (Prescott *et al.*, 2010).
- La membrane cytoplasmique : La membrane cytoplasmique entoure le cytoplasme, elle contrôle les entrées et sorties de la cellule (Nauciel *et al.*, 2005).
- Le cytoplasme : il contient des ribosomes, des substances de réserve, des pigments, des vacuoles et autres (Nauciel *et al.*, 2005).
- Les flagelles (permettent la mobilité des bactéries), la capsule (joue un rôle important dans la défense des bactéries), les spores (une forme de résistance des bactéries quand les conditions sont défavorables) et les pilis (des facteurs de virulence) peuvent être présente chez certaines espèces et introuvables chez d'autres (Nauciel *et al.*, 2005).

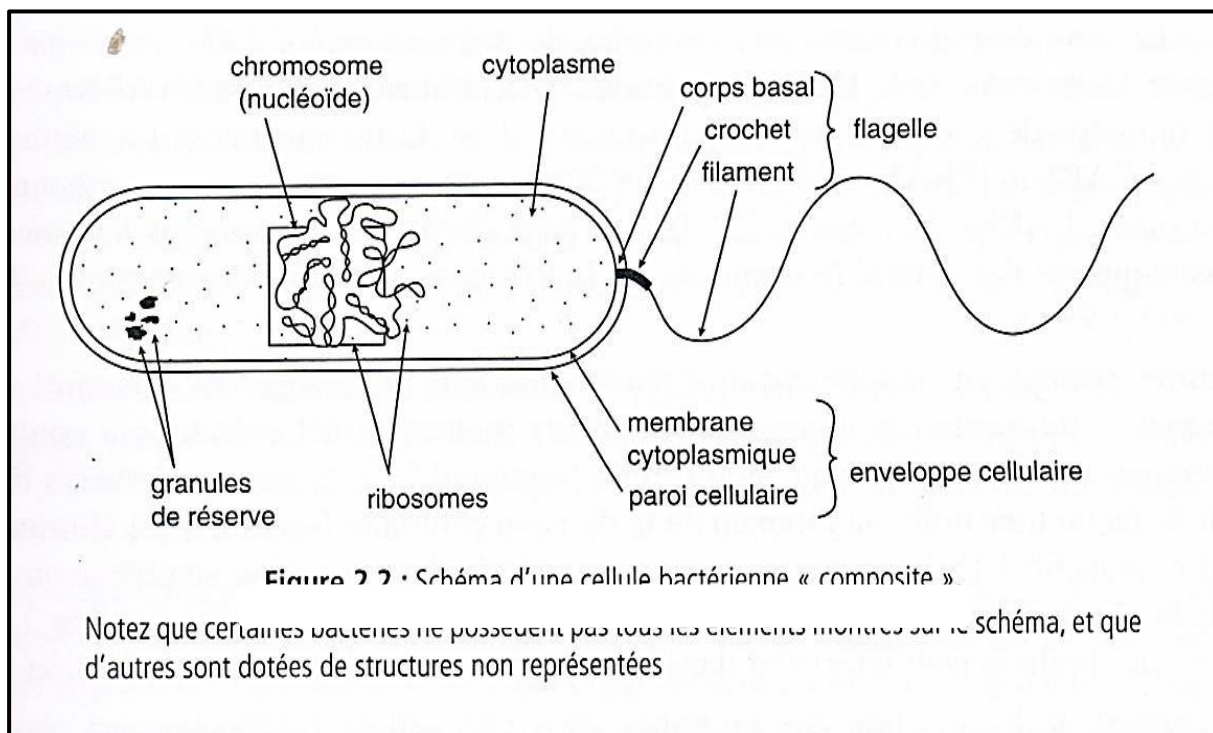


Figure 1 Schéma d'une cellule bactérienne (Singleton, 2004).

2.2.3- Physiologie

2.2.3.1- Nutrition

C'est à partir de substances organiques simples (acides aminés, glucides, acides gras, vitamines, hydrocarbures, ect.) et de certaines substances inorganiques (phosphates, soufre, nitrates, ect.) que les bactéries se nourrissent. Plusieurs types de bactéries sécrètent des enzymes digestives qui leurs permettent d'absorber certains constituants alimentaires plus ou moins complexes (Nauciel *et al.*, 2005).

2.2.3.2- Croissance

Elle correspond à l'accroissement du nombre de bactéries et non à l'augmentation de la taille d'une bactérie. Les exigences essentielles pour la croissance comprennent une provision de nourriture adéquate, une source d'énergie, de l'eau, une température appropriée, un pH appropriée, une teneur approprié en oxygène et bien sûr il ne faut pas oublier qu'aucun de ces paramètre agit seul et que la modification d'un entre eux peut renforcer ou réduire les effets d'un autre.

Dans les conditions adéquates, de telles populations peuvent se développer aussi bien sur des milieux solides qu'au sein d'un liquide. Chaque espèce développe des colonies de taille, de forme, de couleur et de consistance caractéristique (Singleton, 2004).

2.2.3.3- Reproduction

Elle se fait de façon asexuée selon un mode de division cellulaire (fission binaire) qui est caractérisé par une augmentation de la taille de la bactérie, dédoublement du matériel génétique et séparation de ce matériel en deux parties égales, formation d'une paroi transversale puis séparation de la cellule mère en deux cellules filles (Nauciel *et al.*, 2005).

2.2.4- Classification bactérienne

La classification des bactéries entre elles repose sur plusieurs types d'observations et d'études. Les bactéries peuvent ainsi être classées et donc identifiées en fonction :

- de leur morphologie microscopique (bactérie de type coque, bacille, vibrion ; isolés, par deux, en chaînettes...).

- de leur morphologie macroscopique (taille, forme, couleur... des colonies sur milieux de culture gélosés).
 - de leur mobilité (mobilité ou immobilité à une température donnée).
 - de la présence de spores (à l'état frais ou après coloration).
 - du résultat de la coloration de Gram (coloration de Gram positive ou négative).
 - de la température de croissance (4° C, 20° C, 30° C, 37° C...).
 - du type respiratoire (aérobie, anaérobie strict, aéro-anaérobie facultatif, microaérophile...).
 - des besoins nutritionnels (nécessité de substances particulière pour le développement).
 - de la capacité à utiliser certaines sources de carbone ou d'azote (on parlera de biotypes).
- Une donnée importante pour la classification bactérienne est le pourcentage en nucléotides G et C (% G + C) de chaque génome. Ainsi, deux espèces bactériennes proches auront des pourcentages en G et C voisins (Carip, 2008).

2.2.5- activité métabolique

Les bactéries sont capable de synthétiser une grande variété de métabolites secondaires en opposition à ceux du métabolisme primaire: antibiotiques, antifongique et autres dont ils ont des effets généralement toxiques car ils interviennent dans la lutte contre les compétiteurs. Beaucoup de ces produits sont utilisés en médecine, en teinturerie, en agriculture et plain d'autre domaine (Singleton, 2004).

2.2.6- Le genre *Bacillus*

2.2.6.1- Généralités

Les *Bacillus*, classés dans le nouveau genre *Bacillus* avec plus de 90 espèces sont des bactéries saprophytes, sporulées. Elles vivent naturellement dans les sols dans lesquels elles peuvent survivre très longtemps grâce à leurs spores; Certaines espèces sont trouvées dans l'eau douce, d'autres dans l'eau de mer. Il existe des espèces thermophiles, acidophiles, psychrophiles, alcalinophiles. (Dromigny, 2008).

Les *Bacillus* sont rarement commensales chez l'Homme; ils ne sont pas pathogènes en générale pour l'Homme et pour les animaux sauf pour *Bacillus anthracis* et *Bacillus cereus* (Delarras, 2007). Les *Bacillus* font partie du règne des *Bacteria*, embranchement des *Firmicutes*, classe des *Bacilli*, ordre des *Bacillales*, famille des *Bacillaceae* et genre des *Bacillus* (Delarras, 2007).

2.2.6.2- Métabolites secondaires des *Bacillus*

Les cellules de *Bacillus* métabolisent le glucose par la voie d'Embden-Meyerhof-Parnas quand la température de la culture augmente où il y a principalement une forte production d'acides organique extracellulaires, et par la voie des Pentose-phosphates quand la température de la culture diminue (Dromigny, 2008).

Plusieurs espèces synthétisent des antibiotiques comme les polymyxines et la thyrothricine (Delarras, 2007). Des espèces produisent des enzymes industrielles telles que la B-Glucanase, la pénicilline amidase, alors que d'autre sont capable de dégrader des substances chimiques spécifiques comme les hydrocarbures et l'alginate (Delarras, 2007).

Des espèces thermophiles peuvent quelquefois être à l'origine d'altération dans l'industrie des conserves par insuffisance de stérilisation ; les spores thermorésistantes peuvent alors survivre, germer, produire des *bacilles* qui vont contaminer l'aliment si les conditions sont favorables (Delarras, 2007).

2.3- Les Mycètes

2.3.1- Généralités

Les mycètes sont des organismes microscopiques eucaryotes, hétérotrophes. On connaît plus de 100 000 espèces de mycètes, et on estime qu'il existerait 1 500 000 espèces au total (Prescott, 2010). On distingue principalement deux types de mycètes: les levures (unicellulaires) et les moisissures (filamenteuses) (Ripert, 2013), ils sont partout où l'Homme vit ; ils peuvent lui être bénéfique ou néfastes, ils sont largement utiliser en production alimentaire ; pharmaceutique et autres, comme à l'inverse, ils peuvent s'avérer dangereux pour l'Homme, les animaux et les plantes car ils produisent des substances très dangereuse comme les mycotoxines (Baudry *et al.*, 2006).

2.3.2- Organisation

2.3.2.1- Moisissures

Le thalle constitue la forme végétative des moisissures, simple ou ramifiés, cloisonné ou siphonnés s'accroissent uniquement par leur partie apicale. L'augmentation de masse des champignons filamenteux se fait par allongement de l'hyphe sous l'effet de la poussée cytoplasmique périphérique, il se reconstitue à la périphérie tandis qu'il s'épuise dans les parties primitives (Ripert, 2013).

2.3.2.2- Levures

Les levures sont en générale plus grosses que la majorité des bactéries, leurs paroi est rigide, confère à la levure sa forme. Elles sont souvent ovale allongées ou sphériques, leur dimensions et aspects varient selon l'âge, l'environnement et le milieu de culture (Ait Abdelouahab, 2007).

2.3.2.3- Structure cellulaire des Mycètes

➤ La paroi

La paroi fongique se présente typiquement comme un assemblage de couches particulièrement complexe (Figure 2). Schématiquement la couche basale constituée de microfibrilles de chitine et entourée d'une zone protéique, d'une couche de glycoprotéines enchâssée dans une matrice de glucanes associés à des mannanes et d'un manteau externe de glucanes. La chitine est une macromolécule pariétale spécifique des champignons (liaison B1-4 d'acétyl-glucosamine). Les glucanes correspondent à des liaisons B1-3 et B1-6 de glucose. D'autres résidus osidiques peuvent enrichir la paroi : mannose, galactose, tréhalose, et autres. À côté, on retrouve des ports, la majorité sont associées à du mannose (glycoport), des ports à activité enzymatique : intervient dans la nutrition du champignon ou dans l'élongation de la paroi. Les composants de la paroi jouent un rôle comme antigènes ou sont des cibles sur lesquelles agissent certains antifongiques. La paroi confère certaines résistances face à la lyse enzymatique, aux contraintes mécaniques, aux ultraviolets et à la dessiccation (Ripert, 2013).

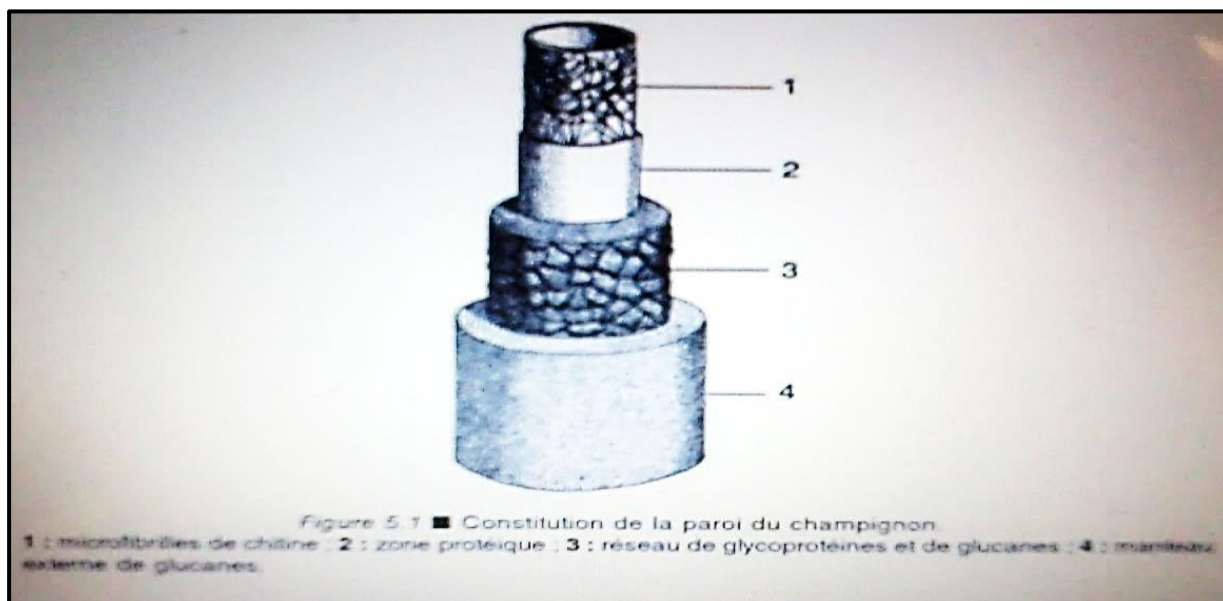


Figure 2 Constitution de la paroi du champignon (Ripert, 2013).

➤ **Autres**

Les mycètes possèdent un petit noyau. Ils possèdent entre 3 et 40 chromosomes différents. Les mitochondries ont des structures qui varient selon les différents embranchements de mycètes. L'appareil de Golgi des mycètes est très peu développé, et n'est souvent formé que d'un saccule (Prescott, 2010).

2.3.3- Physiologie

2.3.3.1- Nutrition

Les mycètes sont hétérotrophes pour le carbone et vivent en général de manière aérobie. Le degré d'autotrophie vis-à-vis de l'azote est variable selon le mycète (à partir d'azote minéral, d'acides aminés ou de protéines). Ils prélèvent les nutriments par absorption, en libérant dans le milieu des enzymes lytiques (Prescott, 2010).

2.3.3.2- Habitat et reproduction

Les mycètes sont principalement terrestres et parfois aquatiques. Ils supportent de fortes variations de pression osmotique, de pH et de température. Ils vivent en relation avec d'autres organismes, ils sont saprophytes, parasites ou symbiotiques. Les champignons ont une croissance rapide, ils se reproduisent en majorité de façon asexuée, c'est par bourgeonnement des levures et par fragmentation du mycélium (Baudry *et al.*, 2006).

2.3.4- *Fusarium oxysporum*

2.3.4.1- Classification

La classification des *Fusarium* a longtemps été basée sur leurs caractères morphologiques, le principal caractère étant la présence de macroconidies fusiformes et cloisonnées.

Ils font partie du règne des Fungi, embranchement des Ascomycota, classe des sordariomycetes, sous-classe des Hypocreomycetidae, ordre des Hypocreales, famille des Nectriaceae, genre des *Fusarium* et l'espèce *Fusarium oxysporum* (Champion, 1997).

2.3.4.2- Généralités

Le genre a une distribution mondiale. La plupart des espèces de *Fusarium* sont capables de se développer comme saprophytes, ils peuvent persister dans le sol pendant plusieurs années grâce à la formation de chlamydospores (Champion, 1997).

Le genre *Fusarium* regroupe plusieurs espèces phytopathogènes susceptibles d'attaquer un grand nombre de plantes comme *F.oxysporum* qui attaque le palmier et provoque la maladie du Bayoud (Daren et al., 2013).

2.3.5-*Yarrowia lipolytica*

2.3.5.1- Classification

Elle fait partie du règne des fungi, division des ascomycota, classe des saccharomycetes, ordre des Saccharomycetales, famille des Dipodascaceae et genre des *Yarrowia* (Agro Paris Tech).

2.3.5.2- Généralités

Y. lipolytica est une levure non pathogène qui se développe à l'état naturel dans les sols. Elle peut également être isolée à partir de matières riches en lipides et en protéines tels que les yaourts, les fromages et la charcuterie (Agro Paris Tech).

Y. lipolytica présente un métabolisme aérobie strict. C'est une levure mésophile qui croît entre 10 et 30 °C et qui est capable de croître jusqu'à 37 °C.

Elle est reconnue comme un organisme GRAS (« Generally Recognized As Safe ») par le FDA (« American Food and Drug Administration »). Ceci permet donc de l'utiliser dans les industries agroalimentaires ou pharmaceutiques. C'est une levure dimorphique qui forme des cellules bourgeonnantes, des hyphes ou des pseudohyphes en fonction du milieu de culture (Agro Paris Tech).

Elle est capable d'assimiler une grande variété de substrats carbonés tels que les sucres comme le glucose, le galactose, le mannitol, le lactate et le citrate ainsi que les acides aminés tels que la méthionine. De plus, elle peut utiliser l'éthanol (à une concentration inférieure à 3%) comme seule source de carbone ainsi que le glycérol. Cette levure ne peut consommer ni le lactose ni le galactose (Agro Paris Tech).

2.4- activité antifongique

Les antifongiques sont des substances biologiques sécrétées principalement par les bactéries et les mycètes, Ils empêchent le développement des champignons.

Comparativement aux antibactériens, le nombre de médicaments antifongiques disponibles reste limité. Les champignons étant plus proches des cellules humaines que les bactéries, la possibilité de trouver des cibles spécifiques est réduite. Les cibles des antifongiques sont essentiellement l'ergostérol de la membrane plasmique pour les polyènes et les azolés, les acides nucléiques pour la flucytosine et la paroi pour les échinocandines (Vandeputte, 2008).

Les polyènes agissent mécaniquement sur le principal stérol membranaire des champignons (Figure 3): L'ergostérol. Elles s'y fixent grâce à des liaisons hydrophobes et forment des pores dans la membrane. La membrane devient perméable, notamment aux cations comme le potassium, et cette fuite ionique entraîne la mort de la cellule (Vandeputte, 2008).

Cependant, la fluorocytosine (5-FC) entre dans la cellule grâce à la cytosine perméase et est ensuite désaminée en sa forme toxique le fluorouracile (5-FU). Les métabolites du 5-FU inhibent la thymidylate synthase et donc la synthèse de l'ADN, ils entre également en compétition avec l'UTP, sont incorporés à l'ARN et bloquent la synthèse protéique (Vandeputte, 2008).

Tandis que le mécanisme d'action des azolés consiste à inhiber la biosynthèse de l'ergostérol, par l'inhibition d'une enzyme du cytochrome P450 des cellules.

Les échinocandines sont des inhibiteurs létaux de la synthèse de la paroi fongique. Elles interrompent spécifiquement la formation du glucane de la paroi fongique par une inhibition non compétitive de l'enzyme β -(1,3)-D-glucane synthase qui est présente dans la plupart des champignons pathogènes et est indispensable pour la formation de la paroi fongique (Vandeputte, 2008).

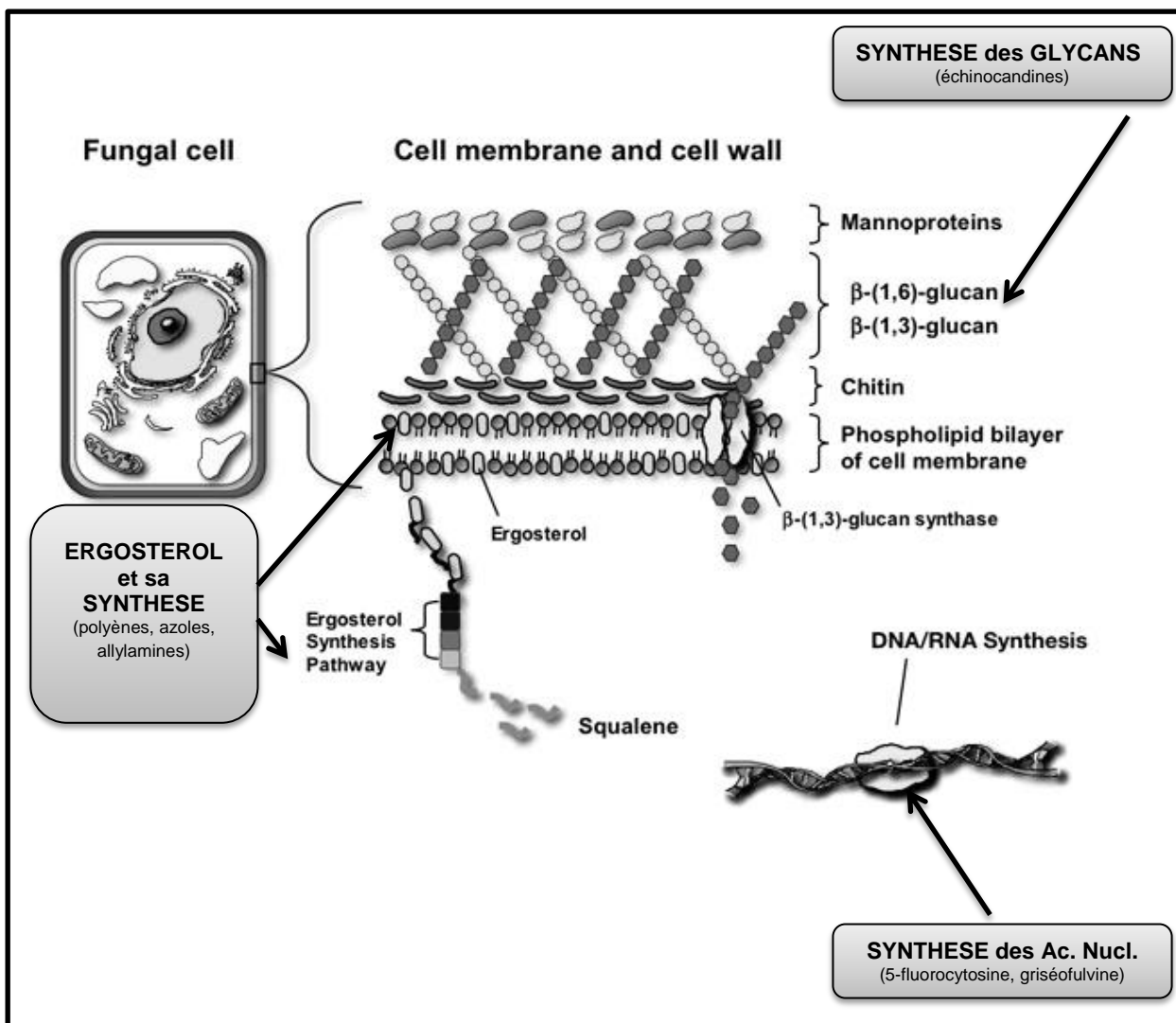


Figure 3 Cibles des substances antifongiques (Vandeputte, 2008).

2.5- Protoplastes

2.5.1-Generalités

Les protoplastes sont des cellules dépourvus de paroi, obtenues expérimentalement par digestion de la paroi. Plusieurs études sur l'isolement de protoplaste des bactéries, des levures, des champignons filamenteux et des plantes ont commencé à apparaître.

L'isolement des protoplastes à partir de cellules microbiennes implique la digestion totale de la paroi cellulaire par les enzymes (Chauhan *et al.*, 2006).

Protoplastes des champignons et des plantes, il y a une vingtaine d'années ont été soulevés dans le centre d'intérêt de nombreux biologistes. Pour les généticiens les protoplastes étaient un progrès révolutionnaire dans tous les systèmes fongiques où le croisement sexuel n'était pas possible et des mécanismes parasexuel n'a pas fonctionné. Avec le temps l'enthousiasme d'hybrider de différentes espèces a changé à une vision plus réaliste. Une autre méthode de manipulation génétique des champignons s'est développée, qui était la transformation de protoplastes fongiques. Après élimination de la paroi cellulaire, uniquement la barrière de la membrane cellulaire doit être surmontée par l'ADN étranger. La fusion de protoplastes et la transformation ont été utilisés à la fois pour améliorer la productivité des souches industrielles de champignons (Dilip, 2004).

2.5.2- Obtention

L'obtention de protoplastes se fait habituellement par digestion enzymatique de la paroi, grâce à des enzymes telles que la pectinase, la cellulase ou le lysozyme qui étaient au début issu de l'activité lytique du suc gastrique de l'escargot, puis d'origine fongique et maintenant ils utilisent directement des enzymes commercialiser comme le novozym 234, cellulase CP, chitinase et plien d'autres enzyme (Chauhan *et al.*, 2006).

2.5.3-Utilisation

Les protoplastes sont devenus un moyen de départ pour l'isolement d'organites cellulaires et autres structures sous-cellulaires, même les structures qui sont très sensibles aux contraintes mécaniques comme les chromosomes peuvent être isolés intacts. Donc, ils représentent un point de départ pour des applications industrielles, ainsi que pour la recherche fondamentale (Chauhan *et al.*, 2006).

Les protoplastes peuvent être fusionnés pour obtenir une recombinaison génétique fongique où aucune recombinaison sexuelle ne pouvait être réalisée *in vivo*. Ils permettent par exemple de faire fusionner des cellules issues de deux variétés ou même espèces différentes (Chauhan *et al.*, 2006).

Les protoplastes permettent de réaliser aisément une transformation génétique. On procède par électroporation pour introduire directement un fragment d'ADN dans les cellules, chose impossible dans le cas où la paroi pecto-cellulosique est présente (Chauhan *et al.*, 2006).

*Matériel et
méthodes*

3 – Matériel et méthodes

Le présent travail est réalisé au niveau du Laboratoire de Mycologie, de Biotechnologies et de l'Activité Microbienne (LaMyBAM), il porte sur l'étude de l'activité antifongique des bactéries isolées à partir des sols agricoles et forestiers de la région de Constantine. La caractérisation de cette activité antifongique est étudiée par la capacité des bactéries isolées à dégrader la paroi fongique et la libération des protoplastes, en vue d'une application biotechnologique servant à l'amélioration des souches par la fusion des protoplastes. Les souches fongiques test utilisées pour cet objectif, englobent une levure et une moisissure, fournies toutes les deux par le même laboratoire, il s'agit respectivement de *Yarrowiia lipolytica* et de *Fusarium oxysporium*.

3.1- Echantillonnage

Les échantillons du sol sont prélevés de la région d'EL MRIDJ (wilaya de Constantine) et ce, à partir d'un sol agricole et forestier. Différentes profondeurs sont ciblées pour cet objectif à savoir, 15 cm, 25 cm et 40 cm. Le choix de cette région est motivé par la juxtaposition des deux sols, rappelant que la localité d'EL MRIDJ se trouve à 14 Km à l'Est de Constantine (figure 4). Le prélèvement des échantillons du sol est effectué durant le mois de Mars (2014).

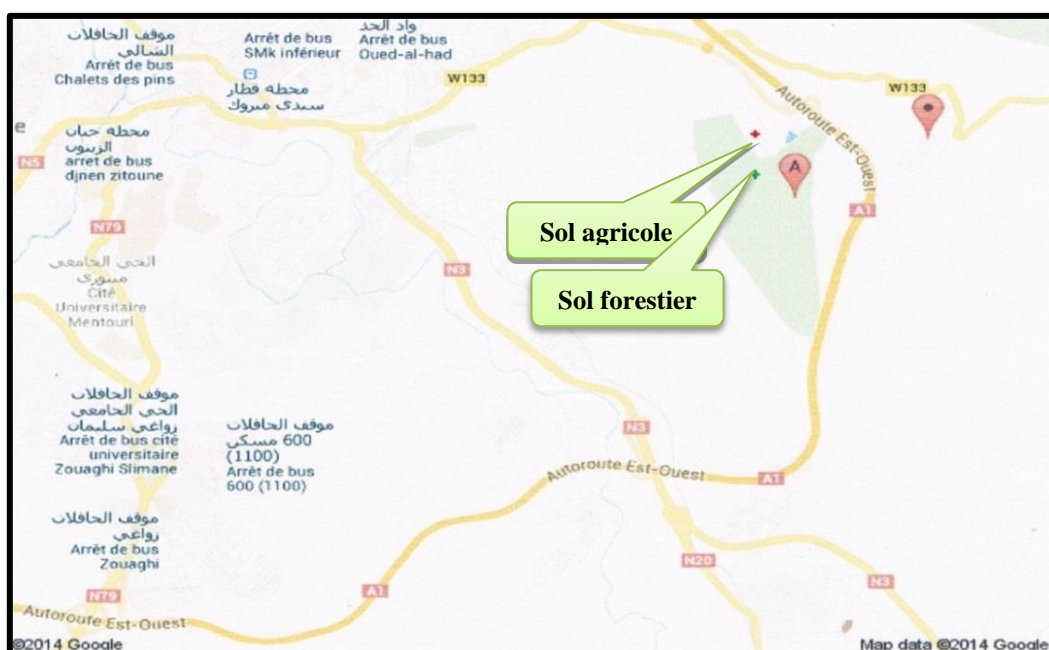


Figure 4 Photo satellite montrant la localisation géographique des sites de prélèvement. (Anonyme, 2014)

Le prélèvement des échantillons est effectué après avoir écarté les cinq premiers centimètres de la couche superficielle du sol ; ce prélèvement est effectué à l'aide de spatules stériles pour cibler les différentes profondeurs définies. Le sol prélevé est transporté au laboratoire dans des seringues stériles de 50 ml afin d'effectuer une analyse microbiologique approfondie.

3.2- Etude microbiologique

3.3.1- Isolement des bactéries

L'isolement des bactéries est réalisé sur gélosé GN (Annexe 1) selon la méthode des dilutions décimales. En effet, un 1g du sol est ajouté à 9ml d'eau physiologique stérile (9g de NaCl dans 1litre d'eau distillée) après agitation légère, un volume de 1ml de la solution, mère, obtenue est introduit dans un nouveau tube contenant un volume de 9ml d'eau physiologique stérile afin d'obtenir la dilution 10^{-1} et ainsi de suite jusqu'à l'obtention de la dilution 10^{-6} . Un volume de 0.1 ml de chaque suspension est étalé dans des boîte de Pétrie contenant le milieu GN. Toutes les boites sont incubées à 30°C, pendant 24 à 48 heures (Prescott *et al.*, 2010).

Une étape de purification est effectuée après développement de colonies par réensemencement par la méthode de stries sur gélose nutritive. Pour ce faire, une anse de platine a servi à prélever les colonies à purifier et les ensemercer sur des nouvelles boites de Pétri contenant le milieu GN. L'incubation est effectuée à 30°C jusqu'à l'obtention des colonies apparentes (Prescott *et al.*, 2010).

3.3.3- Conservation des souches bactériennes

Les jeunes colonies bactériennes, sont aseptiquement ensemencées dans des tubes contenant de la GN inclinée et incubés pendant 24h à 30°C, puis stockés au réfrigérateur à 4°C (Prescott *et al.*, 2010).

3.3.4- Etude morphologique des Mycètes test

3.2.3.1- Caractères morphologique de *F.oxysporum*

L'aspect macroscopique de *F.oxysporum* est observé directement sur gélose SAB après 4jours d'incubation .Cependant, une étude microscopique est effectuée en utilisant le lactophenol bleu coton pour faciliter l'observation et déterminer le type du mycélium et la forme des têtes conidiennes (Carip, 2008).

3.2.3.2- Caractères morphologiques de *Y. lipolytica*

L'aspect macroscopique de *Y. lipolytica* est observé directement sur la gélose SAB après 24h d'incubation. Cependant, une étude microscopique est effectuée et permet de déterminer la forme des cellules (Carpi, 2008).

3.3.5- Sélection des isolats producteurs de substances antifongiques

Le test d'antagonisme des isolats bactériens vis-à-vis des mycètes test à savoir, *Yarrowia lipolytica* et *Fusarium oxysporum* consiste à rechercher l'activité biologique de ces isolats sur le développement des champignons test. Cette sélection est effectuée par la méthode de diffusion sur gélose. Pour *Y. lipolytica*, une suspension levurienne est préparée en inoculant des colonies pures de cette levure dans un tube contenant 9ml d'eau physiologique stérile, ensuite, un volume de 0,1ml est étalé sur la surface de la gélose SAB (Annexe 1). Après séchage d'environ 5 minutes, un disque est prélevé à partir des souches bactériennes purifiées, et est déposé soigneusement au centre de la gélose SAB étalée, préalablement, par la levure.

Cependant le test antifongique réalisé vis-à-vis de *F. oxysporium*, consiste à préparer d'abord une suspension sporale de cette moisissure. Pour ce faire, une culture de 6 jours de *F. oxysporium* dans une fiole contenant la gélose SAB est inondée par de l'eau physiologique stérile. Après une légère agitation, assurée par un barreau magnétique stérile, un volume de 0.1 ml de la solution sporale, ainsi obtenue, est étalé sur la surface de la gélose PDA (Annexe 1) pour effectuer le test de diffusion sur gélose et ce de la même manière appliquée avec *Y. lipolytica*. Le développement de l'activité antifongique se traduit par la formation d'une zone de lyse autour des champignons test. La lecture est effectuée après incubation des boîtes à 30°C pendant 48h (Prescott *et al.*, 2010).

3.3.6- Identification des isolats bactériens sélectionnés

3.3.6.1- Etude macroscopique

L'aspect macroscopique des colonies est observé directement sur la gélose nutritive après purification, il permet de connaître la taille, la brillance, la texture, le contour, la couleur, l'opacité et le relief (Carip, 2008).

3.3.6.2- Etude microscopique

- **Observation à l'état frais**

Elle permet de déterminer la morphologie bactérienne, la longueur et l'épaisseur, le mode de groupement et la mobilité. La méthode consiste à déposer une goutte d'eau distillée sur la lame, puis apporter et dissocier dans la goutte un prélèvement bactérien de la colonie à identifier; recouvrir la lame par une lamelle puis observer au microscope à l'objectif (40X) puis à immersion (100X) (Carip, 2008).

- **Coloration de Gram**

Cette technique permet de mettre en évidence le type de la paroi. Un frottis est prélevé à partir d'une colonie de 24h, fixé à la chaleur, puis recouvert par le violet de Gentiane pendant 1min, ensuite l'élimination de ce colorant par l'ajout de Lugol pendant 1min. le frottis est décoloré par l'éthanol (environ 20 sec). Enfin, une contre coloration est réalisée avec la Fushine. L'observation est faite au grossissement 40X, puis à immersion 100X (Carip, 2008).

3.3.5.3- Caractères biochimiques

- **Type respiratoire**

L'utilisation du milieu VF (Annexe 1) qui est principalement utilisé en tube profond pour la détermination du type respiratoire des micro-organismes. Le milieu doit être régénéré avant ensemencement pour obtenir un gradient de concentration en O₂ si l'on veut rechercher le type respiratoire de la bactérie. La hauteur de la culture permet de déterminer le type respiratoire : culture sur toute la hauteur (aéro-anaérobie facultatif, AAF), culture seulement en haut (aérobie stricte, AS), culture seulement au-dessous (anaérobie stricte, AnS) (Singleton, 2005).

- **Test oxydase**

Le test oxydase sert à déterminer si la bactérie possède l'enzyme oxydase qui permet de colorer un réactif incolore (le diméthyle paraphylène diamine) en un produit coloré en violet. La technique consiste à mettre en contact un prélèvement bactérien et un disque imprégnée du réactif de diméthyle paraphylène diamine (Carip, 2008).

- **Test catalase**

Le test catalase s'effectue sur les bactéries Gram positives, il sert à déterminer si la bactérie possède l'enzyme catalase servant à transformer l'eau oxygénée en eau et en oxygène par contact de la culture avec une solution d'eau oxygénée. La technique consiste à prélever 1ml d'une solution d'eau oxygénée 3% et la déposer dans un petit tube contenant une solution d'eau physiologique stérile et une colonie de la souche à identifier. Une réaction positive suggère la présence de catalase (Carip, 2008).

Les résultats obtenus à partir de ces tests nous ont orientés vers la réalisation d'un traitement thermique sur les cultures bactériennes sélectionnées afin de compléter leurs identifications.

3.3.5.4- Traitement thermique

Le choc thermique permet de se débarrasser de la forme végétative de la bactérie et confirmer la présence ou l'absence de la forme sporulée. La technique consiste à préparer une dilution à partir de la suspension bactérienne, et la mettre dans un bain mari pendant 10 minutes à 80°C. Un volume de 0,1 ml de la dilution précédente est étalé sur une boîte de Pétrie contenant le milieu GN. La présence de spores se caractérise par l'apparition de colonies bactériennes sur la surface de la gélose après 24h d'incubation à 30°C (Singleton, 2005).

3.4- Activité antifongique et libération des protoplastes

3.4.1- Libération des protoplastes des moisissures

L'étude de l'éventuelle production de protoplastes est effectuée en caractérisant l'action des métabolites antifongiques sur la paroi de la moisissure. Pour ce faire, une culture bactérienne est effectuée dans un milieu liquide YPG (Annexe 1) à 28°C pendant 3 jours, temps suffisant pour la production de métabolites secondaires, notamment les antifongiques. Après temps d'incubation, la culture obtenue est centrifugée à 3700 rpm pendant 15 min. Le surnageant obtenu est filtré sur un microfiltre de 0.45 µm pour être utilisé dans le test de libération des protoplastes (Robinson et Deacon, 2001).

Par ailleurs, une culture agitée de 4 jours de la moisissure *F. oxysporium* est effectuée sur milieu liquide MEM (Annexe 1) dans une fiole de 250ml à 30°C. Après 4 jours d'incubation, une filtration à travers du papier filtre stérile est indispensable pour récupérer la biomasse, suivie d'un rinçage avec un volume de 100 ml d'une solution de MgSO₄ (0,6 M). La biomasse est transférée dans un erlen de 250 ml contenant un volume de 40 ml d'un stabilisateur osmotique à savoir, le MgSO₄ (0,98 M) additionné à un volume de 45 ml du surnagent bactérien et 50 ml du milieu MEM (le pH du mélange est 5,8), cette préparation est incubée sous agitation permanente à 28°C jusqu'à l'éventuelle libération de protoplastes. La même expérience est refaite en absence du milieu MEM. Un suivi microscopique de la présente expérience est effectué chaque 30 minute en utilisant le Lactophénol bleu coton pour faciliter l'observation. Cette dernière s'effectue dans une chambre d'incubation composée d'une lame en verre et trois lamelles selon la figure 4 afin de conserver l'intégrité des protoplastes. (Robinson et Deacon, 2001).

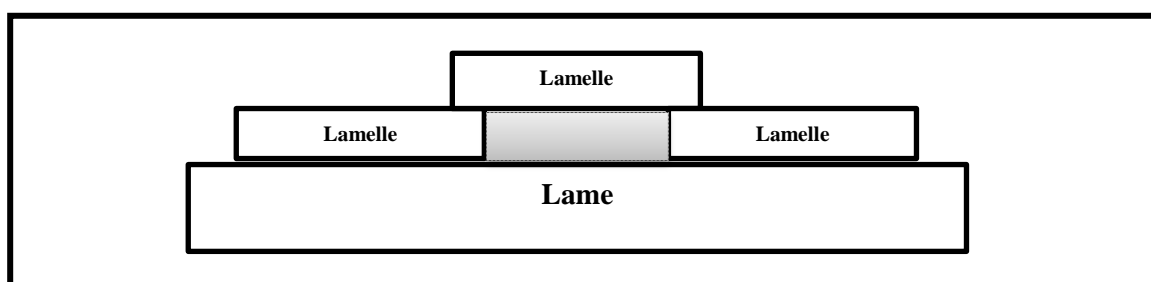


Figure 5 Technique d'observation microscopique des protoplastes (Chongbiao *et al.*, 1993).

3.4.2- Libération des protoplastes des levures

Une culture levurienne est préparée en ensemençant des colonies de *Y. lipolytica* dans une fiole contenant 100 ml du milieu liquide MEM et ce, pendant 3 jours d'incubation à 30°C sous agitation permanente.

Dans le cas de la levure, la libération des protoplastes est effectuée, uniquement, en présence du milieu de culture MEM, motivée par les constatations faites concernant la libération des protoplastes de *F. oxysporium* en absence du milieu MEM (voir partie résultats). Cependant la suspension osmotique utilisée dans ce test a concerné l'MgSO₄ d'une part et le sucrose d'autre part. Après 3 jours d'incubation, une centrifugation à 3700 rpm pendant 15 min est effectuée pour récupérer la biomasse (le culot), suivie d'un rinçage avec 100 ml de la solution de MgSO₄ (0,6 M) pour la première expérience et le sucrose pour la deuxième expérience.

Une centrifugation supplémentaire est effectuée afin de récupérer le culot. Ce dernier est transféré dans un erlen de 250 ml contenant 40 ml d'un stabilisateur osmotique (0,98 M) additionné à 45 ml du surnageant bactérien et 50 ml du milieu MEM à pH 5,8. Un suivi microscopique de la présente expérience est effectué chaque 30 minute en utilisant le LactophénoL bleu coton pour faciliter l'observation (Robinson et Deacon, 2001).

3.4.3- Récupération des protoplastes

Afin de récupérer les protoplastes libérés dans le milieu de culture, un protocole établi par Robinson et Deacon (2001) est suivie. Il consiste à séparer la biomasse du milieu de culture, contenant les protoplastes, et ce par filtration sur papier Wathman, en rinçant la biomasse avec du MTC (Annexe 1) (200ml) au cours de la filtration pour la moisissure. Cependant, la culture de la levure a subit une centrifugation à 3700 rpm pendant 10 minute, le surnageant obtenu est mélangé avec une quantité de MTC (200ml) et soumis à une deuxième centrifugation à 3700 rpm pendant 10 minute. Les échantillons obtenus sont centrifugés à 1800 rpm, à 4°C pendant 10 min. Cette opération sert à récupérer les protoplastes contenus dans les culots, ces derniers sont conservés dans un volume de 1ml du milieu MTC. La confirmation de la présence des protoplastes est effectuée par un simple examen microscopique.

Résultats

4- Résultats

Ce travail porte sur l'isolement des bactéries productrices de substances antifongiques à partir des sols agricoles et forestiers de la région d'EL MRIDJ (Constantine). Cette activité antifongique se caractérise par la production de molécules bioactives ciblant la paroi fongique dont le but est la libération des protoplastes des champignons test en l'occurrence, *Fusarium oxysporum* et *Yarrowia lipolytica*.

4.1- Eude microbiologique

4.1.1- Isolement des bactéries

L'isolement des bactéries à partir des deux sites prospectés a abouti à la sélection de 29 isolats bactériens à partir du sol agricole, 12 isolats sont obtenus de la première profondeur (15cm), 10 de la deuxième profondeur (25 cm) et 7 de la troisième profondeur (35 cm). Cependant, l'isolement effectué à partir du sol forestier a montré la présence de 33 isolats bactériens, dont 11 isolats sont obtenus à partir de la première profondeur (15cm), 14 isolats de la deuxième profondeur (25 cm) et 8 isolats de la troisième profondeur (35 cm). Ces résultats montrent que la profondeur la plus peuplée par les bactéries est celle de 15 cm pour le sol agricole, et celle de 25 cm pour le sol forestier (tableau 1).

Tableau 1 Isolats bactériens obtenus des échantillons du sol agricole et forestier

Profondeurs (cm)	Microorganismes isolés			
	Sol agricole		Sol forestier	
	Nombre	Numéro	Nombre	Numéro
15	12	1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9,10, 11, 12	11	30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40
25	10	13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22	14	41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 51, 52, 53, 54
35	7	23, 24, 25, 26, 27, 28, 29	8	55, 56, 57, 58, 59, 60, 61, 62

Résultats

4.1.2- Etude morphologique des mycètes test

L'étude morphologique des mycètes test à savoir, *Y. lipolytica* et *F. oxysporum* a englobé un examen macroscopique sur gélose et un examen microscopique, comprenant une coloration avec du Lactophénol bleu coton pour la moisissure.

4.1.2.1- Caractères morphologique de *F. oxysporum*

Sur gélose Sabouraud, *Fusarium oxysporum* apparait sous forme d'une grande colonie rose présentant des fructifications élevées. Cependant elle présente sous microscope optique un mycelium septé et des macroconidies fusoides pointue aux deux extrémités (figure 6).

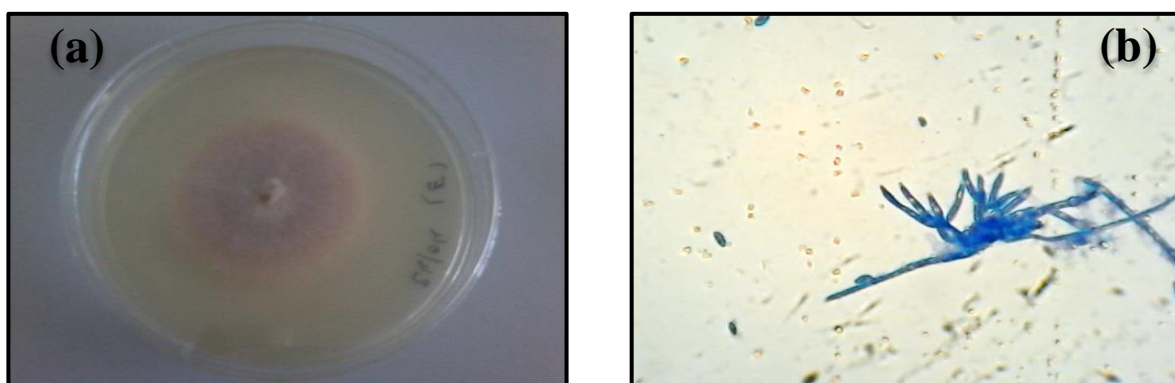


Figure 6 Aspects de la moisissure *F. oxysporum* : (a) sur gélose SAB ; (b) sous microscope optique (Grossissement X 100).

4.1.2.2- Caractères morphologiques de *Y. lipolytica*

Sur gélose SAB, *Yarrowiia lipolytica* se présente sous forme de colonies rondes blanches crémeuses, en revanche, l'examen microscopique de cette levure a révélé qu'elle est sous forme de grandes cellules ovales (figure 7).

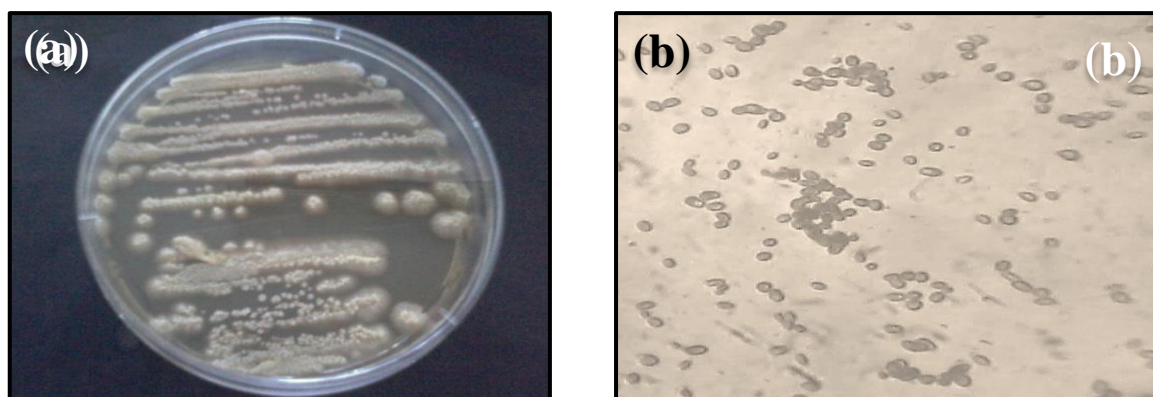


Figure 7 Aspects de la levure *Y. lipolytica* sur : (a) culture sur milieu SAB ; (b) sous microscope (Grossissement X 100).

4.1.3- Sélection des isolats producteurs de substances antifongiques

Parmi les 62 isolats bactériens testés sur la levure *Yarrowia lipolytica* et sur la moisissure *Fusarium oxysporum*, un seul isolat a présenté un effet positif sur les champignons test et ce, en développant une zone d'inhibition, mesurée au millimètre près. Il s'agit de la bactérie N°13, isolée à partir du sol agricole de la région d'EL MRIDJ, Constantine (figure 8).

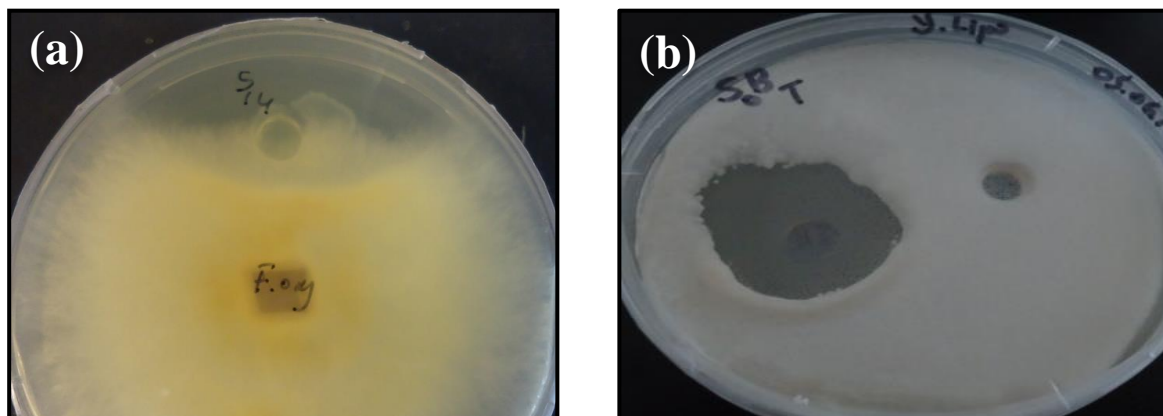


Figure 8 Effet antifongique de la bactérie 13: (a) vis-à-vis de *F. oxysporum*; (b) vis-à-vis de *Y. lipolytica*.

4.1.4- Identification des isolats bactériens sélectionnés

4.1.4.1- Etude macroscopique

La culture de la bactérie N°13 pure sur milieu GN a révélé un développement rapide après 24h d'incubation (figure 9). Les colonies sont de petite taille, de couleur blanche, d'un centre élevé et d'un contour ondulé.



Figure 9 Aspect de la colonie bactérienne n° 13 après purification sur GN.

4.1.4.2- Etude microscopique

- **Observation à l'état frais**

La réalisation de l'état frais nous a permis d'observer la morphologie de la bactérie et de voir si elle est mobile ou non. Cette étude a révélé que la bactérie N° 13 est un grand bacille mobile.

- **Coloration de Gram**

Après avoir effectué une coloration de Gram, la souche a révélé une coloration violette, donc elle est considérée comme Gram + (figure 10).

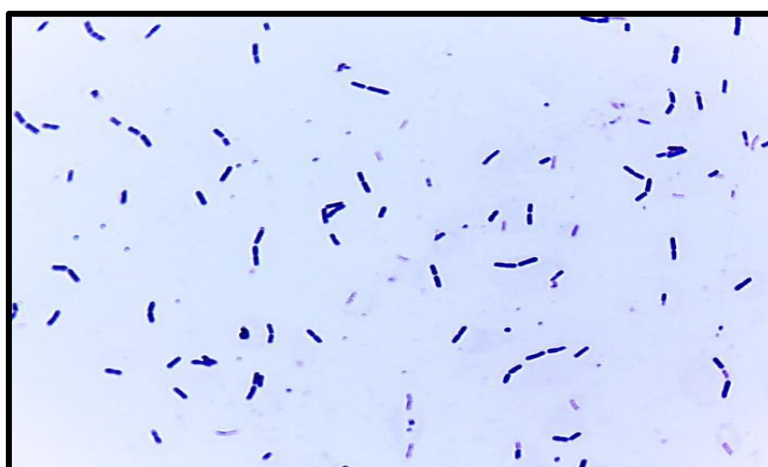


Figure 10 Coloration de Gram positive de la souche N°13 (Grossissement X100).

4.1.4.3- Caractères biochimiques

- **Type respiratoire**

Après 24h d'incubation sur gélose VF, la bactérie N°13 a présenté une croissance uniquement en haut de la gélose ce qui indique qu'elle est aérobie (figure 11).

- **Test oxydase**

Le test de l'oxydase effectué sur la bactérie N°13 a montré qu'elle est oxydase négative car elle est restée incolore après contact avec le disque contenant le diméthyle paraphylène diamine (figure 11).

- **Test catalase**

Le test montre que la souche est catalase positive, car elle présente des bulles après le dépôt du peroxyde d'hydrogène (figure 11).

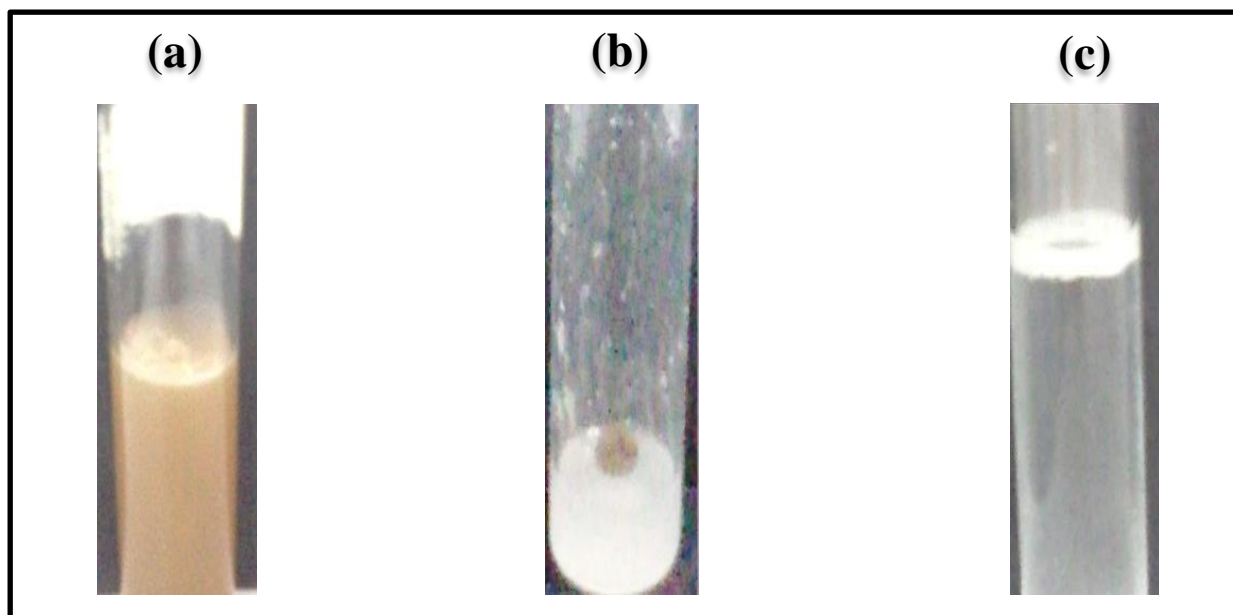


Figure 11 Caractères biochimiques de la bactérie N°13 : (a) type respiratoire, aérobie ; (b) test d'oxydase, négatif; (c) test de catalase, positif.

4.1.4.4- Traitement thermique

Après avoir effectué un traitement thermique sur la bactérie N°13, à 80°C pendant 10 minutes, la lecture a montré l'apparition de colonies bactériennes après 24h d'incubation sur GN, signifiant la persistance des spores dans la solution traitée (figure 12).

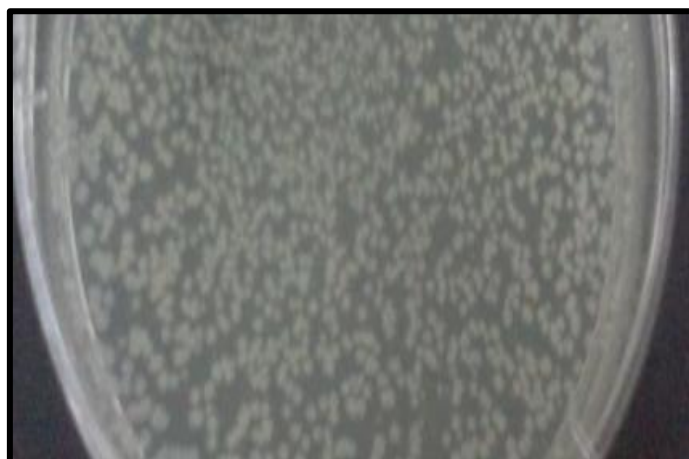


Figure 12 Croissance de la bactérie 13 après élimination de la forme végétative (culture sur GN après 24h d'incubation).

En se basant sur les résultats obtenus à partir de l'étude macroscopique, microscopique et biochimique effectuées sur la bactérie N°13 (tableau 2), il a été conclu que cette dernière appartient au genre *Bacillus*. Le développement de spores par cette bactérie confirme cette identification.

Tableau 2 Récapitulatif des résultats d'identification de la bactérie N°13

N° des souches isolées	Localisation (source d'échantillon)	Etat frais	Coloration de Gram	Type respiratoire	oxydase	catalase	Traitement thermique	Identification présumée
13	Sol agricole (15cm)	Grands bacilles mobiles	+	AS	--	+	Développe des spores	<i>Bacillus</i>

4.2- Activité antifongique et libération des protoplastes

Dans ce travail, l'effet antifongique des molécules bioactives produites par *Bacillus sp.* est caractérisé par l'action de ces molécules sur la paroi de *F. oxysporum* et de *Y. lipolytica* ainsi que la libération des protoplastes après sa dégradation.

4.2.1- Libération des protoplastes des moisissures

Cette expérience est effectuée en présence et en absence du milieu de culture MEM. Pour la première expérience réalisée en présence du MEM, le suivi microscopique effectué chaque 30 minute a montré un épaississement dans la partie apicale du filament, observé après les premières 30 minutes, en comparaison à celui du témoin (culture de *F. oxysporum* sur milieu MEM) (figure 13). Après 1h d'incubation, l'examen microscopique a montré la formation de cellules rondes au niveau apical du thalle (figure 13), indiquant le début de libération de protoplastes. Cette libération est observée aussi au niveau de la partie centrale de l'hyphe et ce après 2h d'incubation (figure 13). Les protoplastes sont complètement libérés dans le milieu de culture après 3h d'incubation (figure 13). Par ailleurs, le suivi de la libération des protoplastes, effectuée en absence du milieu MEM, a montré qu'au bout d'une heure le thalle commence à s'épaissir et les protoplastes commencent aussi à se libérer (figure 14). Les protoplastes continuent toujours à se libérer dans le milieu de culture et ce, après 2h d'incubation. Enfin, l'examen microscopique effectué après 3h a montré une libération d'un nombre important de protoplastes, cependant leurs diamètre était moins important que celui des protoplastes libérés durant la première expérience (en présence du milieu MEM) (figure 14).

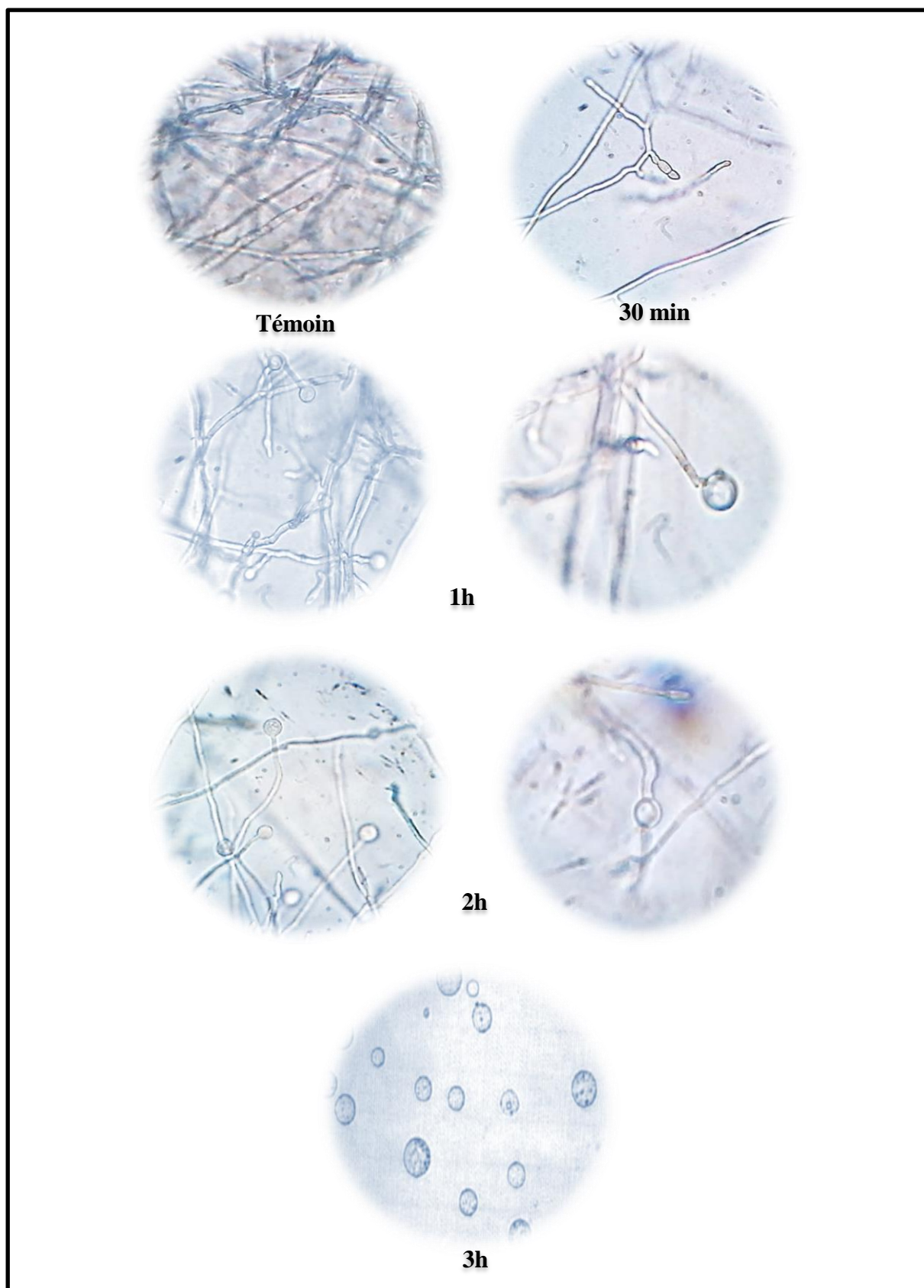


Figure 13 Suivre microscopique de la libération des protoplastes de *F. oxysporum* en présence du milieu MEM au grossissement X100.

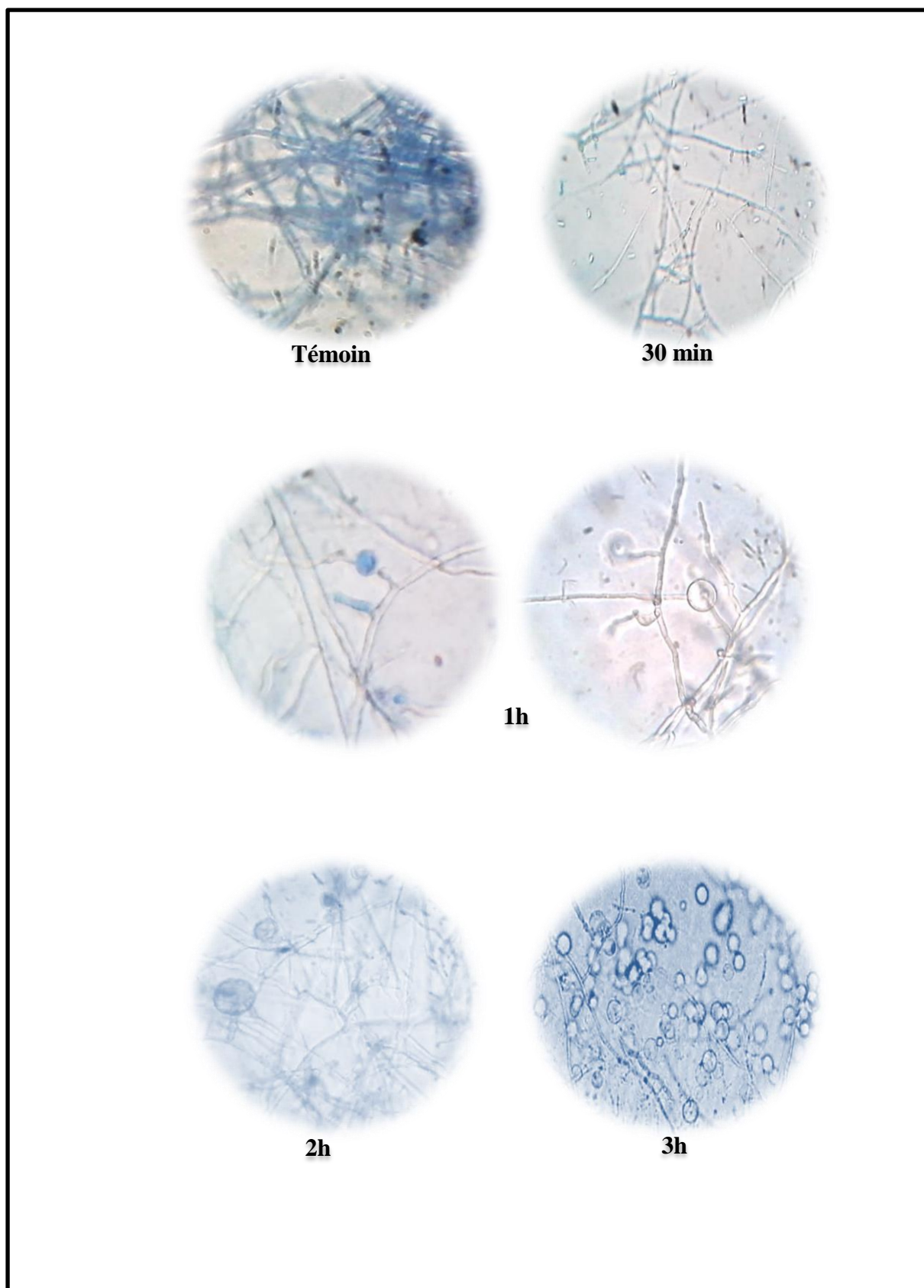


Figure 14 Suivre microscopique de la libération des protoplastes de *F. oxysporum* en absence du milieu MEM au grossissement X100.

4.2.2- Libération des protoplastes des levures

La libération des protoplastes de *Y. lipolytica* est effectuée en utilisant le $MgSO_4$ et le sucrose comme stabilisateur osmotique. Pour la première expérience, réalisée en utilisant le $MgSO_4$, le suivi microscopique effectué après les premières 30 minutes n'a montré aucun changement par rapport au témoin (*Y. lipolytica* cultivée dans le milieu MEM) (figure 15). Cependant, un changement morphologique de la levure est observé après 1 heure d'incubation. Les protoplastes, de forme ronde, commencent à se libérer dans le milieu de culture après 2h d'incubation (figure 15), la même observation est notée après 3h d'incubation.

Par ailleurs, la libération des protoplastes de *Y. lipolytica* en présence du sucrose comme stabilisateur osmotique a montré que les protoplastes commencent à se libérer après 2h d'incubation, cependant leur quantité était beaucoup plus faible que celle observée en présence du $MgSO_4$ (figure 16). Ce résultat révèle que l'utilisation du $MgSO_4$ comme stabilisateur osmotique est meilleur que l'utilisation du sucrose pour la libération des protoplastes des levures.

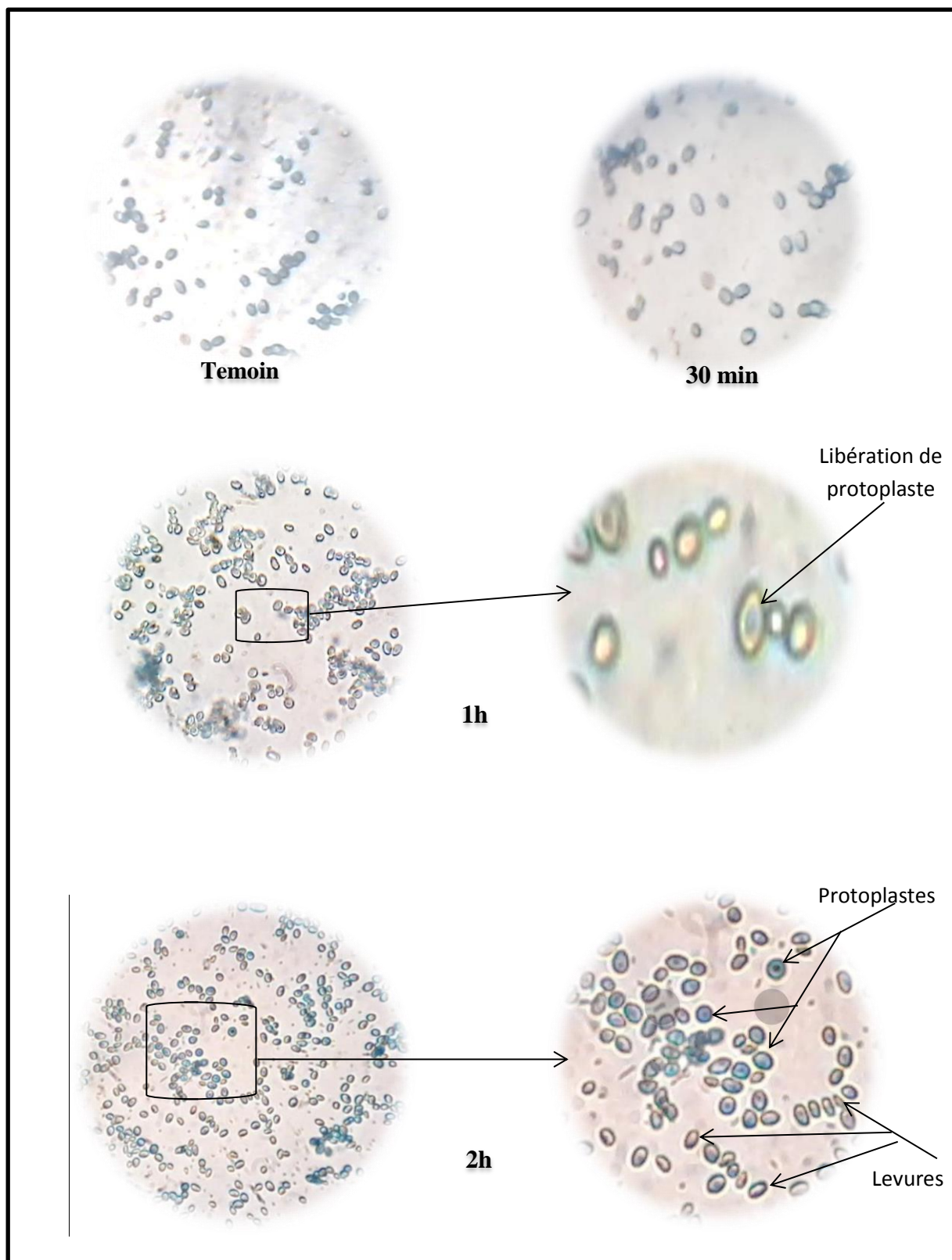


Figure 15 Suivre microscopique de la libération des protoplastes de la levure en utilisant le $MgSO_4$ comme stabilisateur osmotique au grossissement X100.

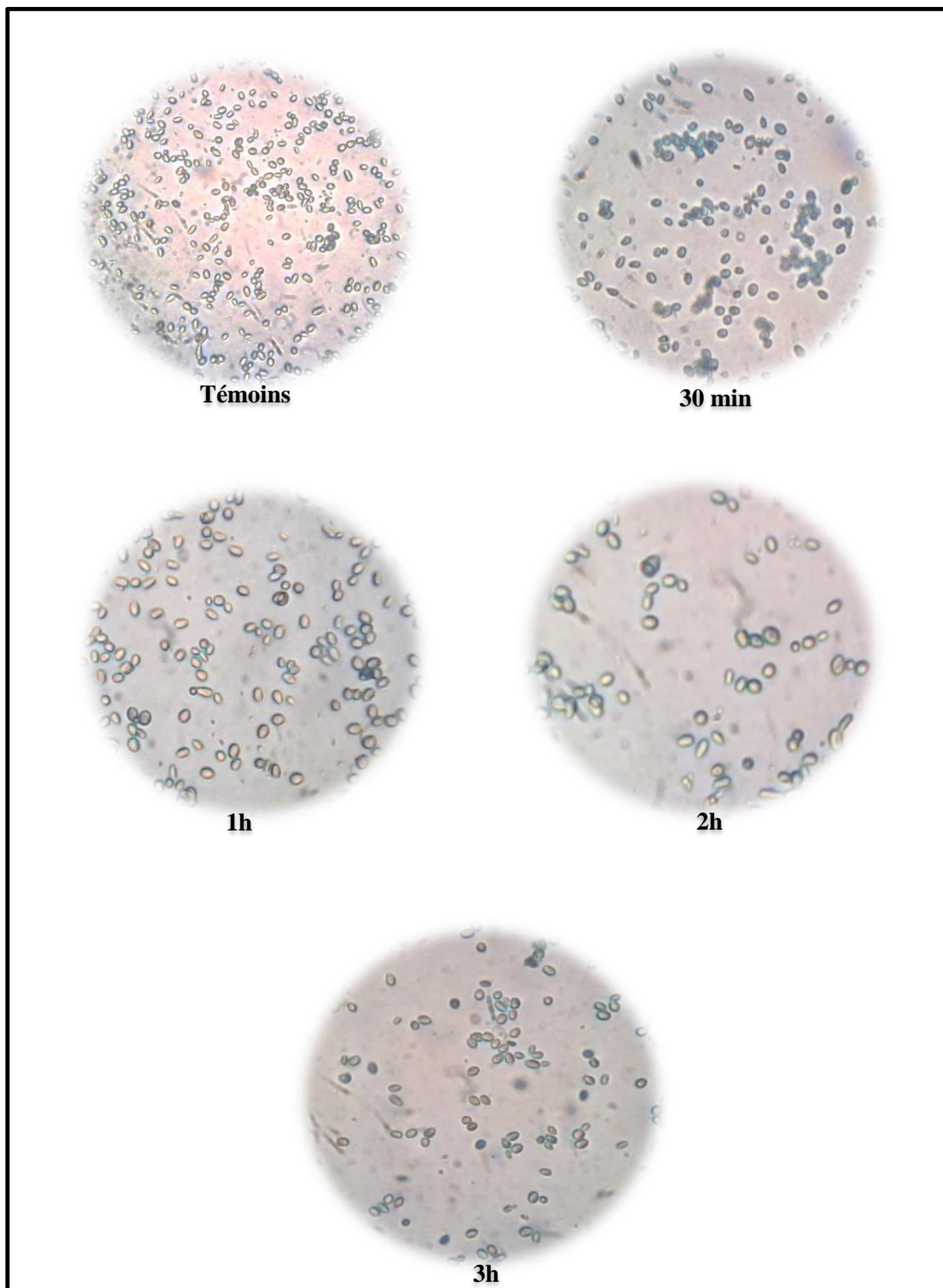


Figure 16 Suivi microscopique de la libération des protoplastes de la levure en utilisant le Sucrose comme stabilisateur osmotique au grossissement X100.

4.3- Récupération des protoplastes

Après récupération des surnageants de culture de *Y. lipolytica* et de *F. oxysporum*, contenant les protoplastes, et application de la technique de récupération des protoplastes, un examen microscopique a montré l'efficacité de la méthode appliquée pour cet objectif. En effet, cet examen a montré la présence de protoplastes dans le milieu MTC pour les deux champignons.

Le diamètre des protoplastes de *F. oxysporum* est beaucoup plus petit en comparaison à leur diamètre après libération (figure 17-a). Par contre, les protoplastes de *Y. lipolytica* récupérés sont du même diamètre que celui des protoplastes libérés, cependant leurs nombre était réduit (figure 17-b).

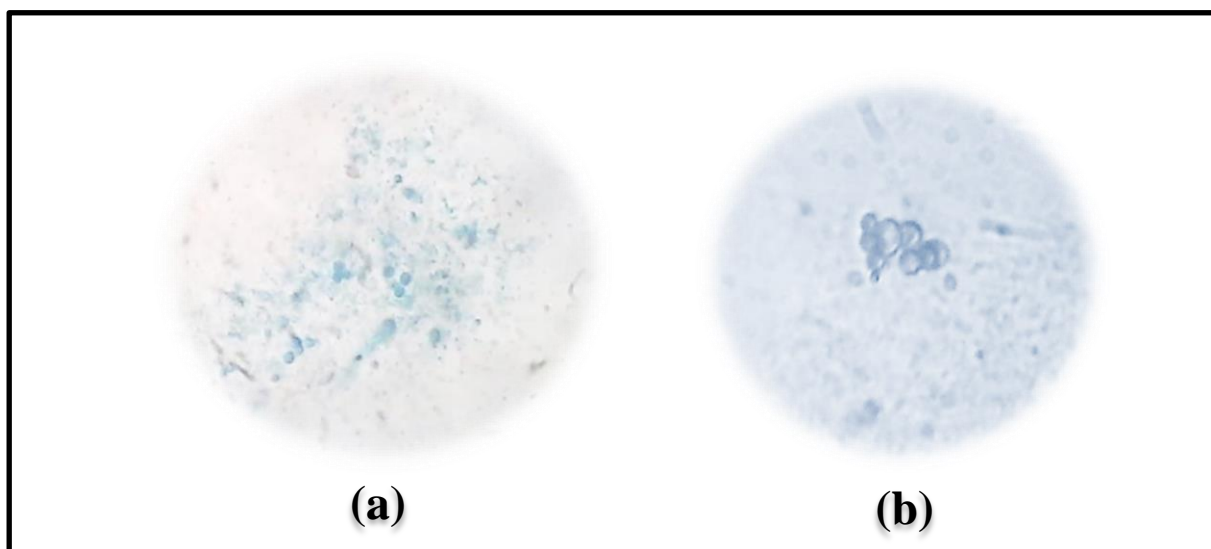


Figure 17 Récupération des protoplastes : (a) protoplastes de *F.oxysporum* ; (b) protoplastes de *Y.lipolytica* au grossissement X100.

Discussion

5- Discussion

La fusion des protoplastes fongiques qui sont devenus un moyen de base indispensable pour la recherche. Il faut d'abord passer par leur libération, en dégradant la paroi par l'intermédiaire de molécules bioactives qui agissent directement sur la paroi des microorganismes. Plusieurs substances sont produites par des bactéries, mais qui diffèrent selon leurs modes d'action. Cette étude vise à isoler des bactéries possédant une activité antifongique; dont les molécules synthétisées doivent agir sur la paroi en libérant les protoplastes. Ces derniers peuvent être récupérés pour une éventuelle application purement biotechnologique.

Pour rappel, la stratégie de notre travail repose sur trois axes principaux :

- 1- Isolement des bactéries à partir des sols agricole et forestier de la région de Constantine ;
- 2- Sélection et identification des souches bactériennes susceptibles de développer une bonne activité antifongique ;
- 3- Caractérisation de cette activité, en se focalisant sur l'action des molécules antifongiques sur la paroi, et par conséquent la libération des protoplastes fongiques dans le milieu de culture ;
- 4- Récupération des protoplastes produits en présence d'un stabilisateur osmotique.

Les échantillons du sol utilisés dans cette étude sont prélevés à partir des sols agricoles et forestiers de la région d'EL MRIDJ, située dans l'Est de la ville de Constantine. De ces sols, 62 isolats bactériens sont obtenus, dont 29 appartiennent au sol agricole. Ces sols sont connus par leur nombre important de bactéries, puisque ils sont chargés en matière organique et en carbone (Monnat *et al*, 2011).

L'action antagoniste des bactéries isolés vis-à-vis des champignons test en l'occurrence, *Fusarium oxysporum* et *Y. lipolytica* a été évaluée par un test de confrontation directe sur gélose. Parmi les 62 bactéries isolées, un seul isolat bactérien a développé une activité antifongique importante vis-à-vis *F. oxysporium* et *Y.lipolytica* et ce, en développant une zone de lyse nette et remarquable.

Discussion

L'identification de l'isolat bactérien par des tests microscopiques et biochimiques a permis de déterminer le genre de la bactérie, elle correspond selon Freney *et al.*, (2007) au genre *Bacillus Sp* ; car elle est de forme Bacille mobile, positive à la coloration de Gram, dotée de l'enzyme catalase, ne possède pas de l'oxydase et produit des spores.

Le surnageant de culture de *Bacillus sp.* contenant les molécules antifongiques a servi pour détruire la paroi fongique de *F. oxysporum* et de *Y. lipolytica* et de libérer leurs protoplastes et ce, en présence d'une solution de stabilisateur osmotique et du milieu MEM.

Dans ce travail, les paramètres de la libération des protoplastes ont été choisis d'après l'étude effectuée par Robinson et Deacon, (2001) ; qui ont étudié les variations de chaque paramètre de libération : température, pH, stabilisateurs osmotiques, quantité de biomasse et l'âge de la culture fongique.

La température et le pH affecte l'activité des enzymes et du stabilisateur osmotique. Une température plus élevée que l'optimale peut provoquer l'agglutination des organites dans les protoplastes isolés, tandis que de basse température affecte la stabilité de la membrane des protoplastes. La température à laquelle les champignons perdent leur paroi cellulaire par enzymolyse varie entre 24 ° C et 35 ° C. La valeur du pH est également un facteur important qui affecte la libération de protoplastes à cause de son effet sur l'activité enzymatique (Chauhan *et al.*, 2006).

La libération des protoplastes de la moisissure *F. oxysporum* effectuée, en présence et en absence du milieu MEM a montré que l'utilisation de ce dernier conduit à une production de protoplastes de diamètre important que celui des protoplastes produits en absence du milieu MEM. Ces résultats corroborent ceux de Ferrer *et al.*, 1985 et de Robinson et Deacon, 2001.

Cependant, la libération des protoplastes de *Y. lipolytica* n'a été effectuée qu'en présence du milieu MEM, en ajoutant du MgSO₄ comme stabilisateur osmotique pour une première expérience et le sucrose pour une deuxième expérience. Il s'est avéré que l'utilisation du MgSO₄ est nettement mieux que le sucrose, puisque il conduit à une libération rapide des protoplastes dans le milieu de culture, contrairement aux résultats de Ferrer *et al.*, (1985) qui révèlent que le sucrose est meilleur que le MgSO₄.

Par ailleurs, la libération des protoplastes de *F. oxysporum*, commence au niveau de la partie apicale de l'hyphe, et après un bon moment elle engendre le centre. Cependant, pour *Y. lipolitica* la libération s'accompagne par un changement de sa forme qui devient ronde. Ces observations sont similaires à celles de Dilip, (2004) qui indique que la libération des protoplastes chez les moisissures débute au niveau de l'apex car il représente la partie jeune du filament puis passe à la partie centrale qui est la partie vieille de la moisissure. Par contre, pour les levures une petite lésion au niveau de la paroi s'élargit jusqu'à la libération totale des protoplastes.

Du fait de l'absence de la paroi et la pression osmotique, les cellules libérées changent de forme, ils adoptent une forme sphérique (Dilip, 2004). La paroi est une structure de protection, elle protège la cellule fongique en maintenant la pression osmotique (de 4 à 20 atmosphères). Mais en présence de substances antifongiques, une inhibition de la synthèse d'un des constituants de la paroi s'impose suivie d'une libération de protoplastes qui sont sensibles à la pression osmotique et s'éclate facilement. (Robinson et Deacon, 2001).

De leur côté, Chauhan *et al.*, (2006) confirment que si les cellules fongiques sont placées dans une solution hypotonique (plus diluée), les cellules traitées aux antifongiques perdent leur résistance à la pression osmotique interne et éclatent. Pour cela, dans ce travail les cellules fongiques sont incubées en présence de substances antifongiques dans une solution isotonique (de même pression osmotique) sont transformées en protoplastes qui survivent aussi longtemps que l'isotonie est maintenue. Le même principe est suivi par plusieurs recherches qui s'intéressent à la libération des protoplastes fongiques tels que les travaux de Chitnis et Deshpande, (2002).

Le milieu d'obtention des protoplastes est constitué d'un milieu nutritif additionné à une solution de stabilisateur osmotique et au surnageant de *Bacillus sp.* Dans son travail, Dilip, (2004) mentionne que le milieu de libération des protoplastes est généralement enrichi en glucides non-métabolisables tels que le mannitol ou le sorbitol. D'autres glucides ou sels minéraux peuvent être utilisés pour diminuer l'activité de l'eau du milieu extracellulaire avec le milieu intracellulaire. La plasmolyse des cellules permet également de "décoller" la membrane plasmique des cellules de la paroi. Ceci protège les cellules des fragments de cellulose pouvant perforer le protoplaste pendant la digestion.

Discussion

Dans la littérature, la libération des protoplastes est faite principalement par des enzymes d'origines fongique (Ferrer *et al.*, 1985 ; Chitnis et Deshpande, 2002). Cependant, il n'y a pas assez de travaux sur la libération de protoplastes par des métabolites secondaires d'origine bactérienne.

En complément, la récupération des protoplastes à partir du surnageant de culture de *F. oxysporum* a révélé qu'ils sont de petite taille en comparaison à ceux libérés dans le milieu MEM. Par contre les protoplastes de *Y. lipolytica* ont gardé le même diamètre que celui des protoplastes libérés auparavant. Dans leur étude, Chauhan *et al.*, (2006) mentionnent que les protoplastes sont excessivement fragiles, ils doivent être manipulés avec beaucoup de délicatesse pour ne pas provoquer la lyse de leurs membrane plasmique.

*Conclusion et
perspectives*

6- Conclusion et perspectives

Dans ce travail, la recherche de bactéries à effet antifongique, effectuée sur différents échantillons du sol agricole et forestier de la région d'EL MRIDJ, a abouti à 62 isolats bactériens, dont 29 sont isolés à partir du sol agricole. Le test d'activité antifongique effectué par les isolats bactériens obtenus, a permis de sélectionner une bactérie présentant un effet antifongique remarquable vis-à-vis de la moisissure *Fusarium oxysporum* et de la levure *Yarrowia lipolytica*.

L'identification de cet isolat bactérien est basée sur une étude morphologique, englobant un examen macroscopique et microscopique à savoir, l'état frais et la coloration de Gram, une étude biochimique (catalase, oxydase, type respiratoire) et enfin un traitement thermique confirmant l'appartenance de cette bactérie au genre *Bacillus*.

Les substances bioactives, à effet antifongique, synthétisées par *Bacillus sp.* présentent une action directe sur la paroi de *F. oxysporum* et sur la paroi de *Y. lipolytica*, révélé par la libération des protoplastes de ces Mycètes dans le milieu de culture.

La libération des protoplastes de *F. oxysporum*, effectuée par l'action du surnageant de culture de *Bacillus sp.* additionné au stabilisateur osmotique ($MgSO_4$) était plus rentable en présence du milieu MEM, les protoplastes libérés sont nombreux et de grande taille. Cependant, en absence du milieu MEM leur taille était plus petite.

Par ailleurs, la libération des protoplastes de *Y. lipolytica* n'a été effectuée qu'en présence du milieu MEM, en ajoutant du $MgSO_4$ comme stabilisateur osmotique pour une première expérience et le sucrose pour une deuxième expérience. Il s'est avéré que l'utilisation du $MgSO_4$ est nettement mieux que le sucrose, puisque il conduit à une libération rapide des protoplastes dans le milieu de culture.

En complément, la technique appliquée pour la récupération des protoplastes libérés et ce, en présence du milieu MTC, a montré que les protoplastes de *F. oxysporum* étaient de petites tailles en comparaison à ceux libérés auparavant, tandis que les protoplastes récupérés de *Y. lipolytica* étaient du même diamètre que celui des protoplastes libérés dans le milieu.

Perspectives

Au terme de cette recherche nous pouvons nous fixer les points suivants comme perspectives :

- Identification complète de *Bacillus sp.* par voie moléculaire à savoir, le séquençage du gène 16S rDNA;
- Production, extraction et séparation des substances antifongiques produites par *Bacillus sp.* afin de les identifier;
- Etude et optimisation des paramètres influençant la libération et la récupération des protoplastes afin d'améliorer leurs caractéristiques qualitatives et quantitatives;
- Se focaliser sur l'étude de fusion des protoplastes dans le but d'une amélioration génétique des souches, et qui peut être exploitées en biotechnologies

Résumé

7- Résumé

L'exploration des sols forestiers et agricoles de la région d'EL MRIDJ a abouti à l'isolement de 62 isolats bactériens dont le but est de tester leurs capacité à inhiber le développement des mycètes test en l'occurrence, *F. oxysporum* et *Y. lipolytica*. Une seule bactérie a montré un effet antifongique remarquable vis-à-vis des mycètes test et ce par la technique de diffusion sur gélose.

L'identification de cet isolat bactérien, fondée sur une étude morphologique (état frais et coloration de Gram) et biochimique (catalase, oxydase et type respiratoire) a montré qu'il s'agit d'un *Bacillus sp.* Un traitement thermique effectué à 80°C pendant 12 min a révélé la présence de spores confirmant l'appartenance de cette souche au genre *Bacillus*.

Par ailleurs, l'étude de l'effet antifongique des molécules bioactives contenus dans le surnageant de culture bactérien, a montré que ces molécules agissent directement sur la paroi des champignons causant la libération de leurs protoplastes dans le milieu de culture.

En effet, la libération des protoplastes de *F. oxysporum* effectuée par l'action du surnageant de culture de *Bacillus sp.* additionné au stabilisateur osmotique ($MgSO_4$) était plus rentable en présence du milieu MEM. En revanche, la libération des protoplastes des levures, effectuée uniquement sur le milieu MEM, en ajoutant du $MgSO_4$ comme stabilisateur osmotique pour une première expérience et le sucrose pour une deuxième expérience a montré que l'utilisation du $MgSO_4$ est nettement mieux que le sucrose, puisque il conduit à une libération rapide des protoplastes dans le milieu de culture.

La récupération des protoplastes libérés en présence du milieu MTC a révélé que les protoplastes de *F. oxysporum* étaient de petites tailles en comparaison à ceux libérés auparavant, tandis que les protoplastes récupérés de *Y. lipolytica* étaient du même diamètre que celui des protoplastes libérés dans le milieu.

Mots clés : Substances antifongiques, Bactéries, *Bacillus sp.*, Mycètes, *Fusarium oxysporum*, *Yarrowia lipolytica*, Protoplastes.

ملخص

ان الاستكشافات المتعلقة بالتربة الغائبة والزراعية لمنطقة 'المريخ' أدت الى عزل 62 عزلة بكتيرية بهدف اختبار قدرتها على تثبيط نمو وتطور الفطريات في هذا الاختبار، *F.oxysporum* و *Y.lipolytica* بكتيريا واحدة بينت تأثير خاصة المضاد للفطري (antifongique) لوحظت بالنسبة للفطريات المختبرة بواسطة تقنية النشر على الجيلوز.

تحديد هذه العزلة البكتيرية يعتمد على دراسة بنيوية (état frais et coloration de Gram) و بيوكيميائية (انزيم Catalase ، Oxydase ، ووسط تنفسي) بينت أنه يدل على *Bacillus sp* بواسطة المعالجة الحرارية التي تصل درجة الحرارة الى 80م خلال 12 دقيقة كشفت على وجود جراثيم تؤكد الصفات الظاهرية الخاصة بهذه السلالة *Bacillus* من ناحية اخرى، فان دراسة تأثير المضاد الفطري (antifongique) للجزيئات الحيوية المحتوية في "surnageant de culture bactérien"، بينت أن هذه الجزيئات تعمل مباشرة على جدار الفطريات مسببة تحرير البروتوبلاست في وسط الزرع.

في الواقع، ان تحرير البروتوبلاست الخاص بـ *F.oxysporum* مدعوم بعمل 'surnageant' لسلالة *Bacillus sp* المضاف الى محلول الاستقرار الاسموزي كبريتات المغنزيوم $MgSO_4$ كانت اكثر انتاجا في وجود وسط MEM من جهة اخرى ، تحرير بروتوبلاست الخميرة تحققت فقط في وسط MEM ،مضاف اليه كبريتات المغنزيوم $MgSO_4$ - يعمل كموازن اسموزي للتجربة الاولى، و السكروز (Sucrose) للتجربة الثانية، بينت ان استعمال كبريتات المغنزيوم ($MgSO_4$) هو الافضل بكثير من السكروز (sucrose) لأنه يؤدي الى تحرير سريع للبروتوبلاست - في وسط الزرع . استرجاع البروتوبلاست المحرر في وجود وسط MTC كشفت أن البروتوبلاست الخاص بـ *F.oxysporum* كانت صغيرة الحجم مقارنة مع الذي حررت سابقا، في حين ان البروتوبلاست المسترجع الخاص بـ *Y.lipolytica* كان لها نفس قطر البروتوبلاست المحرر في الوسط .

الكلمات المفتاحية : المواد ، مضاد الفطري، بكتيريا، *Bacillus sp*، الفطريات، فطر الفيزاريوم-اوكريسبوريم، فطر ياروبا-ليبوليتيكا، بروتوبلاست

Abstract

The exploration of forest and agricultural soils in the El MRIDJ area led to the isolation of 62 bacterial isolates which to test their ability to inhibit the growth of test fungi namely, *F. oxysporum* and *Y. lipolytica*. One bacterium has shown a remarkable antifungal effect vis-à-vis the test fungi and by the agar diffusion technique. The identification of the bacterial isolate, based on morphological uneétude (fresh and Gram stain) and biochemical (catalase, oxidase et type respiratory) showed that this is a *Bacillus* sp. Un heat treatment at 80 ° C for 12 min showed the presence of spores of this confirming the strain belonging to the genus *Bacillus*. Furthermore, the study of the content of bioactive antifungal effect in the bacterial culture supernatant molecules showed that these molecules act directly on the wall of fungi causing their release protoplasts in the culture medium. Indeed, the release of protoplasts *F. oxysporum* powered by the action of the culture supernatant of *Bacillus* sp. additionné osmotic stabilizer ($MgSO_4$) was more efficient in the presence of MEM medium. However, the release of yeast protoplasts, performed only on the MEM medium, adding $MgSO_4$ as osmotic stabilizer for a first experiment and sucrose for a second experiment showed that the use of $MgSO_4$ is significantly better than the sucrose, because it leads to a rapid release protoplasts in the culture medium. Recovery of protoplasts released in the presence of medium TCM found that protoplasts of *F. oxysporum* were small in size compared to those previously released while the protoplasts were recovered from *Y. lipolytica* the same diameter as that released into the protoplasts environment.

Key words: antifungal substances, bacteria, *Bacillus* sp, Fungi, *Fusarium oxysporum*, *Yarrowia lipolytica*, Protoplasts.

*Références
bibliographique*

Références bibliographique

- 1-Anonyme. (2014). GOOGLE EARTH.
- 2-Baudry C., Huguet B et Wolters K. (2006). *Microbiologie et immunologie*. France. P34-37.
- 3-Bourguignon L., Bourguignon C. (2008). *Le sol la terre et les champs*. sang de la terre. (edn). Chapitre 2 ; P55. 68.
- 4-Burges A and Raw F. (2012). *Soil biology*. Academic Press London and New York.
- 5- Calvet R. 2003. *Le sol : propriétés et fonctions*. Editions 1. Paris.
- 6-Carip C. (2008). *Microbiologie*. Hygiene Medicales internationaux. Mic/015. P 9.10.19.
- 7-Champion R. (1997). *Identifier les champignons transmis par les semences*. 4^{ème} Editions. P 190-193.
- 8-Chauhan A and VARMA A. (2006). *Microbes: Health and Environment ; I. K. International. Pvt. Ltd.* P 243-253.
- 9-Daren W et Brown R. H. (2013). *Horizon Scientific Press*. P1-10.
- 10- Davet P. (1996). *Vie microbienne du sol et production végétales*.(edn)INRA. Paris.
- 11-Delarras C. (2007). *Microbiologie pratique pour le laboratoire*. (edn) Lavoisier . Paris. Mic 007. P 195-199.
- 12-Dilip K. A. (2004). *Handbook of Fungal Biotechnology*. CRC Press. P 9-20.
- 13-Dromigny E. (2008). *Microbiologie: bacillus cereus*. Medicales Internationals. P 31. 51 .105.
- 14-Kebe J., Ismaël B., Joseph M, Kouamé F., Prakash K. Hebbar H, Gary S., Samuel S and Severin A. (2009). *Isolement et identification de microorganismes indigènes de cacaoyèresen Côte d'Ivoire et mise en évidence de leurs effets antagonistes vis-à-vis de Phytophthora palmivora, agent de la pourriture brune desc abosses*. UFR Biosciences. Côte d'Ivoire.

Références bibliographique

- 15-Manisha V., Chitnis., Mukund V et Deshpande. (2001). Isolation and regeneration of protoplasts from the yeast and mycelial form of the dimorphic zygomycete *Benjaminiella poitrasii*: Role of chitin metabolism for morphogenesis during regeneration. *Microbiol. Res.* **157**: 29-37
- 16-Mansour S. (2009). *Etude de la levure yarrowia lipolytica dans un ecosystème fromager par une approche transcriptomique*. Thèse pour obtenir le grade de Docteur. Institut des Sciences et Industries du Vivant et de l'Environnement. Agro Paris Tech.
- 17-Monnat T., Chompunuch V., Suphang Ch., Nusara S., World J and Warawut Ch. (2011). Nitrite reductase genes from non-agricultural forest soil bacteria. *Microbiol Biotechnol* .Thailand.
- 18-Moreira F.M. S., Huising E. Jeroen et Bignell E. D. (2012). *Tropical Soil Biology*. Chapitre 1.
- 19- Naseema A., Dhanya B., Anjanadevi I.P., Sheena K.G and Swapna Alex. (2008). Isolation and regeneration of protoplasts from the mycelium of *Fusarium pallidoroseum* – a potential biocontrol agent of water hyacinth. *Journal of Tropical Agriculture* **64** (1-2): 67-69.
- 20-Nauciel C., Elsevier M et Jean-Louis V. (2005). *Bactériologie médicale*. P 5-16.
- 21-Patrick V. (2008). *Mécanismes Moléculaires De La Résistance aux Antifongiques Chez Candida glabrata*. Thèse De Doctorat. Ecole Doctorale D'Angers. Université d'Angers.
- 22-Prescott., Harley., Klein., Wiley., Sherwood et Woolverton. (2010). *Microbiologie*. (3eme edition). P 167-519.
- 23-Ripert C. (2013). *Mycologie médicale*. Lavoisier. P 1. 9. 11. 12.
- 24-Robinson H et Deacon J.D. (2001). Protoplast Preparation and Transient Transformation of *Rhizoctonia solani*. *Mycol. Res.* **105** (11): 1295-1303.
- 25-Singleton P. (2005). *Bactériologie pour la médecine*. La biologie et les biotechnologies, (6th edn) DUNOD. Paris.

Annexe

1-Milieux de culture

Gélose nutritive (GN)

C'est un milieu d'isolement non sélectif dont la composition chimique théorique en g /L d'eau distillé est :

Peptone	10
Extrait de viande	5
Chlorure de sodium	5
Gélose	15

A pH 7.2, autoclaver 20 min à 120 °C.(Guiraud, 1998).

Gélose sabouraud (SAB)

ce milieu est recommandé pour la culture des champignons grâce à la présence de trois peptone et du glucose ; ainsi que le PH acide(6.4).(Delarras).

La composition chimique théorique de ce milieu en g /L d'eau purifiée est

Peptone de viande(bovin ou porcin)	3
Peptone de caséine (bovin)	3
Peptone de soja	3
Extrait de levure	2
Extrait de malt	1
Glucose	19
Phosphate monopotassique	0.5
Phosphate disodique	0.5
Agar	13

Milieu Viande foie (VF)

Base viande foie : 30,0 g

Glucose : 2,0 g

Agar : 6,0 g

pH = 7,4

Milieu gélosé PDA (poteatose dextrose agar)

La composition chimique théorique de ce milieu en g /L d'eau purifiée est

Pomme de terre	200
GLUCOSE	20
AGAR	20

Milieu liquide YPG (yeast peptone glucose)

La composition en g/l :

Extrait de levure	20
Peptone	10
Glucose	10

Le pH est compris entre 5 et 6. autoclave à 120°C pendant 15 min (John, 1996).

Milieu liquide MEM (extrait de levure extrait de malt dextrose)

La composition en g/l

Extrait de levure	5
Extrait de mal	5
Dextrose	5

2-Solutions et colorants

Stabilisateur osmotique (MgSO₄)

La composition en M/L

MgSO ₄	0.98 M
Na ₂ HPO ₄	8.4 mM
NaH ₂ PO ₄	1.6 mM
pH	5.5

Stabilisateur osmotique (Sucrose)

La composition en M/L :

Sucrose	0.98 M
pH	5.5

Solution de rinçage (MgSO₄)

La composition en M/L :

MgSO ₄	0.6 M
-------------------	-------

Solution de rinçage (MTC) :

La composition en M/L :

Manitol	1 M
Tris-Cl	10 mM
CaCl ₂	50 mM
ph 7.5	

Lactophérol bleu coton

Présenté par MOKRANI Oumnia et KICILI Samira	Date soutenance : 25/06/2014												
Thème : Recherche de bactéries à activité antifongique à partir du sol agricole et forestier de la région de Constantine													
<p>Résumé :</p> <p>L'exploration des sols forestiers et agricoles de la région d'EL MRIDJ a abouti à l'isolement de 62 isolats bactériens dont le but est de tester leurs capacités à inhiber le développement des mycètes test en l'occurrence, <i>F. oxysporum</i> et <i>Y. lipolytica</i>. Une seule bactérie a montré un effet antifongique remarquable vis-à-vis des mycètes test et ce par la technique de diffusion sur gélose.</p> <p>L'identification de cet isolat bactérien, fondée sur une étude morphologique (état frais et coloration de Gram) et biochimique (catalase, oxydase et type respiratoire) a montré qu'il s'agit d'un <i>Bacillus</i> sp. Un traitement thermique effectué à 80°C pendant 12 min a révélé la présence de spores confirmant l'appartenance de cette souche au genre <i>Bacillus</i>.</p> <p>Par ailleurs, l'étude de l'effet antifongique des molécules bioactives contenus dans le surnageant de culture bactérien, a montré que ces molécules agissent directement sur la paroi des champignons causant la libération de leurs protoplastes dans le milieu de culture.</p> <p>En effet, la libération des protoplastes de <i>F. oxysporum</i> effectuée par l'action du surnageant de culture de <i>Bacillus</i> sp. additionné au stabilisateur osmotique (MgSO₄) était plus rentable en présence du milieu MEM. En revanche, la libération des protoplastes des levures, effectuée uniquement sur le milieu MEM, en ajoutant du MgSO₄ comme stabilisateur osmotique pour une première expérience et le sucrose pour une deuxième expérience a montré que l'utilisation du MgSO₄ est nettement mieux que le sucrose, puisque il conduit à une libération rapide des protoplastes dans le milieu de culture.</p> <p>La récupération des protoplastes libérés en présence du milieu MTC a révélé que les protoplastes de <i>F. oxysporum</i> étaient de petites tailles en comparaison à ceux libérés auparavant, tandis que les protoplastes récupérés de <i>Y. lipolytica</i> étaient du même diamètre que celui des protoplastes libérés dans le milieu.</p>													
Mots clés : Substances antifongiques, Bactéries, <i>Bacillus</i> sp., Mycètes, <i>Fusarium oxysporum</i> , <i>Yarrowia. lipolytica</i> , Protoplastes.													
Laboratoire de recherche : Laboratoire de Mycologie, de Biotechnologies et de l'Activité Microbienne (LaMyBAM). Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie. Université Constantine 1													
<p>Jury d'évaluation:</p> <table border="0"> <tr> <td>Président de jury:</td> <td>Mme. MOSBAH F.</td> <td>M.A. Univ. Constantine 1</td> </tr> <tr> <td>Rapporteur:</td> <td>Mr. KACEM CHAOUCHE N.</td> <td>Prof. Univ. Constantine 1</td> </tr> <tr> <td>Tuteur:</td> <td>Mlle. YOUCEF- ALI M.</td> <td>Dr. Univ. Constantine 1</td> </tr> <tr> <td>Examineur:</td> <td>Mme. BOUCHERIT Z.</td> <td>M.A. Univ. Constantine 1</td> </tr> </table>		Président de jury:	Mme. MOSBAH F.	M.A. Univ. Constantine 1	Rapporteur:	Mr. KACEM CHAOUCHE N.	Prof. Univ. Constantine 1	Tuteur:	Mlle. YOUCEF- ALI M.	Dr. Univ. Constantine 1	Examineur:	Mme. BOUCHERIT Z.	M.A. Univ. Constantine 1
Président de jury:	Mme. MOSBAH F.	M.A. Univ. Constantine 1											
Rapporteur:	Mr. KACEM CHAOUCHE N.	Prof. Univ. Constantine 1											
Tuteur:	Mlle. YOUCEF- ALI M.	Dr. Univ. Constantine 1											
Examineur:	Mme. BOUCHERIT Z.	M.A. Univ. Constantine 1											

