

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

Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique

جامعة سعيدة د. مولاي الطاهر

Université SAIDA Dr. MOULAY Tahar



كلية العلوم

Faculté des Sciences

قسم البيولوجيا

Département de Biologie

N° d'Ordre

Mémoire pour l'obtention du diplôme de Master

Filière : Sciences biologiques

Spécialité : Microbiologie Appliquée

Thème

Contribution de l'étude de la microflore tellurique d'intérêt présente dans la rhizosphère des plantes médicinales

Présenté par :

- Mr. RAHOU Tayeb

Soutenu le :

Devant le jury composé de :

| | | |
|------------|--------------------------------|----------------------|
| Président | Mr. ADLI Djallal eddine Houari | MCA Université Saida |
| Examineur | Mr. BENABBOU Taha Ahmed | MCB Université Saida |
| Rapporteur | Mr. BELLIL Yahia | MCA Université Saida |

Année universitaire 2021/2022

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

Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique

جامعة سعيدة د.مولاي الطاهر

Université SAIDA Dr.MOULAY Tahar



N° d'Ordre

كلية العلوم

Faculté des Sciences

قسم البيولوجيا

Département de Biologie

Mémoire pour l'obtention du diplôme de Master

En Sciences biologiques

Spécialité : Microbiologie Appliquée

Thème

Contribution de l'étude de la microflore tellurique d'intérêt présente dans la rhizosphère des plantes médicinales

Présenté par :

- Mr. RAHOU Tayeb

Soutenu le :

Devant le jury composé de :

| | | |
|------------|-------------------------|----------------------|
| Président | Mr. ADLI Djalleddine | MCA Université Saïda |
| Examineur | Mr. BENABBOU Taha Ahmed | MCB Université Saïda |
| Rapporteur | Mr. BELLIL Yahia | MCA Université Saïda |

Année universitaire 2021/2022

Dédicaces

Je dédie le fruit de ce modeste travail :

À mes parents ;

À mes frères et sœurs ;

À ma famille ;

À mes ami(e)s.

Remerciements

Au terme de ce modeste travail de recherche, Je remercie d'abord Dieu, le tout puissant, qui m'a donné la force et le courage pour poursuivre mon études.

Je voudrai remercier tous ceux qui m'accordé leur aide et leurs encouragements.

En premier lieu, je remercie tout à mon encadreur Mr : BELLIL.Y d'avoir acceptée de me prendre en charge pour réaliser ce mémoire. Sans ses orientations et ses Suggestion les plus inestimables, ce mémoire n'aurait jamais pu voir le jour.

Mes remerciements sont aussi adressés aux membres du jury, Monsieur le président Mr : ADLI. D.E.H et l'examineur Mr : BENABBOU. T.A qui ont pris de leur temps pour lire ce manuscrit, avec : leurs remarques pertinentes. Je remercie aussi Mr : Hamed responsable du laboratoire de biologie, ainsi que les ingénieurs de laboratoire, de m'avoir accueilli au sein du laboratoire.

Enfin, mes remerciements vont également à toute personne acceptant de nous lire ce présent, de nous corriger et de nous conseiller.

Liste des abréviations

LB : Luria Bertani

YEM : yeast Extract Mannitol

TYG : Trypticase Yeast gélose

PDA : Potato dextrose agar

PGPR : Plant Growth Promoting Rhizobacteria

DAPG : 2, 4 diacéthylephoroglucinol

G : Gram

M : Mol

UFC : Unité formant colonie

GN : Gélose nutritive

DO : Densité optique

Liste des tableaux

| | |
|---|----|
| Tableau 1 : les composé des racines de plantes (giri et al.,2005) | 6 |
| Tableau 2 : Classification des actinomycetes..... | 10 |
| Tableau 3 : Classification de <i>Rosmarinus officinalis</i> | 17 |
| Tableau 4 : Classification d' <i>Artemisa herba alba</i> (Asso,1779)..... | 20 |
| Tableau 5 : La position systématique de l'espèce <i>Marrubium vulgare</i> selon (Judd W.S., 2002)..... | 22 |
| Tableau 6 : les echantillons de sols dans le laboratoire de l'univ de saida Les sachets est codées selon le tableau suivant: | 28 |
| Tableau 7 : Les souches sélectionnées pour les tests de salinités et l'antagonisme | 31 |
| Tableau 8 : Tableau récapulatif d'identification morphologique des souches sur milieu TYG | 36 |
| Tableau 9 : Tableau récapulatif d'identification morphologique des souches sur milieu YEM | 40 |
| Tableau 10 : Tableau récapulatif d'identification morphologique des souches sur milieu PDA..... | 43 |
| Tableau 11 : Tableau récapulatif d'identification morphologique des souches sur milieu LB..... | 46 |
| Tableau 12 : Les zones d'inhibitions des souches actives..... | 54 |

Liste des figures

| | |
|---|----|
| Figure 1 : Les plantes des zones de rhizosphères échantillonnées..... | 27 |
| Figure 2 : Les coordonnées géographiques des zones de prélèvement ;..... | 27 |
| Figure 3: les échantillons de sol au niveau de laboratoire | 28 |
| Figure 4: Conservation long durée dans des éppendorfs..... | 31 |
| Figure 5: isolement de milieu PDA..... | 35 |
| Figure 6: isolement de milieu TYG | 35 |
| Figure 7: isolement de milieu YEM | 35 |
| Figure 8: isolement de milieu LB | 35 |
| Figure 9: Les souche purifier a partir de milieu PDA | 35 |
| Figure 10 : histogramme de test de salinité Des souches de milieu LB (Log UFC/ ml)..... | 52 |
| Figure 11: histogramme de test de salinité Des souches de milieu YEM (Log UFC/ml)..... | 53 |
| Figure 12 : histogramme de test de salinité Des souches de milieu TYG (Log UFC/ ml)..... | 53 |
| Figure 13: histogramme de test de salinité Des souches de milieu PDA (Log UFC/ ml)..... | 54 |
| Figure 14 : Test antimicrobien vis-à-vis (<i>K .oxytoca _E.faecalis</i>)..... | 55 |
| Figure 15: Test antimicrobien vis-à-vis (<i>L.ivanovii-S/ Staphylococcus Intermedius</i>)..... | 55 |

Résumé

Le sol renferme des microorganismes extrêmement diversifiés. Cette biodiversité contrôle les échanges organiques et minéraux dans le sol. Cette étude avait pour but la recherche et l'isolement des souches bactériennes composant la microflore tellurique à partir des rhizosphères de trois plantes médicinales de la région de saïda dans deux zones différentes (Marube blanc, l'armoise et le Romarin. Après l'isolement sur différents milieux (PDA, LB, YEM, TYG) de 90 souches, un criblage des souches dotées d'une tolérance au stress salin a été effectué 30% des souches résistantes à la salinité avec un test d'antagonisme envers quatre bactéries indicatrices (*Klebsiella oxytoca* ATCC 13182, *Enterococcus faecalis* ATCC10541, *Listeria ivanovii* ATCC19119 et *Staphylococcus Intermedius* CECT 1205) avec un pourcentage de 72,22% inhibé les souches pathogènes. Quarante-deux souches ont été isolées avec une diversité morphologique. L'identification microscopique indique une dominance des bacilles à Gram+. Les souches isolées présentent une tolérance au stress salin avec un pourcentage de 22,22%, le test catalase s'est révélé positif avec 80% des isolats. Les résultats de test antimicrobien avec les bactéries indicatrices sont obtenus à l'exception avec *Enterococcus faecalis*.

Mots clés : Marrubium, l'armoise, Romarin, stress salin, test antimicrobien, Rhizosphère, microflore tellurique.

Abstract

The soil contains extremely diverse microorganisms. This biodiversity controls the organic and mineral exchanges in the soil. The purpose of this study was to research and isolate the bacterial strains that make up the telluric microflora from the rhizospheres of three medicinal plants in the saida region in two different zones (white Marube, sagebrush and rosemary. After isolation on different media (PDA, LB, YEM, TYG) of 90 strains, a screening of the strains with a tolerance to saline stress was carried out 30% of the strains resisting to salinity with an antagonism test against four indicator bacteria (*Klebsiella oxytoca* ATCC 13182, *Enterococcus faecalis* ATCC10541, *Listeria ivanovii* ATCC19119 and *Staphylococcus Intermedius* CECT 1205) with 72.22% inhibited pathogenic strains. Ninety strains were isolated with morphological diversity. Microscopic identification indicates dominance of Gram+ bacilli. The isolated strains have a tolerance to saline stress with a percentage of 22.22%, the catalase test was positive with 80% of isolates. Antimicrobial test results with indicator bacteria are obtained with the exception of *Enterococcus faecalis*.

Keywords: *Marrubium*, mugwort, rosemary, salinity test, antimicrobial test.

ملخص

تهدف هذه الدراسة إلى تنقية السلالات من تربة ثلاثة نباتات طبية هي المريروية و إكليل الجبل و الشيح في منطقتين مختلفتين.

لقد أجرينا تخفيفا لعيناتنا وأجرينا اختبارات مختلفة لتحديد الجانب الكلي والمجهري للبكتيريا المعزولة في وسائط مختلفة (PDA ، LB ، YEM ، TYG). السلالات المعزولة لديها القدرة على تحمل اختبار الإجهاد الملحي مع نسبة مئوية أكثر من النصف و 80% تقدم نتائج اختبار الكاتالاز إيجابية. يشير التحديد المجهرى إلى هيمنة عضية الجرام +. تقدم نتائج الاختبارات المضادة للميكروبات مع 4 سلالات مؤشرة هي (*Klebsiella oxytoca* ATCC 13182, *Enterococcus faecalis* ATCC10541, *Listeria ivanovii* ATCC19119 et *Staphylococcus Intermedius* CECT 1205) تعبيراً عن سلالات مختارة تتلامس مع سلالة المؤشر فقط مع *Enterococcus faecalis* الذي يمنع تكوين غالبية السلالات

الكلمات المفتاحية: المريروية، الشيح، إكليل الجبل، اختبار الملوحة، اختبار مضاد للميكروبات.

Table des matières

| | |
|---|----|
| I.1. Introduction..... | 2 |
| II.1. Le sol : | 4 |
| II.1.1. Définition :..... | 4 |
| II.1.2. RHIZOSPHERE : | 4 |
| II.1.2.1. Définition de la rhizosphère | 4 |
| II.1.2.2. Exsudation racinaire :..... | 5 |
| II.1.3. DIVERSITE DE LA MICROFLORE TELLURIQUE BENEFIQUE :..... | 7 |
| II.1.4. Lutte et interactions biologiques antagonistes dans la rhizosphere: | 7 |
| II.1.4.1. Définition de la lutte biologique : | 7 |
| II.1.4.2. Lutte biologique avec des microorganismes rhizosphériques antagonistes : | 8 |
| II.2. Le partenaire bactérien : | 8 |
| II.2.1. Les Actinomycètes | 8 |
| II.2.1.1. Définition..... | 8 |
| II.2.1.2. Écologie des Actinomycètes..... | 8 |
| II.2.1.3. Nutrition des Actinomycètes..... | 9 |
| II.2.1.4. Critères de classification | 9 |
| II.2.1.4.1. Critères morphologiques | 9 |
| II.2.1.4.2. Critères chimiques..... | 9 |
| II.2.1.4.3. Autres critères | 9 |
| II.2.1.5. Classification..... | 10 |
| II.2.2. Les rhizobiums : | 11 |
| II.2.2.1. Caractères généraux : | 12 |
| II.2.2.2. Caractères biochimiques et physiologiques..... | 12 |
| II.2.2.3. Caractères génétiques :..... | 13 |
| II.2.3. <i>Bacillus</i> : | 13 |
| II.2.3.1. Taxonomie: | 13 |
| II.2.3.2. Caractères bactériologiques : | 14 |
| II.2.3.3. Caractères physiologiques : | 15 |
| II.2.3.4. Écologie des <i>Bacillus</i> :..... | 15 |

| | |
|--|----|
| II.3. Description des plantes hôtes : | 16 |
| II.3.1. Le Romarin | 16 |
| II.3.1.1. Historique..... | 16 |
| II.3.1.2. Classification:..... | 17 |
| II.3.1.3. Description botanique | 17 |
| II.3.1.4. Distribution géographique | 18 |
| II.3.1.5. Culture et récolte | 18 |
| II.3.1.6. Les principaux actifs | 18 |
| II.3.1.7. Utilisation du romarin | 18 |
| II.3.1.7.1. Culinaires: | 18 |
| II.3.1.7.2. Phytothérapie | 19 |
| II.3.2. L'Armoise : | 19 |
| II.3.2.1. Description botanique : | 20 |
| II.3.2.1.1. Classification botanique : | 20 |
| II.3.2.1.2. Habitat :..... | 21 |
| II.3.2.2. L'effet thérapeutique de la plante :..... | 21 |
| II.3.3. Marrebure | 21 |
| II.3.3.1. Description de la famille des Lamiacées (Labiées)..... | 22 |
| II.3.3.2. Classification : | 22 |
| II.3.3.3. Répartition géographique :..... | 22 |
| II.3.3.4. Description botanique..... | 23 |
| II.3.3.4.1. Racine :..... | 23 |
| La racine est simple, ligneuse, garnie de plusieurs fibres (M.Ali.Youssef, 2006). | 23 |
| II.3.3.4.2. Tige | 23 |
| II.3.3.4.3. Feuilles..... | 23 |
| II.3.3.4.4. Appareil reproducteur (la fleur) | 23 |
| II.3.3.4.5. Fruit : | 24 |
| II.3.3.5. Utilisations en médecine traditionnelle | 24 |
| III.1. Protocoles expérimentaux : | 27 |
| III.1.1. Présentation de La zone de prélèvement :..... | 27 |
| III.1.2. Mode de prélèvement : | 28 |

| | |
|--|----|
| III.1.3. Travaux au niveau de laboratoire: | 29 |
| III.1.3.1. Isolement : | 29 |
| III.1.3.2. Purification :..... | 30 |
| III.1.3.3. Conservation des souches:..... | 30 |
| III.1.3.3.1. Conservation à court terme: | 30 |
| III.1.3.3.2. Conservation à long terme: | 30 |
| III.1.3.4. Criblage des souches d'intérêt :..... | 31 |
| III.1.3.5. Test de tolérance à la salinité:..... | 32 |
| III.1.3.6. Activité antimicrobienne : | 33 |
| IV.1. isolement des souches :..... | 35 |
| IV.2. Purification des souches :..... | 35 |
| IV.3. Les résultats de pré-identification :..... | 35 |
| IV.4. Test de tolérance au stress salin | 52 |
| IV.5. L'activité antimicrobienne | 54 |
| IV.6. DISCUSSION :..... | 56 |
| VII.1. Annexe 1 | 70 |
| VII.2. Annexe II : | 73 |

PARTIE I. INTRODUCTION

I.1. Introduction

Le monde des végétaux est plein de ressources et de vertus, d'où l'homme puise non seulement sa nourriture mais aussi des substances actives qui procurent souvent un bienfait à son organisme parfois affecté de trouble insidieux.

Sachant que le sol est un fantastique réservoir de microorganismes, en termes de diversité et de densité. Il a été estimé qu'un gramme de sol contient 10^{10} à 10^{11} bactéries, et de 6000 à 50000 espèces bactériennes (Curtis et al., 2002 ; Horner-Devine et al., 2003)

Et la richesse de rhizosphère signifie uniquement avec la présence des microorganismes qui trouvent une méthode d'adapter avec les conditions des sols et aussi les exigences de milieu et quand la plante divise le sol avec ces microorganismes alors que on va trouver une relation entre la plante et la microflore. Et l'activité métabolique de ces plantes va effectuer évidemment dans ces microfores par exemple les rhizobiums qui sont des bactéries symbiotiques spécifiques dans ces interactions avec les plantes.

Et aussi la microflore y a la capacité d'être tolérée aux n'importe quel stress avec l'adaptation au cours de temps.

Pour atteindre notre objectif sur l'importance des rhizosphères des plantes les plus fréquentes dans notre région nous avons sélectionnées trois plantes très utilisées par la population Algérienne. Ce travail est réparti en trois chapitres dont le premier chapitre comporte une recherche bibliographique concernant les plantes médicinales et leur phytothérapie et lutte biologique. Le deuxième chapitre porte sur les expérimentations adoptées dans notre travail ou nous sommes intéressés à isoler des microorganismes qui se trouvent dans un échantillon de sol rhizosphérique de trois plantes médicinales, testé la tolérance des souches isolées au stress salin, criblage de l'activité antimicrobiennes des souches puis nous nous avons exploré les résultats et la discussion, et finalement on conclut par une conclusion et perspectives.

PARTIE II. SYNTHÈSE BIBLIOGRAPHIQUE

II.1. Le sol :

II.1.1. Définition :

Le sol est un environnement où cohabitent les racines des végétaux, les animaux et les microorganismes, c'est un assemblage complexe de substances minérales et organiques, de gaz et d'eau, à l'intérieur duquel se déroulent simultanément des phénomènes de dégradation et de synthèse. A cause de son hétérogénéité, il abrite des populations de microorganismes à des particularités biologiques et biochimiques très diverses. L'activité de ces populations est influencée par divers facteurs : température, pH, profondeur du sol, humidité et présence des substances organiques et inorganiques. Les microorganismes présents dans le sol sont impliqués dans le recyclage de nombreux éléments chimiques (carbone, azote, phosphore, soufre, du fer et d'autres), surtout ceux impliqués dans la formation et la dégradation de l'humus et ceux ayant un rôle important dans la solubilisation des composants organiques et inorganiques inaccessibles aux plantes (CarpCarare et al., 1997).

II.1.2. RHIZOSPHERE :

Représente la source d'agents biologiques performants

II.1.2.1. Définition de la rhizosphère

La rhizosphère, décrite pour la première fois par Lorentz Hiltner en 1904, correspond au volume du sol adhérent aux racines caractérisé par des activités microbiennes intenses grâce aux composés organiques libérés par ces mêmes racines (Prescott et al., 2013 ; Kennedy, 2005). Elle représente une interface essentielle et active entre la plante et le sol par la présence de microorganismes dont le nombre et la diversité est fonction de l'effet rhizosphère. En effet, ce dernier définit tout changement physique, chimique ou biologique s'opérant directement ou indirectement au niveau de la rhizosphère du fait de la libération, par les plantes, d'un ensemble de composés aussi bien organiques qu'inorganiques (Duineveld et al., 1998, 2001 ; Badalucco et Kuikman, 2001 ; Baudoin et al., 2003).

La rhizosphère se subdivise en trois parties dont l'endorhizosphère correspondant aux tissus corticaux des racines âgées (Dommergues et Mangenot, 1970), le rhizoplan qui est la surface même de la racine et constituant un milieu particulier pour les microorganismes (Prescott et al., 2013) et la rhizosphère éloignée qui est la fine couche de sol adhérent aux racines après avoir été secouées.

D'autres auteurs ont ensuite défini la rhizosphère comme étant la zone du sol qui héberge la microflore tellurique est soumise aux influences des racines (Campbell et Greaves, 1990 ; Westover et al., 1997).

Elle est composée de deux parties (Dommergues et Mangenot, 1970) :

- La rhizosphère au sens strict qui correspond à la fine couche du sol adhérent fermement aux racines ;
- Le rhizoplan (ou la surface des racines) où la microflore est extraite par agitation vigoureuse des racines.

II.1.2.2. Exsudation racinaire :

C'est le processus qui aboutit à la libération de substances organiques par les racines des plantes. Les exsudats racinaires agissent sur les populations microbiennes soit en stimulant certaines espèces ou en les inhibant (effet rhizosphérique) (Bodoharisoa et al., 2007).

Les microorganismes stimulés peuvent agir directement sur la plante en mettant à sa disposition des phytohormones (lebuhn et al. 1997 ; Martinez noel et al. , 2001 ; vivas et al., 2006) des vitamines et des molécules organiques absorbables par les racines ou bien indirectement en améliorant sa nutrition minérale par solubilisation ou minéralisation de certains éléments (dommergues et mangenot, 1970 ; lebuhn et al.,1997 ; vivas et al. 2006).

Les exsudats racinaires jouent aussi un rôle important dans la mobilisation de certains éléments minéraux comme le phosphate, le fer, le zinc, le cuivre et le manganèse (dommergues et mangenot, 1970) entraîne un

changement au niveau de la composition de la microflore rhizosphérique (Roesti, 2005 ; Hartmann et al., 2009).

Les exsudats racinaires sont généralement composés d'acides aminés, de facteurs de croissance (vitamines), d'enzymes et d'acides organiques

Tableau 1 : les composé des racines de plantes (giri et al.,2005)

| Exsudat : | Composition: |
|------------------------------------|--|
| Sucres | Glucose, fructose, sucrose, maltose, galactose, rhamnose, ribose, xylose, arabinose, raffinose, oligosaccharide. |
| Acides aminés | Asparagine, a-alanine, glutamine, acide aspartique, leucine isoleucine, sérine, acide 7 aminobutyrique, glycine, cysteine, méthionine, phenylalanine, tyrosine, threonine, lysine, proline, tryptophane, &-alanine, arginine, homosérine, cystathionine |
| Acides organiques | Acide tartrique, oxalique, citrique, malique, propionique, butyrique, succinique, fumarique, glycolique, valérique, malonique |
| Acides gras et Stérols | Acide palmitique, stearique, oléique, linoléique, cholestérol, campestérol, stigmasterol, sitostérol |
| Nucléotides, flavonimes et enzymes | Flavonine, adenine, guanine, uridine cytidine, phosphatase, invertase, amylase, protease, polygalacturonase |
| Composés dérivés | Awanes, scopoletine, substances fluorescentes, acide hydrocyamique, glycosides, saponines (glycosides), composés organiques phosphorés, substances attractives de nematodes, substances stimulatrices et inhibitrices de la croissance mycelienne des champignon |

II.1.3. DIVERSITE DE LA MICROFLORE TELLURIQUE BENEFIQUE :

La population microbienne du sol se compose de six groupes principaux de microorganismes tels que les Bactéries, les Actinomycètes, les Champignons, les Algues, les Protozoaires et les Virus (Drapeau et Jankovic, 1977). Cependant, les bactéries, les actinomycètes et les champignons représentent une part importante de cette population (Lavelle et Spain, 2001 ; Focht et Martin, 1979) et jouent des rôles importants dans la régulation des interactions plante-microorganismes et dans la fertilité du sol (Hoffmann et al., 1951). En effet, certains ont des propriétés particulières par leur capacité à modifier la disponibilité des éléments nutritifs ou à

Protéger la plante contre les agents phytopathogènes via la production de substances comme les antibiotiques, les chélateurs ou même des composés toxiques (Hinsinger et Marschner, 2006).

- 1- Les Bactéries
- 2- Les Rhizobactéries favorisant la croissance des plantes (Plant Growth Promoting Rhizobacteria ou PGPR)
- 3- Les PGPR phytostimulatrices
- 4- Les PGPR phytoprotectrices

II.1.4. Lutte et interactions biologiques antagonistes dans la rhizosphere:

II.1.4.1. Définition de la lutte biologique :

L'utilisation d'organismes vivants pour contrôler ou combattre un ravageur (AAC, 2009). Plusieurs groupes d'organismes peuvent être utilisés en lutte biologique. Les principaux sont les micro-organismes, les nématodes, les insectes et les arachnides. Les organismes bénéfiques utilisés en lutte biologique doivent avoir un bon taux de reproduction, être spécifiques, avoir une bonne capacité d'adaptation et leur cycle de vie doit être synchronisé à celui du ravageur (Weeden, 2007)

II.1.4.2. Lutte biologique avec des microorganismes rhizosphériques antagonistes :

- L'antibiose
- La compétition
- Le parasitisme
- Induction des mécanismes de défense de la plante

II.2. Le partenaire bactérien :

II.2.1. Les Actinomycètes

II.2.1.1. Définition

Les Actinomycètes représentent un groupe assez vaste de bactéries mycéliennes à Gram positives. Ce groupe comprend actuellement quelque centaines espèces (Holt et *al*, 1994). Il présente certaines analogies avec les champignons qui sont en fait superficielles, puisqu'il ne s'agit d'une convergence de forme, ils ont une organisation cellulaire typiquement procaryote. La majorité représente un groupe fort utile dans les domaines agronomiques (fixation d'azote atmosphérique, lutte biologique contre les maladies des plantes) et surtout pharmaceutique. Dans ce dernier cas, de nombreux composés intéressants sont produits industriellement, comme les antibiotiques, les vitamines, les enzymes, les anti-histaminiques, les vasodilatateurs, les immunostimulants... etc. (Nolan et Cross, 1988).

II.2.1.2. Écologie des Actinomycètes

Ils sont universellement répandus. On dehors de quelques espèces parasites de l'homme, des animaux et des plantes, on les rencontre dans le sol, dans les eaux, dans les aliments et dans l'atmosphère.

Dans le sol, ils sont largement distribués. Ils représentent en général 10 à 30 % du total des micro-organismes telluriques (Dommergues et Mangenot, 1970). Ils sont présents dans les fonds fluviaux ou lacustres. La colonisation normale du milieu marin par les Actinomycètes est un point controversé, il existerait une forte d'actinomycètes spécifiques aux sédiments marins caractérisés par une température optimale, faible halophile et barotolérance (Jensen et *al*, 1991).

II.2.1.3. Nutrition des Actinomycètes

Ces microorganismes sont généralement chimiohétérotrophes, ils ont des exigences réduites et tirent leur énergie à partir d'une source très variée de substrats carbonés (Groth et al, 1999).

Les formes aérobies sont très majoritaires et apparaissent comme des précieux auxiliaires de l'environnement grâce à la variété des biodégradations qu'ils effectue est polysaccharides (Pectine, chitine, amidon, cellulose), protéines (kératine, élastine), tanins et lignine (constitué du bois dont les structures complexes sont difficiles à transformer biologiquement) et même les polluants environnementaux comme les pesticides sont la cible de telle ou telle espèce (Zimmeraman, 1990; Bibb, 1996).

Certaines espèces sont fermentatives et représentent souvent des parasites de la cavité buccale, éventuellement pathogènes pour l'homme comme les *Actinomyces* et *Actinomadura madurae* cause certaines tumeurs chez l'homme (mycétomes) (Leclerc, 1995).

II.2.1.4. Critères de classification

II.2.1.4.1. Critères morphologiques

Les caractères morphologiques principaux ont de septation des hyphes, présence de mycélium du substrat et du mycélium aérien, la présence de sporange, de sclérotés, de spores, leur disposition sur l'hyphe et leur forme. L'étude de l'aspect de colonies développées sur milieu translucide (Lechevalier, 1980).

II.2.1.4.2. Critères chimiques

Ils sont représentés par les constituants majeurs de la paroi cellulaire des Actinomycètes. D'autres caractères chimiques complémentaires sont exploités, c'est le cas notamment des phospholipides d'origine membranaire (Lechevalier, 1980), les acides mycoliques ont un intérêt particulier dans la définition des genres respectifs *Mycobacterium*, *Nocardia* et *Corynebacterium* (Asselineau, 1981), les ménaquinones ont été suffisamment étudiées chez certain nombre d'Actinomycètes (Collins et al.1977).

II.2.1.4.3. Autres critères

- L'utilisation des actinophages (Bradley et al. 1961).

- L'ornementation de la surface des spores (Hutter, 1962).
- La sensibilité aux antibiotiques (Lyons et Pridham, 1973).
- L'analyse du pourcentage en Guanine Cytosine des Actinomycètes (Bradley et al. 1961).
- L'analyse des constituants cellulaires (Lechavalier et al. 1977)

II.2.1.5. Classification

Les Actinomycètes sont subdivisés en un certain nombre de groupes. Dans le **Tableau 2** nous citerons seulement la taxonomie des groupes qui produisent les antibiotiques, particulièrement les groupes de classe *Actinobacteria* et sous classe *Actinobacteridae* et ordre *Actinomycetales*

Tableau 2: Classification des actinomycetes

| Ordre | Sous ordre | Famille | Genres |
|-----------------|---------------------------|---------------------------|---|
| Actinomycetales | <i>Actinomycineae</i> | <i>Actinomycetaceae</i> | <i>Actinomyces</i> <i>Actinobaculum</i> <i>Arcanobacterium</i> <i>Mobiluncus</i> |
| | <i>Corynebacterineae</i> | <i>Mycobacteriaceae</i> | <i>Mycobacterium</i> |
| | | <i>Nocardiaceae</i> | <i>Nocardia</i> <i>Rhodococcus</i> |
| | <i>Micromonosporineae</i> | <i>Micromonosporaceae</i> | <i>Micromonospora</i> <i>Actinoplanes</i> <i>Catellatospora</i> <i>Couchioplanes</i> <i>Dactylosporangium</i> <i>Pilimelia</i> <i>Spirilliplanes</i> <i>Verrucosispora</i> |
| | <i>Pseudonocardineae</i> | <i>Pseudonocardiaceae</i> | <i>Pseudonocardia</i> |

| | | | |
|----------------------------|----------------------------|---|---|
| | | | <i>Saccharomonospora</i> |
| | | <i>Actinosynnemataceae</i> | <i>Saccharothrix</i> |
| | <i>Streptomycineae</i> | <i>Streptomycetaceae</i> | <i>Streptomyces</i> <i>Kitasatospora</i> <i>Streptoverticillium</i> |
| | <i>Streptosporangineae</i> | <i>Streptosporangiaceae</i> | <i>Streptosporangium</i> <i>Microtetraspora</i> |
| <i>Nocardiopsaceae</i> | | <i>Nocardiopsis</i> <i>Thermobifida</i> | |
| <i>Thermomonosporaceae</i> | | <i>Thermomonospora</i> <i>Actinomadura</i> <i>Spirillospora</i> | |

II.2.2. Les rhizobiums :

Les interactions plante-bactéries dans la rhizosphère sont les déterminants de la santé des plantes et de la fertilité des sols. Ceux-ci sont associés à la rhizosphère, qui est un environnement écologique important pour les interactions plantes-microbes.

Le premier critère pour l'existence du genre rhizobium est leur capacité d'envahir les racines des plantes légumineuses et de stimuler la production des nodules, le prestige de ces bactéries dans l'agriculture est expliqué par leur aptitude d'entrer dans un rapport symbiotique avec la plante hôte appropriée pour la fixation de l'azote atmosphérique (Allen et Allen, 1950)

Les rhizobactéries favorisant la croissance des plantes (PGPR) sont considérées comme favorisant la croissance des plantes directement ou indirectement. Le PGPR peut présenter une variété de caractéristiques responsables de l'influence sur la croissance des plantes. Les mécanismes exacts par lesquels le PGPR favorise la croissance des plantes ne sont pas entièrement compris, mais on pense qu'ils incluent :

La capacité de produire ou de modifier la concentration des régulateurs de croissance des plantes comme l'acide indoléacétique, l'acide gibbérellique, les cytokinines et l'éthylène (Arshad and Frankenberger, 1993; Glick, 1995), les symbiotiques fixatrices d' N_2 (Boddey and Dobereiner, 1995), l'antagonisme contre les phytopathogènes par production de sidérophores (Scher and Baker, 1982), d'antibiotiques (Shanahan et al., 1992) et cyanide (Flaishman et al., 1996), solubilisation de minéral phosphates et d'autres nutriments (De-Freitas et al., 1997).

II.2.2.1. Caractères généraux :

Les rhizobiums sont des bactéries à Gram négatif, strictement aérobies, possédant une forme de bâtonnets de 0,6 à 0,9 μm de largeur et de 1,2 à 3 μm de longueur et non sporulant (JORDAN, 1984).

Phylogénétiquement, ils appartiennent à la subdivision d'Alpha-Proteobacteria. (ZAKHIA, 2001) (LARANJO, 2002). Ce sont des bactéries mobiles grâce à un flagelle polaire ou subpolaire ou 2 à 6 flagelles péritriches (WERNER, 1992).

Les espèces de rhizobia en culture ont besoin d'un milieu de culture qui renferme une source de carbone et une source d'azote plus des sels minéraux (SOMASEGARAN, 1994) En comparaison avec d'autres bactéries de sol, les rhizobiums et le Bradyrhizobium ont une grande exigence pour le Ca^{2+} , Fe^{2+} et Co^{2+} , leurs besoins en vitamines sont très variables, le genre Bradyrhizobium est généralement stimulé par la biotine, alors que le Rhizobium a besoin conjointement de thiamine et de pantothénate (WERNER, 1992)

II.2.2.2. Caractères biochimiques et physiologiques

Le Rhizobium possède un système respiratoire, où l'oxygène est l'accepteur terminal des électrons dans les conditions d'aérobiose ; alors que dans les conditions d'anaérobiose, les espèces rhizobium peuvent utiliser les nitrates et les nitrites comme accepteurs d'électrons (WERNER, 1992) (BENGADOEUAR, 2000)

Une croissance optimale de la plupart des souches de *Rhizobium* a lieu à des températures variant de 25 à 30°C et un pH 6,0 à pH 7,0 (SOMASEGARAN, 1994)

II.2.2.3. Caractères génétiques :

La génétique de *Rhizobium* n'est pas facile, en raison du grand nombre de gènes impliqués dans la symbiose et les nombreuses particularités d'une souche à l'autre (PELMONT, 1995). Les souches de *Rhizobium* nodulant les légumineuses sont considérées particulièrement sensibles en raison de leurs caractéristiques génétiques (PATRICIA, 1998); (Raposeiras, 2002)

II.2.3. *Bacillus* :

II.2.3.1. Taxonomie:

Ce sont des bactéries aérobies ou aéro-anaérobies facultatives formant des endospores. Depuis la découverte de la bactérie (1913), la possession d'une spore a été utilisée comme une clé dans la classification. Les caractéristiques distinctives entre les membres du genre *Bacillus* et les autres bacilles sporulant sont la nature aérobie stricte ou facultative, la forme bacillaire et la production de catalase. Le genre *Bacillus* a subi des changements taxonomiques considérables. Les premières tentatives de classification des espèces de *Bacillus* sont fondées sur deux caractéristiques: la croissance aérobie et la formation d'endospores. De deux espèces formant des endospores, *Bacillus anthracis* et *B. subtilis*, le genre a atteint 146 espèces dans la cinquième édition du Bergey's Manuel (Bergey et al., 1939). Ce nombre est, cependant, limité à 22 espèces bien définies dans la huitième édition du Bergey's (Buchanan et Gibbons, 1974). Par la suite, le nombre de nouvelles espèces a augmenté régulièrement.

L'approche phylogénétique de la taxonomie du *Bacillus* réalisée par l'analyse du séquençage des oligonucléotides des molécules d'ARNr 16S a révélé que les relations phylogénétiques des espèces de *Bacillus* ont une certaine parenté avec des espèces non sporulées, telles qu'*Enterococcus*, *Lactobacillus*, *Streptococcus*. De plus, certains anciens membres du genre

sont réunis en nouvelles familles, les Acyclobacillaceae, Paenibacillaceae et Planococcaceae. Dans l'actuelle édition du Bergey's Manuel plus de 200 espèces de AEFB allouées à environ 25 genres sont validement publiés.

La taxonomie du genre *Bacillus* est constituée de deux groupes d'organismes usuellement appelé le groupe *B. subtilis* et le groupe *B. cereus* : - Les espèces de groupe *B. subtilis* sont étroitement liées et donc pas facilement discernables et inclus les deux sous-espèces de *B. subtilis* (*B. subtilis subsp. subtilis* et de *B. subtilis subsp. spizizenii*), *pumilus*, *licheniformis*, *amyloliquefaciens*, *mojavensis*, *sorensis* et *vallismortis* (Claus et Berkeley, 1986). - Les espèces du groupe *B. cereus* comprennent des espèces étroitement apparentées telles que *B. cereus*, *thuringiensis*, *mycoides*, et *pseudomycoides*. L'espèce *B. weihenstephanensis* semble composée de souches de *B. mycoides* et *cereus* (Jackson et al. , 1995). Le genre *Paenibacillus* est créé par Ash et al. (1993) pour former l'ancien «Groupe 3» du genre *Bacillus*. Il comprend plus de 30 espèces anaérobies facultatives et formant des endospores, neutrophiles, hétérotrophes, à flagelles pérित्रiches, bacilles à Gram positif à faible % GC.

II.2.3.2. Caractères bactériologiques :

Les espèces du genre *Bacillus* sont des bacilles rectilignes à extrémités carrées ou arrondies, de taille variable (de 0,5 x 1,2 µm jusqu'à 2,5 x 10 µm), sporulés, à Gram positif ou à Gram variable (fréquemment, la coloration de Gram n'est positive que pour les très jeunes cultures).

généralement mobiles grâce à une ciliature pérित्रiche (*B. anthracis* et *mycoides* sont immobiles et pour les espèces mobiles, la mobilité est variable selon les souches), parfois capsulés (*B. anthracis*, *licheniformis*, *megaterium* et *subtilis* peuvent élaborer une capsule formée d'un polymère d'acide glutamique), aérobies ou aéro-anaérobies, le plus souvent catalase positive, donnant une réponse variable au test de l'oxydase (Holt et al., 1994)

II.2.3.3. Caractères physiologiques :

Les caractères physiologiques des *Bacillus* sont impressionnants. Ils peuvent dégrader la plupart de la matière organique animale ou végétale (cellulose, amidon, protéines, hydrocarbures...) par la production d'enzymes extracellulaires, produisent aussi des antibiotiques peptidiques, des molécules peptidiques de signal. Ils sont hétérotrophes, nitrifiants, dénitrifiants, fixateurs d'azote, précepteurs de fer, oxydants le sélénium, oxydants et réduisants le manganèse. Ces microorganismes sont des chimolithotrophes facultatifs, acidophiles, alcalophiles, psychrophiles, thermophiles, halotolérants, ou halophiles et sont capables de croître à des valeurs de pH, de température et de concentrations de sel où peu d'autres organismes peuvent survivre. À cause de cette variabilité physiologique, nos connaissances sur l'écologie du *Bacillus* sont très insignifiantes (Holt et al., 1994).

II.2.3.4. Ecologie des *Bacillus* :

Dans le sol, les *Bacillus* représentent une grande fraction de la communauté microbienne partageant leur milieu avec des commensaux représentant principalement les genres *Pseudomonas* et *Actinomyces*. On les retrouve sous tous les horizons, ils présentent une diversité de capacités physiologiques qui leur permet de vivre dans une large variété d'habitats tels que l'eau de mer, les profondeurs de la mer, les sédiments (Andrea et al., 2008), les marais, les sources d'eau, les aliments, les fourrages, les composts, les volailles, ainsi que de nombreux habitats extrêmes tels que les sables du désert, les sources chaudes et les sols de l'Arctique, bien que quelques espèces soient pathogènes pour des mammifères (*B. anthracis*) et des insectes (*B. sphaericus* et *thuringiensis*). L'habitat primaire du genre *Bacillus* est le sol et la rhizosphère particulièrement les systèmes racinaires des plantes. Ils font partie de la flore zymogène du sol et sont retrouvés dans les épiphytes ou les endophytes des plantes, et la rhizosphère de diverses plantes cultivées comprenant le blé, le maïs, le sorgho, la canne à sucre, l'orge, et des arbres

forestiers tels que le pin et le sapin. (Holl et Chanway, 1992). De multiples espèces de *Bacillus* et de *Paenibacillus* peuvent être aisément cultivées et en grande partie des sols et de la rhizosphère. Le taux cultivable de ces bactéries s'étend généralement de \log_3 à \log_6 cellules par gramme de sol rhizosphérique, tandis que le sol compte un taux excédant ceux obtenus à partir de la rhizosphère (Mahaffee et Kloepper, 1997 ; Seldin et al., 1998). Une variété d'espèces peuvent être isolées du sol et de la rhizosphère (Seldin et al., 1998), mais peu de travaux ont été effectués pour indiquer l'espèce la plus isolée.

II.3. Description des plantes hôtes :

II.3.1. Le Romarin

Le romarin (*Rosmarinus officinalis*) est un arbrisseau de la famille des Lamiacées, poussant à l'état sauvage sur le pourtour méditerranéen, en particulier sur sol calcaire. On peut aussi le cultiver dans les jardins. Il possède de nombreuses vertus phytothérapeutiques, mais c'est aussi une herbe condimentaire.

II.3.1.1. Historique

Depuis longtemps, les anciens Grecs avaient aperçus une grande vénération au romarin. Ils s'en servaient généreusement dans toutes les fêtes, qu'il s'agissait de cérémonies nuptiales, funéraires ou de célébrations profanes.

Les Égyptiens plaçaient des rameaux de romarin dans la tombe des Pharaons afin de fortifier leurs âmes. Les étudiants grecs s'en confectionnaient des couronnes qu'ils portaient durant les examens pour stimuler l'intellect (BAUDOUX. D; 2000).

La reine d'Hongrie utilisait un remède à base de romarin pour soulager les rhumatismes chroniques (BAUDOUX. D; 2000).

II.3.1.2. Classification:

L'espèce *Rosmarinus officinalis* appartient à la famille des lamiaceae, cette classification a été établie à partir des études de QUEZEL et SANTA (1963).

Tableau 3: Classification de *Rosmarinus officinalis*

| | |
|----------------------|--|
| Règne: | Végétales |
| Embranchement : | Spermaphytes |
| Sous Embranchement : | Angiospermes |
| Classe: | Dicotylédone |
| Sous classe: | Dialypétales |
| Ordre : | <i>Lamiales</i> |
| Familles : | <i>Lamiaceae</i> |
| Genre: | <i>Rosmarinus</i> |
| Espèce: | <i>Rosmarinus officinalis</i> . |
| Noms vernaculaires : | Klil, Natissa, Louden, Lazir, Azir, Aklel. |
| Nom scientifique: | <i>Rosmarinus</i> (BENOUALI. H; 1991). |

II.3.1.3. Description botanique

Le Romarin se présente sous forme d'un arbrisseau odorant très ramifié de la famille lamiacées. Il peut atteindre jusqu'à 2 m de hauteur poussant à l'état sauvage sur le pourtour méditerranéen, en particulier sur sol calcaire (CECCHINI. T; 2004).

La tige porte des feuilles aromatiques, opposées, linéaires, étroites, et lancéolées. La feuille mesure jusqu'à 3cm de long, elle est de couleur vert sombre luisant sur blanchâtre en dessous. Les Fleurs bleues violacées visibles

de janvier à mai sont groupées à l'extrémité des rameaux et à la base des feuilles. Le fruit ovoïde et entouré par un calice persistant de couleur brune (VINCENT. R; 2000)

II.3.1.4. Distribution géographique

Le romarin est originaire de la région méditerranéenne. On le trouve dans les continents Européens et africains.

En Europe, très répandu dans le sud de la France; en Italie; en Andalousie et au sud du Portugal. En Afrique, on le trouve en Algérie, Maroc, Egypte, Tunisie et en Liban (BENISTON. N; 1984).

II.3.1.5. Culture et récolte

Le romarin se cultive en des lieux secs et chauds, exposés au soleil. Il se multiplie par bouturage ou division des pieds, à l'automne ou au printemps. Il peut se semer éventuellement. Plusieurs récoltes se font, dès le printemps, en mai, juillet et septembre (VINCENT. R: 2000).

II.3.1.6. Les principaux actifs

La composition de romarin varie manifestement en fonction du cycle végétatif de la plante (BOUTEKEDJIRET. C et al; 1999). Il est constitué des HE à boméol, camphre, acétate de bornyle, α -pinène, camphène et de rosmarine, acide rosmarinique, choline, un saponoside acide, hétérosides, acide oléanolique, acide nicotinique, acide glycolique, vitamine c, tanin, flavonoïdes, acide ursolique, acide caféique, et acide chlorogénique (CECCHINI. T; 2004).

II.3.1.7. Utilisation du romarin

Le romarin possède de nombreuses vertus phytothérapeutiques, mais c'est aussi une herbe condimentaire largement utilisée en cuisine.

II.3.1.7.1. Culinaires:

Le romarin est un aromate apprécié aux utilisations diverses. On l'emploie dans les ragoûts et les civets, les soupes, les marinades et sur les grillades. On s'en sert aussi pour parfumer des flans ou des confitures. Le

romarin est utilisé aussi en cuisine pour rehausser des plats, spécialement de viande comme l'agneau.

II.3.1.7.2. Phytothérapie

Les feuilles de romarin renferment une HE à la quelle il doit ses propriétés intéressantes dans divers domaines (VINCENT. R; 2000). Leur utilisation en phytothérapie est très ancienne. Il a été utilisé traditionnellement pour:

- Stimuler l'appétit et traiter les malaises dus à la dyspepsie
- Soulager les douleurs musculaires et articulaires.
- Stimuler l'activité cérébrale et intellect.
- Antiseptique doux (BLUMENTHAL. M et al; 2000).

Le romarin est réputé pour activer et faciliter les fonctions digestives et un bain de bouche pour hygiène buccal (BRUNETON. J; 1999).

Par son effet relaxant sur les muscles lisses du système respiratoire, il calme aussi la toux et contribue au confort de l'asthmatique.

Grâce à ses propriétés antioxydants dus à certains composés (le carnosol, l'acide carnosique, l'acide ursolique l'acide bétulinique, le rosmaridiphénol et le rosmanol), le romarin est utilisé par les industries agroalimentaires comme un agent de conservation des denrées alimentaires (THORESEN. M. A et HILDEBRAND. K. S; 2003).

II.3.2. L'Armoise :

La famille des Asteraceae englobe un grand nombre de plantes différentes parmi lesquelles ; l'armoise ou le genre *Artemisia* qui comprend plus de 400 espèces, réparties dans le monde (Bencheqroun et al., 2012). Connue depuis des millénaires, l'*Artemisia herba-alba* (armoise herbe blanche) a été décrite par l'historien grec Xénophon, dès le début du IV^e siècle av. J.-C., dans les steppes de la Mésopotamie (Francis, 2001). L'espèce *Artemisia herba alba* (armoise blanche) est une plante aromatique et médicinale appartenant à la famille des Astéracées (Quézel et Santa, 1962). Elle se caractérise par un

polymorphisme morphologique très important en relation avec les conditions écologiques locales (Chaieb, 2000). Elle présente une odeur caractéristique d'huile de thymol et un goût amer d'où son caractère astringent (Nabli, 1989).

II.3.2.1. Description botanique :

d'*Artemisia herba alba* c'est une plante odorante vivace dressée, suffrutescente à tiges nombreuses, tomenteuses, rigides et droites de 30 à 50 cm. Les feuilles sont courtes, généralement pubescentes argentées à pinnatipartites; les bractées externes sont opaques et pubescentes, alors que les bractées intérieures sont oblongues, brillantes et glanduleuses ; Les capitules sont pauciflores en général, homogènes à fleurs hermaphrodites Ils sont sessiles ou subsessiles (Quezel et Santa, 1963 ; Wright, 2002). La croissance végétative d'*Artemisia Herba Alba* a lieu à l'automne ; la floraison commence en Juin et se développe essentiellement en fin d'été (Gharabi et al., 2008).

II.3.2.1.1. Classification botanique :

La classification botanique de l'*Artemisia herba-alba* a été faite par Friedman et al, (1986).

Tableau 4: Classification d'*Artemisa herba alba* (Asso,1779)

| | |
|-------------|----------------------|
| Règne | Plantae |
| Sous-règne | <i>Tracheobionta</i> |
| Division | <i>Magnoliophyta</i> |
| Classe | <i>Magnoliopsida</i> |
| Sous-classe | <i>Asteridae</i> |
| Ordre | <i>Asterales</i> |
| Famille | <i>Asteraceae</i> |

| | |
|--------|-----------------------------|
| Genre | Artemisia |
| Espèce | <i>Artemisia herba alba</i> |

II.3.2.1.2. Habitat :

L'*Artemisia herba alba* est largement répandue depuis les îles Canaries et le Sud-Est de l'Espagne jusqu'aux steppes d'Asie centrale (Iran, Turkménistan, Ouzbékistan) et à travers l'Afrique du Nord, l'Arabie et le Proche-Orient. En Afrique du Nord, cette espèce couvre d'immenses territoires évalués à plus de dix millions d'hectares, l'*Artemisia herba alba* est absente des zones littorales nord. Cependant, l'espèce se raréfie dans l'extrême sud (Nabli, 1989).

II.3.2.2. L'effet thérapeutique de la plante :

L'*Artemisia herba alba* est très utilisée en médecine traditionnelle lors d'un désordre gastrique tel que la diarrhée et les douleurs abdominales. Elle est aussi utilisée en tant que remède de l'inflammation du tractus gastro-intestinal (Ghrabi et Sand, 2008). Plusieurs études scientifiques ont également prouvées l'efficacité de l'armoise blanche en tant qu'agent antidiabétique (Tastekin et al., 2006), antiparasitaire, antibactérien, antiviral, antioxydant, anti-malarien, antipyrétique, antispasmodique et antihémorragique (Yin et al., 2008).

II.3.3. Marrebure

Le Marrube blanc « المريوة » est une Arbuste, d'aspect blanchâtre très rameux, à poils laineux appliqués, à feuilles petites en coin à la base et portant quelque dents au sommet, fleurs en petites glomérules à l'aisselle des paires de feuilles, corolle petite par rapport au calice tubuleux, celui-ci s'accroissant considérablement par sa partie supérieure en formant autour du fruit une auréole membraneuse.

II.3.3.1. Description de la famille des Lamiacées (Labiées)

La famille des lamiacées comporte 260 genres et entre 6500 à 7000 espèces qui se présentent sous forme d'herbes ou arbustes, elles sont considérées comme aromatiques, poilues et glanduleuses (R.E.Spichiger., 2004). C'est une famille exceptionnellement homogène: une lamiacée est très facile à reconnaître mais elle est rare, son aire de dispersion est extrêmement étendue (J.L.Guignard., 2004).

II.3.3.2. Classification :

Tableau 5: La position systématique de l'espèce *Marrubium vulgare* selon (Judd W.S., 2002)

| | |
|-----------------|-----------------------------|
| Règne : | Végétal |
| Ordre : | <i>Lamiales</i> |
| Embranchement : | <i>Angiosperme</i> |
| Famille : | <i>Lamiacées</i> |
| Classe : | <i>Eudicotylédones</i> |
| Genre : | <i>Marrubium</i> |
| Sous-classe : | <i>Gamopétale</i> |
| Espèce : | <i>Marrubium vulgare</i> L. |

II.3.3.3. Répartition géographique :

L'espèce est originaire d'Europe méridionale ; on la trouve à l'état spontané dans les sites abandonnés, surtout en station chaude et ensoleillée (JanVolak, 1983). Le marrube blanc depuis longtemps répandu un peu partout dans l'hémisphère Nord, notamment aux États Unis et au Canada où il est naturalisé (J.C.Houdret, 2004). Le Marrube blanc est une plante qui se trouve Presque dans toute l'Europe, en Asie, et surtout très répandue dans toute

l'aire méditerranéenne notamment au Maroc, Tunisie, Libye, Egypte et en Algérie (M.Ali.Youssef, 2006). C'est une espèce nitrophile, qui est habituellement rencontrée au voisinage des habitations, au pied des murs, en bordure des chemins et dans les terrains vagues (M.Rombi, 2007.).

II.3.3.4. Description botanique

II.3.3.4.1. Racine :

La racine est simple, ligneuse, garnie de plusieurs fibres (M.Ali.Youssef, 2006).

II.3.3.4.2. Tige

Les tiges du marrube blanc peuvent atteindre jusqu'à 50 cm de longueur et 7 mm de largeur ; les jeunes tiges sont recouvertes d'abondants poils duveteux blanchâtres ; les plus âgées sont gris-vert et les poils qui les recouvrent sont moins nombreux (M.Rombi, 2007.). Elles sont carrées, dressées, robustes et feuillues (T.Cecchini ., 2008), et sont dites « tétragones » ou quadrangulaires, cotonneuses, blanches et tomenteuses (M.Ali.Youssef, 2006).

II.3.3.4.3. Feuilles

Les feuilles du marrube blanc sont opposées et pétiolées, elles sont entières et un peu cordées à la base ; leur forme générale est ovale ou arrondie. Ainsi elles sont feutrées, cotonneuses, et de couleur blanchâtre (M.Ali.Youssef, 2006).

Les feuilles du marrube pétiolées ont un limbe mesurant 1,5-4 cm de longueur et 1-3,5 cm de largeur ; elles présentent des bords dentés à crénelés et sont recouvertes de poils blancs, fins et d'aspect vert-gris foncé (M.Rombi, 2007.).

De plus, les feuilles sont gaufrées (T.Cecchini ., 2008).

II.3.3.4.4. Appareil reproducteur (la fleur)

Les fleurs sont petites et forment des amas danses, axillaires, sessiles et réunies en glomérules à l'aisselle des feuilles (M.Rombi, 2007.). Elles rangent de délicats verticilles au long de la tige ; blanches et dotés d'une corolle soyeuse et bilabiées, elles s'épanouissent de la mi-avril à la fin aout (T.Cecchini ., 2008).

i. Calice

Il est velu et laineux ; possède dix dents inégales et crochues dont cinq, dites commissurales, sont un peu plus courtes et toujours terminées en pointe épineuse (M.Ali.Youssef, 2006). Le calice à 5-10 dents et 10 nervures est très poilue à l'intérieur du tube (M.Rombi, 2007.).

ii. Corolle

Elle est blanche, bilabiée. la lèvre supérieure est presque plane, entière ou bifide alors que la lèvre inférieure est ouverte et trifide (M.Ali.Youssef, 2006).

/Androcée L'androcée est à quatre étamines qui sont renfermées dans le tube de la corolle (M.Ali.Youssef, 2006).

II.3.3.4.5. Fruit :

Les fruits consistent en quatre akènes lisses et glabres mûrissent en automne ; tout comme les fleurs, ils dégagent un parfum intense, musqué, et ont une saveur amère (T.Cecchini ., 2008). Ainsi qu'il est visible au fond du calice persistant (M.Ali.Youssef, 2006).

II.3.3.5. Utilisations en médecine traditionnelle

Marrubium vulgare fut employé dans les industries afin de fabriquer des remèdes contre la toux. Plusieurs préparations indiquent l'utilisation curative de marrube. Il est utilisé aussi dans les inflammations des voies respiratoires, l'inappétence, quelques troubles tels que les ballonnements les flatulences.

La plante est très fréquemment utilisée en médecine traditionnelle comme antidiabétique, expectorant, diurétique, antispasmodique et en cas

d'infections respiratoires. Elle est aussi employée pour combattre le problème d'obésité (Glisic S.B., 2007).

PARTIE III. MATERIEL ET METHODES

III.1. Protocoles expérimentaux :

On fait un prélèvement des sols rhizosphériques cultivés par trois plantes médicinales (Le Marrube blanc, L'armoise et le Romarin) a partir de plusieurs zones.

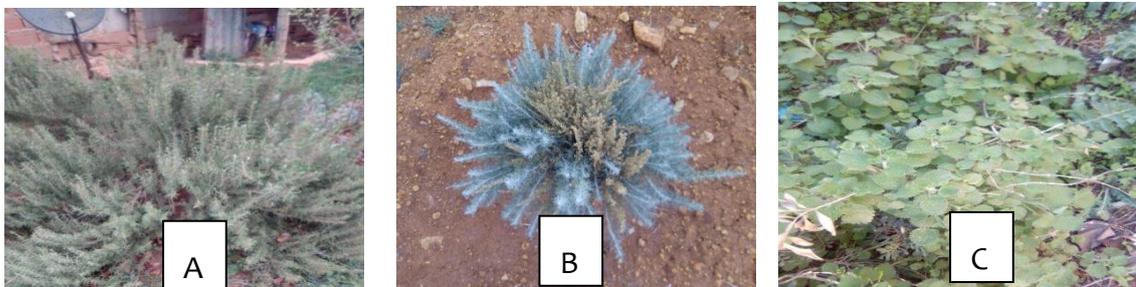


Figure 1 : Les plantes des zones de rhizosphères échantillonnées

A : le Romarin

B : l'armoise

C : Marube blanc

III.1.1. Présentation de La zone de prélèvement :

Un échantillon de sol fertile a été collecté pendant le mois de février 2022 à partir de la région de sidi amer(Nord Est de SAIDA).



Figure 2 : Les coordonnées géographiques des zones de prélèvement ;

Les zones de prélèvements sont mentionnées Avec ❤️ représente la zone de prélèvement ou village, et ⭐ représente la zone de barrage.

III.1.2. Mode de prélèvement :

Le prélèvement des sols à été faits dans des fonds de 15 a 20 cm la profondeur, les sols sont collecté dans des sachets de plastiques spéciales stériles.

On a effectué 6 prélèvements pour les 3 plantes medicinales, les prélèvements été un de chaque plantes dans chaque station.

Les sachets sont transférés au laboratoire de l'université Moulay TAHAR -Saida-.



Figure 3: les échantillons de sol au niveau de laboratoire

Tableau 6: les echantillons de sols dans le laboratoire de l'univ de saida Les sachets est codées selon le tableau suivant:

| La zone de prélèvement | Plante | Code de zone | Temps de prélevemnt |
|------------------------|----------------------|--------------|---------------------|
| Zone de Barrage | Artemesia herba alba | A2 | 12 :35 |
| | Romarin | B2 | 15 :36 |

| | | | |
|-------------------------------|-------------------------|----|--------|
| | Marrubium vulgare | C2 | 13 :30 |
| Zone de village de daallil | Artemisia herba alba | A1 | 11 :30 |
| | Romarin | B1 | 11 :40 |
| | Marrubium vulgare | C1 | 11 :50 |

III.1.3. Travaux au niveau de laboratoire:

III.1.3.1. Isolement :

La première chose qu'on a faite au niveau de laboratoire c'est de l'incubation de quelques grammes (5g) de chaque sachet dans des boites pendent 2h à 37°C.

Après l'incubation et pour la dilution on a prélevé 1g de chaque boite et dilué dans 9ml de l'eau physiologique et mélanger avec le vortex pour 2min. (solutions mères).

On a séché 3 échantillons mentionner sous les abréviation A2 B2 C2 dans le four pasteur pendant 10 min a 80°C après la préparation de série des dilutions décimales pour diminuer la charge microbienne dans les 3 échantillons sécher et on appliqué la même étape pour les préparations principale non sécher (les dilutions de solutions mères)

Pour cela on a préparé les tubes à essai contenant 9ml d'eau physiologique stérile étiqueter-les comme suit : 10^{-1} , 10^{-2} , 10^{-3} , 10^{-4} ,

À l'aide d'une seringue stérile on a prélevé 1ml de la solution mère et déposer dans le premier type de la série qui présente la dilution 10^{-1} , et prélever 1ml de cette dernière et le déposer dans le prochain tube pour faire la dilution 10^{-2} , et ainsi de suite jusqu'à la dilution 10^{-4} . Dans une zone stérile avec le bec de benzène et avec les seringues stériles déposer 0,1ml de chaque

dilution sécher et les dilutions des solutions mères a la surface des boites qui contient déjà les différents milieux (milieu d'YEM, LB, TYG, PDA) après l'étalonnage dans tout la boite à l'aide d'un étaloire et incubé pendant 34h jusqu'à 48h, les boites de :

- PDA et LB à 37°C
- YEM et TYG à 30°C

III.1.3.2. Purification :

On applique une purification pour les souches cible :

- 1- Pour LB et TYG la purification est faite dans un milieu liquide de LB (5ml de MILIEU liquide LB + la souche cible) incubé pour 24h culture gène après l'ensemencement sur la gélose et incubé à 24h.
- 2- Pour YEM et PDA les souches est purifié sur la gélose pour 24h une seule fois

III.1.3.3. Conservation des souches:

III.1.3.3.1. Conservation à court terme:

La conservation à court terme des isolats purifiés, a été réalisée par ensemencement sur gélose inclinée. Après incubation à 28°C pendant 18 heures, les tubes sont placés à (+4°C), où ils peuvent être conservés pour plusieurs semaines. On l'utilise généralement pour prévenir d'éventuelles contaminations des cultures, ou dans le cas de pertes des souches (Kihal et al., 1996).

III.1.3.3.2. Conservation à long terme:

Pour une conservation à long terme, les cultures pures ont été centrifugées à 6000 trs/min pendant 10min, elles sont rincées au tampon phosphate puis recentrifugées à 6000 trs/min pendant 5 min. Les culots ont été maintenus en suspension dans un milieu contenant 10% de lait écrémé (enrichie par 0,05% d'extrait de levure) et 30% de glycérol déposées à une température de (-20°C). Au fur et à mesure des besoins, les cultures seront décongelées rapidement et repiquées dans du lait avant l'utilisation (Samelis et al, 1994). Cette méthode nous permet d'avoir une collection de souches que l'on peut utiliser à volonté suivant la nécessité de l'étude.



Figure 4: Conservation long durée dans des éppendorfs

III.1.3.4. Criblage des souches d'intérêt :

Dans ce travail le criblage des souches a été effectué pour faire des tests.

Tableau 7: Les souches sélectionnées pour les tests de salinités et l'antagonisme

| Code | Milieu | Souche |
|------|--------|--------|
| A | LB | A1C1 |
| E | | C2C3 |
| S | | B2C2 |
| AG | | C2CHC3 |
| AN | | B2CHC2 |
| P3 | PDA | B1C3 |

| | | |
|------|-----|--------|
| P10 | | C2C1 |
| P12 | | C2C3 |
| P16 | | A2C2 |
| P23 | | C2CHC3 |
| M3' | YEM | B2CHC1 |
| M10' | | B2C3 |
| M11' | | B1C3 |
| M15' | | A2C4 |
| M19' | | B2C4 |
| T3 | TYG | A2C2 |
| T5 | | A2C1 |
| T16 | | B1C2 |
| T22 | | B2CHC2 |
| T23 | | A2CHC1 |

III.1.3.5. Test de tolérance à la salinité:

Pour tester la tolérance à la salinité des isolats, des cultures d'une journée complète ont été ajustées à une densité optique (OD600). 250 µL des suspensions bactériennes ont été inoculées dans des flacons contenant 20 mL de milieu LB avec et sans NaCl (à 0,8 M). Les flacons ont été incubés à 30°C avec une agitation constante et l'OD600 a été mesurée toutes les heures pendant 4h et un point final à 24h et 48h, à l'aide d'un spectrophotomètre.

III.1.3.6. Activité antimicrobienne :

Le dépistage préliminaire de l'activité antibactérienne a été effectué sur le milieu GN selon la méthode de Berrfoot et Klaenhammer, (1983). Les cultures isolées à partir des différents milieux solides des souches sélectionnées. La méthode est basée sur la mesure de l'inhibition entre la souche bioactive et la bactérie indicatrice, en utilisant la technique *Spot agar test*. Les souches standardisées à 0,5 McFarland ont été ensemencées en touches sur la surface (Reggani et al., 2021). Cette dernière déjà recouverte avec la souche indicatrice cible par écouvillonnage. Les boîtes de Pétri ont été incubées à 37°C pendant 24h et 48h.

L'inhibition de la croissance de la souche indicatrice conduit à la formation d'une zone claire autour des spots ensemencés. L'inhibition est considérée positive lorsque le diamètre de la zone est égal ou supérieur à 2mm.

PARTIE IV. RESULTATS ET DISCUSSION

IV.1. isolement des souches :

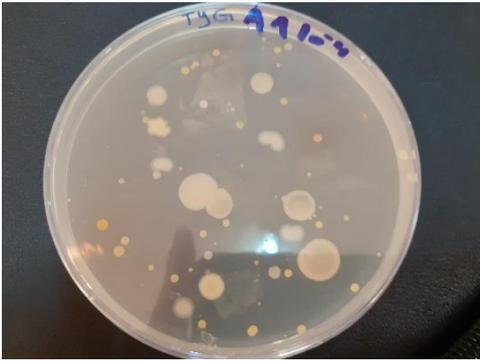


Figure 6: isolement de milieu TYG

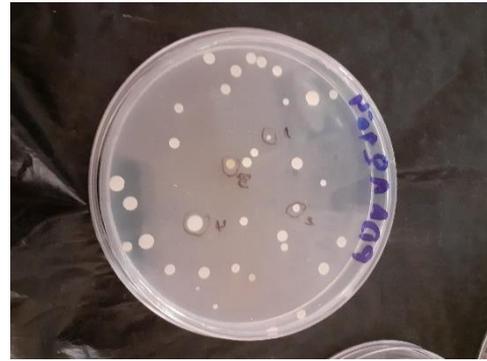


Figure 5: isolement de milieu PDA



Figure 8: isolement de milieu LB

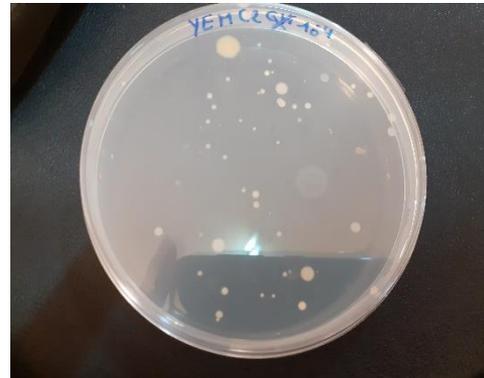


Figure 7: isolement de milieu YEM

IV.2. Purification des souches :



Figure 9: Les souche purifier a partir de milieu PDA

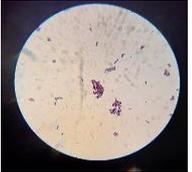
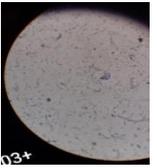


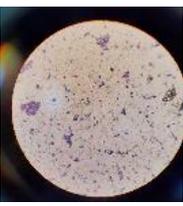
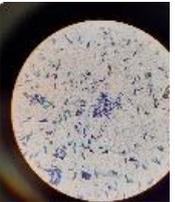
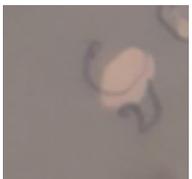
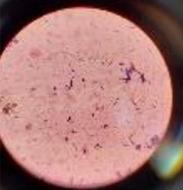
IV.3. Les résultats de pré-identification :

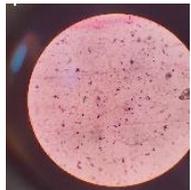
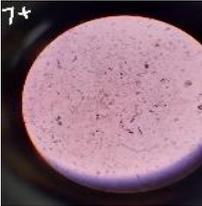
Nous avons choisi les colonies qui présentes différents aspect macroscopiques pour une hétérogénéité et étudier le plus possible des

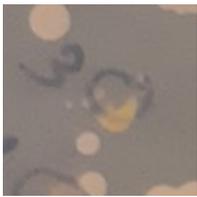
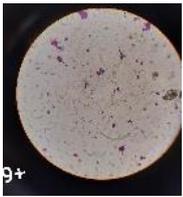
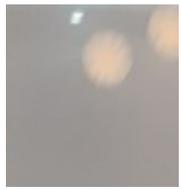
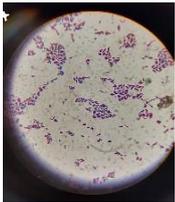
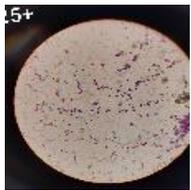
bactéries différents. résultats revient après une coloration de gram qui nous aidions a découvrir le mode d'association (en amas/ en chaînette) et type de Gram (Gram +/-)et la forme des bactéries (bacilles ou coque) type de Gram, l'étape qui vient au début ces l'étude de l'aspect macroscopique qui est pour but de voir la taille et la couleur des colonies (examens phénotypiques) pour la prés identification des souches isolées.

Tableau 8: Tableau récapulatif d'identification morphologique des souches sur milieu TYG

| Souche | N° de souche | Aspect Macroscopie | photo | Test catalase | Coloration de gram | Aspect microscopique |
|--------|--------------|-----------------------------------|---|---------------|--------------------|---|
| B2 C1 | 1. | Colonie Jaune |  | + | Bacille G+ |  |
| B2 C2 | 2. | Colonie blanche |  | + | Bacille G+ |  |
| A2 C2 | 3. | Colonie blanc Forme croissante |  | + | Bacille G+ |  |
| C2 C2 | 4. | Colonie blanche |  | + | Coque En Chenaite |  |

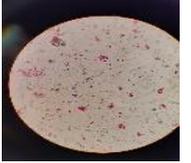
| | | | | | | |
|-------|-----|-----------------------|---|---|---------------|---|
| A2 C1 | 5. | Colonie orange foncé |  | + | Grand Bacille |  |
| B1 C1 | 6. | Colonie crème |  | + | Petit Bacille |  |
| B2 C2 | 7. | Colonie jaune |  | + | Bacille G+ |  |
| C1 C2 | 8. | Colonie blanche |  | + | Bacille G+ |  |
| A1 C1 | 9. | Colonie orange |  | + | Bacille G+ |  |
| B1 C3 | 10. | Colonie orange claire |  | + | Bacille G+ |  |

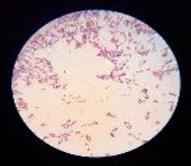
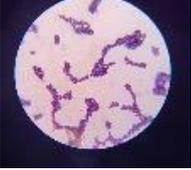
| | | | | | | |
|---------|-----|-----------------|---|---|------------|---|
| C2 C1 | 11. | Colonie blanche |  | + | Bacille G+ |  |
| A2 C1 | 12. | Colonie orange |  | + | Bacille G+ |  |
| A1 C2 | 13. | Colonie orange |  | + | Bacille G+ |  |
| B1 C2 | 14. | Colonie crème |  | + | Bacille G+ |  |
| C2 C1 | 15. | Colonie jaune |  | + | Bacille G+ |  |
| C1 1 C2 | 16. | Colonie blanche |  | + | Bacille G+ |  |

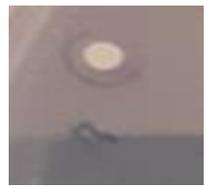
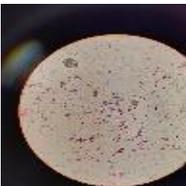
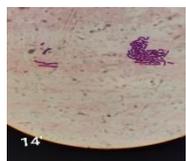
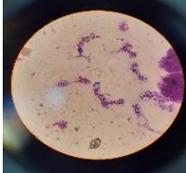
| | | | | | | |
|--------------|-----|------------------------|---|---|---------------------|---|
| A2 C3 | 17. | Colonie jaune |  | + | Bacille G+ |  |
| B2 SCH C1 | 18. | Colonie jaune |  | + | Bacille G- |  |
| B2 SCH C2 | 19. | Colonie blanche |  | - | Bacille G- |  |
| A2 SCH C1 | 20. | Colonie rose claire |  | + | Bacille G- |  |
| A2 SCH C2 | 21. | Colonie crème |  | + | Bacille G+ |  |
| C2 SCH C5 | 22. | Colonie jaune |  | + | BACILLE G+ Petit |  |

| | | | | | | |
|-------------------------------|-----|------------------|---|---|------------|---|
| C2 SCH 10 ⁻⁴ C3 | 23. | Colonie jaune |  | + | Bacille G+ |  |
|-------------------------------|-----|------------------|---|---|------------|---|

Tableau 9: Tableau récapitulatif d'identification morphologique des souches sur milieu YEM

| Souche | N° de souche | Aspect Macroscopie | photo | Test catalase | Coloration de gram | Photo microscopique |
|----------|--------------|-----------------------------|---|---------------|--------------------|---|
| A2 CH C1 | 1. | Colonie blanche transparent |  | - | Coque en chent G+ |  |
| A2 CH C2 | 2. | Colonie blanche |  | + | Bacille G+ |  |
| B2 CH C1 | 3. | Colonie orange |  | + | Bacille G+ |  |
| B2 CH C2 | 4. | Colonie orange |  | + | Coque isolé G+ |  |

| | | | | | | |
|----------|-----|-----------------------|---|---|------------|---|
| C2 CH C1 | 5. | Colonie blanche |  | + | Bacille G+ |  |
| C2 CH C2 | 6. | Colonie orange claire |  | + | Bacille G+ |  |
| C2 CH C3 | 7. | Colonie orange claire |  | + | Bacille G+ |  |
| A2 CH C3 | 8. | Colonie blanc claire |  | + | Bacille G+ |  |
| B2 C1 | 9. | Colonie crème |  | + | Bacille G+ |  |
| B2 C3 | 10. | Colonie blanche |  | + | Bacille G+ |  |

| | | | | | | |
|-------|-----|-----------------------|---|---|----------------------|---|
| B1 C3 | 11. | Colonie blanche rond |  | + | Bacille G+ |  |
| B1 C2 | 12. | Colonie blanche |  | - | Bacille G+ |  |
| B2 C1 | 13. | Colonie jaune rond |  | + | Coque en Amas |  |
| B2 C2 | 14. | Colonie blanche |  | - | Bacille G+ |  |
| A2 C4 | 15. | Petit colonie blanche |  | + | Coque en chenetit G+ |  |
| B1 C1 | 16. | Colonie crème |  | + | Diplocoque G+ |  |

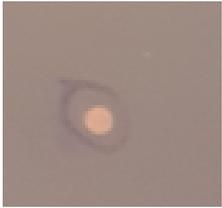
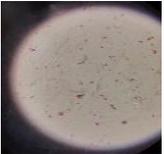
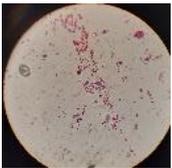
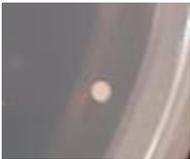
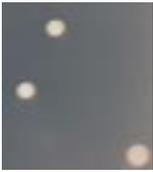
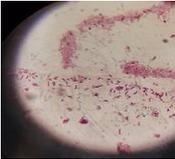
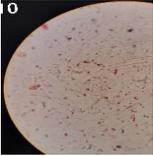
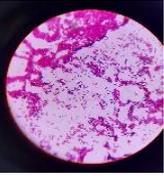
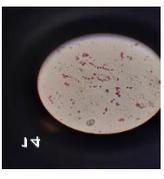
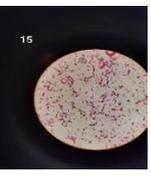
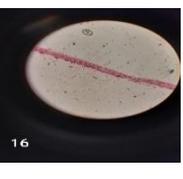
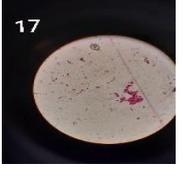
| | | | | | | |
|-------|-----|-----------------------|---|---|---------------|---|
| B2 C2 | 17. | Colonie orange claire |  | - | Bacille G+ |  |
| B2 C4 | 18. | Colonie jaune claire |  | + | Diplocoque G- |  |

Tableau 10: Tableau récapitulatif d'identification morphologique des souches sur milieu PDA

| souche | N° de souche | Aspect Macroscopie | Photo | Test catalase | Coloration de gram | Photo microscopique |
|--------|--------------|----------------------|---|---------------|---------------------|---|
| B1 C2 | 1. | Colonie Crème rond |  | + | Coque en chenaît G+ |  |
| B1C3 | 2. | Colonie blanche rond |  | + | Bacille G- |  |
| B1 C4 | 3. | Colonie blanc |  | + | Bacille G- |  |

| | | | | | | |
|-------|----|----------------------------------|---|---|------------------|---|
| C1 C1 | 4. | Colonie petit blanche rond |  | + | Diplocoque G- |  |
| C1 C2 | 5. | Colonie crème |  | + | Bacille G+ |  |
| B2 C2 | 6. | Colonie blanche |  | + | Bacille G+ |  |
| C2 C1 | 7. | Colonie jaune |  | + | Bacille G- |  |
| C2 C2 | 8. | Blanche/ orange |  | + | Bacille G+ |  |
| C2 C3 | 9. | Colonie jaune |  | + | Bacille G- |  |

| | | | | | | |
|--------------|-----|---|---|-----|---------------------|---|
| C2 C4 | 10. | Colonie jaune |  | +/- | Bacille G+ |  |
| B2 C1 | 11. | Colonie blanche |  | +/- | Coque en Amas G+ |  |
| B2 C2 | 12. | Colonie jaune/ blanche |  | +/- | Bacille G- |  |
| A2 C2 | 13. | Colonie blanche visqueuse |  | + | Bacille G+ |  |
| A2 C1 | 14. | Colonie blanche rond visqueuse |  | - | Bacille G- |  |
| C2 SCH C1 | 15. | Colonie blanche |  | - | Bacille G- |  |

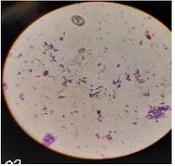
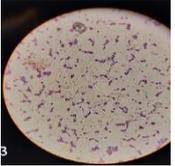
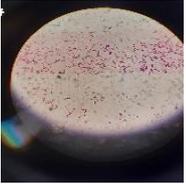
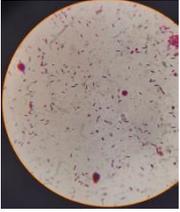
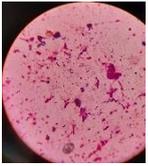
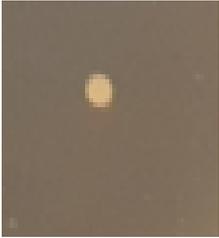
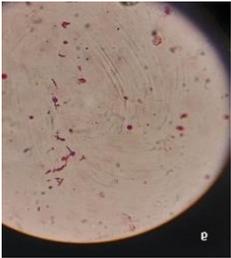
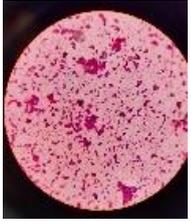
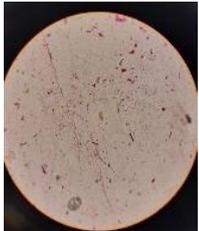
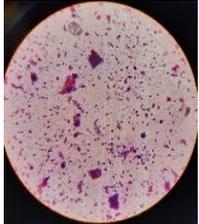
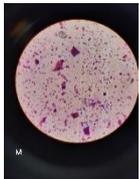
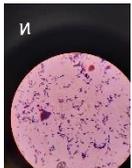
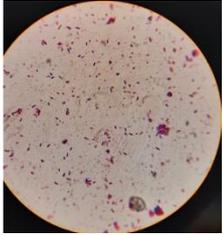
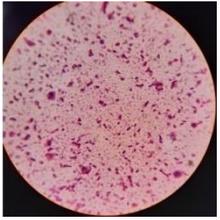
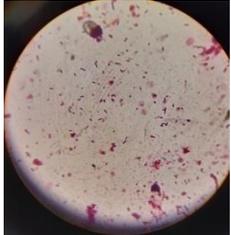
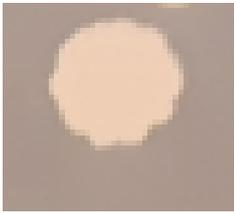
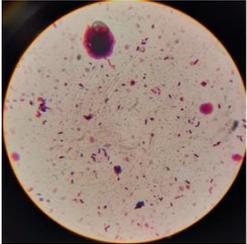
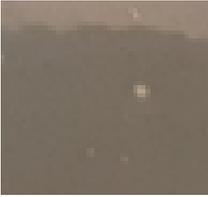
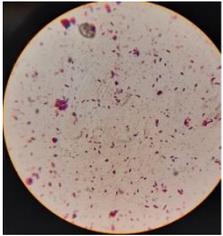
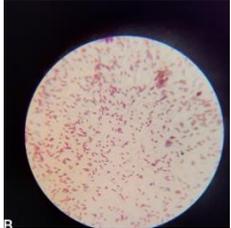
| | | | | | | |
|--------------|-----|-------------------------------|---|-----|---------------------|---|
| B2 SCH C3 | 16. | Colonie blanche/ crème |  | +/- | Bacille G- |  |
| C2 SCH C2 | 17. | Colonie blanche/ jaune |  | + | Bacille G+ |  |
| C2 SCH C3 | 18. | Colonie blanche/ claire |  | + | Coque en Amas G+ |  |
| B2 SCH C1 | 19. | Colonie blanche |  | + | Bacille G+ |  |

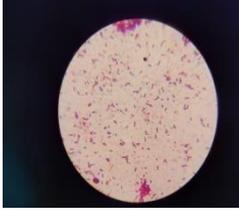
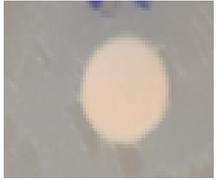
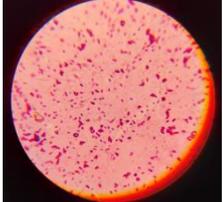
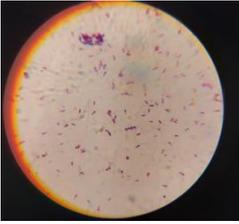
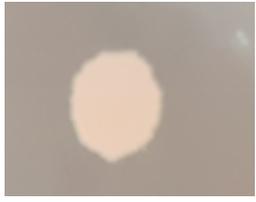
Tableau 11: Tableau récapitulatif d'identification morphologique des souches sur milieu LB

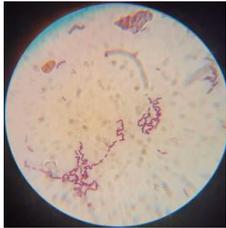
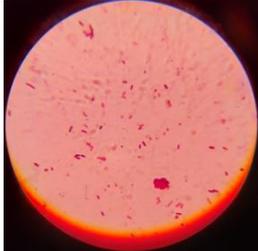
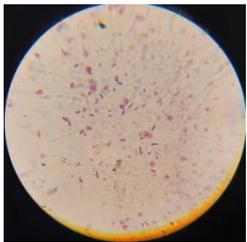
| Souche | N° de souche | Aspect Macroscopie | Photo | Test catalase | Coloration de gram | Photo microscopique |
|--------|--------------|-----------------------|---|---------------|------------------------|---|
| A1 C1 | A | Colonie Crème rond |  | + | Coque en chenait G+ |  |

| | | | | | | |
|-------|---|--------------------------------|---|---|------------|---|
| A1 C2 | B | Colonie petit blanc : Crème |  | + | Bacille G+ |  |
| B2 C1 | C | Colonie Crème |  | + | Bacille G+ |  |
| C2 C3 | E | Colonie jaune |  | + | Bacille G+ |  |
| C2 C2 | F | Colonie crème |  | + | Bacille G+ |  |
| C2 C5 | G | Colonie Crème petit |  | + | Bacille G- |  |
| C2 C4 | H | Colonie Crème |  | + | Bacille G+ |  |

| | | | | | | |
|-------|---|----------------------------|---|---|---------------------|---|
| A2 C2 | I | Colonie Crème |  | + | Bacille G+ |  |
| A2 C1 | J | Colonie Crème rond |  | + | Bacille G- |  |
| A1 C3 | K | Colonie Crème/ jaune |  | + | Bacille G+ |  |
| C1 C3 | M | Colonie blanche |  | + | Bacille G+ |  |
| C1 C4 | N | Colonie blanche rond |  | + | Coque en Amas G+ |  |
| A1 C5 | O | Colonie jaune |  | + | Bacille G- |  |

| | | | | | | |
|-----------|----|----------------------|---|-----|-------------------|---|
| B1 C1 | P | Colonie crème petit |  | + | Bacille G+ |  |
| C1 C2 | Q | Colonie crème moyen |  | -/+ | Bacille G- |  |
| CA C1 | R | Colonie crème/ jaune |  | -/+ | Bacille G+ |  |
| B2 C2 | S | Colonie jaune/ crème |  | + | Bacille G- |  |
| C2 C1 | T | Colonie blanche |  | - | Bacille G- |  |
| C2 SCH C6 | AB | Colonie orange |  | +/- | Bacille/ diplo G- |  |

| | | | | | | |
|-------------------------------|----|-----------------------|---|---|----------------------|---|
| C2 SCH 10 ⁻⁴ C5 | AC | Colonie jaune |  | + | Bacille G+ |  |
| C2 SCH 10 ⁻⁴ C1 | AD | Colonie crème rond |  | + | Bacille G+ |  |
| C2 SCH C2 | AE | Colonie crème |  | + | Bacille/ diplo G+ |  |
| C2 SCH C4 | AF | Colonie crème rond |  | + | Diplocoque G+ |  |
| C2 SCH C3 | AG | Colonie blanc rond |  | + | Diplocoque G- |  |
| A2 SCH C1 | AH | Colonie blanc rond |  | + | Bacille G- |  |

| | | | | | | |
|--------------|----|-----------------------------|---|---|------------------------|---|
| A2 SCH C1 | AI | Colonie jaune |  | - | Bacille G+ |  |
| C2 SCH C3 | AK | Colonie jaune rond |  | + | Bacille G+ |  |
| B2 SCH C3 | AL | Colonie blanc |  | + | Bacille G- |  |
| B2 SCH C2 | AN | Colonie orange claire |  | + | Coque en chenait G+ |  |

Après l'isolement des souches de la microflore tellurique des plantes médicinales, les résultats obtenus dans les quatre milieux (YEM - LB - TYG - PDA) indiquent la présence de différentes colonies avec différents aspects macroscopiques et microscopiques qui est une suite de la diversité des microorganismes dans la rhizosphère.

Avec cette coloration double, les bactéries Gram⁺ apparaissent en violet foncé tandis que les bactéries Gram⁻ sont colorées en rose ou en rouge (Delarras, 2007)

L'estimation de présence de bacille G^{+/-} est observée par rapport aux coques G^{+/-}. (bacille à Gram⁺ avec un pourcentage de 61% et bacille Gram⁻ avec 15% et diplocoque avec 12% et même pourcentage pour les coques) qui est une dominance des bactéries bacille Gram⁺.

Le test catalase a été positif pour la majorité des souches (catalase+ avec 80% et 12% catalase négative et le reste pseudo-catalase). Ce test révèle la capacité des bactéries à dégrader le H₂O₂.

IV.4. Test de tolérance au stress salin

La plupart des tests physicochimique jouent un rôle sur la croissance et la cinétique bactérienne. Dans notre cas on a testé la tolérance des souches sélectionnées à la salinité (0,8m de NaCl). Les résultats sont affichés dans les tableaux suivant ;

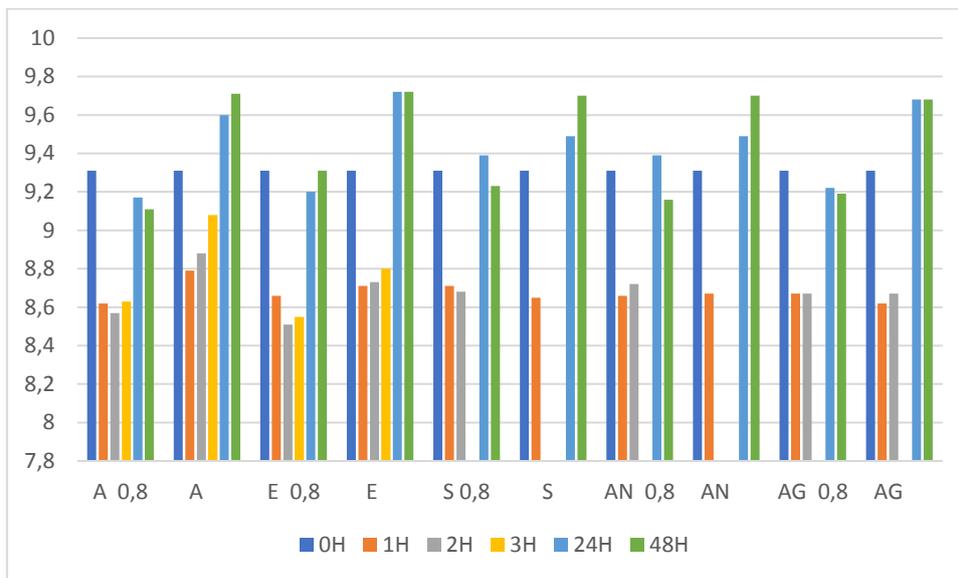


Figure 10 : histogramme de test de salinité Des souches de milieu LB (Log UFC/ml)

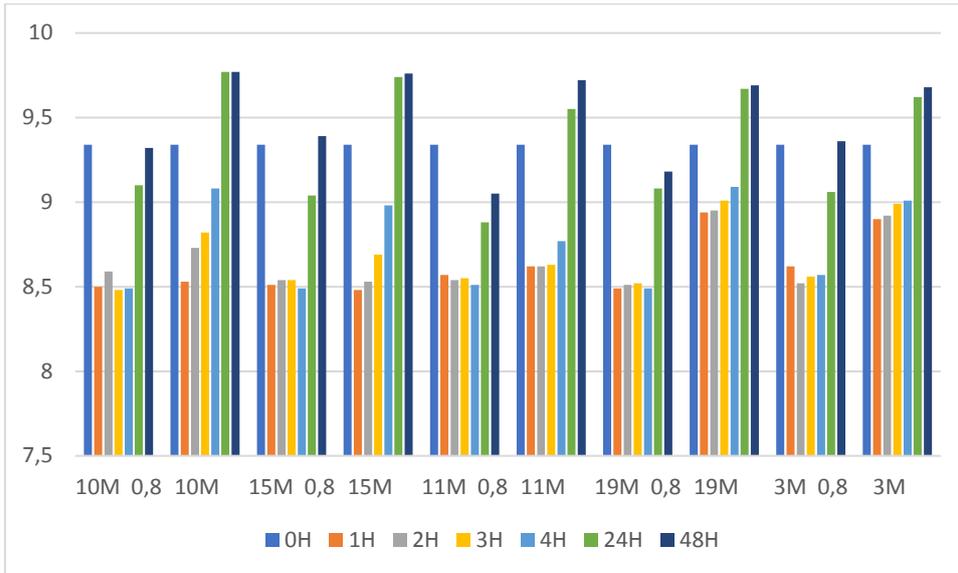


Figure 11: histogramme de test de salinité Des souches de milieu YEM (Log UFC/ml)

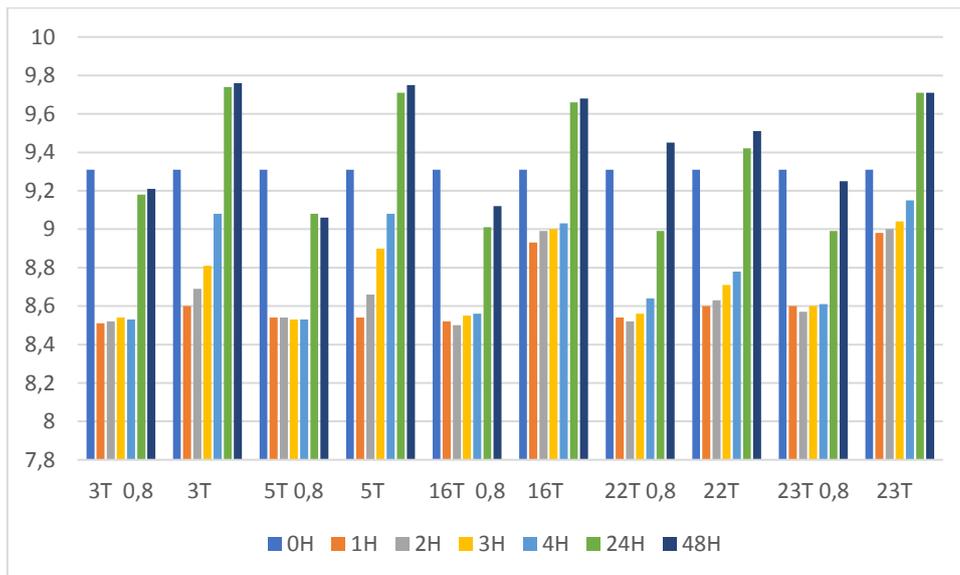


Figure 12: histogramme de test de salinité Des souches de milieu TYG (Log UFC/ml)

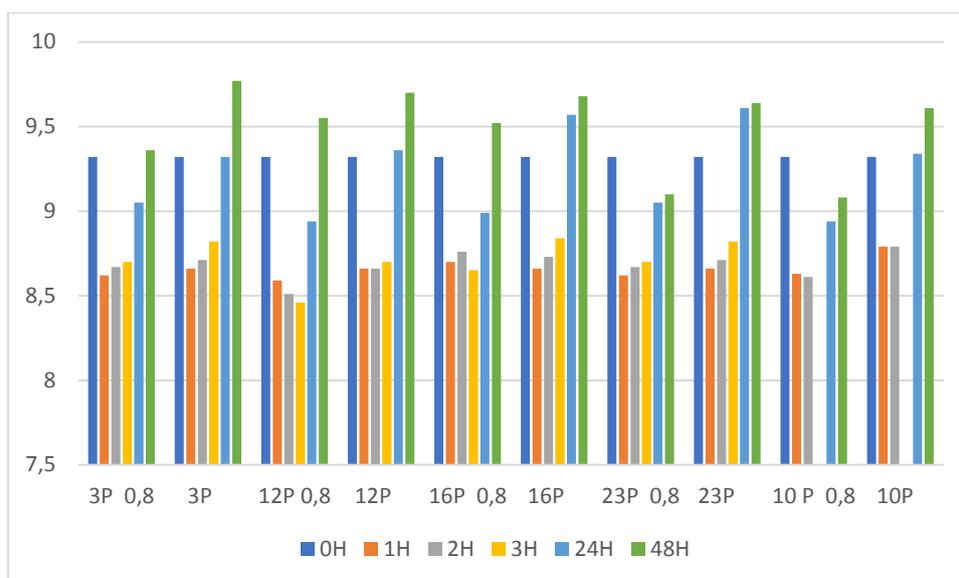


Figure 13 : histogramme de test de salinité Des souches de milieu PDA (Log UFC/ml)

IV.5. L'activité antimicrobienne

Le test de l'activité antimicrobienne à été mise en évidence par la technique de spot agar sur 18 isolats pour observer le pouvoir inhibiteur et effet antagoniste contre les souches pathogènes. Les résultats affichés dans le tableau 16 ont confirmé la formation des zones des inhibitions autour des isolats avec des diamètres variable.

Tableau 12 : Les zones d'inhibitions des souches actives

| souche/ind | E,F | List | Klc | Io2 |
|------------|-----------|------------|------------|-------------|
| 10M | 0 | 9,5±8,515 | 8,5 ±0,707 | 0 |
| 11M | 0 | 8,5±0,707 | 0 | 0 |
| 15M | 8,5±0,707 | 10,5±0,707 | 6 | 12,25±0,354 |
| 19M | 0 | 0 | 0 | 0 |
| 10P | 0 | 2,5 ±0,707 | 7 | 7,5 ±0,707 |
| 12P | 0 | 5,5 ±0,707 | 6,5±0,707 | 0 |
| 16P | 0 | 5 | 4 | 13 ±0,707 |
| 23P | 0 | 9,25±0,354 | 0 | 9 |
| A | 0 | 5,25±0,354 | 5±1,414 | 5 |
| E | 0 | 0 | 3,5 | 0 |

| | | | | |
|-----|---|------------|------------|------------|
| S | 0 | 5 | 10,25 | 7,25 |
| AG | 0 | 9,5 | 3,5 | 8,5±2,828 |
| AN | 0 | 8,75±0,354 | 4,5 ±0,707 | 5,5 |
| 3T | 0 | 3,5 ±0,707 | 5 | 5±1,414 |
| 5T | 0 | 3 | 0 | 0 |
| 16T | 0 | 9 | 9,5±2,121 | 8,5 ±0,707 |
| 22T | 0 | 0 | 12±4,243 | 6 |
| 23T | 0 | 9 | 0 | 5,25 |



Figure 14 : Test antimicrobien vis-à-vis (*K. oxytoca* _*E. faecalis*)



Figure 15: Test antimicrobien vis-à-vis (*L. ivanovii-S/* *Staphylococcus Intermedius*)

IV.6. DISCUSSION :

Après l'étude comparative des isolats sur le plan morphologique (macroscopiques et microscopique) révèle une large diversité de la population microbienne selon leur habitat d'isolement par exemple les genres les plus répons sont *Bacillus*, *Pseudomonas*, *Rhizobium* et les actinomycètes (Ameur, 2014). La croissance des souches bactériennes (30% des souches) dans un milieu salin indique l'existence d'une grande variété au niveau de la tolérance de nos souches vis-à-vis la salinité ou la concentration de milieu est 0,8 M de NaCl. Cette tolérance à la salinité des souches nous indique sur la concentration du sel du sol à partir de laquelle elles ont été isolées, montrant ainsi l'adaptation des trois plantes hôtes à l'halophile malgré qu'elles ne fussent pas halophiles.

Ces résultats ont été signalés aussi par Stefain Bernardette costa, (2021) qui a cultivé plusieurs souches dans un milieu salin ou les bactéries affichent une résistance. TAREK, (2021) a confirmé aussi les résultats enregistrés à la concentration 0,8 mol de NaCl. Les souches les plus résistantes avec une charge de plus 9 Log UFC sont (15M et 22T, 3P, 12P, 16P, 3M). Cependant, les caractéristiques communes de la microflore tellurique dans les trois zones de prélèvement à montrer des résultats qui sont variable et comparables aux données précédentes.

L'activité antimicrobienne à été mise en évidence en utilisant la technique *Spot agar test*, cette technique montre de meilleurs résultats (LOUCIF, 2011)

Après un temps d'incubation de 24h à 37°C on observe les halos d'inhibition au tour des souches ciblés, montrant ainsi le pouvoir inhibiteur de nos souches et leurs métabolites vis-à-vis les bactéries cibles (*Klebsiella oxytoca* ATCC 13182, *Enterococcus faecalis* ATCC10541, *Listeria ivanovii* ATCC19119 et *Staphylococcus Intermedius* CECT 1205) 72.22% des souches ont inhibées presque tous les indicatrices. La plus performante s'était la souche 15M avec des diamètres d'inhibition (10.5, 8.5, 9, 12.25).

Aujourd'hui on recherche de nouveaux composés antimicrobiens d'origine biologique à partir d'une grande variété d'organismes et de nombreux habitats naturels (Melouah, 2015). Les métabolites secondaires microbiens représentent une source important pour la production de composé dotés d'un pouvoir inhibiteur (bactériostatique, bactéricide).

Selon Belyagoubi, (2014), l'une des caractéristiques des actinomycètes est la production des antibiotiques capable d'inhiber d'autres bactéries pathogènes aux plantes et aux animaux.

Plusieurs étude ont montrées que les *Bacillus* sont capable de synthétiser des métabolites secondaire tells que les lipopeptides cycliques (*surfactine bacillomycine-D* et fongycin et *bacclibactin*) ainsi que les *polykitides* (*macrolactine*), l'induction de leur résistance et la suppression des phytopathogènes et des microorganismes délétères (Rebbee et al., 2019). Les *Bacillus* sont considéré comme une usine cellulaire microbienne produisant une variété de métabolites secondaires actifs.

Cependant, *Pseudomonas spp* produisent le DAPG, un antibiotique à large spectre vis-à-vis des virus, des bactéries et des champignons (Kwaket et al., 2011). *Pseudomonas fluorescens* synthétise diverses enzymes lytiques, β -1,3-glucanases et β -1,4- glucanase et des lipases qui provoquent la lyse de la paroi cellulaire de *Phytophthora capsici* (Diby et al., 2005). *Pseudomonas fluorescens* CHAO secrète une protéase extracellulaire qui est impliquée dans le bio contrôle d'un nématode (*Meloidogynein cognita*) au cours de l'infection de la tomate et du soja (Siddiquietal.,2006). *Pseudomonas spp. fluorescens* diffusent le cyanure d'hydrogène qui assure une activité antimicrobienne à large spectre dans le contrôle biologique des maladies telluriques de nombreuses plantes (Ramette et al., 2003). L'activité antagoniste des *Pseudomonas* fluorescentes *putida* implique la production de la pyoverdine (Colin, 1988). Cette production est dépendante de la nature du milieu (King et al., 1954), en cas de carence en ions ferriques, la synthèse de la pyoverdine par les *Pseudomonas* fluorescents afin de chélater les ions ferriques et de les

transporter (Eyquem et al., 2003). L'addition des ions ferriques inhibe l'activité antagoniste des *Pseudomonas in vitro*, de même, des mutants déficients en sidéro phores ne peuvent plus réduire la croissance des agents pathogènes (Fernando et al., 2005).

PARTIE V. CONCLUSION ET PERSPECTIVES

Conclusion

Les bactéries du rhizosphère des plantes médicinales surtout de la région de Saïda ou appelé aussi rhizobactéries ayant une capacité pour favoriser la croissance des plantes, stimulant directement la croissance de celles-ci en augmentant le prélèvement des éléments nutritifs du sol, en induisant et produisant des régulateurs de croissance végétale. Cependant, ces rhizobactéries stimulent indirectement la croissance par leur effet antagoniste pour contrer la microflore pathogène qui leur est néfaste, en transformant les métabolites toxiques et en stimulant la nodulation. Leur pouvoir antagoniste implique la production d'antibiotiques et la compétition nutritionnelle avec les pathogènes.

L'association rhizobactéries-plantes est primordiale pour l'expression des effets bénéfiques aux plantes.

Le développement des inoculants contenant des rhizobactéries bioactives et ou leurs métabolites, surtout afin de réduire l'utilisation des pesticides de synthèse en agriculture.

En perspective notre étude pourra servir à d'éventuelles études cliniques, et la mise en forme définitive de la préparation. Par ailleurs, des essais d'isolation de substances biologiquement actives à partir des rhizosphères de notre plantes pourront constituer une porte d'avenir très prometteur.

PARTIE VI. REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

Références bibliographiques

- Allen E.K. et Allen O.N., 1950. Biochemical and symbiotic properties of the Rhizobia. Department of Agricultural Bacteriology, University of Wisconsin, Madison.
- Ameur H., 2014. Effet d'osmoprotecteurs naturels sur la restauration de croissance de *Streptomyces* et de plantes d'intérêt agricole sur sol salé ou aride. Pp 36-37-38-39.
- Andrea, S., Boyd, M., Henrik, S., Jö, F., Kenneth, T., & Terry, M. (2008). Diversity of *Bacillus*-like organisms isolated from deep-sea hypersaline anoxic sediments.
- Arshad, M., Hussain, A., Javed, M., & Frankenberger, W. T. (1993). Effect of soil applied L-methionine on growth, nodulation and chemical composition of *Albizia lebeck* L. *Plant and soil*, 148(1), 129-135.
- Ash, C., Priest, F. G., & Collins, M. D. (1993). Molecular identification of rRNA group 3 bacilli (Ash, Farrow, Wallbanks and Collins) using a PCR probe test. *Antonie van leeuwenhoek*, 64(3), 253-260.
- Asselineau, C. (1981). Constituants lipidiques de *Mycobacterium leprae* isolé de tatou infecté expérimentalement.
- Badalucco L., Kuikman P. J. (2001). Mineralization and immobilization in the rhizosphere, In: *The Rhizosphere. Biochemistry and organic substances at the soil-plant interface*, Pinton, R., Varanini, Z. and Nannipieri, P., eds., Marcel Dekker, Inc. N.Y., 159-196.
- Barefoot, S. F., & Klaenhammer, T. R. (1983). Detection and activity of lactacin B, a bacteriocin produced by *Lactobacillus acidophilus*. *Applied and Environmental microbiology*, 45(6), 1808-1815.
- Baudoin E., Benizri E., Guckert A. (2003). Impact of artificial root exudates on the bacterial community structure in bulk soil land maize rhizosphere. *Soil Biology & Biochemistry*, 35: 1183- 1192.
- Baudoux, D. (2000). *L'aromathérapie: se soigner par les huiles essentielles.*(Ed) Atlantica.
- Belyagoubi L., 2014. Antibiotiques produits par des bactéries (actinomycètes et bactéries lactiques) issus de différents écosystèmes naturels Algériens. 91-92.
- Bencheqroun, H. K., Ghanmi, M., Satrani, B., Aafi, A., & Chaouch, A. (2012). Activité antimicrobienne des huiles essentielles d'*Artemisia mesatlantica*, plante endémique du Maroc. *Bulletin de la société Royale des sciences de Liège*, 81, 4-21.
- Beniston, N. T., & Beniston, W. S. (1984). *Fleurs d'Algérie*. Entreprise nationale du livre.
- Bergey, D. H., Breed, R. S., Murray, E. G. D., & Hitchens, A. P. (1939). *Manual of determinative bacteriology. Fifth Edn.*

- Bergey, D. H., In Buchanan, R. E., In Gibbons, N. E., & American Society for Microbiology. (1974). *Bergey's manual of determinative bacteriology*. Baltimore: Williams & Wilkins Co.
- Bibb, M. 1996. The regulation of antibiotic production in *Streptomyces coelicolor* A3(2). *Microbiology*. 142: 1335-1344.
- Blumenthal, M., Goldberg, A., & Brinckmann, J. (2000). *Herbal medicine. Expanded commission E monographs*. Integrative Medicine Communications.
- Boddey, R. M., & Dobereiner, J. (1995). Nitrogen fixation associated with grasses and cereals: recent progress and perspectives for the future. *Nitrogen economy in tropical soils*, 241-250.
- Bodoharisoa O., Laingo I.R., Rakotoarimanana N. A., Ralisoa N., Randrianarison Z. M., Rasamimanana N., Rasolonjatovo M. A., Razafindrakoto C., Razafinimaro N. C. R., Razanakotonarivo T.O., 2007. Les microbes du sol. Exposé de Microbiologie. Ecole Supérieure des Sciences Agronomiques, Univ. Antananarivo, Madagascar. 63p.
- BOUCHAT, J. (1956). Beni-Ounif (Sud Oranais); geographical, historical and medical study. *Archives de l'Institut Pasteur d'Algerie. Institut Pasteur d'Algerie*, 34(4), 575-671.
- Boutekedjiret, C., Belabbes, R., Bentahar, F., & Bessiere, J. M. (1999). Study of *Rosmarinus officinalis* L. essential oil yield and composition as a function of the plant life cycle. *Journal of Essential Oil Research*, 11(2), 238-240.
- Bradley, S. G., Papermaster, B. W., Watson, D. W., & Good, R. A. (1961). Immune Response to Actinophage in the Mouse. *Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine*, 108(1), 79-82.
- Bruneton, J. (1999). *Toxic plants dangerous to humans and animals*. Intercept Limited.
- Campbell R., Greaves M.P., 1990. In: Brahim S., 1998. Isolement à partir de la rhizosphère des conifères de bactéries et d'actinomycètes antagonistes aux champignons phytopathogènes. Mém. Etudes Sup., Univ. Laval, Canada, 69p.
- Cecchini S., Dalstein L., Vas N., Ulrich E., 2004. Dégradation de la forêt française en relation avec l'ozone: Première approche. *Environnement et technique* : 42-44.
- Cecchini T. 2004. *Encyclopédie des plantes médicinales*. Ed. Vecchisa. Paris, pp.351.
- Chaieb, M., & Zaâfour, M. S. L'élevage extensif, facteur écologique primordial.
- Claus, D. and Berkeley, R.C.W. (1986) Genus *Bacillus* Cohn, 1872. In: Sneath, P.H.A., Mair, N.S., Sharpe, M.E. and Holt. J.G., Eds., *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*, The Williams & Wilkins Co., Baltimore, 2, 1105-1139.
- Colin J.E., (1988). Antagonisme entre les pseudomonas fluorescents et plusieurs pathovars de *pseudomonas syringae* . Application comme méthode de lutte contre la moucheture bactérienne de la tomate. *EPPO Bulletin*, 18, (1), PP 47-54.

- Collins, M. D., Pirouz, T., Goodfellow, M., & Minnikin, D. E. (1977). Distribution of menaquinones in actinomycetes and corynebacteria. *Microbiology*, 100(2), 221-230.
- Costa-Gutierrez, S.B.; Caram-Di Santo, M.C.d.V.; Zenoff, A.M.; Espinosa-Urgel, M.; de Cristóbal, R.E.; Vincent, P.A. Isolation of Pseudomonas Strains with Potential for Protection of Soybean Plants against Saline Stress. *Agronomy* 2021, 11, 2236. <https://doi.org/10.3390/agronomy11112236>
- Curtis T.P., Sloan W.T., Scannell J.W. (2002): Estimating prokaryotic diversity and its limits. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 6(99): 10494-10499p.
- De Freitas, J. R., Banerjee, M. R., & Germida, J. J. (1997). Phosphate-solubilizing rhizobacteria enhance the growth and yield but not phosphorus uptake of canola (*Brassica napus* L.). *Biology and Fertility of soils*, 24(4), 358-364.
- Diby p., Saju K.A., jisha J.P., Sarma Y.R., Kumar A., Anandaraj M., (2005). Mycolytic Enzymes produced by *Trichoderma* and *pseudomonas fluorescens* spp. Against phytophthora capsic, foot rot pathogen of the black pepper (*piper nigrum* L.). *Annals of Microbiology*, 55, (2), pp 129-133.
- Dommergues Y., Mangenot F. (1970). *Ecologie microbienne du sol*. Masson, Paris.
- Drapeau A. J., Jankovic S. (1977). *Manuel de Microbiologie de l'environnement*. OMS, Genève (CH). 251 p.
- Duineveld B. M., Kowalchuk G. A., Keijzer A., van Elsas J. D., van Veen J. A. (2001). Analysis of bacterial communities in the rhizosphere of chrysanthemum via denaturing gradient gel electrophoresis of PCR-amplified 16S rRNA as well as DNA fragments coding for 16S rRNA. *Applied and Environmental Microbiology*, 67: 172-178.
- Duineveld B. M., Rosado A. S., van Elsas J. D., van Veen J. A. (1998). Analysis of the dynamics of bacterial communities in the rhizosphere of the chrysanthemum via denaturing gradient gel electrophoresis and substrate utilization patterns. *Applied and Environmental Microbiology*, 64: 4950-4957.
- Eyquem A., Alouf J., Montagnier L., (2003). *Traité de microbiologie clinique : Deuxièmes mises à jour et compléments*. Piccin Nuova Libreria, Italie, p 238.
- Fernando W.G., Dilantha N.S. and Zhang Y., (2005). Biosynthesis of antibiotics by PGPR and its relation in biocontrol of plant diseases. In Siddiqui Z.A., (ed) *PGPR and biofertilization*. Springer, Netherlands, p 313.
- Flaishman, M. A., Eyal, Z., Zilberstein, A., Voisard, C., & Haas, D. (1996). Suppression of *Septoria tritici* blotch and leaf rust of wheat by recombinant cyanide-producing strains of *Pseudomonas putida*. *MPMI-Molecular Plant Microbe Interactions*, 9(7), 642-645.

- Francis Joannès, 2001. Dictionnaire de la civilisation mésopotamienne. Ed Robert Laffont ISBN2-221-09 207-4.
- FRIEDMAN. J, YANIZ. Z, DAGNI. A, PALE WITCH. D, 1986. A preliminary classification of the healing potential and medicinal plants, based on a rational analysis of an ethnopharmacological field survey among Bedouins in the negev desert. *J. Ethnopharmacol.* Jun; 16 (2-3): 275-87
- Gharabi et Sand R.L. 2008. *Artemisia herba alba* Asso. A Guide to Medicinal Plants in North Africa : 49 - 49.
- Giri B., Giang P.H., Kumari R., Prasad R., Varma A., 2005. Microbial diversity in soils. In: Eds Buscot F., Varma A., *Microorganisms in soils: Roles in genesis and functions.* Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, Germany. pp: 195-212.
- Glick, B. R. (1995). The enhancement of plant growth by free-living bacteria. *Canadian journal of microbiology*, 41(2), 109-117.
- Groth, I., Vettermann, R., Schuetze, B., Schumann, P., & Saiz-Jimenez, C. (1999). Actinomycetes in Karstic caves of northern Spain (Altamira and Tito Bustillo). *Journal of microbiological methods*, 36 1-2, 115-22 .
- Hiltner L. (1904). New experience and problems of the role of land bacteria under special considerations of formation and utilization. *Journal of German Agriculture Research*, 98: 59–63
- Hinsinger P., Marschner P. (2006). Rhizosphere–perspectives and challenges—a tribute
- Hoffmann E., Seegerer A. (1951). Soil enzymes as factors of fertility. *Naturwissenschaften*. 38: 141-142.
- Holl, F. B., & Chanway, C. P. (1992). Rhizosphere colonization and seedling growth promotion of lodgepole pine by *Bacillus polymyxa*. *Canadian Journal of Microbiology*, 38(4), 303-308.
- Holt JG, Krieg NR, Sneath PHA, Staley JT, Williams ST: *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology* Baltimore: Williams & Wilkins; 1994
- Holt, R. D., & Lawton, J. H. (1994). The ecological consequences of shared natural enemies. *Annual review of Ecology and Systematics*, 495-520.
- Horner-Devine M.C., Leibold M.A., Smith V.H., Bohannan B.J.M. (2003): Bacterial diversity patterns along a gradient of primary productivity. *Ecology Letters*. 6(7): 613-622p.
- Hütter R.** 1962; Zur Systematik der Actinomyceten. 7. Streptomyceten mit blauem, blaugrünem und grünem Luftmycel. *Archiv. für Mikrobiol* 43:23
- Jackson, S.G., Goodbrand, R.B., Ahmed, R., Kasatiya, S., 1995. *Bacillus cereus* and *Bacillus thuringiensis* isolated in a gastroenteritis outbreak investigation. *Lett. Appl. Microbiol.* 21, 103–105.

- Jensen P.R., Dwight R., and Fenica I.W., 1991. Distribution of actinomycetes in nearshore tropical marine sediments. *Appl Environ Microbiol*, 57(4):1102–1108
- JORDAN, D.C. (1984). Family III. Rhizobiaceae Conn 1938. In: N.R. Kreig and J.H. Holt (Ed.). *Bergey's manual of systematic bacteriology*. Vol.1 the Williams & Wilkins Co. Baltimore. pp. 234 - 254.
- Kennedy A. C. (2005). Rhizosphere, In: *Principles and Applications of Soil Microbiology*, D.M., Sylvia, J.J., Fuhrman, P.G., Hartel, and D.A., Zuberer, eds., 2nd ed. Pearson, Prentice Hall, New Jersey, 242-262.
- KIHAL M, PREVOST H., LHOTTE M.E., HUANG D.Q., DIVIES C. 1996, Instability of plasmid-encoded citrate permease in *Leuconostic*. *J. Appl. Microbil.*, 22, 219-223
- King E.O., Ward M.K. and Raney D.E., (1954). Two simple media for the demonstration of pyocyanin and fluorescin . *J Lab Clin Med.* , 44, 301-307.
- Kwak Y.S., Han S ., Thomashow L.S., Rice J.T ., paulitz T.C . Kim D ., Weller D .M., (2011) . *saccharomyces cerevisiae* Genome-Wide Mutant Screen for sensitivity to 2,4-Diacetylphloroglucinol, an Antibiotic produced by *pseudomonas fluorescent*..
- Lavelle P., Spain A. V. (2001). *Soil Ecology*. Kluwer Academic Publishers. Dordrecht. The Netherlands. 654 pages.
- Lebuhn M., Heulin T., Hartmann A., 1997. Production of auxine and other indolic and phenolic compounds by *Paenibacillus polymyxa* strains isolated from different proximity to plant roots. *FEMS Microbiol. Ecol.*, 22: 325-334.
- Lechevalier, M. P., & Moss, C. W. (1977). Lipids in bacterial taxonomy-a taxonomist's view. *CRC critical reviews in microbiology*, 5(2), 109-210.
- LeChevallier, M. W., Seidler, R. J., & Evans, T. M. (1980). Enumeration and characterization of standard plate count bacteria in chlorinated and raw water supplies. *Applied and Environmental Microbiology*, 40(5), 922-930.
- Lyons, A. J., & Pridham, T. G. (1973). Standard antimicrobial spectra as aids in characterization and identification of actinomycetales. *Developments in industrial microbiology*
- Mahaffee, W. F., & Kloepper, J. W. (1997). Temporal changes in the bacterial communities of soil, rhizosphere, and endorhiza associated with field-grown cucumber (*Cucumis sativus* L.). *Microbial Ecology*, 34(3), 210-223.
- Martinez-Noel G.M.A., Madrid E.A., Bottini R., Lamattina L., 2001. Indole acetic acid attenuates disease severity in potato-*Phytophthora infestans* interaction and inhibits the pathogen growth in vitro. *Plant Physiol. Biochem.*, 39: 815-823.
- Melouah R. (2015) .Production et extraction de quelques principes actifs isolés à partir des Actinomycètes UKM Ouargla. Mémoire de master académique. Microbiologie appliquée. Université kasdi Mesbah Ouargla. Pp.12-13.

- Mulas M., Francescani A. H. D., Perinu B. & Del Vais E., 2002. Selection of rosemary (*Rosmarinus officinalis* L.) cultivars to optimize biomass and yield. *J. Herbs Spices & Med. Plants*, 9, 133-138.
- NABLI. MA. 1989. Essai de synthèse sur la végétation et la phyto-écologie tunisiennes. Tome 1. Ed MAB (faculté des sciences de Tunis) : 186-188 p.
- Nolan, R.D., & Cross, T. (1988). 1 – Isolation and Screening of Actinomycetes.
- Prescott L. M., Harley J. P., Klein D. A., Bacq-Calberg C. - M., Dusart J. (2013). *Microbiologie*. 4^{éd}. De Boeck Université, Bruxelles : Deboeck et Larcier ; 1070 p.
- QUENZEL. P., Santa S. -Nouvelles flores d'Algérie et des régions désertiques méridionales . Tome II. Ed. CNRS Paris 1963, 1170p
- Quézel P. & Santa S., 1962-1963. Nouvelle flore de l'Algérie et des régions désertiques méridionales. CNRS, Paris. Tome I : 1-570 + 65 planches h.-t. Tome II : 571-1170 + 70 planches h.-t
- Ramette A., Frapolli M., Défago G., Moenne-Loccoz Y., (2003). Phylogeny of HCN synthase-encoding hcnBC genes in biocontrol fluorescent pseudomonads and its relationship with host plant species and HCN synthesis ability . *Mol plant Microbe Interact*, 16 (6), pp 525-535.
- REGGANI, K., DRICI, H., & GHALLAI, L. (2021). MORPHOLOGICAL CHARACTERIZATION AND PRELIMINARY SCREENING FOR ANTIBACTERIAL ACTIVITY OF ACTINOBACTERIA STRAINS ISOLATED FROM TAMANRASSET SOIL AS A HYPER ARID REGION IN SOUTHERN ALGERIA. *Algerian Journal of Arid Environment "AJAE"*, 11(2), 18-18.
- Roesti R., 2005. Bacterial community associated with the rhizosphere of wheat: interactions with the arbuscular mycorrhizal fungi and selection of plant growth promoting rhizobacteria for the increase of wheat growth and soil health in Indian marginal rainfed fields. These Doctorat Sciences Biologiques, Univ. de Neuchâtel, Suisse. 179p.
- Samelis, J., Maurogenakis, F. and Metaxopoulos, J. (1994) Characterisation of lactic acid bacteria isolated from naturally fermented Greek dry salami. *International Journal of Food Microbiology* 23, 179±196.
- Scher, F. M., & Baker, R. (1982). Effect of *Pseudomonas putida* and a synthetic iron chelator on induction of soil suppressiveness to *Fusarium* wilt pathogens. *Phytopathology*, 72(12), 1567-1573.
- Seldin, L., Rosado, A. S., da Cruz, D. W., Nobrega, A., van Elsas, J. D., & Paiva, E. (1998). Comparison of *Paenibacillus azotofixans* strains isolated from rhizosphere, rhizosphere, and non-root-associated soil from maize planted in two different Brazilian soils. *Applied and Environmental Microbiology*, 64(10), 3860-3868.

- Shanahan, P., O'Sullivan, D. J., Simpson, P., Glennon, J. D., & O'Gara, F. (1992). Isolation of 2, 4-diacetylphloroglucinol from a fluorescent pseudomonad and investigation of physiological parameters influencing its production. *Applied and environmental microbiology*, 58(1), 353-358.
- Siddiqui A., Shahid Shaukat S., Imtiaz Hussain S., Khan A., (2006). Role of cyanide production by *Pseudomonas fluorescens* CHAO in the suppression of root-knot nematode, *Meloidogyne javanica* in tomato. *World journal of microbiology & Biotechnology*, 22 (6), pp 641-650.
- Tarek, H., & Amrani, S. (2021). Effet du chlorure de sodium (NaCl) sur la croissance des souches bactériennes nodulantes *Acacia ehrenbergiana*. *Ann. Rech. For. Algérie*, 11(01), 42-52.
- Tastekin, D., Atasever, M., Adiguzel, G., Keles, M., & Tastekin, A. (2006). Hypoglycaemic effect of *Artemisia herba-alba* in experimental hyperglycaemic rats. *Bulletin of the Veterinary Institute in Pulawy*, 50(2).
- Thoresen MA, Hildebrand KS (2003) Quantitative determination of phenolic diterpenes in rosemary extracts. Aspects of accurate quantification. *Journal of Chromatography A* 995: 119- 125
- Vivas A., Barea J.M., Biro B., Azcon R., 2006. Effectiveness of autochthonous bacterium and mycorrhizal fungus on *Trifolium* growth, symbiotic development and soil enzymatic activities in Zn contaminated soil. *J. Appl. Microbiol.*, 100: 587-598.
- Westover K.M., Kennedy A.C., Kelleys S.E., 1997. Patterns of rhizosphere microbial community structure associated with co-occurring plant species. *J. Ecol.*, 85: 563-873
- Wright, J. M., & Chambers, J. C. (2002). Restoring riparian meadows currently dominated by *Artemisia* using alternative state concepts—above-ground vegetation response. *Applied Vegetation Science*, 5(2), 237-246.
- Yin, Y., Gong, F. Y., Wu, X. X., Sun, Y., Li, Y. H., Chen, T., & Xu, Q. (2008). Anti-inflammatory and immunosuppressive effect of flavones isolated from *Artemisia vestita*. *Journal of Ethnopharmacology*, 120(1), 1-6.
- Zegorka G and Glowniak K, (2001). Variation of free phenolic acids in medicinal plants belonging to the lamiaceae family. *J. Pharm. Biomed. Anal.*
- Zimmerman W (1990) Degradation of lignin by bacteria. *J Biotechnol* 13:119-130.

PARTIE VII. ANNEXES

VII.1. Annexe 1

Examen à l'état frais :

- Technique :

Prendre une lame propre nettoyée avec un coton imbibé d'alcool à 95° :

- Dans le cas d'une culture en milieu liquide (bouillon), déposer sur la lame une goutte

de cette culture, à l'aide d'une pipette Pasteur stérile ou un inoculum avec une anse de platine.

- Dans le cas d'une culture sur milieu solide (gélosé) en tube ou sur boîte de Pétri, déposer tout d'abord sur la lame une goutte d'eau distillée stérile ou une goutte d'eau physiologique stérile, puis apporter et dissocier dans l'eau un inoculum bactérien ;

- Recouvrir d'une lamelle,

- Observer au microscope optique à l'objectif $\times 40$ ou $\times 60$.

- Conseil pratique

Il faut régler convenablement la lumière et ne pas prolonger le temps d'observation au-delà de 3 minutes, sinon la préparation se dessèche (Camille.D,2007).

Examen microscopique (coloration de Gram) :

1-Matériel :

Anse de platine

Bec benzène

Lames et lamelle

Microscope optique

Pipettes

Les frottis

2-Réactifs :

Violet de gentiane

Lugol

L'alcool

Fuchsine

L'huile d'émersion

3-Protocole technique :

La coloration de GRAM peut être obtenue suivant divers protocoles techniques normalisés, obéissant tous aux mêmes étapes : fixation, coloration, décoloration, contre-coloration.

Un des protocoles les plus usuels se déroule selon les étapes suivantes :

1-Etalement et fixation par la chaleur de la suspension bactérienne sur une lame porte objet,

2- Coloration pendant une minute au violet de gentiane(ou au cristal violet) pendant 30s,

3-Lavage à l'eau,

4-Coloration au lugol pendant une minute,

5-Lavage à l'eau,

6-Décoloration à l'éthanol à 95°jusqu'à élimination du colorant (environ 30S),

7-Lavage à l'eau,

8-Contre-coloration pendant 1 à 2 minutes par une solution de fuschine diluée à 10% ou par une solution de safranine.

9-Lavage à l'eau.

Après séchage, la lame peut être observée au microscope avec un objectif à immersion. Les bactéries à GRAM positif apparaissent en violet et les bactéries à GRAM négatif en rose. (Bousseboua, 2002).

10- coloration de gram :

Nous avons procédé de la même manière pour les souches isolées.

Un frottis fixé a la chaleur est coloré pendant une minute avec une solution de violet gentiane, le frottis coloré est rincé rapidement avec une solution iodo-iodurée de Lugol qui est un mélange d'iode et d'iodure dans l'eau. Il est maintenu dans ce même milieu pendant une minute. Le frottis est ensuite décoloré avec de l'alcool a 95%. Cette décoloration est prolongée pendant quelques secondes de façon a permettre l'écoulement de l'alcool et en fin rincé la lame immédiatement et délicatement sous un robinet. L'observation microscopique montre que toutes les cellules gram+ du frottis sont colorées en violet tandis que les cellules gram- sont incolores. Le frottis est alors soumis a une coloration de contraste.

Le but de ce traitement est de permettre d'observer plus clairement les cellules gram- éventuellement présentes et de bien les différencier par rapport aux cellules gram+. Le frottis est traité par exemple avec une solution diluée de fuchsine pendant une minute, rincé rapidement par l'eau de robinet et séchés ce traitement. (SINGLETON et SAMISBY, 1984)

11-Lecture :

Quand les bactéries sont violettes, elles sont des grams positifs et quand elles sont roses, elles sont des grams négatifs (SINGLETON et SAMISBY, 1984).

VII.2. Annexe II :**Milieu Potato dextrose agar (PDA) (Guiraud, 1998) :****Compositions:**

| | |
|----------------------|---------|
| Pomme de terre | 200g |
| Glucose..... | 20g |
| Agar..... | 20g |
| Eau distillée..... | 1000 ml |

Bouillon Luria Bertani LB (g/l)

| | |
|------------------------|---------|
| Peptone..... | 10 g |
| NaCl | 10 g |
| Extrait de levure..... | 5 g |
| pH..... | 7.2±0.2 |

Pour le milieu solide LB :

100ml de la solution CAS- HDTMA est ajouté à 900 ml de LB dans un erlenmeyer stérile (le mélange doit être homogénéisé). Couler ce milieu dans les boîtes de pétri, puis ensemencée les isolats.

Milieu Trypticase Yeast gélose (TYG) :**Compositions:**

| | |
|---------------------------------------|------|
| Tryptone..... | 200g |
| Glucose..... | 20g |
| K ₂ HPO ₄ | 1g |
| Agar..... | 20g |
| Extrait de levure..... | 3g |
| PH..... | 7,4 |

Milieu yeast Extract Mannitol(YEM) medium :

Compositions:

| | |
|---------------------------------------|------|
| Mannitol..... | 200g |
| MgSo4..... | 20g |
| K ₂ HPO ₄ | 1g |
| NaCl..... | 20g |
| Extrait de levure..... | 3g |
| Agar..... | |
| PH..... | 7,4 |