

**UNIVERSITE MOULOU MAMMERI DE TIZI-OUZOU  
FACULTE DES SCIENCES BIOLOGIQUES ET DES SCIENCES  
AGRONOMIQUES**

**DEPARTEMENT DE BIOCHIMIE-MICROBIOLOGIE**



## **Polycopié de Cours**

**Titre**

**Biotechnologies Fongiques et Bactériennes**

Cours destinés aux étudiants de

Master I Biotechnologie microbienne

Domaine : Sciences de la Nature et de la Vie

**Présenté par :**

**Dr BENAZZOUZ KINZA**

**Année Universitaire : 2024/2025**

## Première Partie : Bactéries

I.	Généralités	1
I.1.	Morphologie et ultrastructure des bactéries	1
I.1.1.	Forme et associations cellulaires	1
I.1.2.	Structure cellulaire	3
I.1.3.	Eléments constants et inconstants de la structure bactérienne	4
I.1.4.	Paroi	4
I.1.4.1.	Coloration de Gram	5
I.1.4.2.	Paroi des Gram positives	7
I.1.4.3.	Paroi des Gram négatives	8
I.1.4.4.	Structure chimique de la paroi	13
I.1.4.5.	Fonctions	13
I.1.5.	Membrane plasmique	14
I.1.5.1.	Structure et composition chimique	14
I.2.	Métabolisme bactérien	15
I.2.1.	Métabolisme énergétique et types respiratoires	16
I.2.1.1.	Métabolisme énergétique	16
I.2.1.1.1.	Métabolisme énergétique chez les phototrophes	17
I.2.1.1.2.	Métabolisme énergétique chez les chimiotrophes	18
I.1.3.	Classification bactérienne	25
I.1.3.1.	Définitions	25
I.1.3.2.	Importance de la taxonomie	27
I.1.3.3.	Unités de classification	27
I.1.3.4.	Classification naturelle	27
I.1.3.4.1.	Classification phénotypique	28
I.1.3.4.2.	Taxonomie génétique ou phylogénique	32
I.1.3.4.3.	Classification de Bergey	40
II.	Bactéries d'intérêts et applications en biotechnologie	41
II.1.	Agriculture	41
II.1.1.	Lutte biologique des ravageurs des plantes	41
II.1.1.1.	Définition de lutte biologique	42
II.1.1.2.	Notions du contrôle biologique microbien : Bio-contrôle des bactéries et champignons phytopathogènes	43
II.1.1.2.1.	Définition du bio-contrôle microbien	43
II.1.1.3.	Biopesticides	43
II.1.1.3.1.	Définition	43

II.1.1.3.2.	Biopesticides à base de bactéries	44
II.1.1.3.3.	Biopesticides à base de champignons	45
II.1.1.3.4.	Biopesticides à base du cholestérol oxydase de <i>Streptomyces</i>	46
II.1.1.4.	Avantages et inconvénients de la lutte biologique	49
II.1.2.	Utilisation des bactéries comme 'Biofertilisants' (PGPR, production d'hormones et solubilisation du phosphore, bactéries dénitrifiantes dans le sol)	50
II.1.2.1.	Définition de biofertilisant	51
II.1.2.2.	Rhizobactéries promotrices de la croissance des plantes (PGPR) en tant qu'agents de lutte biologique	52
II.1.2.2.1.	Mode d'action des PGPR en lutte biologique	52
II.1.2.3.	Solubilisation des phosphates	58
II.1.2.3.1.	Mobilisation du phosphore dans le sol	58
II.1.2.3.2.	Solubilisation	59
II.1.2.3.3.	Minéralisation	59
II.1.2.3.4.	Immobilisation	60
II.1.2.4.	Bactéries dénitrifiantes dans le sol	60
II.1.2.4.1.	Conditions de réalisation de la dénitrification	62
II.1.2.4.2.	Processus de la dénitrification	62
II.2.	Santé et industrie pharmaceutique	63
II.2.1.	Production d'antibiotiques et produits pharmacologiques (Alcaloïdes et immunosuppresseurs) (Exemple : Actinomycètes).	63
II.2.1.1.	Importance et application des actinobactéries	63
II.2.1.2.	Production d'antibiotiques	64
II.2.2.	Bactéries probiotiques	65
II.2.2.1.	Définitions	65
II.2.2.2.	Probiotiques	66
II.2.2.3.	Prébiotiques et symbiotiques	66
II.2.2.4.	Composition et répartition du microbiote intestinal	66
II.2.2.5.	Facteurs influençant l'implantation et la stabilité du microbiote intestinal	68
II.2.2.6.	Fonctions du microbiote intestinal	69
II.2.2.7.	Effets bénéfiques pour la santé	69

II.2.3.	Produits de bactéries génétiquement modifiés : hormone de croissance Humaine, Insuline.	70
II.2.3.1.	Déficit en hormone de croissance	70
II.2.3.1.1.	Causes de l'insuffisance en hormone de croissance	71
II.2.3.1.2.	Traitement du déficit en hormone de croissance	72
II.2.3.1.3.	Dose, fréquence et heure du traitement	72
II.2.3.2.	Production d'insuline	73
II.2.3.2.1.	Structure	73
II.2.3.2.2.	Technologie de recombinaison de l'ADN Dans la synthèse de l'insuline humaine	74
II.2.3.2.3.	Etapas de la fabrication d'insuline	74
II.2.4.	Exploitation des toxines bactériennes en médecine : exemple vaccins	75
II.2.4.1.	Objectifs de la vaccination	75
II.2.4.2.	Types de vaccins	76
II.2.4.2.1.	Vaccins inertes	76
II.2.4.2.2.	Vaccins vivants	79
II.3.	Industrie agroalimentaire	80
II.3.1.	Toxines bactériennes	80
II.3.1.1.	Description de l'espèce	80
II.3.1.2.	Mode d'action sur les cibles	82
II.3.2.	Bactéries lactiques	85
II.3.2.1.	Généralités sur les bactéries lactiques	85
II.3.2.2.	Métabolisme de protéines	90
II.3.2.3.	Métabolisme des lipides	92
II.3.2.4.	Aptitude aromatisante	92
II.3.2.5.	Polysaccharides	93
II.4.	Environnement : Bioremédiation	93
II.4.1.	Principe de la bioremédiation	94
II.4.1.1.	Bioaugmentation	95
II.4.1.2.	Biofiltration	95
II.4.1.3.	Biostimulation	96
II.4.1.4.	Compostage	97
II.4.1.5.	Biolixiviation	97
II.4.2.	Microorganismes utilisés en bioremédiation	98

<b>Deuxième Partie : Mycètes</b>		99
I.	Généralités	99
I.1.	Caractéristiques morphologiques, Cytologiques et Biochimiques des champignons (levures et moisissures)	99
I.1.1.	Morphologie et structure des cellules	99
I.1.2.	Composition chimique de la paroi des champignons (levures et moisissures)	101
I.2.	Classification et diversité des champignons	103
II.	Champignons d'intérêts biotechnologiques	104
II.1.	Valeur économique des mycètes	104
II.2.	En Industrie agroalimentaire	104
II.2.1.	Culture de mycètes pour consommation	104
II.2.2.	Applications et utilisations thérapeutiques des champignons	106
II.2.2.1.	Comment renforcer le système immunitaire	106
II.2.3.	Mycètes comme agents de fermentation alimentaire: Fermentation panaire par la levure <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	108
II.2.3.1.	Définitions	108
II.2.3.2.	Caractéristiques générales de <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	108
II.2.3.3.	Action de la levure en panification	108
II.2.4.	Production de métabolites	109
II.2.4.1.	Protéines d'origine fongiques (Exemple : Les enzymes)	109
II.2.4.2.	Production de vitamines	110
II.2.4.3.	Alcools	110
II.2.4.4.	Acides organiques	110
II.3.	En industrie pharmacologique	111
II.3.1.	Synthèse de médicaments (exemple. le polysaccharide K, produit chimique dérivé de <i>Trametes versicolor</i> )	111
II.3.1.1.	Habitat et distribution	111
II.3.1.2.	Classification	111
II.3.1.3.	Propriétés de <i>Coriolus versicolor</i>	112
II.3.1.4.	Utilisations thérapeutiques	112
II.3.1.4.1.	Immuno-modulateur	112
II.3.1.4.2.	Neuropathie	113

II.3.1.4.3.	Action antivirale / Infection à papillomavirus	113
II.3.2.	Production de métabolites secondaires: Pénicilline, Céphalosporine, Griséofulvine et Ergot	114
II.3.2.1.	Antibiotiques	114
II.3.2.2.	Ergot	114
II.3.2.2.1.	Biosynthèse des alcaloïdes	115
II.3.2.2.2.	Utilisation	115
II.3.3.	Production de biomasse	116
II.3.3.1.	Biomasse	116
II.3.3.1.1.	Biomasse de levures	116
II.3.3.1.2.	Biomasse de champignons filamenteux (moisissures)	117
II.4.	En agriculture	117
II.4.1.	Lutte biologique (Exemple : <i>Beauveria bassiana</i> , contre le doryphore dans la culture des pommes de terre ou contre une chenille responsable de la pyrale du maïs	117
II.4.1.1.	Aspects taxonomiques du champignon <i>Beauveria bassiana</i>	118
II.4.1.2.	Morphologie	118
II.4.1.3.	Mode d'action	119
II.4.2.	Champignons mycorhiziens	122
II.4.2.1.	Généralités	122
II.4.2.2.	Types de mycorhizes	123
II.4.2.2.1.	Ectomycorhizes	123
II.4.2.2.2.	Endomycorhizes	124
II.4.2.2.3.	Ectendomycorhizes (mycorhizes ectendotrophes)	127
II.4.2.3.	Fonctions des mycorhizes	127
II.4.3.	Biofertilisants, biopesticides, hormones de croissance	129
II.4.3.1.	Définition d'un biofertilisant	130
II.4.3.2.	Intérêt des champignons endomycorhiziens à vésicules et arbuscules	131
II.5.	Environnement	131
II.5.1.	Champignons ligno-cellulolytiques	131
II.5.1.1.	Structure de la cellulose	132
II.5.1.1.1.	Etapas enzymatiques de la dégradation de la cellulose par les moisissures (champignons)	133
II.5.1.2.	Processus de dégradation de la lignine	134

II.5.2.	Biomining ou Biolixiviation	135
II.5.2.1.	Définition	135
II.5.2.2.	Procédés	136
II.5.2.2.1.	Mode statique	137
II.5.2.2.2.	Mode dynamique	137
II.5.2.3.	Application	137

### **Travaux Pratiques**

- Rappels microbiologiques : différentes techniques utilisées en bactériologie et mycologie (milieux de culture, la numération des bactéries, coloration et identification de souches bactériennes).
- Reconnaissance microscopique des principales caractéristiques morphologiques des champignons micromycètes (structure des mycètes).
- Galerie d'identification des bactéries
- Test d'activité antibactérienne sur boîte de Pétri utilisant une souche produisant des bactériocines et dirigés contre des champignons et des bactéries inductrices.
- Réalisation d'antibiogramme (méthode de diffusion et méthode de dilution), détermination de la CMI, détermination de la CMB.
- Mise au point de la production de quelques métabolites.

### **Travail personnel**

- Construction du protocole de manipulation autour de la problématique scientifique posée (milieux à préparer, solutions stock à prévoir pour les analyses, établissement d'un planning).
- Rédaction et présentation des rapports des travaux pratiques
- Exposés sur l'utilisation biotechnologique des toxines bactériennes et fongiques

**Liste des tableaux**

<b>Tableau I :</b>	Quelques types morphologiques fréquemment retrouvés chez les bactéries	2
<b>Tableau II :</b>	Eléments constants et inconstants de la structure bactérienne	4
<b>Tableau III:</b>	Illustration des étapes de la coloration de GRAM	6
<b>Tableau IV :</b>	Principaux constituants chimiques de la paroi des bactéries Gram positif et Gram négatif	13
<b>Tableau V :</b>	Différents accepteurs d'électrons utilisés lors de la respiration chez les bactéries	20
<b>Tableau VI :</b>	Exemple simplifié de taxonomie numérique	31
<b>Tableau VII :</b>	Importance thérapeutique de certains antibiotiques produits par le genre <i>Streptomyces</i>	65
<b>Tableau VIII :</b>	Mécanismes des interactions probiotiques / hôte.	70

**Liste des Figures**

<b>Figure 1.</b>	Structure d'une cellule bactérienne	4
<b>Figure 2.</b>	Représentation de la paroi des bactéries Gram-positives	8
<b>Figure 3.</b>	Représentation de la paroi des bactéries Gram-négatives	9
<b>Figure 4.</b>	Structure schématique du lipopolysaccharides	10
<b>Figure 5.</b>	Dessin schématique du peptidoglycane	12
<b>Figure 6.</b>	Composition des sous unités du peptidoglycane	12
<b>Figure 7.</b>	La structure de la membrane cytoplasmique bactérienne (modèle en mosaïque fluide)	15
<b>Figure 8.</b>	Représentation schématique simplifiée montrant la relation entre le catabolisme et l'anabolisme	16
<b>Figure 9.</b>	Respiration des fumarates	21
<b>Figure 10.</b>	Nitrification	25

<b>Figure 11.</b>	Dendrogramme, de quelques espèces du genre <i>Bacillus</i> et de genres apparentés	31
<b>Figure 12.</b>	Composition en base azotées selon Chargaff	33
<b>Figure 13.</b>	Technique d'hybridation	35
<b>Figure 14.</b>	Schéma montrant la technique d'hybridation	36
<b>Figure 15.</b>	Composition des ribosomes procaryotes vs ribosomes eucaryotes	38
<b>Figure 16.</b>	Schéma de l'arbre phylogénétique universel des organismes vivants, établis par l'analyse de L'ARNr16S et 18S	39
<b>Figure 17.</b>	Exemples de profils de restriction	40
<b>Figure 18.</b>	Mécanisme de réaction catalysé par le cholestérol oxydase.	49
<b>Figure 19.</b>	Promotion de la croissance des plantes par les PGPR	51
<b>Figure 20.</b>	Cycle de l'azote	61
<b>Figure 21.</b>	Répartition de la flore intestinale bactérienne le long de l'intestin	67
<b>Figure 22</b>	Facteurs influençant la stabilité du microbiote intestinal	68
<b>Figure 23.</b>	Organe producteur d'hormone de croissance	71
<b>Figure 24.</b>	Sites d'injection par l'hormone de croissance	72
<b>Figure 25.</b>	Production d'hormone de croissance par génie génétique	73
<b>Figure 26.</b>	Structure de l'insuline	74
<b>Figure 27.</b>	Production de l'insuline par génie génétique	75
<b>Figure 28.</b>	Action des adjuvants	79
<b>Figure 29a.</b>	Bactérie <i>Bacillus thuringiensis</i> subsp <i>kurstaki</i>	81
<b>Figure 29b.</b>	Cycle de vie de <i>Bacillus thuringiensis</i>	82
<b>Figure 30.</b>	Schéma décrivant le devenir des sporanges de <i>Bt</i> et des toxines Cry dans l'intestin après leur ingestion par les larves d'insectes cibles	83
<b>Figure 31.</b>	Représentation des principaux récepteurs membranaires	84

	des toxines Cry	
<b>Figure 32.</b>	Représentation schématique des principales voies de fermentation des hexoses chez les bactéries lactiques	90
<b>Figure 33.</b>	Principales étapes et enzymes participant dans la dégradation des protéines et dans le catabolisme des acides aminés	92
<b>Figure 34.</b>	Schéma récapitulatif du principe de bioaugmentation	95
<b>Figure 35.</b>	Système de biofiltration	96
<b>Figure 36.</b>	Schéma récapitulatif du principe de biostimulation	97
<b>Figure 37a.</b>	Représentation schématique des filaments mycéliens	100
<b>Figure 37b.</b>	Dessin d'un septum multiperforé	100
<b>Figure 38.</b>	Structure chimique de la paroi	102
<b>Figure 39.</b>	Schéma de la paroi et de la membrane d'une levure	103
<b>Figure 40.</b>	Quelques espèces de champignons comestibles	107
<b>Figure 41.</b>	Quelques espèces mortelles	107
<b>Figure 42.</b>	Champignon <i>Trametes versicolor</i>	112
<b>Figure 43.</b>	Différents sclérotés sur leur plante hôte	115
<b>Figure 44.</b>	Morphologie de <i>B. bassiana</i>	119
<b>Figure 45.</b>	Schéma du cycle biologique de <i>Beauveria bassiana</i>	121
<b>Figure 46.</b>	Production de mycélium de <i>Beauveria bassiana</i> sur le cadavre des principaux insectes ravageurs du fraisier	121
<b>Figure 47.</b>	Différents types d'associations mycorhiziennes	124
<b>Figure 48.</b>	Arbre phylogénétique des Glomeromycota basé sur l'analyse des séquences de la petite sous-unité ribosomale	125
<b>Figure 49.</b>	Endomycorhizes à vésicules et arbuscules	126
<b>Figure 50.</b>	Transport et métabolisme de l'azote et du phosphore dans un système (racine de carotte transformée – champignon MA)	129
<b>Figure 51.</b>	Symbiose mycorhizienne	130
<b>Figure 52.</b>	Représentation schématique d'une coupe transversale de parois végétales	132
<b>Figure 53a.</b>	Structure de la cellulose	132
<b>Figure 53b.</b>	Représentation schématique des composants de la paroi cellulaire végétale des biomasses lignocellulosiques	133



# Première Partie : Bactéries

## I. Généralités








Les bactéries sont des micro-organismes unicellulaires classées parmi les procaryotes, à paroi rigide faite d'un constituant spécifique : peptidoglycane ou muréine. Les cellules procaryotes, comprenant les bactéries et archéobactéries, sont délimitées uniquement d'une membrane cytoplasmique dans laquelle le chromosome, les ribosomes et les autres constituants baignent dans le cytoplasme. Les bactéries ont généralement un diamètre inférieur à 1  $\mu\text{m}$  (entre 0.2 $\mu\text{m}$ , ex : *Mycoplasma pneumoniae*, *chlamydia*, etc.) et 18 $\mu\text{m}$  (ex : *Thiovulum majus*). Cependant, certaines espèces peuvent dépasser largement cet intervalle, à l'instar des certaines cellules de *Spirochaeta* qui avoisinent les 250  $\mu\text{m}$  de long (Angert *et al.*, 1993).








## I.1. Morphologie et ultrastructure des bactéries

### I.1.1. Forme et associations cellulaires

Les formes, les plus retrouvées sont; les formes arrondies (sphériques) ou cocci (coques), les formes bacilles (bâtonnets allongés), les formes coccobacilles (formes intermédiaires entre coques et bacilles, ovoïdes), les formes incurvées (vibrions), les formes spiralées dont certaines sont rigides (spirilles) et d'autres sont flexibles (spirochètes), les formes filamenteuses (mycélium des actinomycètes), les formes pédonculées (allongement dans l'extrémité) et enfin des formes pléomorphes (changent de formes). Toutes ces formes peuvent être retrouvées seules, associées par deux (diplococoques, diplobacilles), en chaînette (streptocoques, streptobacilles), en amas (groupées), en tétrades (par quarte), amas en grappe de raisin, etc. Dans le tableau ci-dessous, les formes les plus retrouvées avec leurs caractéristiques, les groupements fréquents et les schémas correspondants de chaque forme sont rapportés (**Tableau I**).

Tableau I : Quelques types morphologiques fréquemment retrouvés chez les bactéries.

Formes	caractéristiques	Regroupement	Schéma	Exemple de genre bactérien
<b>Coques</b>	Forme sphérique généralement de 0.5 à 2 µm	Isolés		Genre <i>Micrococcus</i>
		Diplocoques		Genre <i>Enterococcus</i> Genre <i>Neisseria</i> ( <i>N. meningitidis</i> : méningite cérébrospinale)
		Chaînettes		Genre <i>Streptococcus</i> ( <i>S. pyogenes</i> : lésions cutanées, otites, conjonctivites ; <i>S. pneumoniae</i> : pneumonies, otites, sinusites) Genre <i>Enterococcus</i>
		Amas réguliers, grappe de raisin		Genre <i>Staphylococcus</i>
		Tétrades		Genre <i>Sarcina</i> (flore intestinale), Genre <i>Deinococcus</i> (non pathogène)
<b>Bacilles (Bâtonnets)</b>	Forme droite Jusqu'à 6 µm de long, 0.5 à 2µm de large. Extrémités plates, arrondies ou carrées	Souvent isolés mais retrouvés également en paires ou en chaînettes (streptobacilles).		Genre <i>Bacillus</i> (sol, eaux, plantes ; pathogènes = <i>anthracis</i> (charbon), <i>cereus</i> et <i>subtilis</i> (intox alim)) Genre <i>Lactobacillus</i> Genre <i>Pseudomonas</i> Genre <i>Chlostridium</i> Genre <i>Mycobacterium</i>
<b>Coccobacilles</b>	Forme intermédiaire entre les coques et les bacilles. Courts et larges, ressemblant à des coques	Isolés ou en paires		Genre <i>Brucella</i> Genre <i>Pasteurella</i> Genre <i>Acinetobacter</i> (infections nosocomiales), <i>Haemophilus influenza</i> (infections respiratoires, méningite de l'enfant, grippe espagnole)

<b>Incurvés</b>	Forme de virgule	Le plus souvent Isolés		Genre <i>Vibrio</i> ( <i>V. Cholerae</i> : choléra)
<b>Spirilles</b>	hélices rigides en spirale	Souvent en chaînettes		Genre <i>Spirulina</i> Genre <i>Rhodospirillum</i>
<b>Filamenteuses</b>	réseau de longs filaments (Mycélium)	Ramifié ou non ramifié (souvent en chaînettes)		Genre <i>Streptomyces</i> Genres <i>Actinomyces</i> (svt associé à des inflammations sans être patho)
<b>Pléomorphes</b>	Pédicule à grande capacité adhésive due aux polysaccharides	Isolés		Genre <i>Caulobacter</i>
<b>Bacilles corynéformes (Coryne=une massue)</b>	Extrémités renflées	isolés		<i>Corynebacterium diptheriae</i>
<b>Bacilles ramifiés</b>		isolés		Genre <i>Bifidobacterium</i> (flore intestinale : probiotique = protège contre bact patho)
<b>Bacilles fusiformes (fusus=fuseau)</b>	Extrémités fuselées	isolés		Genre <i>Fusobacterium</i> (infections bronchopulmonaires)

### I.1.2. Structure cellulaire

Une cellule bactérienne est composée d'éléments constants qu'on retrouve chez la quasi-majorité des bactéries. Ces éléments en nombre de cinq (5), sont de l'intérieure à l'extérieure ; un chromosome circulaire et des ribosomes qui baignent dans le cytoplasme, l'ensemble est entouré par une membrane cytoplasmique, elle-même, entourée par une paroi bactérienne. Cependant, d'autres éléments de structure peuvent être retrouvés chez certaines bactéries mais pas chez d'autres, appelés "éléments inconstants". Parmi ces structures, on cite; la capsule qui entoure la paroi bactérienne, les plasmides, les pilis sexuel, les fimbriae, les flagelles, les spores et les corps d'inclusions (Figure 1).

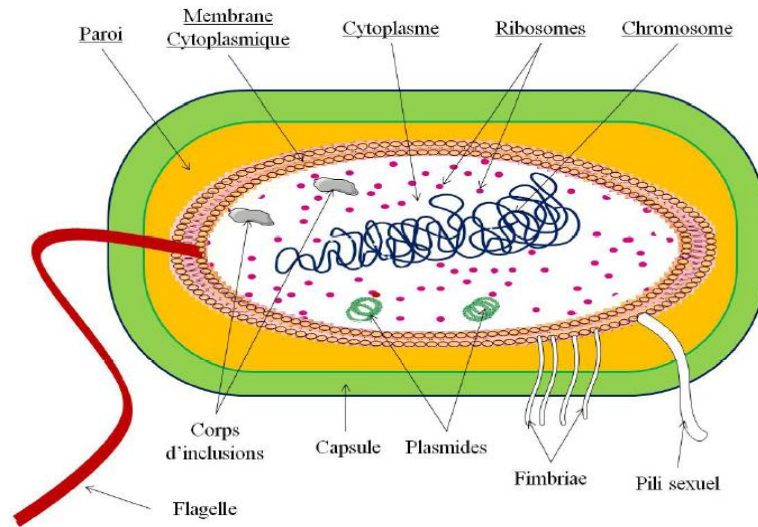


Figure 1. Structure d'une cellule bactérienne

**I.1.3. Eléments constants et inconstants de la structure bactérienne**

Certaines structures sont présentes chez toutes les bactéries, ce sont les éléments « constants » ; d'autres sont retrouvés seulement chez certaines bactéries : ce sont les éléments « inconstants » ou « facultatifs » (Tableau II)

**Tableau II** : Eléments constants et inconstants de la structure bactérienne

Eléments constants	Elément facultatifs
Paroi - Membrane plasmique - Périplasma (espace périplasmique)- Cytoplasme – Chromosome- Ribosomes - Polysomes	Capsule - Pili ou Fimbriae – Flagelle- Mesosome - Plasmide Vacuole à gaz (bactéries aquatiques)– Inclusions de réserve -La spore- Chromatophore (bactéries photosynthétiques)

**I.1.4. Paroi**

Enveloppe rigide assurant l'intégrité de la bactérie. Elle est responsable de la forme des cellules. Elle protège des variations de pression osmotique. Elle est absente chez les Mollicutes, (*Mycoplasma*).

#### I.1.4.1. Coloration de Gram




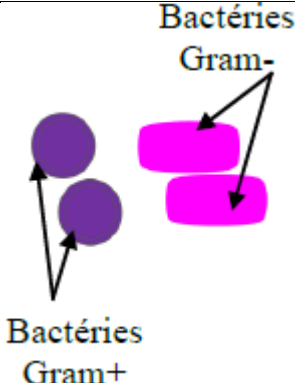
En 1884, le bactériologiste danois Hans Christian Gram a mis au point le protocole de la coloration de Gram. C'est une coloration différentielle qui permet de mettre en évidence les propriétés de la paroi bactérienne.

La coloration de GRAM est la base de la taxonomie bactérienne (Bergey & Holt, 2000); elle a permis de diviser les bactéries en deux groupes distincts à savoir; les bactéries à Gram positif, caractérisées par une paroi très riche en peptidoglycane (couche épaisse) et en acide teichoïques et lipoteichoïques (ce qui empêche la pénétration des solvants organiques tel que l'alcool et l'acétone), et les bactéries à Gram négatif, caractérisées par une paroi très riche en lipides et lipopolysaccharides grâce à la présence d'une membrane externe. Cependant, la couche du peptidoglycane est beaucoup moins importante par rapport aux bactéries Gram positives. Ce qui permet la pénétration des solvants organiques.

La méthodologie de la coloration de GRAM qui est rapide et précise, consiste en l'application, sur un frottis fixé, de deux colorants basiques séparés par une étape de décoloration. Tout d'abord, recouvrir un frottis fixé avec le violet de gentiane ou avec le crystal violet. Puis, le lugol sera appliqué afin de fixer la première coloration. Ensuite, l'étape la plus importante qui distingue les deux types de parois (Gram+ et Gram-) est la décoloration à l'éthanol ou l'acétone (ou le mélange éthanol/acétone). Enfin, une contre coloration avec de la fuschine qui va colorer uniquement les bactéries décolorées avec de l'éthanol (Bactéries Gram-) qui vont apparaître en rose. En effet, les bactéries non décolorées par l'éthanol (bactéries à Gram+) gardent toujours leur première coloration et paraissent alors en violet (Tableau III).

Il est à noter qu'un rinçage à l'eau est nécessaire après chaque étape pour enlever l'excès de colorant et une décoloration massive (long) peut entraîner la décoloration de certaines bactéries à Gram+.

**Tableau III:** Illustration des étapes de la coloration de GRAM.

Etape	Observation	Résultats	Interprétation
Recouvrir le frottis préalablement fixé avec le <b>violet de gentiane</b> et laisser agir 1mn puis rincer à l'eau		Toutes les bactéries sont colorées en violet	violet de gentiane est un colorant basique qui colore toutes les structures chargées négativement
Appliquer le <b>lugol</b> et laisser agir 1mn puis rincer à l'eau		Toutes les bactéries restent colorées en violet	Le lugol est un fixateur et mordant de la première coloration.
Décoloration à l' <b>éthanol</b> pendant 20s puis rincer à l'eau		Les bactéries à Gram positif restent colorées en violet mais les bactéries à Gram négatif sont décolorées	A l'inverse des bactéries Gram-, La paroi des bactéries Gram+ sont imperméables aux solvants organiques
Contre coloration avec de la <b>fuchsine</b> puis rincer à l'eau		Les bactéries à Gram positif sont colorées en violet et les bactéries à Gram négatif sont colorées en rose	Les bactéries à Gram- prennent la coloration de la fuchsine (vu qu'elles étaient incolores), alors que les bactéries à Gram+ gardent toujours la première coloration

- **Cas de parois particulières**

Les parois bactériennes ne sont pas toutes identiques à celles des bactéries Gram+ et des Gram- conventionnelles. Car certaines bactéries présentes des parois particulières voire même absentes. Chez les *Mycoplasmes*, la paroi bactérienne est absente. De ce fait, ils sont insensibles aux antibiotiques ciblant la paroi bactérienne. Vu l'absence de paroi, les mycoplasmes ont tendance à être pléomorphes.

Le genre *Chlamydia* par exemple, qui fait partie des bactéries à Gram-, le peptidoglycane est inexistant. Ce sont des parasites intracellulaires obligatoires. Chez

l'homme, *Chlamydia trachomatis* est responsable de l'urétrite (maladie sexuelle transmissible) et de la cécité évitable (trachome) (Prescott *et al.*, 2013).

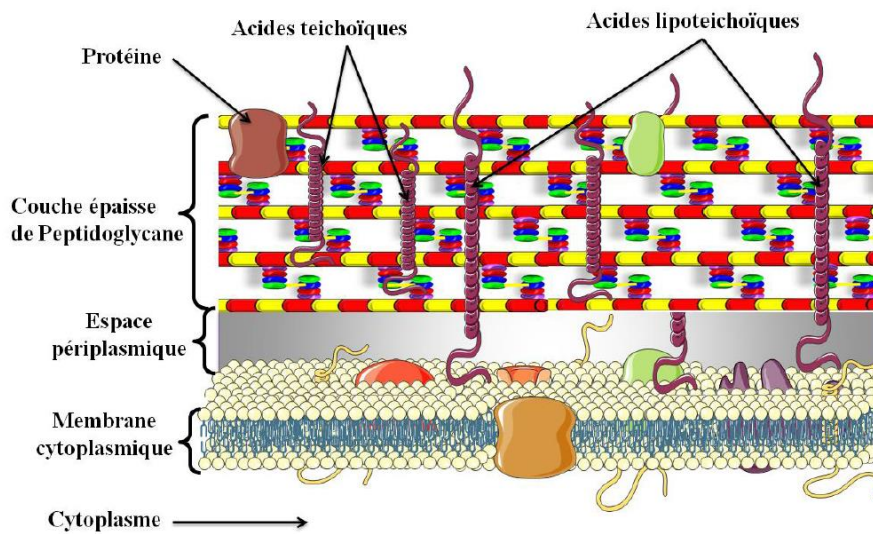
Le genre *Mycobacterium* dont l'espèce *Mycobacterium tuberculosis* fait partie de ce groupe de bactérie Gram+, cependant en plus de peptidoglycane, leur paroi est très riche en acides mycoliques (lipide de la classe des cirides) qui résulte d'une estérification entre un acide gras long avec un alcool long). Ces bactéries sont dites "acido-alcool-résistantes" et elles sont mises en évidence par la coloration de Zielh Nielsen.

Parmi les parois anormales des bactéries; les protoplastes et les sphéropastes. Ces deux appellations désignent respectivement des bactéries à Gram + et à Gram - ayant un peptidoglycane dégradé par un agent comme le lysozyme. Les archéobactéries représentent un domaine à part très différent de celui des bactéries. Ces Archaea ne présentent pas de peptidoglycane habituel, mais certaines possèdent une pseudomureine composée de N-acétyl-alosaminuronique à la place de l'acide N-acétylmuramique (NAM).

#### **I.1.4.2. Paroi des Gram positives**

La paroi des bactéries à Gram positif est homogène et épaisse, constituée principalement de peptidoglycane (jusqu'à 80nm). De plus, elles contiennent généralement une grande quantité de polymères secondaires dont les acides téichoïques et les acides lipotéichoïques, et peuvent contenir également des protéines pariétales (ex: adhésines, couche S, etc.) (Figure 2). L'espace périplasmique, situé entre la membrane cytoplasmique et la paroi, est petit par rapport à celui des bactéries Gram-négatives et peu de protéines sont retrouvées fixées au côté extérieur de la membrane cytoplasmique. Il est admis que la plupart des protéines secrétées par les cellules traversent habituellement le peptidoglycane. Ces dernières sont considérées comme des exoenzymes, car elles servent souvent à dégrader les substrats nutritifs trop grands pour être transportés à travers la membrane cytoplasmique.

D'autres polysides (polyside C chez les streptocoques) ou des protéines de surface, peuvent être associés à la paroi, jouant un rôle important dans le pouvoir pathogène de certaines espèces: Protéines A de *Staphylococcus aureus* et Protéines T et M de *Streptococcus pyogenes*.



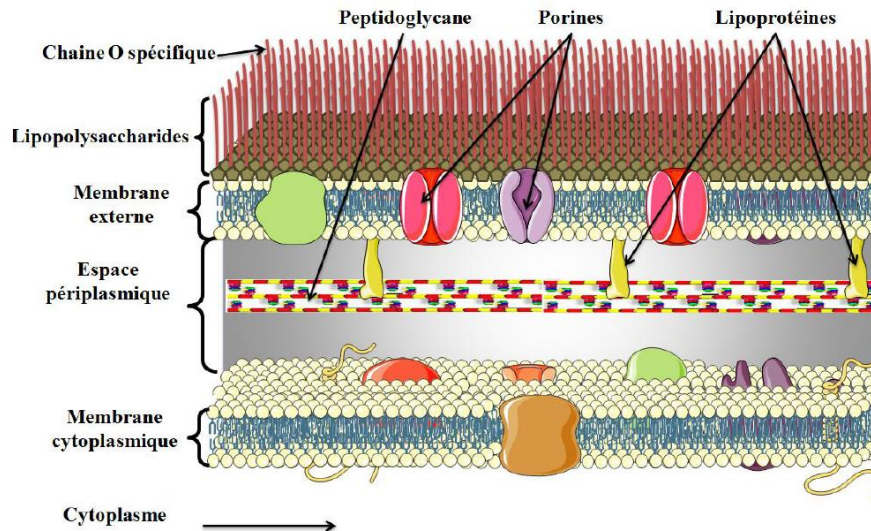
**Figure 2.** Représentation de la paroi des bactéries Gram-positives

### I.1.4.3. Paroi des Gram négatives

La paroi des bactéries Gram négatives est plus complexe que celles des bactéries Gram-positives (Figure 3). Elle est composée d'une mince couche de peptidoglycane qui ne représente pas plus de 10% du poids total de la paroi avec une épaisseur d'environ 2 nm chez certaine espèce comme *Escherichia coli* (Prescott *et al.*, 2013).

La particularité de la paroi des bactéries Gram-négatives est qu'elle est entourée par une membrane externe en plus de sa membrane cytoplasmique. Entre les deux membranes s'intercale le peptidoglycane qui est, lui-même, attaché à la membrane externe grâce aux lipoprotéines (lipoprotéines de Braun).

L'espace périplasmique est différent de celui des bactéries à Gram+, il couvre tout l'espace entre les deux membranes et peut atteindre 71 nm voire 20 à 40% du volume cellulaire total (Prescott *et al.*, 2013). Cet espace contient des enzymes qui participent à la nutrition (hydrolases) et des protéines qui sont impliquées dans le transport de molécules à l'intérieur de la cellule et divers autres enzymes parmi lesquelles figurent parfois les  $\beta$ -lactamases, enzyme pouvant dégrader des antibiotiques appartenant à la famille des  $\beta$ -lactamines



**Figure 3.** Représentation de la paroi des bactéries Gram-négatives.

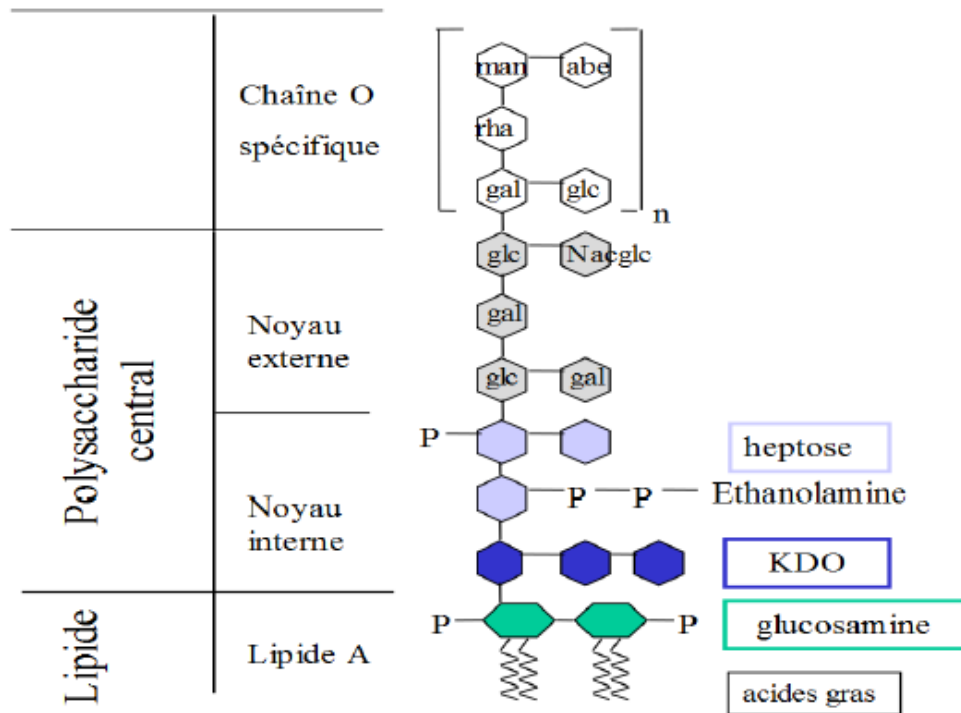
La membrane externe est constituée d'une bicouche de phospholipides, de lipopolysaccharides (LPS) et de protéines (OMP : *outer membrane protein*) permettant le passage de petites molécules, les porines. Seule la partie inférieure est phospholipidique. La partie supérieure est constituée de LPS (lipopolysaccharide) (Figure 4). Celui-ci comprend :

- une partie lipidique, un glycolipide (lipide A) qui comporte une activité toxique, enchâssé dans le feuillet externe de la membrane externe.
- liée à une fraction polysaccharidique comprend une partie qui reste constante dans l'espèce (le noyau saccharidique) (le « core »), constitué de 10 sucres.
- et une partie plus superficielle qui porte la chaîne latérale O, est une courte chaîne de polysaccharides particuliers dont la composition varie selon les espèces (spécifique) (unités osidiques répétée (chaînes de 3 à 6 sucres)) tournées vers l'extérieur et déterminant la spécificité antigénique (appelées « l'antigène O » car très antigénique).

La nature des sucres et leur mode de liaison peuvent varier dans la même espèce, ce qui entraîne des variations dans leur spécificité antigénique. Les mutants qui perdent la capacité de synthétiser l'antigène O sont appelés R (Rough) en raison de l'aspect rugueux des colonies auxquelles ils donnent naissance.

A cause du pouvoir toxique du lipide A, le LPS est appelée une « endotoxine ».

La perméabilité de la membrane externe est plus importante par rapport à celle de la membrane cytoplasmique et ce malgré le rôle des LPS dans l'imperméabilité de certaines molécules. Ceci est dû à la présence de protéines spéciales de forme d'un tube « canaux » appelées "porines". Ces porines de caractère aqueux laissent rentrer des petites molécules inférieures à 600 daltons. Cependant, les plus grosses molécules traversent la membrane externe par les transporteurs spécifiques (ex : vitamine B12).



**Figure 4.** Structure schématique du lipopolysaccharides (Julio, 2015).

Le LPS joue plusieurs fonctions, telle que l'attachement sur les surfaces, bloque l'entrée de substances toxiques. Il agit comme une endotoxine (lipide A) qui cause les symptômes des maladies induites par des Gram négatives. On note également la présence de protéines: dont certaines forment des canaux traversant le feuillet de phospholipides: ce sont les porines, ce sont des protéines spéciales majeures représentant 70 % de protéines membranaires, groupées pour former des pores au niveau de cette membrane externe. En effet, trois molécules de porines s'assemblent et traversent la membrane externe et forment des canaux étroits permettant la diffusion passive des petites molécules hydrophiles dans l'espace périplasmique. Seules structures de transport des composés hydrophiles, essentielles à la vie de la bactérie

comme les monosaccharides, mais aussi à l'action de certains antibiotiques. D'autres protéines servent à la captation d'ions (fer), ou de vitamines (facteurs de croissance).

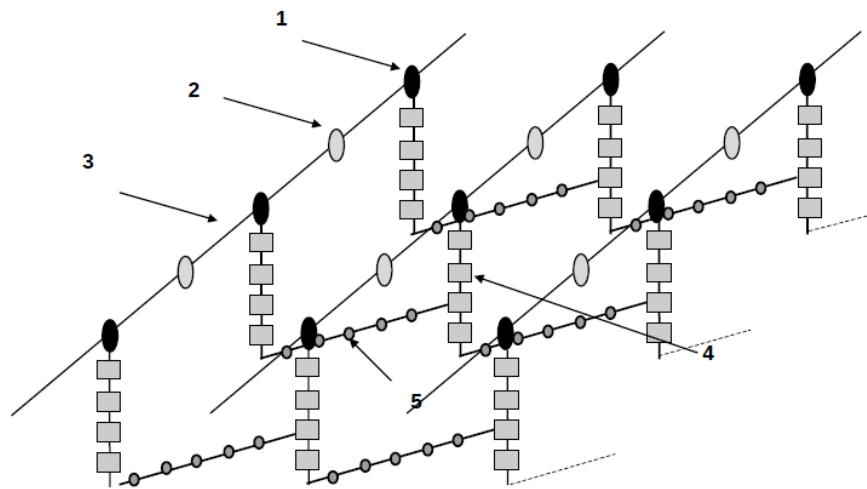
Le LPS exerce plusieurs fonctions, telles que l'attachement aux surfaces et le blocage de l'entrée de substances toxiques. Il agit comme une endotoxine (lipide A) qui induit les symptômes des maladies causées par les bactéries Gram-négatives. On remarque également la présence de protéines, dont certaines forment des canaux traversant la couche de phospholipides - ce sont les porines. Elles représentent 70 % des protéines membranaires et s'agglomèrent pour former des pores au niveau de cette membrane externe. En effet, trois molécules de porines s'associent pour traverser la membrane externe et créer des canaux étroits, permettant la diffusion passive de petites molécules hydrophiles dans l'espace périplasmique. Ces structures de transport sont essentielles à la vie bactérienne pour les composés hydrophiles tels que les monosaccharides, mais elles interviennent également dans l'action de certains antibiotiques. D'autres protéines remplissent des fonctions telles que la capture d'ions (fer) ou de vitamines (facteurs de croissance).

- **Peptidoglycane**

Le constituant commun à toutes les parois des eubactéries est le peptidoglycane. C'est une macromolécule faite de chaînes polysaccharidiques, reliées entre elle par de courts peptides, (Figure 5,6)

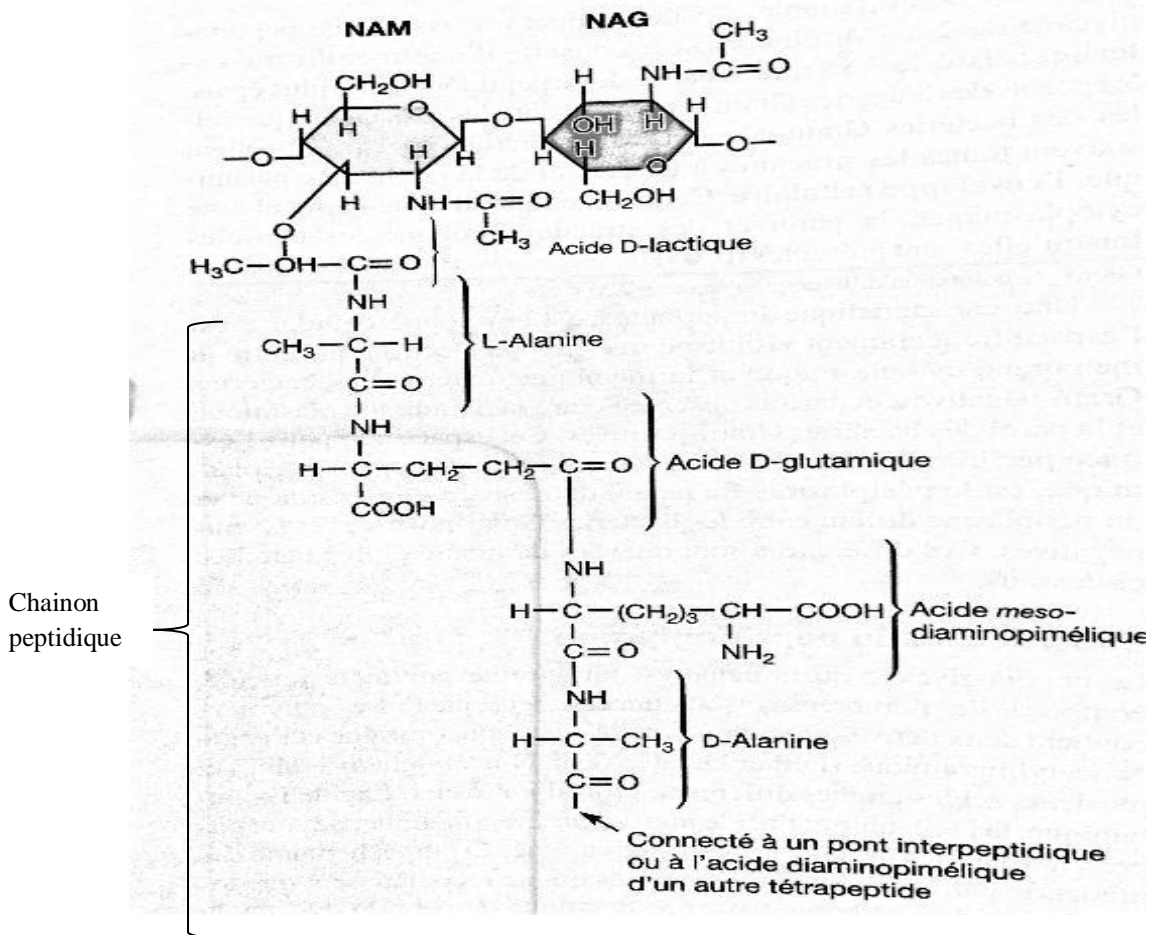
➤ Les chaînes polysaccharidiques sont faites de l'alternance d'un polymère de N-acétyl glucosamine (NAG) et d'acide N-acétyl muramique (ANAM). Sur les résidus d'acide N-acétyl muramique (ANAM) sont fixés les térapeptides faits de l'alternance d'acides aminés de la série D et de la série L. Les térapeptides sont reliés entre eux soit par une liaison directe, soit par des acides aminés supplémentaires constituant le pont interpeptidique.

➤ Chez les bactéries à Gram-, la séquence habituelle est : L-alanine-acide D-Glutamique- acide diaminopimélique-D-alanine. Quelques variations dans cette séquence se rencontrent chez les bactéries à Gam+ (L-lysine remplace souvent l'acide diaminopimélique).



- 1: ANAM      2: NAG      3: liaison glucosidique  $\beta$  1-4      4: tétrapeptide  
 5: pont interpeptidique

**Figure 5.** Dessin schématique du peptidoglycane



**Figure 6.** Composition des sous unités du peptidoglycane (Roujeinikova, 2008).

#### I.1.4.4. Structure chimique

Les principaux constituants chimiques présents dans la paroi des bactéries Gram positif et Gram négatif sont illustrés dans le tableau ci-dessous:

**Tableau IV.** Principaux constituants chimiques de la paroi des bactéries Gram positif et Gram négatif.

Paroi des Gram positive	Paroi des Gram négative
Osamines : N-acétyl glucosamine (NAG) et Acide N-acétyl muramique (ANAM)	
Acides teïchoïques et lipoteïchoïques (polymères de polyribitol phosphate ou polyglycérol phosphate)	Pas d'acides teïchoïques ni lipoteïchoïques
4 Acides aminés majeurs : Ala (D et L) D-Glu, L-Lys, acide diaminopomélique (DAP)	Mêmes acides aminés (moins de DAP et de L-Lys)
Très peu de lipides (1 à 2 %)	Lipides en grande quantité (10 à 20 % dans la membrane externe)

#### I.1.4.5. Fonctions de la paroi

La paroi assure plusieurs fonctions vis-à-vis de la cellule bactérienne, elle permet de :

- Assurer le maintien de la forme de la bactérie
- Assurer une protection contre la pression osmotique intracellulaire (car forte concentration en métabolites à l'intérieur de la cellule, l'eau rentre).
- Propriétés antigéniques : Un protoplaste ne possède plus les propriétés antigéniques de la bactérie d'origine. En effet, les antigènes pariétaux (de la paroi) :  
 Chez les Gram(+) : peptidoglycane + acides teïchoïques et lipoteïchoïques + polyside C (Streptocoques).  
 Chez les Gram (-) : les antigènes O du LPS.
- Permettre la fixation des bactériophages. Ils reconnaissent des récepteurs localisés sur le peptidoglycane des Gram(+) ou la membrane externe des Gram(-). Cette propriété est utilisée pour l'identification de certaines bactéries : c'est la lysotypie.

-Participer à la mobilité : En effet, les flagelles sont implantés dans la membrane cytoplasmique mais ne peuvent pas fonctionner en absence de peptidoglycane (d'où immobilité des protoplastes).

-Toxicité : Chez les Gram(-), le LPS est une endotoxine (effet toxique porté par le lipide A) qui peut donner fièvres et lésions.

-Perméabilité : La paroi laisse passer de petites molécules comme l'eau, les sels minéraux ou des métabolites simples. Par contre elle est plus ou moins perméable à certains solvants (exemple l'alcool. cf. coloration de Gram).

-Espace périplasmique : Contient des enzymes qui participent à la nutrition (hydrolases) et des protéines qui sont impliquées dans le transport de molécules à l'intérieur de la cellule.

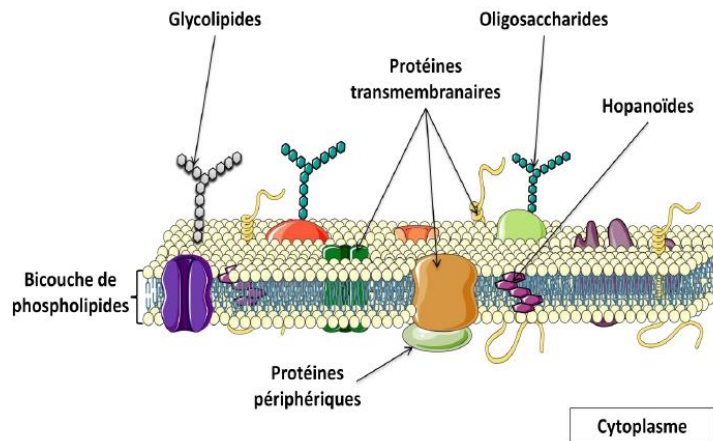
Les Gram (+) excrètent plutôt les enzymes hors de la cellule. Ce sont alors des « exo enzymes ». Celles des Gram (-) sont retenues entre les membranes Interne et Externe.

### **I.1.5. Membrane plasmique**

La membrane plasmique (ou cytoplasmique) est un élément de structure fluide qui entoure le cytoplasme et se situe sous la paroi bactérienne. Généralement, c'est une couche fine de 7.5 à 8 nm d'épaisseur, organisée, asymétrique, flexible et dynamique. Plusieurs antibiotiques ciblent la membrane cytoplasmique de bactéries telles que les polymyxines et polypeptides antimicrobiens.

#### **I.1.5.1. Structure et composition chimique**

Au microscope électronique, les membranes cytoplasmiques des bactéries apparaissent en triple feuillet; deux feuillets denses limitant une couche claire. De point de vue moléculaire, la membrane cytoplasmique bactérienne (Figure 7) est principalement constituée de lipides (de 30 à 40%) et de protéines (de 60 à 70%). Les glucides sont quantitativement des constituants mineurs et souvent associés aux lipides (glycolipides) ou aux protéines (glycoprotéines).



**Figure 7.** La structure de la membrane cytoplasmique bactérienne (modèle en mosaïque fluide).

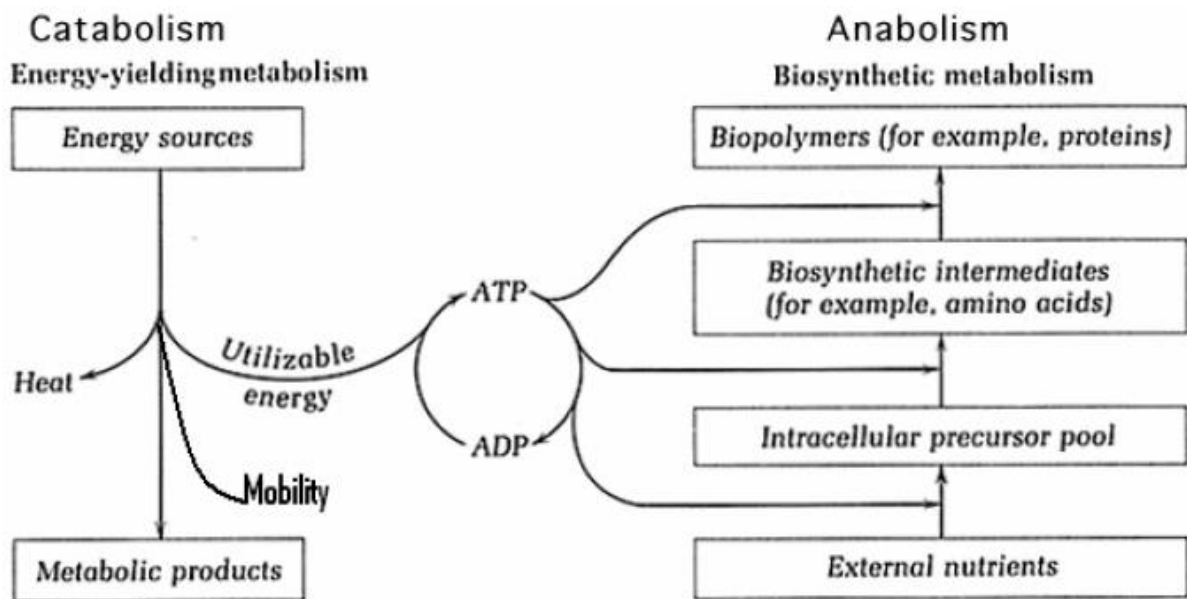
## I.2. Métabolisme bactérien

Pour assurer sa croissance ou sa survie, une bactérie doit trouver dans son environnement de quoi satisfaire ses besoins nutritifs: sources d'énergie, de carbone, d'azote, etc. Ces éléments doivent être apportés dans un milieu où règnent des conditions physicochimiques favorables (température, pH, pression osmotique, etc.).

Le métabolisme bactérien est l'ensemble des processus biochimiques qui se produisent à l'intérieur d'une bactérie pour maintenir la vie et la croissance. Les bactéries ont une grande variété de métabolismes, ce qui leur permet de s'adapter à une grande diversité d'environnements (Figure 8).

Les réactions métaboliques peuvent être classées en deux catégories:

- celles qui produisent de l'énergie: **catabolisme ou dégradation.**
- celles qui consomment de l'énergie: **anabolisme ou biosynthèse.**



**Figure 8.** Représentation schématique simplifiée montrant la relation entre le catabolisme et l'anabolisme.

## I.2.1. Métabolisme énergétique et types respiratoires

### I.2.1.1. Métabolisme énergétique

Une bactérie, pour qu'elle puisse synthétiser ses constituants et se déplacer, doit dépenser de l'énergie. Cette énergie est procurée soit par photosynthèse (cas des bactéries photosynthétiques utilisant l'énergie solaire), soit par transformation de produits chimiques présents dans leur environnement par des réactions biochimiques d'oxydoréduction (bactéries chimiotrophes). On distingue alors deux types trophiques:

- énergie lumineuse  $\longrightarrow$  **phototrophie.**
- énergie chimique  $\longrightarrow$  **chimiotrophie.**

Cette énergie est stockée dans des liaisons chimiques comme l'ATP (Adénosine triphosphate)

#### Energie



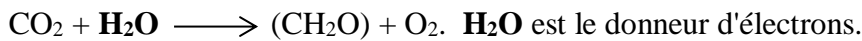
La bactérie, quand elle a besoin d'énergie, utilise l'ATP  $\rightarrow$  ADP + Pi (PO<sub>4</sub><sup>3-</sup>) + Energie

### I.2.1.1.1. Métabolisme énergétique chez les phototrophes

Les êtres-vivants phototrophes (végétaux et quelques types de bactéries) sont capables d'utiliser la lumière comme source d'énergie, afin de réduire le dioxyde de carbone (ou les ions  $\text{HCO}_3^-$ ) en molécules carbonées. Ce processus, appelé photosynthèse, requiert la présence de pigments (chlorophylles et bactériochlorophylles), qui après excitation par un rayonnement lumineux (photons), sont capables de convertir la lumière absorbée en énergie chimique (production d'ATP par photophosphorylation).

- **Chez les plantes**, la photosynthèse peut se résumer ainsi :

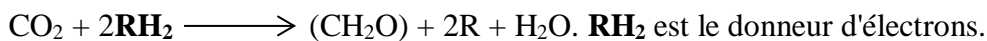
**Lumière**



La photosynthèse a lieu au niveau des chloroplastes grâce aux pigments chlorophylliens.

- **Chez les bactéries photosynthétiques**, il n'existe pas de chloroplastes; la bactériochlorophylle est dispersée dans le cytoplasme sous forme de chromatophores. On peut résumer leur photosynthèse comme suit:

**Lumière**



Chez les bactéries, le donneur d'électrons n'est jamais  $\text{H}_2\text{O}$  ; sa nature chimique permet de distinguer deux types trophiques. Il peut être:

- minéral → **Photolithotrophie**
- organique → **Photoorganotrophie**

Pendant la photosynthèse, deux types de réactions ont lieu:

- l'énergie lumineuse est absorbée par les pigments chlorophylliens, puis transformée en énergie de liaison (ATP) grâce à un système de transfert des électrons (light reaction).
- réactions de biosynthèse (dark reaction) pendant lesquelles l'énergie stockée sous forme d'ATP est utilisée pour les biosynthèses bactériennes effectuées à partir du  $\text{CO}_2$  (ou de composés organiques).

#### a- **Photolithotrophes**

Elles sont anaérobies strictes et utilisent les sulfures ou  $\text{H}_2$  comme donneurs d'électrons. L'oxydation des sulfures produit des grains de soufre qu'on trouve dans le cytoplasme bactérien. On rencontre deux familles:

- *Chlorobacteriaceae* (bactéries vertes sulfureuses)
- *Thiorodaceae* (bactéries pourpres sulfureuses).

#### **b- Photoorganotrophes**

- *Athiorodaceae* (bactéries pourpres non sulfureuses).

Elles utilisent, comme leur nom l'indique, des substrats organiques comme donneurs d'électrons. Dans la plupart des cas, la photosynthèse n'est pas obligatoire; à l'obscurité, les bactéries deviennent chimioorganotrophes.

#### **I.2.1.1.2. Métabolisme énergétique chez les chimiotrophes**

La majorité des bactéries rencontrées dans la nature sont dépourvues de pigments chlorophylliens et sont par conséquent incapables de faire la photosynthèse. Elles doivent donc se procurer de l'énergie à partir de réactions chimiques d'oxydoréduction.

Les chimiotrophes tirent leur énergie de l'oxydation de produits chimiques. Ceux qui utilisent des composés organiques sont appelées les **chimioorganotrophes**, et ceux qui utilisent des composés inorganiques sont appelées **chimiolithotrophes**.

En fonction de la nature du donneur, on définit donc deux types trophiques:

- donneur minéral → **chimiolithotrophie**
- donneur organique → **chimioorganotrophie**

#### **a- Types respiratoires des chimioorganotrophes**

Les microorganismes chimioorganotrophes utilisent des substrats carbonés à la fois comme source de carbone et source d'énergie. Ces substrats, de nature variable (glucides, acides aminés, acides gras...), sont oxydés (généralement par déshydrogénation) et les électrons libérés sont pris en charge par des accepteurs organiques ou inorganiques.

L'énergie produite au cours de ces réactions n'est pas libérée globalement, mais par petites étapes successives permettant la production d'ATP. Le devenir des électrons permet de distinguer deux voies métaboliques majeures :

- la **respiration**, lorsque les électrons sont pris en charge par une chaîne de transporteurs localisés dans une membrane, l'ATP est alors majoritairement synthétisé par phosphorylation oxydative, grâce à l'énergie provenant du gradient de protons;

- la **fermentation**, si une molécule organique est utilisée comme accepteur d'électrons et de protons, l'ATP est synthétisé dans ce cas uniquement par phosphorylation au niveau du substrat (La production de l'énergie peut se faire donc soit par **fermentation** et / ou par la **respiration**)

- **Respiration**

La respiration est l'ensemble des réactions biochimiques d'oxydation procurant à l'organisme l'énergie nécessaire à ses biosynthèses essentiellement grâce à des phosphorylations oxydatives membranaires (chaîne de transfert des électrons). Le substrat est métabolisé complètement avec intervention d'agent oxydant exogène.

On distingue deux types de réactions en fonction de la nature chimique de l'accepteur final (Tableau V). Lorsque l'accepteur final d'électron est l'oxygène moléculaire on parle de **respiration aérobie**, lorsque il s'agit d'une substance minérale (ex : nitrate, sulfates, carbonate, gaz carbonique, etc.) ou organique (ex : fumarate, acétate, formiate, etc.) on parle de **respiration anaérobie**.

- accepteur =  $O_2$  → **respiration aérobie**

- accepteur  $\neq O_2$  → **respiration anaérobie**

**Tableau V.** Différents accepteurs d'électrons utilisés lors de la respiration chez les bactéries

Accepteur d'électrons	Produit final réduit	Nom du processus	Exemples de Microorganismes
O <sub>2</sub>	H <sub>2</sub> O	Respiration aérobie	<i>Escherichia coli</i> , <i>Streptomyces</i>
NO <sub>3</sub> <sup>-</sup>	NO <sub>2</sub> , NH <sub>3</sub> ou N <sub>2</sub>	Respiration anaérobie (dénitrification)	<i>Bacillus</i> , <i>Pseudomonas</i>
SO <sub>4</sub>	S ou H <sub>2</sub> S	Respiration anaérobie (réduction des sulfates)	<i>Desulfovibrio</i>
fumarate	Succinate	Respiration anaérobie utilisant un accepteur d'e <sup>-</sup> organique	<i>Escherichia coli</i>
CO <sub>2</sub>	CH <sub>4</sub>	Méthanogenèse	<i>Methanococcus</i>

➤ **Respiration aérobie**

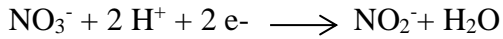
Les bactéries aérobies strictes et la majorité des bactéries aéroanaérobies possèdent une chaîne respiratoire dont l'accepteur final des électrons est le dioxygène (O<sub>2</sub>). Cette chaîne respiratoire est composée de transporteurs (FAD, protéine Fe/S, ubiquinone, cytochromes, etc.) qui transfèrent les électrons du NADH (donneur) vers le dioxygène (accepteur). Ces transporteurs sont localisés dans la membrane interne des mitochondries chez les Eucaryotes, dans la membrane plasmique chez les bactéries. Les chaînes respiratoires bactériennes sont généralement différentes de celle des mitochondries, notamment en ce qui concerne la nature des cytochromes (a, b, c). Chez *Escherichia coli*, la composition de la chaîne varie même en fonction du niveau de dioxygène.

➤ **Respirations anaérobies**

Chez de nombreuses bactéries aérobies, le dioxygène peut être remplacé en tant qu'accepteur final d'électrons par une autre molécule minérale (NO<sub>3</sub><sup>-</sup>, SO<sub>4</sub><sup>2-</sup>, etc.) ou par un composé organique (fumarate).

### 1- Respiration nitrique

Dans le cas de la respiration des nitrates, les électrons sont transférés du NADH vers le  $\text{NO}_3^-$  par une chaîne respiratoire dont la dernière enzyme est la nitrate réductase A, qui catalyse la réduction des nitrates en nitrites :



Les nitrites peuvent s'accumuler dans le cytoplasme, ou être à leur tour dégradés sans production d'énergie supplémentaire jusqu'au stade  $\text{N}_2$ . Dans ce cas la nitrate réductase A est dite **dissimilatrice**, car elle intervient dans le processus de **dénitrification**.



La **réduction désassimilatrice** du nitrate en ammoniac ( $\text{NH}_3$ ) est un processus respiratoire réalisé par certaines bactéries (G : *Enterobater*, *Vibrio*).

### 2- Respiration sulfurique (Bactéries réductrices de sulfates)

Le sulfate ou le soufre sont des accepteurs finaux d'électrons, ils sont réduits en sulfure  $\text{H}_2\text{S}$  (sulfure d'hydrogène) (ex : *Desulfovibrio* réducteur de sulfates  $\text{H}_2\text{SO}_4$  et *Desulfuromonas* réducteur de soufre  $\text{SO}_2$ ).

### 3- Respiration fumarique

Dans le cas de la respiration fumarate, bien que l'accepteur final d'électrons soit un composé organique (le fumarate  $\text{C}_4\text{H}_4\text{O}_4$  qui est réduit en succinate ( $\text{C}_4\text{H}_6\text{O}_4$ ) (ex : *Escherichia coli*), il existe tout de même une chaîne de transport électronique membranaire permettant la synthèse d'ATP. C'est la fumarate réductase qui permet la réduction du fumarate en succinate (Figure 9).

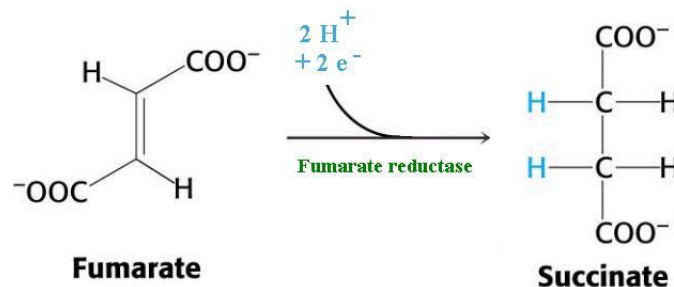


Figure 9. Respiration des fumarates

- **Fermentation**

La fermentation est l'ensemble des réactions biochimiques d'oxydation qui fournissent à l'organisme de l'énergie grâce à des phosphorylations au niveau du substrat non couplées aux processus membranaires, mais ayant lieu uniquement dans le cytoplasme. La production d'énergie, par fermentation, est impossible chez les bactéries aérobies strictes. En aérobiose, seules les bactéries anaérobies facultatives aérotolesérantes peuvent produire de l'énergie par fermentation; chez les bactéries anaérobies strictes et aéroanaérobies facultatives les voies fermentatives sont réprimées en aérobiose (effet inhibiteur de l'oxygène).

Les bactéries anaérobies strictes (*Clostridium*) ou anaérobies préférentielles (Streptocoques) pratiquent exclusivement la fermentation, tandis que les bactéries aérobies facultatives (Entérobactéries) respirent et/ou fermentent en fonction des conditions environnementales. Le rendement énergétique des fermentations est inférieur à ceux des respirations (respiration aérobie > respirations anaérobies > fermentations).

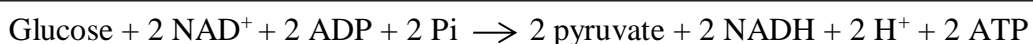
La fermentation est définie comme un processus d'oxydo-réduction, les accepteurs finaux d'électrons sont des **composés organiques** et non pas des molécules d'O<sub>2</sub>

- **Fermentation du Glucose**

La première étape comporte les différentes voies du métabolisme intermédiaire qui aboutissent au Pyruvate. Puis viennent les réactions de réduction du Pyruvate qui différencient les bactéries fermentaires car elles conduisent à des produits finals divers, soit uniques, soit plus souvent mélangées (acide lactique, acétate, éthanol, etc.).

- a- **La glycolyse de Glucose (voie d'Embden – Meyerhoff)**

La glycolyse est une suite de réactions permettant la transformation du glucose en deux molécules de pyruvate, au cours de laquelle sont produites deux molécules de NADH et deux molécules d'ATP (4 ATP formés par phosphorylation au niveau du substrat et 2 ATP consommés). Le bilan de glycolyse s'écrit ainsi :

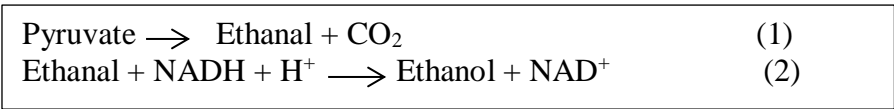


**b- Métabolisme anaérobie du pyruvate**

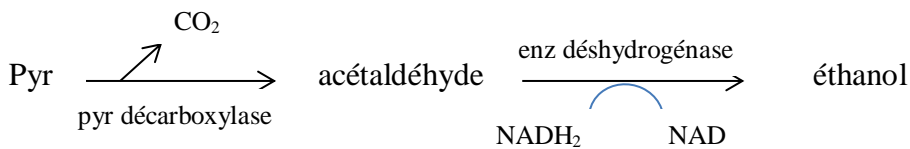
Selon l'équipement enzymatique des espèces bactériennes en particuliers les bactéries anaérobies strictes ou aéro-anaérobies métabolisent le pyruvate par différentes voies, les principales sont :

- **Fermentation éthanolique (ou « alcoolique »)**

Le pyruvate est décarboxylé en éthanal (1), qui est ensuite réduit en éthanol (2) :



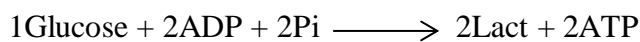
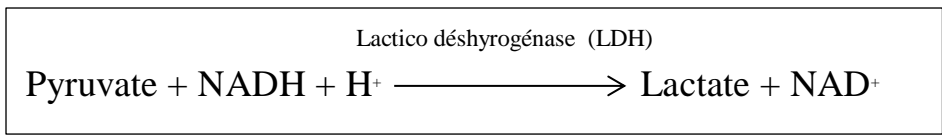
Ou selon la réaction :



Cette fermentation, est à la base de la fabrication du pain et de boissons alcoolisées telles que le vin ou la bière. Elle est répandue chez de nombreuses levures (dont *Saccharomyces cerevisiae*).

- **Fermentation homolactique**

Lorsque l'acide lactique est le seul produit on parle de fermentation homolactique. C'est le cas le plus simple : le pyruvate sert d'accepteur d'électrons et d'hydrogène pour la réoxydation du NADH :



Il s'agit de la principale fermentation permettant la transformation du lait en yaourt ou en fromage frais. Elle est présente chez de nombreuses espèces de streptocoques et de *Lactobacillus*.

- **Fermentation « acides mixtes »**

Elle se caractérise par la diversité des produits de fermentation par des espèces ex : *E. coli* possédant un système enzymatique la formate-hydrogène-lyase (éthanol, acide acétique, acide lactique, acide succinique, CO<sub>2</sub>, H<sub>2</sub>). Elle est pratiquée par les entérobactéries dites « VP<sup>-</sup> » (ex : *E. coli*, *Salmonella*, *Proteus*, etc.).



- **Fermentation butanediolique**

Chez les bactéries dites « VP<sup>+</sup> » (*Klebsiella*, *Enterobacter*, *Serratia* chez les entérobactéries), une grande partie du pyruvate est transformée en acétoïne (mise en évidence lors de la réaction de Voges Proskauer), qui sert d'accepteur d'électrons et d'hydrogène. Le produit final de cette voie est le 2,3-butanediol.

- **Fermentations des bactéries anaérobies**

Chez les *Clostridium*, les voies de fermentation sont multiples : elles conduisent à la formation d'acides organiques, d'alcools, de cétones etc. Les composés les plus fréquemment produits sont l'acide butyrique (butanoïque), le butanol et l'acétone. Chez *Propionibacterium*, la fermentation conduit à la formation d'acide propanoïque.

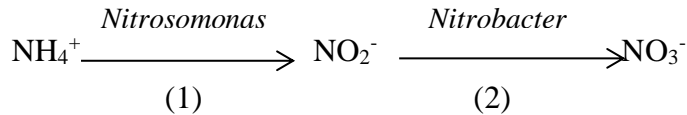
**b- Types respiratoires des chimiolithotrophes**

Les bactéries chimiolithotrophes tirent leur énergie, leurs électrons et leurs protons de substances inorganiques réduites (par oxydation des substrats inorganiques tel que le soufre, soufre, ammoniac, l'hydrogène et les ions ferreux, ce métabolisme consiste en une respiration aérobie ou anaérobie). Leur source de carbone est le CO<sub>2</sub> (ce qui en fait des autotrophes). On trouvera dans cette section des bactéries nitrifiantes, d'autres oxydant le soufre, le dihydrogène ou des métaux.

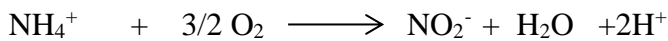
- **Bactéries nitrifiantes**

Ce sont des bactéries strictement aérobies qui se développent dans les couches superficielles du sol et dans les sols pollués. Les bactéries nitrifiantes aérobies oxydent soit l'ammoniac (*Nitrosomonas*), soit les nitrites (*Nitrobacter*). Ces micro-organismes ont une importance écologique considérable, du fait de leur rôle dans le cycle de l'azote.

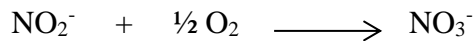
En effet, leur présence dans le sol assure la nitrification, c'est à dire la conversion des ions ammoniums en ions nitrates (Figure 10).



(1) Nitrosation (bactéries nitreuses)



(2) Nitratisation (bactéries nitriques)



**Figure 10.** Nitrification

Chez les bactéries nitreuses, le couplage énergétique de l'oxydation de  $\text{NH}_4^+$  avec la réduction du  $\text{CO}_2$  leur permet de réaliser la chimiosynthèse, dont le rendement est toutefois assez faible.

En aérobiose, le genre *Thiobacillus* oxyde de nombreux composés inorganiques soufrés en sulfates ( $\text{H}_2\text{SO}_4$ ). Sa source principale de carbone est le  $\text{CO}_2$ . Certaines espèces sont capables d'utiliser les ions  $\text{Fe}^{2+}$  comme source d'électrons, produisant ainsi des ions  $\text{Fe}^{3+}$ . *Thiobacillus denitrificans* se développe même en anaérobiose en réduisant les nitrates en azote gazeux. La production d'acide sulfurique par *Thiobacillus ferrooxydans* peut entraîner la destruction de structures métalliques.

### I.1.3. Classification bactérienne

#### I.1.3.1. Définitions

**Systematique:** Science de la classification des êtres vivants. Elle étudie leur diversité biologique et les relations qui existent entre eux. Elle permet de classer et d'organiser les taxons dans un ordre logique. Elle comprend trois disciplines distinctes: la **classification**, la **nomenclature** et l'**identification**.

- **La classification (Taxonomie** ou taxinomie: du grec taxi: arrangement ou ordre et nomos: signifie lois): La science des lois de la classification. Est la description des caractères des groupes d'organismes, de leurs rapports entre eux et avec les organismes qui les ont précédés au cours de l'évolution. La taxinomie permet de nommer les organismes vivants (**la nomenclature**) et de les classer ou de les regrouper en unités (**taxons**), au sein desquels, ils partagent un grand nombre de caractéristiques communes (selon leur similitude et leur parenté évolutive).
- **La nomenclature:** consiste à attribuer un nom conventionnel à chaque taxon distinct, en respectant un ensemble de règles (*Code international de nomenclature des bactéries*).
- **L'identification (détermination) :** consiste à intégrer des souches bactériennes à l'un des taxons, préalablement définis sur la base de la comparaison de leurs caractères spécifiques respectifs. En microbiologie, cela nous permet d'identifier (de les reconnaître et leur donné un nom : **l'identification**) les micro-organismes pour mieux les utiliser ou les exploiter (ceux qui sont bénéfiques) ou bien pour mieux s'en protéger et de les contrôler (ceux qui sont pathogènes).

**Taxon :** Des ensembles d'organismes vivants, apparentés sur la base de critères suffisamment spécifique pour leur permettre d'être à la fois reconnaissables et distincts des autres groupes. «Groupe de classification d'organismes différents mais phylogénétiquement apparentés».

La taxinomie microbienne est en perpétuelle évolution. Chaque année, de nouvelles espèces sont découvertes. A l'heure actuelle, on connaît à peine 10 à 15% des micro-organismes existant. Le reste est à découvrir. Ce constat est du à notre incapacité de les isoler et de les cultiver. L'obtention d'une culture pure est nécessaire pour toute étude taxinomique au sens large, ou plus simplement pour toute identification d'un agent infectieux.

Enfin, on doit définir la phylogénie, comme l'étude de l'histoire évolutive d'un groupe d'organisme à partir d'un ancêtre commun. Elle permet de regrouper les organismes selon leurs liens de parenté.

Plusieurs méthodes ont été développées pour la classification et l'identification des micro-organismes. On distingue, les méthodes phénotypiques et les méthodes génotypiques

### **I.1.3.2. Importance de la taxonomie**

Il y a trois intérêts majeurs pour classer les microorganismes:

- le classement organise une « banque de données » sur les microorganismes,
- indispensable pour identifier un nouvel isolement,
- donne accès à la phylogénie (c.à.d. le lien de parenté entre les différents organismes).

### **I.1.3.3. Unités de classification**

#### **Notion d'espèce bactérienne**

Dans la classification, le taxon de base est l'espèce (species). C'est l'unité fondamentale de la classification en microbiologie. L'espèce se définit comme un ensemble d'organismes partageant de nombreux caractères. Le genre étant un groupe d'espèces semblables, la famille étant un groupe de genres semblables, l'ordre est un groupe de familles semblables, jusqu'au règne qui est un ensemble d'embranchements (phylum) semblables. Notant que l'espèce biologique se définit comme un ensemble d'organismes reconnaissables par leurs caractères, partageant une même niche écologique, et capables de se reproduire sexuellement entre eux en donnant naissance à une progéniture fertile. Mais l'espèce bactérienne ne peut pas être définie de la même façon que l'espèce biologique puisque, chez les bactéries, la reproduction dans leur majorité est asexuée. Cependant, toute espèce convenablement définie en taxonomie phylogénétique devrait respecter les deux conditions suivantes : tous les individus d'une espèce descendent d'un ancêtre particulier. Ainsi, tous les descendants de cet ancêtre particulier sont dans l'espèce.

### **I.1.3.4. Classification naturelle**

Arrange les organismes en groupes dont les membres ont en commun de nombreuses caractéristiques (un max de critères). Reflète autant que possible la nature biologique des organismes. Il existe deux méthodes (approches) différentes:

**•Phénétique (classification phénotypique)**

-Groupe les organismes suivant la similitude de leurs caractères phénotypiques.

**•Phylogénique (classification phylogénétique)**

-Groupe les organismes selon des relations évolutives. Utilise sur des caractères génétiques.

Elle est Basée sur les marqueurs moléculaires pour leur grande stabilité évolutive /faible variabilité.

**I.1.3.4.1. Classification phénotypique**

Depuis la classification proposée par Cohn en 1872 et jusqu'au début des années soixante, toute la taxonomie bactérienne reposait sur une classification phénétique.

L'identification de l'espèce repose sur la comparaison de divers caractères phénotypiques de la souche à étudier vis à vis de ceux d'une souche de référence. C'est l'étude du phénotype (manifestation apparente du patrimoine héréditaire). La classification phénétique (ou phénotypique) utilise un nombre de caractères considérés comme importants :

**✚ Observations macroscopiques, microscopiques:**

Descriptions des colonies (forme, taille, couleur, odeur) ; la morphologie et structure des cellules (bacille, coque) ; leurs arrangements.

**✚ Les aspects ou caractères tinctoriaux comme :**

Les colorations (Gram, bleu méthylène, acido-alcool-résistance, coloration de la spore) ; observation de la mobilité à l'état frais, on peut également rechercher la présence d'endospores, Types trophiques, types respiratoires (la croissance **aérobie**, **anaérobie**).

**✚ Les Tests métaboliques**

Très importants, ils peuvent distinguer des bactéries très apparentées. On recherche la présence d'enzymes (oxydase, catalase), la dégradation de l'urée, de l'esculine. La transformation du lactose et la production de gaz, l'utilisation de différents sucres comme source de carbone, l'utilisation du citrate, la production d'acétoïne, production d'ammoniac, etc.

Ces techniques sont miniaturisées dans des galeries spécialisées **Analytical Profile Index (API)**, ce sont des galeries standardisés de tests biochimiques, on peut faire 20 tests sur une même galerie spécifique des entérobactéries.

- ✚ **La méthode sérologique** : Le sérodiagnostic et le stéréotypage est basé sur la réaction spécifique **antigène – anticorps**. Cette méthode permet de différencier des espèces et même des souches au sein d'une même espèce. Les antigènes ciblés sont les Ag O chez les Gram négatives, les Ag H flagellaires et les Ag K capsulaires.
- ✚ **Les tests d'inhibition** : On évalue la croissance des micro-organismes sur des milieux sélectifs, en présence d'antibiotiques (**antibiogramme**).
- ✚ **La chimiotaxonomie** : On détermine le profil **des acides gras des parois**. Le Profil **des protéines totales** par électrophorèse (séparation selon le pHi et le poids moléculaire).
- ✚ **La lysotypie** : Infection par des bactériophages et formation de plages de lyses. On définit **le lysovar ou le lysotype**.

En 1763, le botaniste français Adanson proposait une méthode de classification qui tenait compte de l'ensemble des caractères d'un organisme, chaque caractère ayant la même « valeur » le même « poids ».

En 1957, Sneath applique une méthode similaire aux bactéries et développe une taxonomie qualifiée de **numérique** ou d'**adansonienne**.

De manière schématique, la méthode consiste à étudier, pour chaque souche, plus d'une centaine de caractères morphologiques, biochimiques, culturels, structuraux... et à attribuer le même poids à chacun des caractères qui sont codés 1 (présence du caractère) ou 0 (absence du caractère). Le but recherché est de rassembler dans une classe de similitude les individus les plus semblables.

Pour former des groupes d'individus, il faut tenir compte de leurs ressemblances mais aussi de ce qui les différencie des autres qui ne seront pas inclus dans le groupe. Or deux souches bactérienne ne sont jamais totalement semblables ni totalement différentes. Il est donc souhaitable de calculer des indices de similitude acceptés ou de différence pour les comparer à des normes fixées à l'avance, qui déterminent le degré de similitude accepté pour entrer dans le groupe. On quantifie la similitude pour former des groupes.

L'analyse se fait par un programme informatique (programme d'agrégation ou « Cluster analysis », il évalue la ressemblance entre les souches en calculant l'indice numérique, l'indice de jacquard. la correspondance entre le phénotype et la taille du génome n'est pas connue. on est donc amené à donner le même poids à tous les caractères. Les données taxonomiques se présentent sous forme d'une matrice de données (sous forme d'un tableau) (Tableau VI).

Ligne : N (nombre d'individus)

Colonne : n (nombre de caractères)

L'analyse mathématique de quantités importantes de données concernant les caractères phénotypiques et moléculaires permet le calcul des distances existant entre différents groupes taxonomiques. Les résultats obtenus peuvent être représentés graphiquement sous forme de **dendrogramme ou cladogramme (clado= branche)** (Figure 11). Chaque point d'intersection de deux branches correspond à des caractéristiques communes aux espèces situées après ce nœud.

#### ✚ Mesure de l'affinité entre individus (entre les souches)

Pour estimer l'affinité entre deux souches (a et b), on utilise le coefficient de Jacquard-Sneath.

**L'indice de Jacquard** :  $S_{(a,b)} = (nS^+ / (nS^+ + nd)) \times 100$

$S_{(a,b)}$  = Coefficient de similitude entre les souches a et b.

$nS^+$  = Nombre de caractère semblables (positifs chez a et b).

$nd$  = nombre de caractères différents chez a et b.

Ici seuls interviennent les similitudes entre caractères positifs, les négatifs ne sont pas pris en considération.

On peut calculer l'indice de pseudo-distance « **D** »  $D_{(a,b)} = 1 - S_{(a,b)}$

« Cet indice sera autant plus petit que la similitude est grande ».

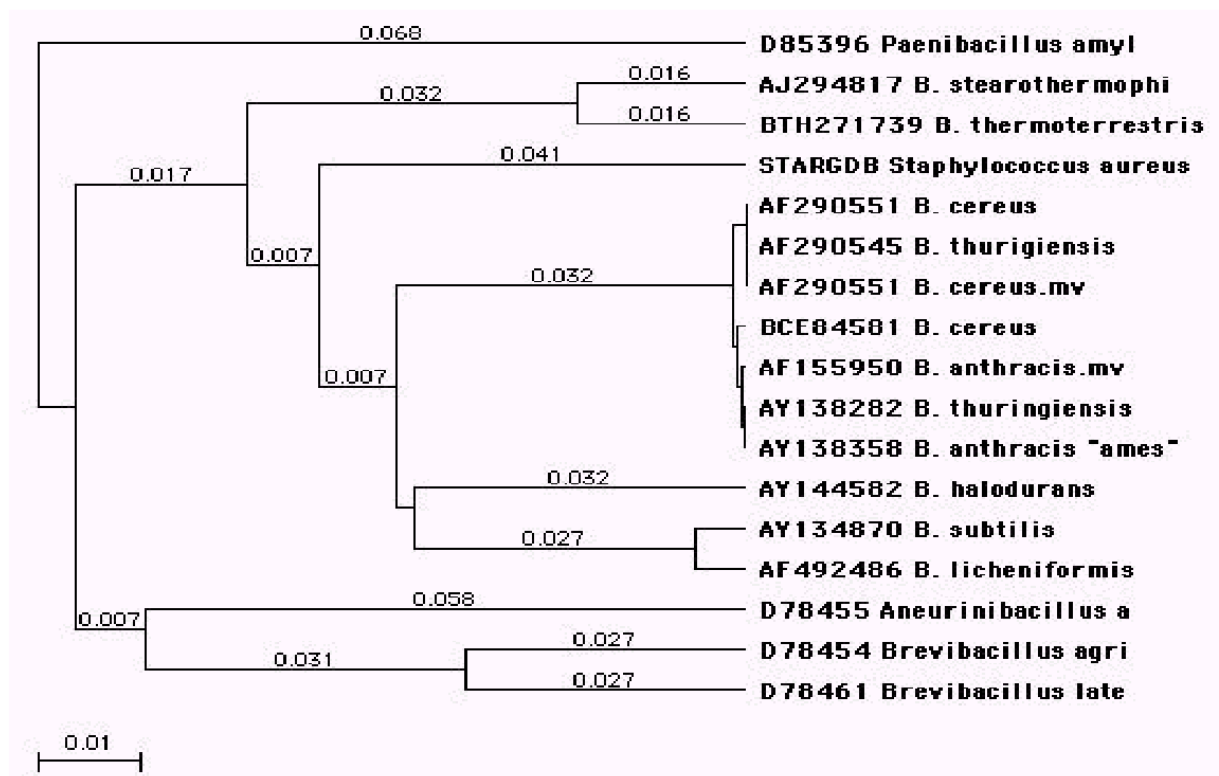
$D=0 \implies$  les deux souches sont semblables ( $S_{(a,b)} = 1$ )

$D=1 \implies$  les deux souches n'ayant aucun caractère commun ( $S_{a,b} = 0$ )

On considère que des souches appartiennent à la même espèce à partir de **85%** de similitudes (limite de l'espèce), pour appartenir au même genre, il faut **65%** de similitudes.

**Tableau VI.** Exemple simplifié de taxonomie numérique: matrice de données (6 souches, 20 caractères)

Souches	Réponses aux tests T1 à T20 0: caractère négatif, 1: caractère positif
S1	001 001 011 111 101 000 00
S2	111 011 000 011 101 010 00
S3	001 001 011 101 011 000 10
S4	001 100 011 111 101 000 00
S5	010 001 011 101 011 000 10
S6	011 011 000 011 101 010 00



**Figure 11.** Dendrogramme, de quelques espèces du genre *Bacillus* et de genres apparentés

### ➤ Limites de la classification phénotypique

Les caractères morphologiques sont utiles pour l'identification, mais ne peuvent pas démontrer à eux seuls les relations phylogénétiques. Donc l'étude globale du phénotype d'un individu, selon les méthodes décrites précédemment, ne renseigne pas très imparfaitement sur la nature du génotype, car :

Des individus très différents génétiquement mais vivant dans la même niche écologique, peuvent présenter les mêmes propriétés physiologiques.

- Techniques non adaptée au diagnostic des bactéries dont la culture est lente ou difficile (*Chlamidia*, *Rickettsiae*, etc.) ou aux germes que l'on ne sait pas cultiver. Il faut disposer d'une culture pure.

La forme peut varier en fonction du milieu de culture et peut être parfois difficile à définir. Même en multipliant le nombre de tests (400 tests) on n'évalue que 5 à 20 % du potentiel génétique d'une bactérie (*E. coli* possède 3000 gènes).

Les caractères étudiés peuvent être absents notamment chez les bactéries mutantes. Ex : existence de souches d'*E. coli* lactose.

Expression différente des caractères phénotypiques selon la température, la composition du milieu de culture, Ex. Les bactéries Gram<sup>+</sup> âgées prennent l'aspect des G<sup>-</sup> (*Bacillus subtilis*).

Le phénotype ne peut exprimer la totalité du génotype, c'est pourquoi le génotype doit être étudié pour une classification plus rigoureuse. Il existe des variations intra espèce.

Les progrès réalisés dans la connaissance de l'ADN bactérien permettent des comparaisons plus fines et précises entre les bactéries et une classification plus juste.

#### I.1.3.4.2. Taxonomie génétique ou phylogénique

La classification phylogénétique des procaryotes se base sur des critères moléculaires, les organismes sont classés principalement selon les différences ou les similitudes de leurs acides nucléiques.

Les critères recherchés sont :

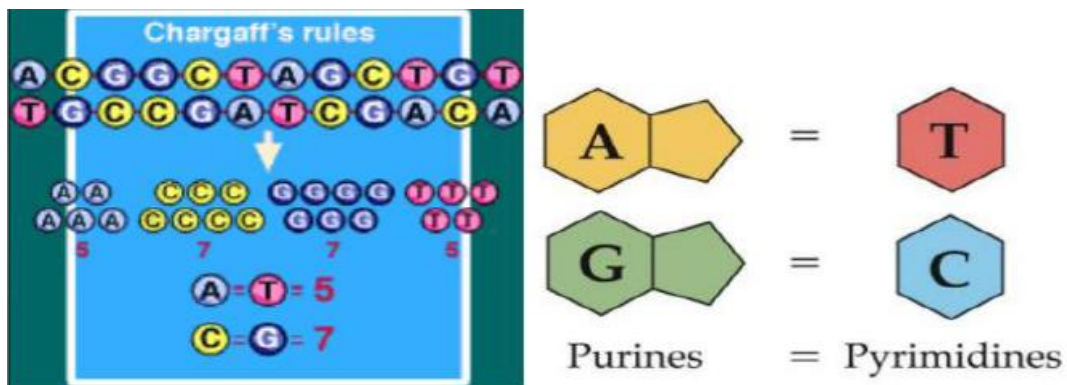
- a- Composition des bases d'ADN sous la forme de pourcentage de G+C (GC%)
- b- Taux d'hybridation ADN/ADN
- c- Séquence de l'ADN qui code pour l'ARN ribosomal 16 S
- d- Profils de restriction (RFLP)

**a- Composition en base d'ADN (GC %) (Coefficient de Chargaff)**

Du nom de la personne qui a remarqué (dans les années 1949) que ce paramètre est constant au sein d'une espèce et quel que soit l'espèce d'origine, l'ADN contient toujours autant de purine que de pyrimidine soit :

$$(A + G) = (C + T) \text{ ou } (A+G) / (C+T) = 1$$

De plus, il y a autant de thymine que d'adénine  $A/T = 1$ , autant de guanine que de cytosine  $G/C = 1$  (Figure 12).



**Figure 12.** Composition en base azotées selon Chargaff

Par contre, le rapport  $(A+T) / (C+G)$  varie beaucoup : **il est caractéristique de l'espèce.**

Chargaff a montré que le contenu en bases purines (Guanine G, et Adénine A) et pyrimidiques (Cytosine C et Thymine T) de l'ADN variait d'un organisme à l'autre, mais était constant dans une espèce donnée.

Puisque les bases sont toujours appariées spécifiquement (G avec C, A avec T), le contenu en bases de l'ADN a été exprimé par le **Coefficient de Chargaff**. Il peut être calculé suite à un séquençage par la formule suivante :

$$\text{GC\%} = ((G+C) / (A+T+G+C)) \times 100$$

Ou bien par une méthode de spectrométrie ultra-violet.

### Règles d'interprétations du GC%

- ✚ 2 espèces microbiennes ayant des GC% différents n'ont aucune communauté génétique.
- ✚ 2 espèces microbiennes ayant les mêmes séquences nucléotidiques ont nécessairement le même GC%.
- ✚ 2 espèces microbiennes ayant le même GC% peuvent être génétiquement éloignées (n'appartiennent pas forcément à la même espèce, les séquences nucléotidiques ou séquences de bases azotés peuvent être très différentes).
- ✚ Les bactéries appartenant à la même espèce ont le même GC%.
- ✚ 2 espèces microbiennes dont les GC% diffèrent de 5%, appartiennent à des espèces différentes (Moins de 5% de différences : même espèce ; *Moins de 10%* de différences : *même genre*).

GC% = 97 à 100% : même espèce.

GC% > 70% : même genre.

#### b- Hybridation ADN/ADN

Lorsque deux valeurs de GC% sont identiques, la preuve que les deux taxons descendent d'un ancêtre commun ne peut être apportée qu'en montrant que les séquences de leurs nucléotides sont identiques ou très voisines : on estime le taux d'hybridation de leur ADN au cours de la renaturation de l'ADN. Les réassortiments seront d'autant plus complets que les brins d'ADN seront complémentaires : les bactéries sont génétiquement semblables.

#### ✚ Stabilité thermique des hybrides

La spécificité des hybrides est estimée par la mesure de la stabilité thermique.

#### Les températures clés et leurs définitions :

**T<sub>m</sub>** : Point de fusion (Thermal elution midpoint) : Température de dénaturation de 50% de l'hybride

**T<sub>or</sub>** : Température optimale de renaturation : 25° à 30°C < Température de dénaturation

**T<sub>rr</sub>** : Température restrictive de renaturation: 10 à 15 °C < Température de dénaturation

Cette méthode permet la comparaison de la totalité du génome de deux bactéries par la mesure du degré d'homologie des deux ADN. Les différentes techniques reposent sur le même principe : la renaturation *in vitro* de deux brins d'ADN hétérologues



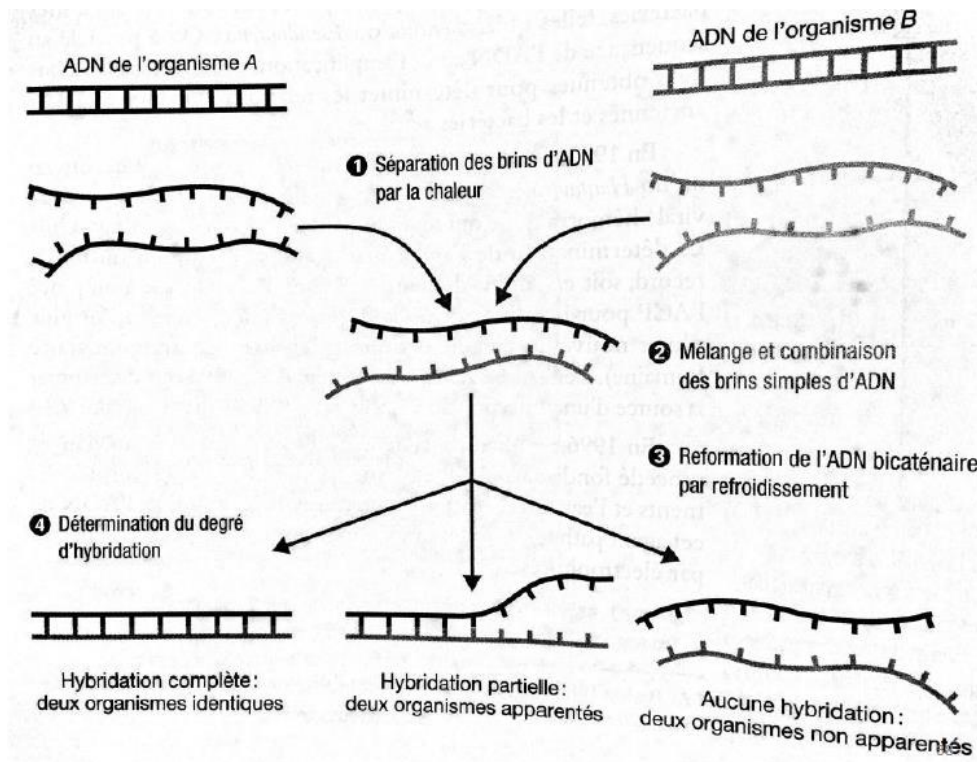


Figure 14. Schéma montrant la technique d'hybridation

La complémentarité dépend de l'homologie des séquences de bases des brins des hybrides hétérologues.

- ✚ Hybridation complète des brins ADN hétérologues (même espèce)
- ✚ Hybridation partielle (espèces apparentées)
- ✚ Pas d'hybridation (espèces non apparentées)

### Les techniques d'hybridation ont permis

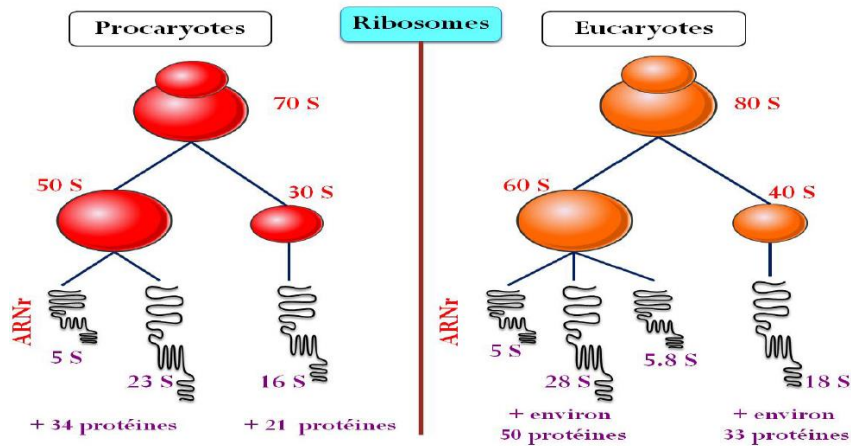
- ✚ de rapprocher des genres bactériens étaient éloignés, Ex : le genre *Shigella* et *Escherichia* de la famille des Entérobactéries, phénotypiquement éloignées (caractères biochimiques différents) mais génotypiquement, les deux genres sont proches (% d'hybridation supérieur à 70%).
- ✚ de créer des espèces ou genres nouveaux.

**c- Séquençage des ARN ribosomiaux (ARNr)**

L'ARN reflète une partie de l'ADN. Les ARNr sont les meilleurs chronomètres moléculaires.

- ✚ On s'intéresse à l'ARN16s car il n'est pas trop gros (en taille l'ARN23s est trop gros et l'ARN5s est trop petit) et il possède suffisamment d'informations,
- ✚ L'ARN est une structure universelle qui se retrouve dans tout le monde vivant, on peut donc acquérir une phylogénie de tous les êtres vivants (ils sont présents dans les cellules procaryotes et eucaryotes),
- ✚ L'ARN a une fonction identique chez tous les êtres vivants,
- ✚ Ils ont une structure bien conservée chez tous les êtres-vivants,
- ✚ des portions d'ARNr ont une séquence identique chez tous les êtres vivants,
- ✚ Il y a de l'ARN en grande quantité dans les cellules donc il s'agit d'un matériel biologique accessible, faciles à purifier et à séquencer (par utilisation d'une reverse transcriptase),
- ✚ Les gènes qui codent les ARN ribosomiaux ne sont pas soumis à des transferts horizontaux (transfert verticaux = transferts de gènes de mères a filles; a contrario transferts horizontaux = transferts de gènes entre même génération, comme les plasmides).

Les ARNr s'associent à des protéines pour former les ribosomes. La sous-unité 30S d'un ribosome contient de l'ARNr 16S et la sous-unité 50S contient de l'ARNr 5S 120 nucléotides (très petit ARNr) et de l'ARNr 23S. L'ARNr 5S est formé d'environ 120 nucléotides, l'ARNr 16S de 1 540 nucléotides et l'ARNr 23S comprend environ 2900 nucléotides. Le plus utilisé pour les études taxonomiques est l'ARNr 16S. Les travaux sur ces ARNr 16S ont permis de distinguer les Eubactéries « bactéries vraies » des Archaeobactéries (ou Archéobactéries) (Figure 15).



**Figure 15.** Composition des ribosomes procaryotes vs ribosomes eucaryotes

On peut purifier l'ADN génomique (le chromosome bactérien) et utiliser l'ACP (l'amplification en chaîne par polymérase) ou PCR en anglais. C'est une technique qui permet de multiplier l'ADN codant pour l'ARN 16S pour l'analyser par électrophorèse et le séquencer base par base.

Après digestion par une RNase T1 (ribonucléase) qui coupe de façon systématique des 3'G. l'ARN ribosomal est fragmenté en oligonucléotides (courts fragments) qui sont séquencés par la **Méthode de SANGER**: « méthode des dideoxynucleotides ».

On dispose de brins d'ARN, une ARN polymérase qui permet de faire une copie = matrice dans 4 tubes différents dans lesquels on rajoute des nucléotides dd: ddATP, ddUTP, ddCTP et ddGTP. L'incorporation par la matrice d'un nucléotide dd entraîne le STOP de la polymérisation. On peut faire alors une électrophorèse et on lit le résultat de la séquence en partant du nucléotide qui a le plus migre jusqu'au bout du gel.

Comparaison de la séquence nucléotidique de l'ARNr16S à celles de souches déposées dans des banques de données internationales VIA INTERNET (des catalogues d'oligonucleotides dont certains sont spécifiques de certains groupes bactériens= se sont des séquences signatures.

Plus de 97,5 % d'homologie, même genre. Pour l'espèce possibilité faire des hybridations ADN/ADN.

Entre **90 et 97,5%**: espèces différentes, a priori même genre, à conforter par chimiotaxonomie.

**Moins de 90%**: a priori genres différents.

Grâce aux statistiques et à l'informatique on peut construire des arbres phylogénétiques.

Toute description d'une nouvelle espèce devrait inclure le séquençage de l'ARNr16S de la souche type et s'accompagner de l'analyse des caractères phénotypiques.

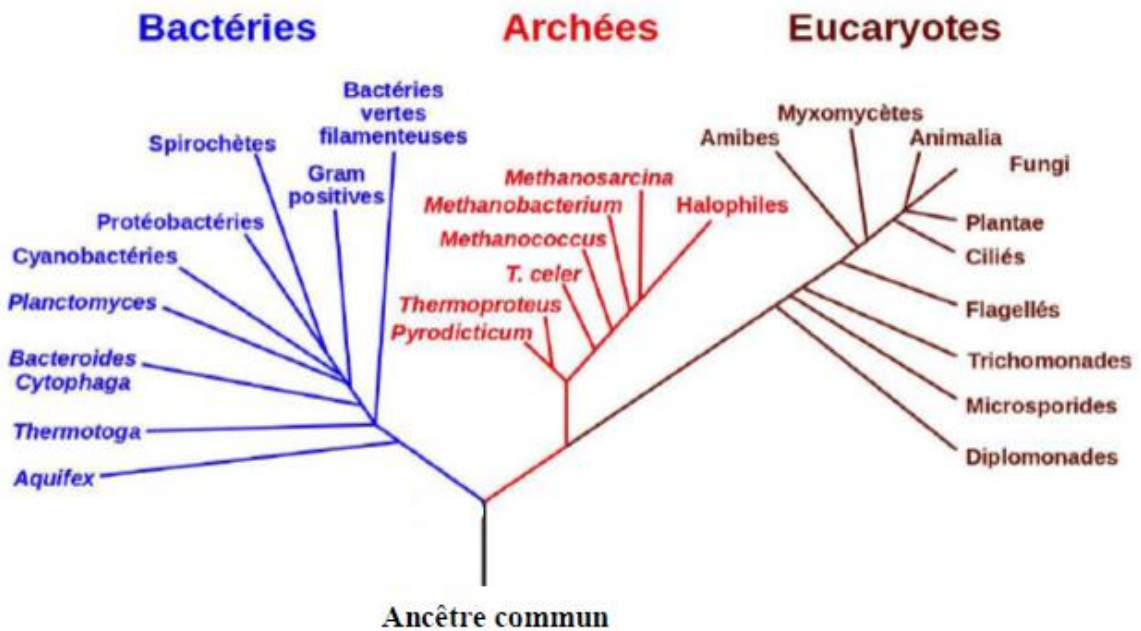
**En conclusion l'approche devrait être polyphasique :**

- 1) Approche numérique phénotypique
- 2) Approche génotypique

**✚ Classification Génomique selon, CR, Woese (1978)**

Le développement des techniques de biologie moléculaire a permis de caractériser les gènes qui codent pour les ARN ribosomiaux (ARNr). En comparant une multitude de séquences d'ARNr 16S, appartenant à divers organismes vivants, il est arrivé à diviser les organismes vivants en trois domaines. Le domaine des *Bacteria* ou *Eubacteria*, le domaine des *Archaea* et le domaine des *Eucarya* (animaux, plantes, les mycètes et les protistes) (Figure 16).

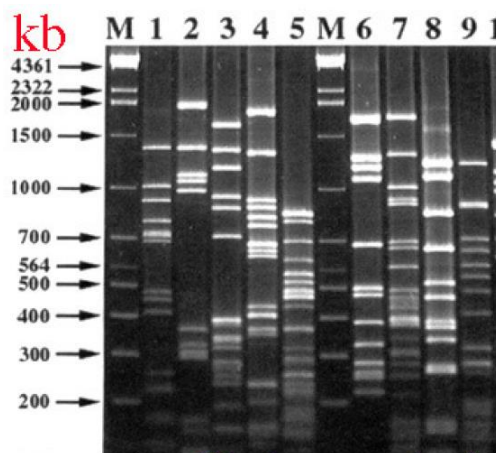
## Arbre phylogénétique de la vie



**Figure 16.** Schéma de l'arbre phylogénétique universel des organismes vivants, établis par l'analyse de L'ARNr16S et 18S.

**d- Etude des profils de restriction (RFLP) (Polymorphisme de longueur de fragments de restriction)**

L'ADN double brin peut être coupé par des enzymes de restriction, dénommées endonucléases (qui coupent l'ADN en des points précis et connus). Le génome bactérien est alors caractérisé par une série de fragments (dont la taille est mesurable) séparés par électrophorèse en gel d'agarose. Le mode d'action très spécifique des endonucléases permet d'établir des profils de restriction, d'où leur intérêt en taxonomie et en épidémiologie (Figure 17).



**Figure 17.** Exemples de profils de restriction

Cette méthode est utilisée pour l'identification et la classification au niveau de l'espèce et de la souche. L'identification précise d'une bactérie peut être faite grâce à l'analyse des profils de restriction (électrophorèse). Les profils obtenus sont comparés à ceux de souches connues. Les mutations supprime certaines séquences : on n'obtient pas le même profil.

**I.1.3.4.3. Classification de Bergey**

Le *BERGEY'S Manual* est le plus remarquable travail de classification des bactéries. Sa première édition était en 1923 aux USA sous le nom de *BERGEY's Manual of determinative Bacteriology*. Son objectif initial était le regroupement exhaustif de l'ensemble des informations phénotypiques disponibles pour l'identification des espèces bactériennes reconnues, afin de permettre l'identification de souches bactériennes inconnues. Il y a eu neuf (9) éditions du *BERGEY's Manual of Determinative*

*Bacteriology* jusqu'au 1994. Avec l'apparition dans la 8ème édition (1984) d'une nouvelle classification des bactéries. Les bactéries sont classées en quatre divisions où une est réservée aux archaebactéries, alors que les trois autres sont définies sur la base de la présence ou non d'une paroi et sur sa nature: les bactéries à GRAM négatif, les bactéries à GRAM positif et les Mycoplasmes (bactéries sans paroi). C'est aussi en 1984 qu'est paru le premier volume de la première édition du ***BERGEY's Manual of Systematic Bacteriology*** (constitué de quatre volumes) qui est la version exhaustive détaillée du *BERGEY's Manual of Determinative Bacteriology*. Toutes les éditions proposent une classification phénotypique des bactéries, ces données étant alors disponibles. Ce n'est qu'en 2001 que le premier volume de la 2ème édition *BERGEY's Manual of Systematic Bacteriology* est apparue. La classification proposée est pour la première fois phylogénétique, basée sur les données accumulées en ce domaine depuis les années 1970, grâce à la généralisation des études génomiques. C'est une classification naturelle totalement différente des précédentes classifications du *BERGEY's Manual*. Elle s'inscrit dans le cadre de la classification des organismes vivants en trois domaines, selon leur organisation cellulaire et leurs parentés évolutives: *Archaea, Bacteria, Eucarya*.

## **II. Bactéries d'intérêts et applications en biotechnologie**

### **II.1. Agriculture**

#### **II.1.1. Lutte biologique des ravageurs des plantes**

L'utilisation des produits phytosanitaires chimiques a considérablement diminué la pénibilité du travail au champ tout en permettant une production suffisante et à moindre coût pour satisfaire aussi bien le marché que le consommateur. Les pertes de production, avant récolte, des cultures mondiales majeures dues aux ravageurs (insectes, micro-organismes) et aux adventices sont estimées à 35 %. Sans une protection efficace des cultures, ces pertes seraient de 70 % (Popp *et al.*, 2013). La diminution de la production mondiale de denrées alimentaires causée par la non-utilisation des produits phytosanitaires pourrait être à l'origine de famines chez les populations déjà fragilisées. Tous ces arguments pris en compte, il est indéniable que les produits phytosanitaires chimiques présentent de nombreux avantages. Cependant, leur utilisation peut être la cause de problèmes environnementaux et de santé publique, d'autant plus que les risques inhérents à certains d'entre eux sont mal évalués.

**Inconvénients de la lutte chimique**

- l'environnement : accumulation de résidus et la pollution des sols
- Apparition et généralisation des mécanismes de résistance chez les plantes
- Déséquilibre écologique, dû au fait que beaucoup de ces composés de synthèse ont un large spectre d'action, détruisent non seulement les agents nuisibles, mais également les autres populations de l'écosystème.
- accumulation de substances chimiques provenant de ces pesticides au niveau des plantes cultivées (ex : céréales).

Au regard de ces inconvénients, il est important de trouver des solutions alternatives qui permettent de continuer à lutter contre les phytopathogènes tout en diminuant l'emploi de produits chimiques. Celles-ci peuvent faire appel à la rationalisation des pratiques agricoles :

- Désinfection des graines
- Rotation des cultures
- Contrôle du vecteur de la maladie
- Utilisation de variétés végétales résistantes (croisement sélectif, insertion de gènes, etc.).
- Développement de biopesticides

**II.1.1.1. Définition de la lutte biologique**

Dans le domaine agronomique, on entend par lutte biologique toute forme d'utilisation d'organismes vivants ayant pour but de limiter la pullulation et/ou la nocivité des divers ennemis des cultures : micro-organismes (champignons, bactéries, virus), animaux invertébrés (acariens, insectes, nématodes) ou vertébrés (reptiles, amphibiens, oiseaux, poissons, mammifères), sont justiciables d'une telle lutte, qui est basée sur des relations naturelles entre individus ou entre espèces, mises à profit par l'Homme de diverses manières. L'organisme vivant utilisé comme agent de lutte est un « auxiliaire » de l'Homme.

## II.1.1.2. Notions du contrôle biologique microbien : Bio-contrôle des bactéries et champignons phytopathogènes

### II.1.1.2.1. Définition du bio-contrôle microbien

Le mot bio-contrôle (biocontrol) est l'abrégié du terme anglo-américain « biological control » utilisé dans différents domaines de la biologie, comme l'entomologie et la phytopathologie. Les produits de bio-contrôle sont définis comme « l'ensemble des méthodes de protection des végétaux qui utilisent des mécanismes naturels. Il vise à la protection des plantes en privilégiant l'utilisation de mécanismes et d'interactions qui régissent les relations entre espèces dans le milieu naturel ». L'Association Française des Fabricants de Produits de Bio-contrôle (IBMA) rejoint assez largement cette dernière définition, précisant que les produits de bio-contrôle se répartissent en cinq familles : macroorganismes, microorganismes, médiateurs chimiques et attractifs/répulsifs naturels, substances naturelles et tous produits et technologies nouveaux à faible risque (AAF, 2016).

#### - Une autre définition

Le terme « bio-contrôle » désigne un ensemble de méthodes de lutte contre les bio-agresseurs des cultures basées sur l'utilisation de mécanismes naturels. Il fait l'objet d'une définition officielle (article L. 253-6 du Code rural et de la pêche maritime, modifié par l'article 50 de la loi no 2014-1170) qui est en réalité un classement des produits de bio-contrôle en quatre catégories : macroorganismes, microorganismes, médiateurs chimiques (tels que les phéromones) et substances naturelles permettant de lutter contre des ennemis des cultures (Fauvergue *et al.*, 2020).

## II.1.1.3. Biopesticides

### II.1.1.3.1. Définition

✚ Les bio-pesticides, «organismes vivants ou produits issus de ces organismes ayant la particularité de supprimer ou limiter les ennemis des cultures ». De nos jours, ils sont classés en trois grandes catégories selon leur origine (microbienne, végétale ou animale) (Deval *et al.*, 2014).

✚ Produits phytosanitaires dont le principe actif est un organisme vivant ou l'un de ses dérivés exerçant une activité protectrice sur les plantes vis-à-vis d'agents phytopathogènes, mais aussi de substances d'origines naturelles telles que des extraits végétaux, phéromones, etc.

### II.1.1.3.2. Biopesticides à base de bactéries

Les biopesticides à base de *Bacillus thuringiensis* sont les plus commercialisés. Ils ont une action insecticide. *Bacillus thuringiensis* est une bactérie à Gram<sup>+</sup> qui produit, durant sa phase stationnaire de croissance, des protéines cristallines appelées delta-endotoxines ou pro-toxines Cry. Ces protéines sont libérées dans l'environnement après la lyse des parois bactériennes lors de la phase de sporulation et sont actives, une fois ingérées par les ravageurs, contre les lépidoptères, les diptères et les larves de coléoptères (Rosas-Garcia, 2009).

Des espèces bactériennes du genre *Bacillus* utilisant des mécanismes d'action autres que celui employé par *B. thuringiensis* peuvent également protéger les plantes. Il y a, parmi ces espèces, des souches de *Bacillus licheniformis*, *Bacillus amyloliquefaciens* ou *Bacillus subtilis*. *Bacillus amyloliquefaciens* et *B. subtilis* sont capables de coloniser les racines des plantes et de produire des molécules de nature lipopeptidique qui sont les surfactines, les iturines et les fengycines. Ces dernières peuvent soit activer les défenses des plantes, soit avoir un effet antibactérien ou antifongique direct (Pérez-Garcia *et al.*, 2011).

Des bactéries appartenant à d'autres genres que le genre *Bacillus* ont également été développées en tant que biopesticides. Ainsi, la souche *Pseudomonas chlororaphis* MA342 est utilisée dans la prévention et le traitement de certains champignons des graines de céréales comme *Drechslera teres*, agent de l'helminthosporiose de l'orge (Tombolini *et al.*, 1999). *Pseudomonas chlororaphis* MA342 protège également le blé et le seigle contre la fusariose et la septoriose. Plusieurs modes d'action sont proposés pour justifier son efficacité. Cette bactérie pourrait agir contre les champignons phytopathogènes par antibiose directe, par concurrence spatiale et nutritive ou en activant les défenses des plantes (Boulon, 2010). Ainsi, les lipopeptides cycliques produits par les bactéries du genre *Bacillus* peuvent, à la fois, faciliter la colonisation de l'environnement par le micro-organisme producteur (surfactines et iturines), avoir une

activité antifongique directe (iturines et fengycines) et induire les mécanismes de défense des plantes (surfactines, fengycines) (Ongena *et al.*, 2008).

#### II.1.1.3.3. Biopesticides à base de champignons

Outre les bactéries et les virus, certains champignons présentent des activités contre les bio-agresseurs et sont exploités en tant que biopesticides. *Coniothyrium minitans* est connu pour parasiter les champignons du genre *Sclerotinia* spp. Ce genre fongique se retrouve dans le sol et est à l'origine de la maladie appelée pourriture blanche qui peut affecter de nombreuses cultures dont la carotte, le haricot, le colza ou le tournesol. *Coniothyrium minitans* est connu pour pénétrer dans les sclérotites de *Sclerotinia sclerotiorum* soit par des craquelures situées à l'extérieur de cette forme de conservation du champignon, soit en s'introduisant par l'écorce extérieure en suivant une voie intercellulaire. Il poursuit ensuite son chemin en intracellulaire en pénétrant le cortex et la médullaire. Le parcours intracellulaire de *C. minitans* est possible car il produit des enzymes de dégradation des parois telles que les chitinases ou les  $\beta$ -1,3 glucanases. En plus de ces enzymes extracellulaires, diverses molécules pouvant intervenir dans les mécanismes d'action contre *Sclerotinia* spp. ont été identifiées dans des cultures de *C. minitans*. Parmi ces molécules, il y a des 3(2H)-benzofuranones, des chromanes, des métabolites antifongiques ainsi que la macrosphelide A connue pour inhiber l'adhésion des cellules de mammifères et qui, à de faibles concentrations, inhibe la croissance de *Sclerotinia sclerotiorum* et de *Sclerotinia cepivorum* (McQuilken *et al.*, 2003).

Plusieurs souches du champignon filamenteux du genre *Trichoderma* spp. sont utilisées pour la protection biologique des plantes. Elles ont généralement une activité antifongique contre plusieurs pathogènes du sol ou contre des pathogènes foliaires (Dodd *et al.*, 2003). *Trichoderma atroviride* est notamment utilisée pour la protection biologique de la vigne (Longa *et al.*, 2009). L'activité de bio-contrôle de cette souche est attribuée à plusieurs mécanismes d'action qui agissent en synergie. Parmi ces mécanismes d'action, il y a la compétition pour les nutriments, l'antibiose, ou la production d'enzymes spécifiques de dégradation des parois cellulaires comme les chitinases ou protéases (Brunner *et al.*, 2005).

En provoquant des pertes totales de cultures estimées à près de 10 %, les nématodes du genre *Meloidogyne* spp. sont les plus destructeurs au monde. Les

nématicides chimiques les plus efficaces contre eux ont été progressivement retirés du marché à cause de leur impact sur l'environnement (Anastasiadis *et al.*, 2008). Le champignon *Paecilomyces lilacinus* est l'un des produits alternatifs les plus étudiés dans la lutte biologique contre ces nématodes. Il a la capacité d'infester plusieurs phases de développement du parasite. Il est particulièrement connu pour avoir des propriétés ovicides. *Paecilomyces lilacinus* pénètre dans les œufs de nématodes en sécrétant des chitinases et protéases (Dong *et al.*, 2007). Il peut également infester les nodules racinaires où se trouvent ces œufs. Les hyphes fongiques déjà formées peuvent s'introduire dans les nématodes adultes *via* leurs orifices naturels. Dans tous les cas d'infestation, *Paecilomyces lilacinus* se nourrit des tissus des nématodes pour pouvoir se développer (Site web 1).

#### II.1.1.3.4. Biopesticides à base du cholestérol oxydase de *Streptomyces*

Les actinomycètes constituent l'ordre des actinomycétales. Ce sont des bactéries filamenteuses, septées, ramifiées, prenant généralement le Gram ; possédant un coefficient de chargaff (GC%) compris entre 60-70% (Larpen, 1989). Ils sont abondamment distribués dans la nature. Les actinomycètes sont importants en raison surtout de leur rôle dans la fertilisation des sols, synthèse de composés complexes comme les antibiotiques, les vitamines, les stérols, etc.

Leurs propriétés chimiques, physiologiques, immunologiques, etc. les rangent parmi les procaryotes. Leur paroi cellulaire ne renferme ni chitine ni cellulose mais une glycoprotéine contenant de la lysine (formes fermentatives) ou de l'acide diaminopimélique (formes oxydatives) et leur cytologie est celle des bactéries. La morphologie des différents groupes d'Actinomycètes est très variable. Elle va de simples bacilles diphtéroïdes à des formes mycéliennes complexes.

Les spores se forment sur le mycélium aérien. Dans le cas de la majorité des actinomycètes, notamment les streptomycètes, il s'agit d'exospores. Des parois transversales se forment pour délimiter les spores, ces parois s'épaississent autour de chaque spore individualisée. Des ornements externes peuvent se former, pour donner l'aspect externe important dans la taxonomie. Ces spores permettent la propagation de l'espèce et la survie dans des conditions défavorable à la croissance végétative, certaines spores de *Streptomyces* peuvent survivre plus de 20 ans, elles sont

plus ou moins résistante à la chaleur. La formation et la maturation d'une colonie requière de 3 à 7 jours au laboratoire pour la plupart des espèces du genre *Streptomyces*.

Les actinomycètes sont très largement distribués dans la nature et principalement dans les sols de différentes natures. Ils ont été trouvés dans les eaux douces ou salées, dans les compostes, dans l'atmosphère et dans les substrats les plus divers. Dans le sol, ils sont présents depuis la surface jusqu'à plus de 2 mètres de profondeur. Le rapport Microorganismes totaux / Actinomycètes, diminue au fur et à mesure que la profondeur augmente. Les actinomycètes préfèrent un pH neutre ou peu alcalin, ils sont généralement mésophiles, d'autres sont thermophiles tolérants des températures avoisinant 50°C et peuvent aller jusqu'à 60°C. La majorité des actinomycètes croient dans des conditions humides mais aérobies et peuvent se développer dans des endroits où l'activité de l'eau (Aw) est très basse (Goodfellow et Williams, 1983).

Les Actinomycètes sont fréquemment bactériolytiques grâce à des enzymes hydrolytiques capables de fragmenter les peptides de la paroi, leurs propriétés anti microbienne sont aussi bien connues et un bon nombre d'antibiotique sont produits lors de leur croissance. L'équipement enzymatique des actinomycètes est très diversifiés, il est à l'origine du rôle écologique majeur de ces organismes. Leurs variétés et leur importance quantitative, dépendent de nombreux facteurs comme le pH, la matière organique, les saisons, traitement agricole, etc. Les actinomycètes sont aussi important en milieu hydrique, dans les eaux douces, les rivières et les fleuves, les membres des genres : *Micromonospora*, *Actinoplana* prédominent. Ceux des eaux usées traitées par aération favorisent la multiplication de certains actinomycètes comme les *Nocardia*. En milieu marin de nombreuses espèces ont été isolées mais il est difficile de connaître l'importance de leur rôle dans la décomposition de la matière organique.

#### **Production de Cholesterol Oxidase (COX)**

La capacité de décomposer le cholestérol est très répandue chez les micro-organismes (Yamane et *al.*, 1979 ; Lee and Liu, 1992), il est utilisé comme une source de carbone (ex : *Streptomyces* et mycobactéries) grâce à la production de l'enzyme cholestérol oxydase (Constantinidis, 1980). COX peut être intracellulaire ou une enzyme extracellulaire, produite par divers microorganismes, elle peut être liée à la membrane-intrinsèques ou situées à l'extérieur de la cellule.

Plusieurs micro-organismes ont la capacité de produire la COX. En 1944, Turfitt a été le premier à isoler l'enzyme à partir de *Rhodococcus erythropolis*. Il a exploré son effet comme oxydant de cholestérol. Elle est isolée de différentes espèces de *Mycobacterium* isolées du sol (Schatz *al.*, 1949). Diverses espèces appartenant au genre *Rhodococcus*, *Micrococcus* sp., ont également été trouvés à avoir la capacité de dégrader le cholestérol (Ferreira and Tracey, 1984).

Une caractéristique de cholestérol oxydase est la stabilité marquée dans des conditions extrêmes telles que les températures élevées et les pH plutôt acides et basique. La stabilité à la chaleur de cette enzyme est d'un grand avantage pour l'usage clinique. La température optimale pour l'activité enzymatique de COX des espèces de *Brevibacterium* est d'environ 53°C (Tomioka *et al.*, 1976), *Rhodococcus equi* (47°C) et *Corynebacterium cholesterolicum* avec 40°C. *Streptomyces violascens*, avec une température optimale d'environ 50°C et le plateau entre 40°C et 60°C (Yazdi *al.*, 2001).

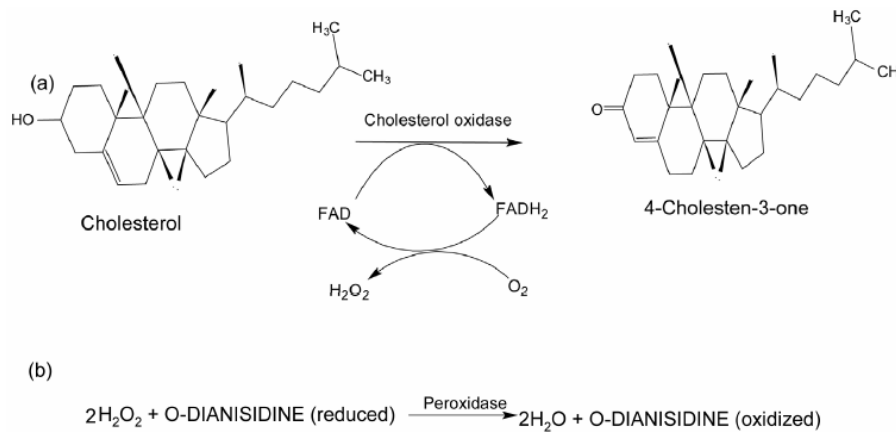
#### **Activité insecticide**

COX bactérien a une activité insecticide efficace contre le charançon de capsule de coton *Anthonomus grandis*, *Gossypium hirsutum*. Elle a la capacité de changer la structure physique des lipides de la membrane en convertissant le cholestérol en cholest-4-en-3-one (156.. Après ingestion, cette enzyme cause l'arrêt du développement et la mort des larves de charançon de coton, et la diminution de la fécondité des adultes femelles. COX montre également l'effet insecticide contre plusieurs espèces des lépidoptères de coton comprenant *Heliothis virescens*, *Helicoverpa zea*, et *Pectinophora gossypiella*.

#### **Mode d'action**

COX attaque les stérols aux positions 3 $\beta$ -hydroxyle pour former la 4-cholesténone et H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. il s'agit de la première étape de dégradation microbienne du cholestérol dans l'oxydation du groupe 3 $\beta$ -hydroxyle par COX suivie de la dégradation de la chaîne latérale par un complexe enzymatique impliquant éventuellement le cytochrome P-450 et des lyases conduisant au 4-androstène-3, 17-dione, ou 1, 4-androstadiène-3 ou 17-dione, et une éventuelle décomposition de la fraction stéroïde avec du dioxyde de carbone et de l'eau comme produits finaux. Le mode d'action direct de COX a été

signalé, qui impliquait l'oxydation enzymatique du cholestérol dans des vésicules de membrane de bordure de brosse de la membrane épithéliale de l'intestin moyen du charançon (Figure 18).



**Figure 18** : Mécanisme de réaction catalysé par le cholestérol oxydase. (a) : oxydation du cholestérol en 4-cholestène-3-one et  $\text{H}_2\text{O}_2$  ; (b) :  $\text{H}_2\text{O}_2$  et o-dianisidine (réduction) avec oxydation de o-dianisidine par l'enzyme peroxidase et libération d'une molécule d'eau (Kumari et Kanwar, 2012)

#### II.1.1.4. Inconvénients et avantages de la lutte biologique

##### II.1.1.4.1. Avantages

Comme toute lutte biologique elle constitue, une alternative plus respectueuse de l'environnement et de la santé humaine que la lutte chimique. Par ailleurs, et même si cet aspect reste souvent peu ou mal chiffré, elle s'avère économiquement très bénéfique.

-Faible rémanence

-Ils sont actifs contre un faible spectre de nuisibles,

- Effets permanents une fois que les ennemis naturels sont bien établis.

- Pas d'effets secondaires nocifs (absence de résidus chimiques, de pollution chimique).

- L'agent est sans danger pour l'environnement ou les cultures car il est spécifique à l'espèce-cible.

- L'agent se développe, se reproduit et se dissémine seul. Il peut s'étendre à tous les habitats et répondre aux fluctuations en nombre de l'espèce-cible.

- Pas de phénomènes de résistance d'insectes ravageurs comme pour l'utilisation d'insecticides.

- L'effet est souvent graduel et ne cause pas de perturbation forte sur l'environnement.

- Les dépenses ne sont pas renouvelables car une fois le système bien établi, aucun frais supplémentaire n'est nécessaire.

#### **II.1.1.4.2. Inconvénients**

- Il y a initialement une dépense en temps, efforts humains et financière importante (coût et durée parfois élevés du programme de recherche).
- Dans le cas où des résultats rapides sont exigés, la lutte biologique agit trop lentement.
- Les effets varient selon les conditions du milieu et ne sont pas garantis.
- Il existe un nombre limité d'ennemis naturels pour chaque espèce-cible.
- Les agents se disséminent le plus souvent seul et le contrôle ne peut pas être localisé.
- C'est une méthode irréversible.

Leur activité souvent dépendante des conditions climatiques et environnementales rend les biopesticides moins efficaces que leurs homologues chimiques (Popp *et al.*, 2013).

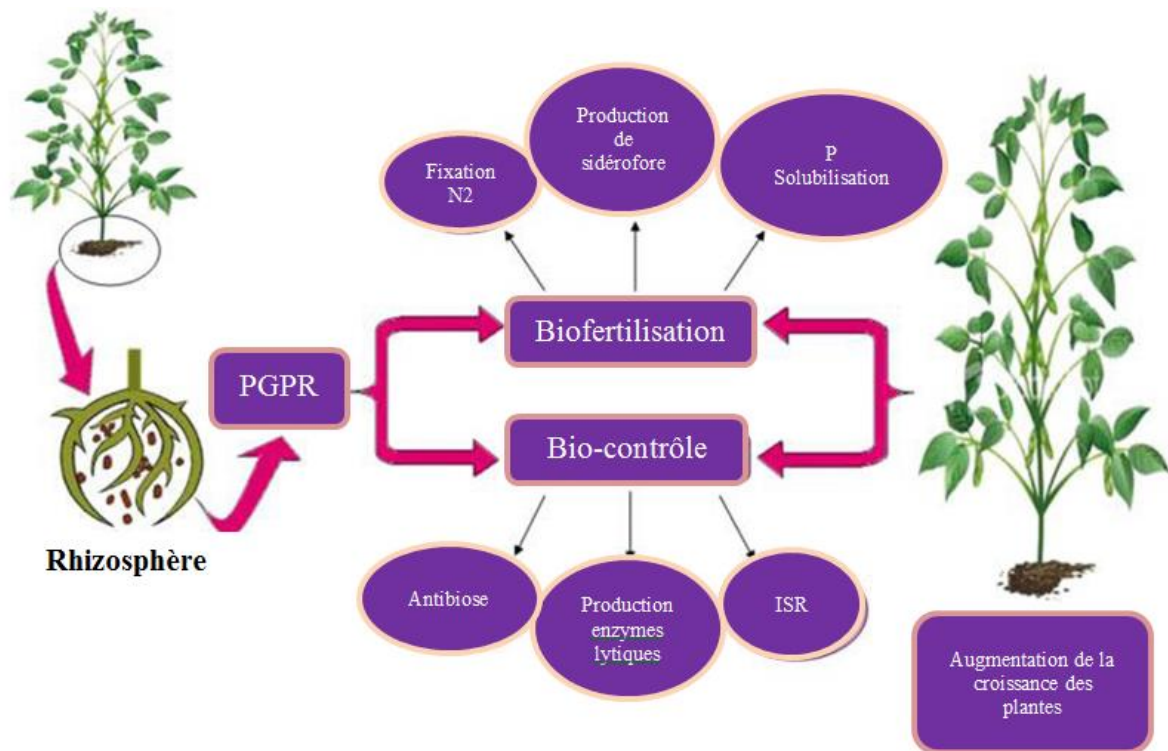
Le taux de succès d'un programme de lutte biologique varie entre 0% à 100% selon les cas. Au niveau mondial, environ 5000 introductions de plus de 1000 espèces d'agents de lutte biologique pour contrôler des insectes nuisibles ont été effectués, avec un taux de succès moyen de 10-15% ; environ 1100 relâchés de 365 espèces d'insectes et de champignons sur 133 espèces de plantes envahissantes et mauvaises herbes, avec un taux de succès moyen de 25% (Follett and Duan, 2000, Perrings *et al.*, 2000).

#### **II.1.2. Utilisation des bactéries comme 'Biofertilisants' (PGPR, production d'hormones et solubilisation du phosphore, bactéries dénitrifiantes dans le sol)**

Les effets bénéfiques des rhizobactéries sur la croissance végétale résultent de différents mécanismes exercés par les PGPR (Plant Growth Promoting Rhizobacteria) dont les modes d'action sont directs ou indirects. Les mécanismes indirects sont, en général, ceux qui se produisent en dehors de la plante, tandis que les mécanismes directs sont ceux qui se produisent à l'intérieur de la plante et affectent directement leur métabolisme. Ces mécanismes (Figure 19) pouvant être actifs simultanément ou séquentiellement à différentes étapes de la croissance des plantes sont:

- 1- La solubilisation des phosphates, la fixation de l'azote et les minéraux nutritifs, rendant ces aliments disponibles pour la plante.

2- La production de phytohormones telles que l'acide d'indole-3-acetic (IAA)  
 3- La répression des microorganismes pathogènes du sol (par la production du cyanure d'hydrogène, de sidérophores, d'antibiotiques, et/ou de la concurrence pour les nutriments) (Gupta *et al.*, 2000). De plus, les PGPR peuvent contribuer dans l'amélioration de la résistance de la plante aux stress biotiques et abiotiques (la salinité, la sécheresse et à la toxicité des métaux lourds) sur la base de leur activités. Somers *et al.* (2004) ont classé les PGPR comme biofertilisants (augmentant la disponibilité des éléments nutritifs aux plantes), phytostimulateurs (améliorant la croissance des plantes, habituellement par la production de phytohormones), rhizoremédiateurs (dégradants les polluants organiques) et biopesticides (lutte contre les maladies, principalement par la production de métabolites antibiotiques et antifongiques).



**Figure 19:** Promotion de la croissance des plantes par les PGPR (Khan *et al.*, 2009)

### II.1.2.1. Définition de Biofertilisant

Ce sont des préparations liquides fermentées qui nourrissent le sol et les plantes. Elles sont composées d'éléments nutritifs, de bactéries et champignons entre autres. En fonction des ingrédients, elles peuvent également avoir un rôle de stimulation des

défenses naturelles des plantes (ou stimulateur de croissance) ainsi qu'un rôle de lutte contre les maladies et les ravageurs.

### **II.1.2.2. Rhizobactéries promotrices de la croissance des plantes (PGPR) en tant qu'agents de lutte biologique**

Dans le sol, l'activité microbienne est intense en particulier dans la zone sous l'influence des racines, la rhizosphère, qui contient plus d'un million de microorganismes par gramme de sol. Les micro-organismes trouvent en effet dans ce milieu des substrats énergétiques libérés par les racines et nécessaires à leur métabolisme : sucres, acides aminés, acides organiques, hormones, etc. Certains de ces micro-organismes, principalement des bactéries, sont capables de coloniser efficacement les systèmes racinaires et influencent de manière bénéfique la plante en stimulant sa croissance et/ou en la protégeant contre des infections par des agents phytopathogènes. Ces bactéries de la rhizosphère sont alors reprises sous le terme PGPR (Plant Growth-Promoting Rhizobacteria). La plupart des souches bactériennes exploitées comme biopesticides appartiennent aux genres *Agrobacterium*, *Bacillus* et *Pseudomonas*.

#### **II.1.2.2.1. Mode d'action des PGPR en lutte biologique**

##### **a- Interactions directes PGPR/Pathogène**

###### **- Compétition pour l'espace et les nutriments**

Dans certains cas, une réduction de la maladie peut être associée à une colonisation importante des racines par les bactéries bénéfiques, ce qui réduit le nombre de sites habitables pour les microorganismes pathogènes et par conséquent, leur croissance (Piano *et al.*, 1997).

Le PGPR doit être présent sur les racines en nombre suffisant pour avoir un effet bénéfique sur les plantes et pour être capable d'instaurer une compétition pour les nutriments dans la rhizosphère (Haas et Defago, 2005). Outre la vitesse de croissance intrinsèque, les autres propriétés renforçant le potentiel colonisateur d'une souche sont la mobilité (présence d'un flagelle) (Jofre *et al.*, 2004), le chimiotactisme et la faculté d'utilisation des composés excrétés par les racines en tant que sources de carbone et d'azote (Berggren *et al.*, 2001; Gupta, 2003). Exp : effet de la compétition pour l'espace

concerne la lutte biologique contre le pathogène *Ceratocytis paradoxa* responsable de la maladie de la pourriture noire sur les fruits d'ananas. Il a été observé que cette maladie a seulement été réduite dans les fruits prétraités avec l'eau de lavage de fruits d'ananas contenant la levure *Pichia guilliermondii* (Reyes *et al.*, 2004).

#### - **Compétition pour le fer et production de sidérophores**

Un cas particulier de compétition pour les nutriments repose sur la compétition pour le fer. Les micro-organismes ont la capacité de synthétiser des siderophores qui sont des molécules chélatrices du fer nécessaire à leur croissance. Ces composés ont une grande affinité pour le  $Fe^{3+}$  (Neilands *et al.*, 1987). En s'appropriant les ions ferriques présents dans la rhizosphère, ils les rendent ainsi non disponibles pour le champignon pathogène, ce qui provoque une diminution de sa croissance. Par exemple, certaines bactéries du genre *Pseudomonas* ont un grand pouvoir de chélation du fer. Elles peuvent reconnaître et utiliser les sidérophores produits par d'autres souches, alors que ces dernières ne sont pas capables d'utiliser le sidérophore qu'elles produisent (Ongena *et al.*, 2002).

#### - **Antibiose et parasitisme**

L'antibiose est probablement le mécanisme le plus connu et peut-être le plus important utilisé par les PGPR pour limiter l'invasion de pathogènes dans les tissus de la plante hôte. Il consiste en une inhibition directe de la croissance du pathogène via la production de métabolites aux propriétés antifongiques et/ou antibiotiques (Dong *et al.*, 2002). Les souches de *B. subtilis* produisent une variété de métabolites antifongiques puissants, par exemple : la zwittermycine-A, la kanosamine (Peypoux *et al.*, 1999), des lipopeptides des familles de la surfactine, de l'iturine et de la fengycine (Peypoux *et al.*, 1999; Rahman *et al.*, 2007) et encore des enzymes hydrolytiques ( $\beta$ -1,3-gluconase) qui peuvent dégrader les parois cellulaires fongiques (Leelasuphakul *et al.*, 2006). D'autre part chez *Pseudomonas*, d'autres molécules antifongiques comme le HCN, la viscosamide, la pyoluteorine, le 2,4-diacetylphloroglucinol, la pyrrolnitrine, les phenazines et les butyrolactones sont impliquées dans le bio-contrôle.

Ainsi, la capacité de certaines bactéries à parasiter et à dégrader les spores des pathogènes à travers la production d'enzymes détruisant la barrière cellulaire a été démontrée.

### - Composés volatiles

Selon Howell *et al.* (1988) ont énoncés l'inhibition de *Pythium* par *Enterobacter cloacae* par la production de substances volatiles telles que l'ammoniac. Il est produit comme un intermédiaire du catabolisme des acides aminés des exsudats racinaires assimilés par la bactérie.

Un autre métabolite secondaire produit par certaines rhizobactéries, est l'acide cyanhydrique (HCN). Bien que le cyanure soit un inhibiteur métabolique général, il est synthétisé, excrété et métabolisé par certains organismes, y compris les bactéries par la voie de décarboxylation oxydative en utilisant la glycine, le glutamate ou la méthionine comme précurseurs (Castric, 1977; Curl et Truelove, 1986). Son rôle est d'éviter la prédation ou la compétition. L'HCN joue un rôle dans la lutte biologique contre les mauvaises herbes (Heydari *et al.*, 2008). La production de HCN est une activité commune chez *Bacillus* (50%) dans le sol rhizosphérique (Ahmad *et al.*, 2008).

D'autres composés volatiles, le 2,3-butanediol et l'acétoïne libérés par des PGPR entraînent une amélioration appréciable de la croissance de la plante en induisant sa résistance aux maladies (Ryu *et al.*, 2003).

### b- Interactions PGPR/plante

#### - Promotion de la croissance de l'hôte

Certaines souches de PGPR des genres *Pseudomonas*, *Bacillus*, *Paenibacillus*, *Rhodobacter*, *Azospirillum* ont récemment été décrites pour leur effet direct positif sur la croissance des plantes et l'augmentation du rendement des cultures (légumes, pomme, citron, myrtille, mûre, abricot, framboise, betterave à sucre, etc.). Les PGPR peuvent favoriser la croissance des plantes hôtes par divers mécanismes tels que la fixation d'azote (N<sub>2</sub>) et la solubilisation d'oligoéléments tels que le phosphate (P), l'inhibition de la synthèse d'éthylène par la plante, la synthèse des phytohormones ou de vitamines, et en diminuant la toxicité des métaux lourds.

#### - Renforcement de la capacité défensive de l'hôte

D'autre part, certaines souches de PGPR peuvent protéger les plantes d'une façon indirecte par la stimulation de mécanismes de défense inductibles dans la plante, ce qui peut rendre l'hôte beaucoup plus résistant à l'agression future par des agents

pathogènes. Ce phénomène a été nommé «Résistance Systémique Induite» (ISR, Induced Systemic Resistance).

### c- **Phyostimulation**

#### ➤ **Production d'hormones de croissance**

Plusieurs étapes de la croissance et du développement des plantes telles que l'élongation et la division cellulaires, la différenciation tissulaire, et la dominance apicale sont régulées par des hormones. De nombreuses phytohormones sont produites par les PGPR. Les mécanismes directs des PGPR sur la croissance des plantes comprennent la production d'hormones telles les auxines, les cytokinines, les acides gibbérelliques et l'abaissement du taux d'éthylène chez la plante (Costacurta et Vanderleyden 1995 ; Glick, 1995; Lucy *et al.*, 2004).

Les régulateurs de croissance des végétaux sont les substances qui influencent les processus physiologiques de la plante à de très faibles concentrations et modifient ou contrôlent un ou plusieurs événements spécifiques du métabolisme d'une plante. Les hormones végétales sont des messagers chimiques affectant la capacité de la plante à réagir à son environnement (Spaepen *et al.*, 2007)

#### - **Acide indole acétique (AIA)**

L'AIA est le plus important du groupe des auxines (Ashrafuzzaman *et al.*, 2009) et quantitativement le plus produit par les PGPR. Il fonctionne comme une molécule signal importante dans la régulation du développement des plantes, agissant sur l'organogenèse, les réponses trophiques, les réponses cellulaires telles que l'expansion des cellules, la division, la différenciation et la régulation des gènes (Ryu et Patten, 2008).

Diverses espèces bactériennes possèdent la capacité de produire de l'AIA. Une grande proportion (80%) de bactéries colonisant la rhizosphère le synthétise (*Bacillus* et *Paenibacillus* (Kloepper *et al.*, 2004 ; Idris *et al.*, 2007)).

#### - **Cytokinines et gibbérellines**

**Les cytokinines** sont des aminopurines N6-substituées qui jouent un rôle-clé dans un grand nombre de processus physiologiques tels que la division cellulaire des plantes,

l'interruption de la quiescence des bourgeons dormants, l'activation de la germination des graines, la promotion de la ramification, la croissance des racines, l'accumulation de la chlorophylle, l'expansion des feuilles et le retard de la sénescence (Salisbury et Ross, 1992). En outre, les cytokinines régulent l'expression du gène codant pour l'expansine, protéine qui induit le relâchement des parois cellulaires des plantes et facilitant l'expansion de la cellule végétale et provoquant sa turgescence, ceci a un impact à la fois sur la taille et la forme des cellules (Downes *et al.*, 2001).

De nombreuses PGPR y compris *Agrobacterium tumefaciens*, *Azotobacter*, *Azospirillum*, *Rhizobium*, *Bacillus* et *Pseudomonas* spp. sont productrices de cette hormone (Nieto et Frankenberger 1989; Timmusk *et al.*, 1999).

Les **gibbérélines** sont synthétisées par les plantes supérieures, les champignons et les bactéries ; ce sont des acides diterpénoïques constitués de résidus isopréniques. Un nombre important (136) de gibbérélines différentes sont identifiées et caractérisées. Elles affectent la division et l'allongement cellulaires et sont impliquées dans plusieurs processus de développement tels que la germination des graines, la floraison, la fructification et le retard de la sénescence dans de nombreux organes d'une large gamme d'espèces végétales (MacMillan, 2002). Les gibbérélines sont également impliquées dans la promotion de la croissance de la racine car elles régulent l'abondance des poils racinaires (Bottini *et al.*, 2004). La capacité des bactéries à synthétiser des substances de gibbérélines a été initialement décrite chez *A. brasilense* (Tien *et al.*, 1979) et *Rhizobium* (Williams et de Mallorca, 1982 ) puis chez différents genres bactériens qui peuplent le système racinaire de la plante, y compris *Azotobacter*, *Arthrobacter*, *Azospirillum*, *Pseudomonas*, *Bacillus*, *Acinetobacter*, *Flavobacterium*, *Micrococcus*, *Agrobacterium*, *Clostridium*, *Burkholderia*, et *Xanthomonas* (Mitter *et al.*, 2002; Tsakelova *et al.*, 2006; Joo *et al.*, 2009).

#### - Rôle de l'éthylène

L'éthylène gazeux produit de manière endogène par les plantes a plusieurs effets sur leur développement et agit comme molécule secondaire de signal dans l'induction des défenses de la plante (Ecker, 1995). L'éthylène est impliqué dans beaucoup de processus physiologiques, comme la germination de la graine, la différenciation de tissus, la formation et l'élongation de la racine, le développement latéral des bourgeons,

le fleurissement, l'ouverture de la fleur, la sénescence d'organe, la maturation de fruit et l'abscission de la feuille et du fruit (Frankenberger et Arshad, 1995). A des concentrations élevées, l'éthylène affecte négativement de nombreuses étapes physiologiques des plantes. Une augmentation de la production d'éthylène agissant comme hormone sensitive stimule la maturation des fruits et le vieillissement des fleurs. Ces symptômes sont associés à une perte de la chlorophylle des feuilles, une dégradation des protéines et des ARN et une perte de pigmentation des fleurs (Oldroyd *et al.*, 2001; VanLoon *et al.*, 2006). De plus, l'éthylène, à forte concentration, empêche le développement des nodules de la luzerne (*Medicago sativa*) (Glick *et al.*, 2007) et des pois (*Pisum sativum*) (Cheng *et al.*, 2008) et affaiblit la défense de la plante contre des pathogènes (Wang *et al.*, 2000).

- **Aminocyclopropane-1-carboxylate (ACC) désaminase**

Un nouveau mécanisme de promotion de la croissance des plantes impliquant l'éthylène est proposé (Burdman *et al.*, 2000). Certaines PGPR produisent de l'ACC désaminase, une enzyme qui pourrait cliver l'ACC, le précurseur immédiat de l'éthylène dans la voie de biosynthèse de l'éthylène chez les plantes. L'activité de l'ACC désaminase diminuerait la production d'éthylène et favoriserait un allongement des racines. Les PGPR produisant cette enzyme soulageraient ainsi la plante de plusieurs stress causés par des infections, l'absorption de métaux lourds, la salinité élevée et même la sécheresse (Glick *et al.*, 1998). Elle intervient dans la régulation de l'éthylène chez les plantes. Les PGPR s'attachent aux racines et métabolisent les exsudats racinaires tels que le tryptophane et le transforment en auxines particulièrement en AIA. Cet AIA rhizobactérien ainsi que l'AIA endogène de la plante peuvent induire l'activité de l'ACC-synthase qui produit de l'ACC (Penrose et Glick, 2001).

Une partie de l'ACC de la plante est excrétée et dégradée par l'ACC-désaminase des rhizobactéries en ammoniacque et  $\alpha$ -cétobutyrate, composés rapidement métabolisés par les bactéries (Holguin et Glick, 2001) par conséquent la diminution de l'ACC entraîne l'abaissement du taux d'éthylène dans la plante.

### II.1.2.3. Solubilisation des phosphates

Le phosphore (P) est l'un des éléments importants sur terre. En effet, il s'agit de l'élément essentiel du métabolisme énergétique de toutes les formes de vie. Le P est indispensable pour les cellules vivantes vu qu'il est un composant principal de l'ADN, de l'ARN, de l'ATP et des phospholipides (composant majeur des membranes cellulaires). Il est conséquemment impliqué dans la division cellulaire, la transmission de l'information génétique, le transfert et le stockage d'énergie et aussi dans le système photosynthétique. Toutes ces propriétés font de cet élément l'un des trois macronutriments nécessaires pour la croissance et le développement des plantes (avec l'azote (N) et le potassium (K)), généralement présents dans les engrais chimiques.

Le P est un élément peu mobile dans le sol (Holford, 1997). Certaines formes de P sont insolubles ou ont une solubilité modérée. Dans la nature, le P existe sous forme d'orthophosphate ( $\text{PO}_4^{3-}$ ) plutôt que sous sa forme élémentaire puisqu'il réagit facilement avec l'oxygène. Au niveau du sol, les deux principales formes d'ions phosphatés sont le  $\text{H}_2\text{PO}_4^-$  (condition acide) et le  $\text{HPO}_4^{2-}$  (condition alcaline).

De nos jours, l'agriculture dépend essentiellement de l'apport régulier d'engrais phosphaté. Cet apport indispensable en P fait de cette ressource non renouvelable un produit non substituable.

- Le phosphore est le poly-élément le plus souvent limitant dans les sols naturels. Il s'y trouve principalement sous des formes insolubles, organiques (phytate de calcium; le phytate est un hexaphosphate d'inositol; l'inositol est un alcool cyclisé à six carbones) et minérales (hydroxyapatite  $\text{Ca}_{10}(\text{OH})_2(\text{PO}_4)_6$  dans les sols calcaires, strengite  $\text{FePO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  et variscite  $\text{AlPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  dans les sols acides). La teneur de la solution du sol en  $\text{H}_2\text{PO}_4^-$  et  $\text{HPO}_4^{2-}$  est toujours très faible et la mobilité de ces ions est réduite.

#### II.1.2.3.1. Mobilisation du phosphore dans le sol

Bien que le contenu en P total (inorganique et organique) des sols ne dépasse généralement pas les 0,12%, seulement 0,1% de ce P total existe sous la forme inorganique soluble facilement assimilable par les plantes. Quant au P organique, sa contribution au P total, peut dépasser les 50% dans certains sols. Il peut exister sous plusieurs formes comme les phytates et polyphosphates faiblement biodisponibles et

formant des complexes avec des cations, à l'origine de certaines limitations en minéraux importants pour la nutrition des plantes.

La déficience en P soluble limite la productivité végétale de plusieurs sols agricoles de manière universelle. Cependant la protection de l'environnement exige l'utilisation de pratiques durables de gestion, faisant usage de peu d'intrants chimiques. Par ailleurs, l'application de fertilisants s'effectue toujours sans tenir compte des mycorhizes et de la microflore présente au niveau de la mycorrhizosphère, ce qui conduit à des applications excessives et souvent néfastes. Ainsi, une énorme quantité de P est immobilisée dans les sols, ce qui présente un risque potentiel pour l'environnement si ce sol est transféré par érosion dans les cours d'eau (Plassard et *al.*, 2015).

#### **II.1.2.3.2. Solubilisation**

La solubilisation microbienne du phosphate joue un rôle important dans la conversion du P insoluble en P soluble. En effet, il a été démontré que certains microorganismes du sol sont impliqués dans la solubilisation des phosphates insolubles. Ces microorganismes bénéficient directement du P biodisponible nécessaire pour leur croissance. De même d'autres organismes sont en mesure de profiter du P solubilisé, tels que les champignons et les plantes supérieures. Notons que ces microorganismes produisent des acides organiques et relâchent des protons, qui à travers leurs groupements carboxyliques, chélatent les cations fixés aux phosphates insolubles ce qui permet de les convertir en formes solubles (mono et dibasiques).

#### **II.1.2.3.3. Minéralisation**

Dans le sol, les plantes et les détritux animaux constituent un énorme réservoir de P organique qui est généralement indisponible pour la plupart des organismes vivants. Pour devenir biodisponible, le P contenu dans la matière organique doit tout d'abord être minéralisé en phosphate.

Le processus de minéralisation, au cours duquel les complexes de P organique sont convertis en minéraux phosphatés, est un processus modulé grâce à l'activité de certaines enzymes microbiennes, notamment les phosphatases qui sont classées en fonction du type des groupements carbonés liés aux phosphates qu'elles clivent.

Les phosphatases ont des exigences spécifiques vis-à-vis de certains substrats. Les catégories les plus courantes des phosphatases microbiennes contribuant à la minéralisation du P comprennent les phosphomonoestérases, les phosphodiesterases, les nucléases, et les nucléotidases, ainsi que les phytases (Mackey and Paytan, 2009).

#### **II.1.2.3.4. Immobilisation**

Lors du processus de l'immobilisation, le « P » labile est séquestré et retiré de l'environnement pour une période de temps. Les procédés d'immobilisation peuvent être regroupés en deux catégories : La première catégorie, l'immobilisation transitoire ou l'assimilation cellulaire, comprend tous les processus de séquestration du P dans les cellules vivantes microbiennes et est rapidement réversible à la mort cellulaire. La deuxième catégorie appelée la formation de minéraux phosphatés, englobe les processus de minéralisation influencé par l'activité microbienne qui génèrent des minéraux contenant du P : il s'agit de la phosphogénèse (Mackey and Paytan, 2009).

#### **II.1.2.4. Bactéries dénitrifiantes dans le sol**

Dans la biosphère, le plus important stock d'azote (1.000.000 milliards de tonnes) se trouve sous forme gazeuse ( $N_2$ ) dans l'atmosphère. Seuls certains procaryotes sont capables de fixer l'azote atmosphérique. Il existe également d'importants réservoirs d'azote inutilisable, présent dans les roches ignées et sédimentaires sous forme d'ammoniaque non échangeable. L'azote fixé, azote organique (organismes vivants, matière morte et humus) et ions inorganiques (ammonium, nitrite et nitrate) pouvant être utilisés par tous les organismes vivants est le stock le plus limité. Il est présent dans les milieux aqueux sous formes dissoutes, complexées ou gazeuse.

L'azote représente 78% de l'atmosphère et 4 à 6% du poids sec d'un animal. Il constitue entre 16 et 23% des protéines cellulaires et environ 12% des acides nucléiques. L'ensemble des réactions biologiques de croissance et de maintenance requiert la présence de l'élément azote. Le cycle de l'azote est caractérisé par trois réservoirs : azote organique (acides aminés, protéines...), azote minéral ( $NO_2^-$ ,  $NO_3^-$ , etc.) et composés gazeux ( $N_2$ ,  $NH_3$ ,  $N_2O$ , etc.) (Patureau, 1995) (Figure 20).

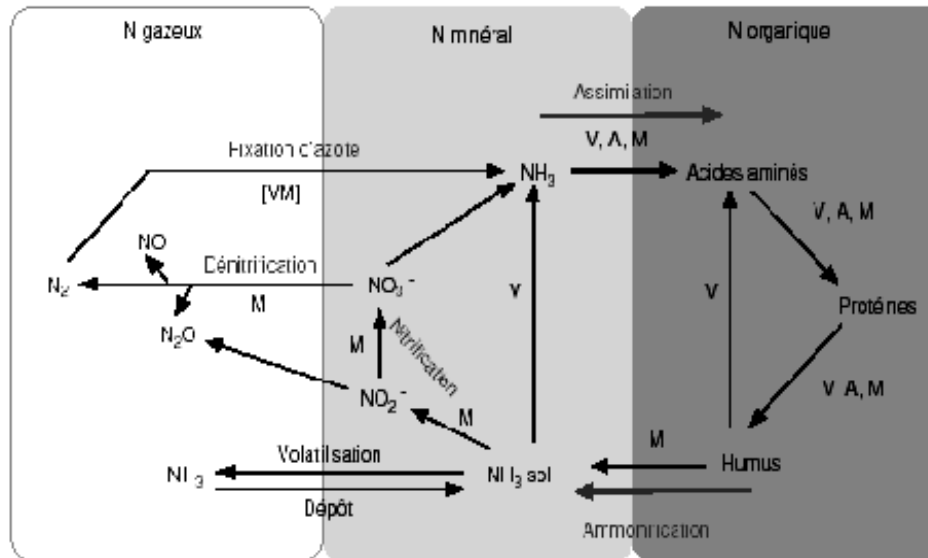


Figure 20 : Cycle de l'azote

L'azote est un constituant essentiel pour toutes les formes de vie, aussi bien dans les écosystèmes aquatiques que terrestres (l'homme prenant part à ces processus). De façon générale, l'azote est un facteur limitant de la croissance pour les règnes animal et végétal dans les écosystèmes naturels (Portejoie *et al.*, 2002).

L'azote est un élément omniprésent. Il intervient dans le métabolisme de tous les organismes, qu'ils soient microbiens, végétaux ou animaux. Il décrit un cycle biogéochimique qui relie ses différentes formes  $N_2$ ,  $NO_2^-$ ,  $NO_3^-$ ,  $NH_4^+$  et N-organique. Une respiration des nitrates (ou dénitrification dissimilatrice), qui correspond au processus par lequel le  $NO_3^-$  est réduit en  $N_2O$  ou en  $N_2$ , cette dernière a lieu en conditions anaérobies, lorsque le nitrate remplace l'oxygène comme accepteur terminal d'électrons.

La dénitrification est un processus très complexe et quarante gènes au moins sont impliqués dans sa réalisation. La transformation des nitrates en azote gazeux s'effectue selon une chaîne de réactions enzymatiques, chaque étape de la transformation étant catalysée par une enzyme distincte (Zehnder et Stumm, 1988) :

composé	$NO_3^-$	$NO_2^-$	$NO$	$N_2O$	$N_2$
nombre d'oxydation	+5	+3	+2	+1	0
enzyme	nitrate réductase	nitrite réductase	oxyde nitrique réductase	oxyde nitreux réductase	

#### II.1.2.4.1. Conditions de réalisation de la dénitrification

La dénitrification nécessite :

- Présence de bactéries possédant la capacité de métaboliser les nitrates.
- Présence de donneurs d'électrons appropriés comme les composés organiques ou les composés soufrés.
- Présence de phosphates.
- Etablissement de conditions anaérobies strictes ou des concentrations faibles en oxygène.
- Présence de substrats azotés,  $\text{NO}_3^-$ ,  $\text{NO}_2^-$ ,  $\text{NO}$  et  $\text{N}_2\text{O}$  comme accepteurs terminaux d'électrons.

#### II.1.2.4.2. Processus de la dénitrification

La dénitrification est un processus biologique qui participe au cycle de l'azote. Même si certains eucaryotes comme les champignons sont capable de dénitrifier, ce processus est principalement assuré par les bactéries (Zumft, 1997). Ce processus hétérotrophe, véritable « respiration des nitrates », est une alternative à la respiration aérobie : en présence de faibles concentrations d'oxygène ou en son absence, les nitrates jouent le rôle d'accepteur final d'électron.

La dénitrification consiste en une réduction séquentielle, en quatre étapes, des nitrates en azote gazeux. Dans chaque étape différentes enzymes interviennent. La première étape consiste en la transformation des nitrates en nitrites. Elle est catalysée par deux types de molybdo-enzymes : une nitrate-réductase liée à la membrane (Nar) et une nitrate-réductase periplasmique (Nap).

La réduction des nitrites en oxyde nitrique est catalysée par deux enzymes de structure et métaux prosthétiques différents : l'une avec du cuivre (Cu-Nir) et l'autre avec du cytochrome *cd1* (Cd-Nir). L'étape suivante consiste en la transformation de l'oxyde nitrique en protoxyde d'azote. Cette étape est aussi catalysée par deux enzymes : l'une reçoit l'électron du cytochrome c ou de la pseudoazurin (cNor) et l'autre d'un pool de quinol (qNor). La dernière étape de la dénitrification, la transformation du protoxyde d'azote en azote gazeux, est une étape pour laquelle on ne connaît qu'une seule enzyme (Nos) localisée dans le périplasme des bactéries Gram-. L'identification

de cette enzyme a constitué une découverte méthodologique majeure dans l'étude de la dénitrification (Richardson *et al.*, 2001).

## **II.2. Santé et industrie pharmaceutique**

### **II.2.1. Production d'antibiotiques (Exemple : Actinomycètes) et produits pharmacologiques (Alcaloïdes et immunosuppresseurs).**

#### **II.2.1.1. Importance et application des actinobactéries**

Les actinobactéries représentent une grande proportion de la biomasse microbienne du sol. Ils ont la capacité de produire une large variété de molécules bioactifs entre autre les antibiotiques et des enzymes extracellulaires (Loucif, 2011). En biotechnologie microbienne, les actinobactéries jouent un rôle primordial dans les domaines, agronomique, alimentaire et environnemental (Nouioui, 2014), ainsi que le domaine pharmacologique. La recherche de nouveaux actinomycètes constitue une composante essentielle à la découverte de médicaments à base de produits naturels et à large spectre d'activité biologique, tels que les antibiotiques antibactériens et antifongiques et les substances toxiques, cytotoxiques, neurotoxiques, antimétaboliques, antivirales et anticancéreuses (Chen *et al.*, 2010). De nouveaux objectifs ont été ajoutés au dépistage général: la recherche de nouvelles molécules actives contre le sida, l'immunosuppression, la maladie d'Alzheimer, le processus de vieillissement et certaines maladies tropicales ; ces objectifs visent à la découverte de nouveaux médicaments (Parthasarathi *et al.*, 2011).

La fonction écologique principale des actinobactéries au sein des écosystèmes est la décomposition des matières organiques complexes (Prescott *et al.*, 2010). Cette activité est due à la présence d'une large gamme d'enzymes hydrolytiques, comme les protéases, les nucléases, les lipases, etc. (Prakash *et al.*, 2012), ainsi que les enzymes d'hydrolyse des sucres complexes, tel que la cellulose et l'hémicellulose. De même, certaines espèces d'actinobactéries attaquent la carapace chitineuse des cadavres d'insectes (Maier *et al.*, 2009).

Au niveau de la rhizosphère, les actinomycètes forment des relations symbiotiques avec les racines des plantes en contribuant à la promotion de leur croissance par des effets directs et indirects (Barreto *et al.*, 2008). Parmi les effets directs, la solubilisation du

phosphate, la fixation d'azote, et la production de phytohormones, (El-Mehalawy *et al.*, 2004). Tandis que les effets indirects, ils peuvent être dus au contrôle des agents phytopathogènes par la production de métabolites secondaires, tels que les antibiotiques (Barreto *et al.*, 2008), ou par la compétition nutritionnelle vis-à-vis des agents pathogènes (Getha *et al.*, 2005).

### **II.2.1.2. Production d'antibiotiques**

Par leur diversité écologique, leur hétérogénéité biochimique et leur capacité exceptionnelle à produire des métabolites secondaires, les actinobactéries sont considérées comme des candidats potentiels pour la recherche de divers composés intéressants en industrie pharmaceutique, agro-alimentaire, agricole et autres. Cependant, le plus grand intérêt des actinobactéries reste leur grande capacité à produire des antibiotiques qui peuvent potentiellement détruire ou inhiber divers microorganismes. D'ailleurs, 45% des antibiotiques connus, sont naturellement issus des actinobactéries et plus précisément du genre *Streptomyces* (Sibanda *et al.*, 2010). Parmi les antibiotiques qui ont des applications thérapeutiques, on peut citer, les aminoglycosides, les anthracyclines, les glycopeptides, les bêta-lactamines, les tétracyclines, les macrolides, les nucléosides, etc. (Messoudi, 2013).

Les actinomycètes ont fourni un nombre considérable de composés bioactifs de haute valeur commerciale, et sont recherchés de façon routinière dans le but de découvrir de nouvelles substances bioactives (Vijayakumar *et al.*, 2007). Le Tableau VII, résume les principaux intérêts.

**Tableau VII :** Importance thérapeutique de certains antibiotiques produits par le genre *Streptomyces* (Chater, 2006).

Organismes ou maladie ciblée	Antibiotiques	Organismes producteurs
Typhoïde	Chloramphénicol	<i>Streptomyces venezuelae</i>
Tuberculose et lèpre	Rifamycine	<i>Amycolatopsis (Streptomyces medeteranei)</i>
<i>Staphylococcus aureus</i> (SARM)	Vancomycine	<i>Amycolatopsis (Streptomyces orientalis)</i>
Cancer	Daunomycine	<i>Streptomyces coeruleorubidus</i>
Pathogènes résistants à la pénicilline	Acide clavulorique	<i>Streptomyces clavuligerus</i>

## II.2.2. Bactéries probiotiques

Le corps humain est habité par un grand nombre de bactéries, virus et organismes eucaryotes unicellulaires vivant en symbiose, coexistant avec leur hôte et constituant la microflore, également appelée microbiote. Cet écosystème microbien contiendrait, en moyenne  $10^{14}$  bactéries (soit dix fois plus que le total des cellules de notre corps) avec plus de 500 à 1 000 espèces différentes (Sommer et Backhed, 2011). Le microbiote colonise chaque surface du corps humain exposé à l'environnement extérieur comme la peau, l'appareil génito-urinaire, l'appareil respiratoire et l'appareil gastro-intestinal qui est de loin le plus colonisé. A lui seul, le côlon représente plus de 70% des bactéries du corps humain car il est riche en molécules utilisées comme nutriments (prébiotiques) par les bactéries.

### II.2.2.1. Définitions

**Probiotiques :** Microorganismes vivants qui, lorsqu'ils sont administrés en quantité adéquate, ont des effets bénéfiques sur la santé de l'hôte.

**Prébiotiques :** Selon Bengmark et Martindale (2005), les prébiotiques sont des ingrédients alimentaires non digestibles qui ont un effet bénéfique sur leur hôte en

stimulant la croissance et/ou l'activité d'une ou d'un nombre limité de bactéries résidant dans le colon, améliorant ainsi la santé de leur hôte.

**Symbiotiques** : Produits qui contiennent à la fois des probiotiques et des prébiotiques

### II.2.2.2. Probiotiques

Les probiotiques sont des microorganismes vivants qui peuvent être intégrés dans différents types de produits, y compris les aliments, les médicaments et les suppléments alimentaires. Les espèces de *Lactobacillus* et *Bifidobacterium* sont les plus communément utilisées comme probiotiques, mais la levure *Saccharomyces cerevisiae* et quelques espèces d'*E. coli* et de *Bacillus* sont également utilisées comme probiotiques.

### II.2.2.3. Prébiotiques et symbiotiques

Les prébiotiques sont des substances alimentaires (consistant surtout en polysaccharides à l'exclusion de l'amidon et oligosaccharides non digestibles par les enzymes humaines) qui nourrissent un group sélectif de microorganismes vivant dans l'intestin. Ils stimulent la croissance des bactéries à effet positif aux dépens des autres à effets négatifs. A la différence des probiotiques, la plupart des prébiotiques sont utilisés comme ingrédients alimentaires dans les biscuits, les céréales, le chocolat, la pâte à tartiner et autres produits alimentaires, par exemple. Les prébiotiques les plus communs sont les oligosaccharides tel que les Fructo-oligosaccharides (FOS), les Galacto-oligosaccharides (GOS), l'Inuline, le lactulose, les oligosaccharides du lait maternel.

### II.2.2.4. Composition et répartition de microbiote intestinal

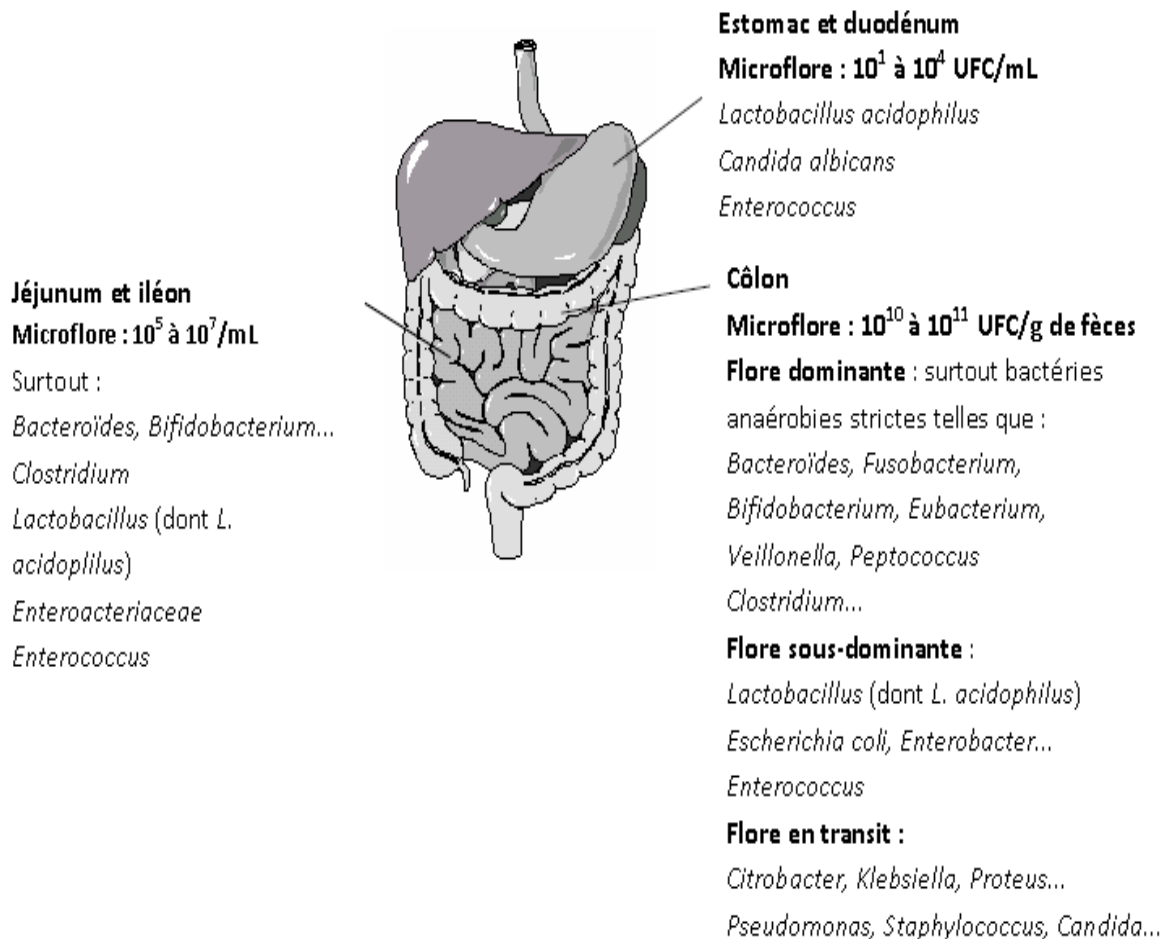
La composition de la flore (Figure 21) varie tout au long du tube digestif avec un gradient croissant dans le sens oral-anal. On distingue trois populations (Seignalet, 2004):

- **La flore dominante** qui est la plus nombreuse se localise essentiellement au niveau du colon où le taux de colonisation de chacun des groupes bactériens qui la compose atteint  $10^9$  à  $10^{11}$  germes/ g ou ml de contenu intraluminal avec très peu de variations interindividuelles, elle est composée essentiellement de germes anaérobies,

les familles principales représentant la flore dominante sont celles des *Bifidobactéries* et des *Lactobacilles*.

- **La flore sous-dominante**, se localise au niveau du colon à des taux inférieurs à ceux des germes de la flore dominante soit  $10^6$  à  $10^8$  germes / g ou ml de contenu intraluminal, elle est composée de germes aéro-anaérobies facultatifs (*Entérobactéries*, *Streptocoques*).

- **La flore de passage**, variable, transitoire, est normalement en faible concentration  $< 10^4 - 10^6$  germes/g. Elle est polymorphe composée de tous ce qui peut être ingérés (bactéries, virus, levures), et sauf circonstances pathologiques elle est incapable de s'implanter dans le tube digestif et d'exprimer son potentiel pathogène.

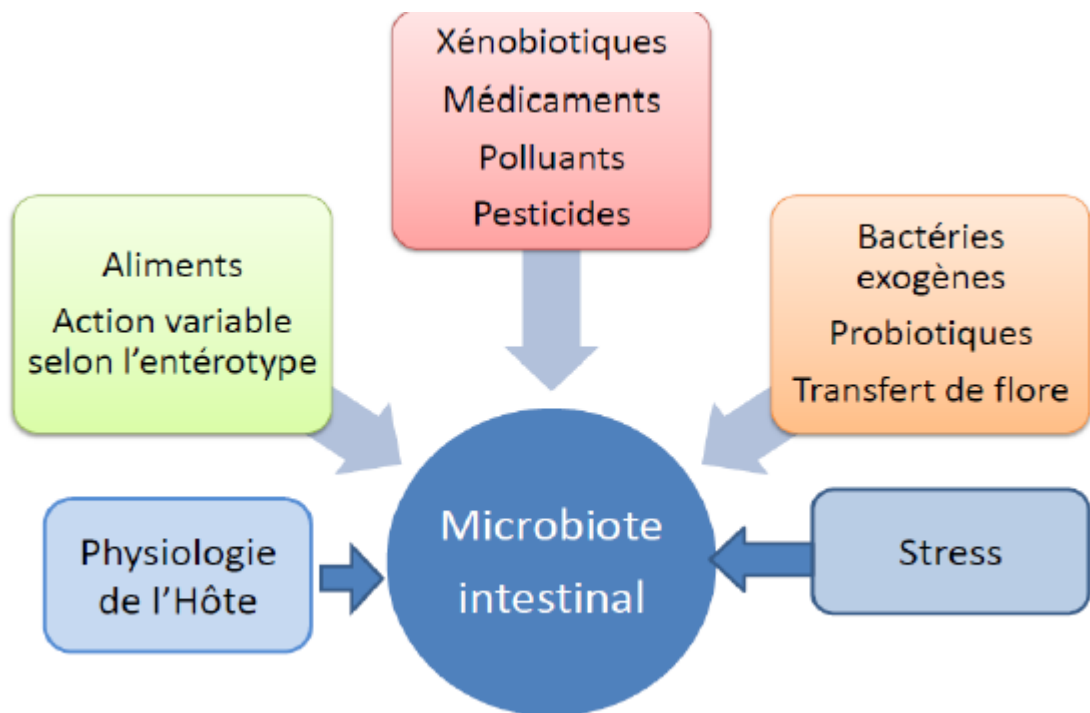


**Figure 21** : Répartition de la flore intestinale bactérienne le long de l'intestin

### II.2.2.5. Facteurs influençant l'implantation et la stabilité du microbiote intestinal

A la naissance, le tube digestif est stérile, le processus de colonisation bactérienne commence à partir de ce moment. Plusieurs facteurs influencent ce processus initial : l'âge gestationnel, le mode d'accouchement, la nutrition néonatale et des facteurs génétiques. Le microbiote évolue jusqu'à la deuxième année de vie puis atteint un état définitif qui restera stable jusqu'à l'âge adulte. Cette stabilité est toute relative puisque le microbiote est soumis à de multiples facteurs pouvant le modifier et le déréguler (régime alimentaire riche en graisses, consommation chronique d'alcool, tabagisme, prise d'antibiotiques (Figure 22). Ce dérèglement, défini par le terme de dysbiose, n'est autre qu'un déséquilibre entre les bactéries commensales et les bactéries pathogènes du microbiote.

La dysbiose s'avère être le dénominateur commun à plusieurs pathologies : l'obésité, les hépatopathies alcooliques et non alcooliques et enfin les maladies inflammatoires chroniques de l'intestin (Schwartz, 2004).



**Figure 22 :** Facteurs influençant la stabilité du microbiote intestinal  
(Bourlioux, 2013).

### II.2.2.6. Fonctions du microbiote intestinal

Il est paradoxal que constater que la communauté microbienne intestinale de chaque individu est fortement spécifique du sujet à l'échelon des espèces bactériennes, alors que les fonctions du microbiote sont hautement conservées entre individus. Le microbiote intestinal joue un rôle multiple et complexe, aussi bien sur le plan nutritionnel que sur le développement des défenses immunitaires de la muqueuse intestinale (Guarner et *al.*, 2011).

#### - **Fonctions métaboliques**

Ces agents microbiologiques interviennent à tous les stades du métabolisme des aliments (Métabolisme des glucides, Métabolisme des lipides, Métabolisme des protéines, Métabolisme minéral et vitaminique)

#### - **Fonctions trophiques** : croissance et différenciation des cellules épithéliales.

- **Effet barrière** : Le microbiote et les cellules épithéliales intestinales de l'hôte entretiennent une relation symbiotique dont la conséquence est un effet de barrière protectrice efficace. La flore résidente évite la colonisation de l'intestin par les bactéries potentiellement pathogènes et protège l'hôte de substances environnementales qui pourraient être nocives lors de leur présence dans le tube digestif.

#### - **Fonctions immunes**

Le microbiote intestinal stimule le développement du système immunitaire inné et adaptatif de l'hôte. Ce mécanisme sera détaillé dans le chapitre de mécanisme d'action des probiotiques.

### II.2.2.7. Effets bénéfiques pour la santé

Les probiotiques ont pour but d'aider la flore microbienne naturelle de l'intestin. Quelques préparations de probiotiques ont été utilisées pour prévenir la diarrhée due aux antibiotiques, ou comme part d'un traitement contre une dysbiose (déséquilibre au niveau de la flore bactérienne) liée aux antibiotiques. Les probiotiques affectent l'écosystème intestinal en stimulant les mécanismes immunitaires muqueux et en stimulant les mécanismes non immunitaires par antagonisme et par compétition avec les pathogènes potentiels (Tableau VIII).

**Tableau VIII :** Mécanismes des interactions probiotiques / hôte. La symbiose entre la flore microbienne et l’hôte peut être optimisée par une intervention pharmacologique ou nutritionnelle sur l’écosystème microbien de l’intestin en utilisant des probiotiques ou des prébiotiques (Guarner *et al.*, 2011).

<p><b>Probiotiques</b></p> <p><b>Effets immunologiques positifs</b></p> <p><b>Effets non immunologiques positifs</b></p> <p><b>Prébiotiques</b></p>	<ul style="list-style-type: none"> <li>· Activation des macrophages locaux pour augmenter la présentation des antigènes aux lymphocytes B et augmenter la production d’immunoglobulines sécrétoires A (IgA) à la fois sur un plan local et systémique</li> <li>· Modulation du profil des cytokines</li> <li>· Induction d’une hyporéponse aux antigènes alimentaires</li>   <li>· Digestion de la nourriture et compétition avec les pathogènes pour les nutriments</li> <li>· Modification du pH local de manière à créer un environnement défavorable aux pathogènes</li> <li>· Production des bactériocines pour inhiber les pathogènes</li> <li>· Eliminer les radicaux superoxydes</li> <li>· Stimulation de la production de mucus par l’épithélium</li> <li>· Amélioration de la fonction de la barrière intestinale</li> <li>· Compétition pour l’adhésion avec les pathogènes</li> <li>· Modification des toxines dérivées des pathogènes</li>   <li>· Effets métaboliques: production d’acides gras à chaîne courte, métabolisme des graisses, absorption de ions (Ca, Fe, Mg)</li> <li>· Renforcer l’immunité de l’hôte (production d’IgA, modulation des cytokines, etc.)</li> </ul>
---	---

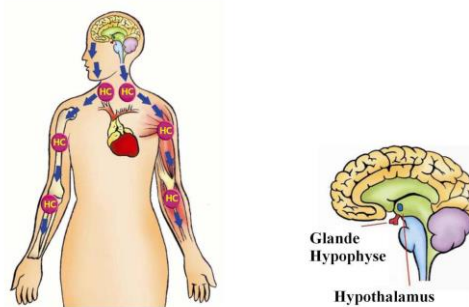
**I.2.3. Produits de bactéries génétiquement modifiés : hormone de croissance Humaine, Insuline.**

**II.2.3.1. Déficit en hormone de croissance**

Les hormones sont des « messagers » utilisés dans le corps avec chacune une action spécifique. Le rôle de l’hormone de croissance est de contrôler la croissance du corps. Elle contrôle aussi plusieurs métabolismes, ainsi que la répartition des masses musculaires et graisseuses et la qualité de l’os. Cette hormone est fabriquée dans le cerveau par la glande hypophyse sous le contrôle de l’hypothalamus et circule dans le sang.

Chez l'Homme, l'hormone de croissance (HC) ou somatotropine est une protéine de poids moléculaire 22000, constituée d'une seule chaîne polypeptidique de 191 acides aminés et possédant 2 ponts disulfure. Elle est sécrétée par la partie antérieure de l'hypophyse et stimule la croissance et la multiplication cellulaire chez les humains et les autres vertébrés.

Cette glande située à la base de notre cerveau. Une quantité trop faible de HC dans l'organisme d'un jeune enfant conduit au nanisme. On peut palier cette déficience en administrant l'hormone par injection aux enfants dont la taille est anormale mais seule de l'hormone de croissance d'origine humaine a alors un effet (Figure 23).



**Figure 23:** Organe producteur d'hormone de croissance

#### **II.2.3.1.1. Causes de l'insuffisance en hormone de croissance**

Il y a plusieurs causes d'un déficit en hormone de croissance mais la plupart sont encore inconnues. Il survient quand la glande hypophyse dans le cerveau ne produit pas des quantités adéquates d'hormone de croissance. Cela peut être secondaire à un dysfonctionnement ou une anomalie de développement de l'hypothalamus ou de l'hypophyse à la naissance. Cette lésion peut aussi être secondaire à une infiltration (maladie infiltrative, tumeur) au niveau de la glande hypophyse, ou secondaire à une irradiation du cerveau (radiothérapie), voire à un traumatisme crânien sévère. Dans certains cas l'affection peut être héréditaire. L'hormone de croissance est sécrétée sous forme de pics de sécrétion le jour et la nuit, et plus spécifiquement pendant le sommeil. Quand le taux d'hormone de croissance est très bas voire absent on dit que l'enfant présente un déficit complet (total) en hormone de croissance. Quand le taux d'hormone de croissance dans le sang est insuffisant on dit que l'enfant présente un déficit partiel en hormone de croissance. Le traitement des enfants présentant un déficit complet ou partiel en hormone de croissance doit être institué dans tous les cas.

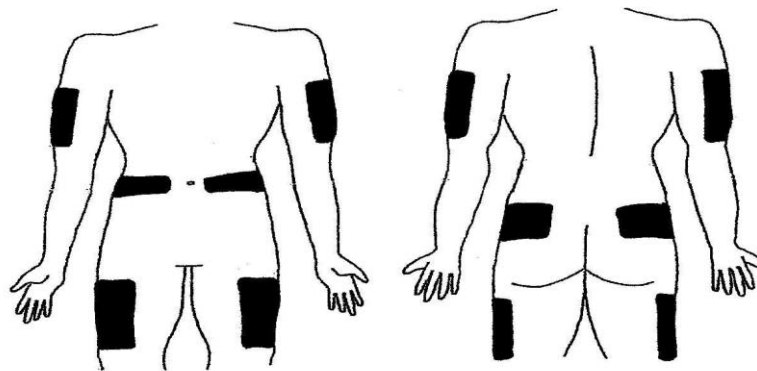
### II.2.3.1.2. Traitement du déficit en hormone de croissance

Il s'agit d'un traitement hormonal substitutif utilisant une forme synthétique de l'hormone de croissance. Cette forme synthétique est similaire à l'hormone naturelle humaine.

### II.2.3.1.3. Dose, la fréquence et heure du traitement

La dose d'hormone de croissance varie en fonction du poids de l'enfant. Ceci implique que la dose administrée à votre enfant va augmenter au fur et à mesure de la croissance de l'enfant.

Habituellement le traitement par l'Hormone de Croissance est prescrit quotidiennement (7jours/7), par des injections sous-cutanées. Il est préférable de faire les injections en fin de journée. Pour les sites d'injection recommandés, voir le schéma ci-joint :



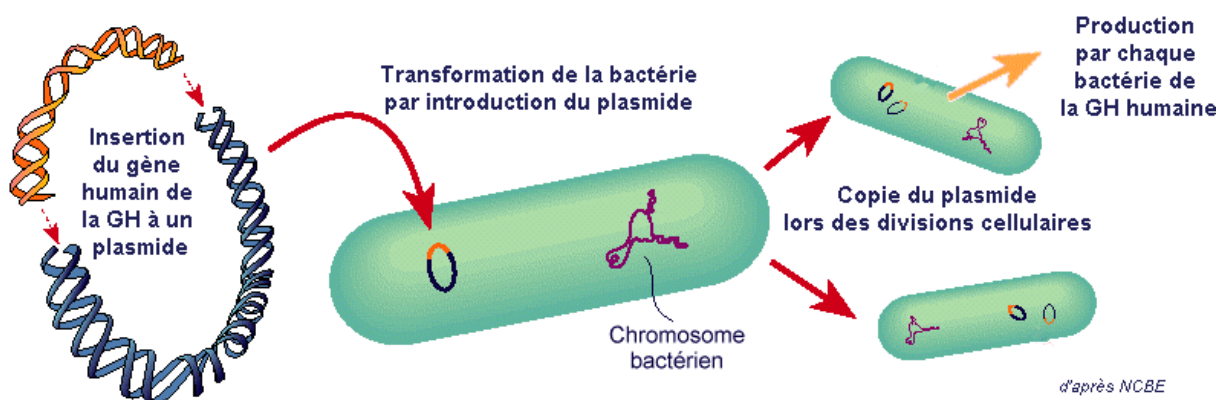
**Figure 24 :** Sites d'injection par l'hormone de croissance

Les sites d'injections (en gris sur le schéma) sont les bras, les cuisses, le haut des fesses, le ventre en évitant le nombril et 5 centimètres autour du nombril. Le ventre n'est utilisé que chez les enfants ayant plus d'un centimètre de tissu adipeux (gras). Pour éviter les lipodystrophies ("bosse" où le produit s'accumule sous la peau et diffuse moins bien dans le corps), il est recommandé de changer les sites d'injection tous les soirs. Choisir avec l'enfant au minimum 4 sites différents

Actuellement, les industries biotechnologiques produisent l'hormone de croissance par génie génétique. C'est la bactérie *Escherichia coli* qui est capable de

produire cette hormone. Une seule cuve contenant 500 litres produit la même quantité d'hormone de croissance que 35 000 hypophyses humaines.

Le fragment d'ADN humain contenant le gène de l'hormone de croissance ayant été identifié et isolé, il est inséré dans un plasmide qui est introduit dans la bactérie *Escherichia coli*. Les bactéries transgéniques ainsi obtenues, placées en culture sur un milieu approprié, dans un fermenteur, expriment ce gène et synthétisent de l'hormone de croissance identique à l'hormone de croissance humaine, que l'on récupère sans risque en vue des injections (Figure 25).



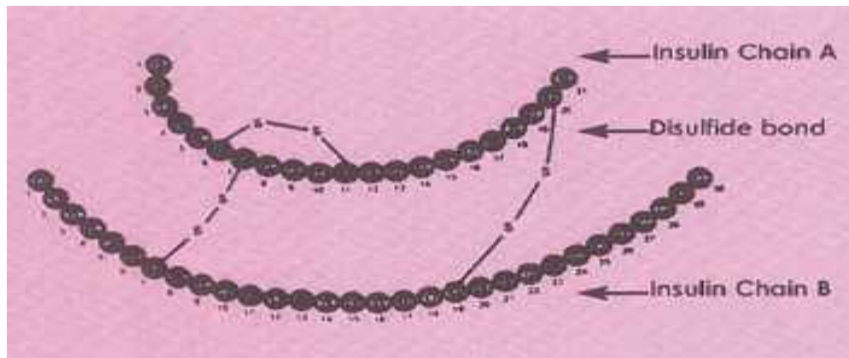
**Figure 25:** Production d'hormone de croissance par génie génétique

### II.2.3.2. Production d'insuline

L'hormone, produite et sécrétée par la cellule bêta du pancréas, règle l'utilisation et le stockage de la nourriture, en particulier les hydrates de carbone.

#### II.2.3.2.1. Structure

Chimiquement, l'insuline est une petite et simple protéine. Elle se compose de 51 acides aminés, dont 30 constituent une chaîne polypeptidique, et les 21 restant composent la deuxième chaîne. Les deux chaînes sont liées par des ponts bi-sulfuriques (Figure 26).



**Figure 26 :** Structure de l'insuline

### II.2.3.2.2. Technologie de recombinaison de l'ADN Dans la synthèse de l'insuline humaine

Les protéines recombinantes sont ainsi qualifiées dans la mesure où elles sont produites par des cellules dont l'ADN a été modifié par recombinaison génétique.

Au sens large, un système de production adapté à la fabrication d'une protéine recombinante donnée, est un processus biotechnologique qui s'appuie principalement sur :

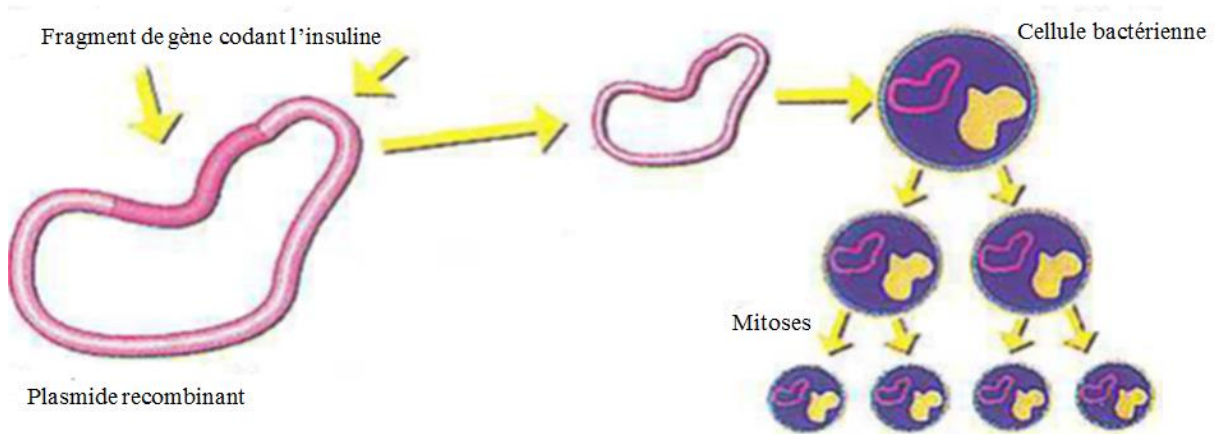
- l'emploi d'un vecteur d'expression (en général un plasmide), jouant le rôle de transporteur génétique du gène d'intérêt codant pour la protéine recherchée ;
- l'utilisation d'une cellule hôte, chargée d'exécuter les instructions fournies par le gène d'intérêt qui lui est inséré, dans l'objectif de synthétiser la protéine recherchée ;
- une phase de production proprement dite permettant de fabriquer les volumes de protéines souhaités ;
- enfin, une séparation et extraction de la protéine du milieu de culture, suivie par une purification de celle-ci.

### II.2.3.2.3. Etapes de la fabrication d'insuline

Aujourd'hui, suite à la découverte du gène codant l'insuline, cette hormone peut être fabriquée en quantité illimitée à l'aide du génie génétique. Le principe est le suivant :

Tout d'abord, il faut extraire l'ADN de cellules humaines saines. Ensuite, il s'agit de le dupliquer grâce à l'enzyme de la polymérase. Par la suite, le gène codant l'insuline est prélevé sur l'ADN au moyen d'une enzyme de restriction spécifique. Puis, à l'aide d'enzymes, ce gène est minutieusement intégré à un plasmide. Ce plasmide, une fois

modifié, est réintroduit dans la bactérie. Désormais, celle-ci produit donc de l'insuline, puisqu'elle " lit " le gène la codant. De plus, en se reproduisant, la bactérie " copie " aussi le gène inséré. Ainsi, la souche se multiplie en produisant un nombre toujours plus grand d'insuline. Les bactéries sont ensuite détruites afin de ne conserver que l'insuline, désormais susceptible d'être administrée aux malades (Figure 27).



**Figure 27:** Production de l'insuline par génie génétique

L'insuline humaine est la seule protéine animale avoir été fait dans les bactéries de telle manière que sa structure soit absolument identique à celle de la molécule normale. Ceci réduit la possibilité de complications résultant de la production d'anticorps. Dans des études chimiques et pharmacologiques, l'insuline humaine de recombinaison disponible dans le commerce d'ADN a prouvé sa ressemblance à l'insuline humaine pancréatique.

## II.2.4. Exploitation des toxines bactériennes en médecine : exemple vaccins.

### II.2.4.1. Objectifs de la vaccination

Le principe de la vaccination consiste à administrer à un être vivant un principe actif capable d'induire une immunité spécifique vis-à-vis d'un agent pathogène, ainsi qu'une mémoire immunitaire susceptible d'amplifier plus rapidement la réponse immune qu'après primo-infection.

Les performances, et donc les objectifs de la vaccination, sont variables en fonction de la nature des maladies visées. Ainsi, la vaccination est la méthode de lutte la plus efficace contre des maladies infectieuses aiguës qui bénéficient d'une réponse immune post-infectieuse stérilisante, dans ces cas, la vaccination permet une baisse de

l'incidence et de la prévalence de l'infection. Au-delà de cette protection individuelle, les vaccins confèrent une protection collective en limitant le risque de transmission aux sujets qui ne peuvent être vaccinés ou ne répondent pas aux vaccins (Miot et *al.*, 2019).

La protection vaccinale repose sur les anticorps, qui neutralisent les toxines ou agents pathogènes ou favorisent la phagocytose, mais également sur les cellules T helper nécessaires à la génération de lymphocytes B mémoires et de lymphocytes T cytotoxiques qui peuvent détruire les cellules infectées.

Un vaccin idéal doit induire une réponse anticorps et en LTc et de longue durée contre certaines protéines, le plus souvent virales ; Induire une mémoire immunitaire ; Ne pas être dangereux (innocuité) ; Etre stable à la conservation.

#### **II.2.4.2. Types de vaccins**

Quel que soit leur mode d'obtention, les vaccins se divisent en deux catégories, qui conditionnent leurs modes d'action et leurs qualités respectives: les vaccins inertes et les vaccins vivants atténués.

##### **II.2.4.2.1. Vaccins inertes**

Les souches vaccinales des vaccins inertes sont incapables de se multiplier chez l'hôte. Il faut donc fournir à l'animal une masse antigénique suffisante pour assurer une réponse immune protectrice. L'obtention d'une réponse immune protectrice nécessite souvent l'emploi d'adjuvants et/ou la répétition de l'intervention. Les vaccins inertes sont de 3 types: **les vaccins inactivés, les vaccins sous unitaires et les anatoxines.**

##### **a- Vaccins inactivés**

Les principes actifs des vaccins inactivés sont obtenus à partir de souches virales ou bactériennes choisies pour la qualité de leur équipement antigénique et multipliées de telles sortes qu'elles conservent ces propriétés. Les virus, bactéries, toxines sont alors inactivés par l'action d'agents physiques (chaleur, rayon UV, etc.), chimiques (formaldéhyde, etc.) ou par l'action conjuguée de deux ou plusieurs agents, séparés du milieu de culture par une succession d'étapes de purification et de concentration, les principes actifs portant les antigènes sélectionnés font alors l'objet de l'étape de formulation. Des adjuvants de l'immunité et des agents de stabilisation et de

conservation sont généralement ajoutés. De cette façon des vaccins sont produits par exemple contre la grippe, la poliomyélite (injectable), le Choléra, la peste ou l'hépatite A.

**Ex :** fragment de l'agent infectieux (sa paroi ou sa toxine), c'est le cas par exemple de l'hépatite B ou du tétanos ; la totalité de l'agent infectieux qui est inactivé (coqueluche).

Pour la majorité des vaccins inactivés (ne comportant pas de microbe vivant), la présence d'adjuvants est indispensable pour permettre une réponse immunitaire entraînant une protection. Les sels d'aluminium (phosphate et surtout hydroxyde d'aluminium) figurent parmi les adjuvants les plus utilisés dans le monde. Des conservateurs antimicrobiens peuvent être employés pour empêcher la contamination microbienne du vaccin. Des stabilisants (lactose, sorbitol, etc.) peuvent être utilisés afin de maintenir la qualité du vaccin pendant toute sa durée de conservation (Miot et *al.*, 2019).

La liste suivante est une liste non exhaustive des vaccins inactivés disponibles chez les animaux (ovins) :

- Chlamydie+ Fièvre Q (Chlamyvac FQ ®)
- Toxi infection à clostridies : Coglavax ®/Miloxan ®/Tasvax®huit
- Colibacillose et toxi-infection à clostridies : Séranamix®
- Colibacillose: Imocolibov®
- Pasteurellose: Lysopast®/Salmopast®
- Piétin: Footvax ®
- Arthrite à rouget : Ruvax®

#### **b- Les vaccins sous unitaires**

L'analyse des fonctions des protéines virales ou bactériennes conduit à identifier celles qui sont responsables de l'induction de l'immunité chez l'hôte. Le plus souvent pour les virus, il s'agit des protéines de l'enveloppe virale. La démarche consiste alors à obtenir ces protéines et à les formuler dans une préparation vaccinale. Il existe deux méthodes pour obtenir les protéines immunogènes :

**Obtention par purification à partir de l'agent pathogène :** Cette approche permet de limiter la part de protéines non nécessaires dans un vaccin et peut limiter le nombre de réactions non désirables.

**Obtention par génie génétique :** le gène codant pour une protéine immunogène est inséré dans un système d'expression *in vitro* (bactéries, levures, cellules en culture, etc.) puis la protéine est formulée dans une préparation vaccinale. Ce genre de vaccin nécessite le plus souvent l'utilisation d'adjuvants.

#### **c- Vaccins vivants recombinants (vaccins vectorisés)**

Il s'agit de vaccins constitués d'un vecteur vivant, viral ou bactérien, dépourvu de virulence pour l'espèce à vacciner, que l'on a rendu capable par génie génétique d'exprimer un ou plusieurs antigènes susceptible d'induire une immunité protectrice contre le pathogène dont ils proviennent.

**Ex :** vaccin vivant recombinant à partir d'une souche recombinante de *Bacillus anthracis* produisant un épitope immunogène de *Clostridium perfringens*.

**Ex :** vaccin vivant recombinant thermostable contre la peste bovine utilisant une souche recombinante du virus de la vaccine (Cow-Pox) exprimant la protéine d'enveloppe immunogène du virus de la peste bovine.

#### **d- vaccin à base de toxines inactivés ou anatoxine**

Ce type de vaccin est utilisé pour immuniser l'organisme contre des maladies dont les symptômes sont dus à la production de toxines par l'agent pathogène. Ils consistent à introduire dans un organisme vivant une toxine inactivée par traitements chimiques ou physiques. **Ex :** le tétanos (*Clostridium tetani*), la diphtérie (*Corynebacterium diphtheria*), vaccins polysaccharidiques (*Neisseria meningitidis* : infections à méningocoques).

#### **🚦 Définition, mécanisme d'action des adjuvants**

Les adjuvants sont des substances inertes, non immunogènes mais immunostimulantes qui, administrées en même temps et au même site qu'un antigène, vont accroître la réponse immunitaire vis-à-vis de ce dernier, augmenter son immunogénicité, et éviter la tolérance. Ils permettent ainsi d'amplifier la réponse immunitaire spécifique des vaccins

inactivés et surtout des vaccins sous-unitaires qui, seuls, sont incapables d'induire une réponse immunitaire protectrice (Paul et Lelièvre, 2018). Les adjuvants sont le plus souvent des composés particuliers, qui, de par leur structure, favorisent la phagocytose des antigènes vaccinaux par les cellules présentatrices d'antigènes (CPA) et leur dépôt prolongé dans les organes lymphoïdes secondaires. En outre, ils activent la sécrétion de cytokines par les cellules immunitaires innées, renforçant la stimulation des lymphocytes T CD4 auxiliaires et par effet de cascade l'activation des lymphocytes B et la génération de clones mémoires B et T (Figure 28).

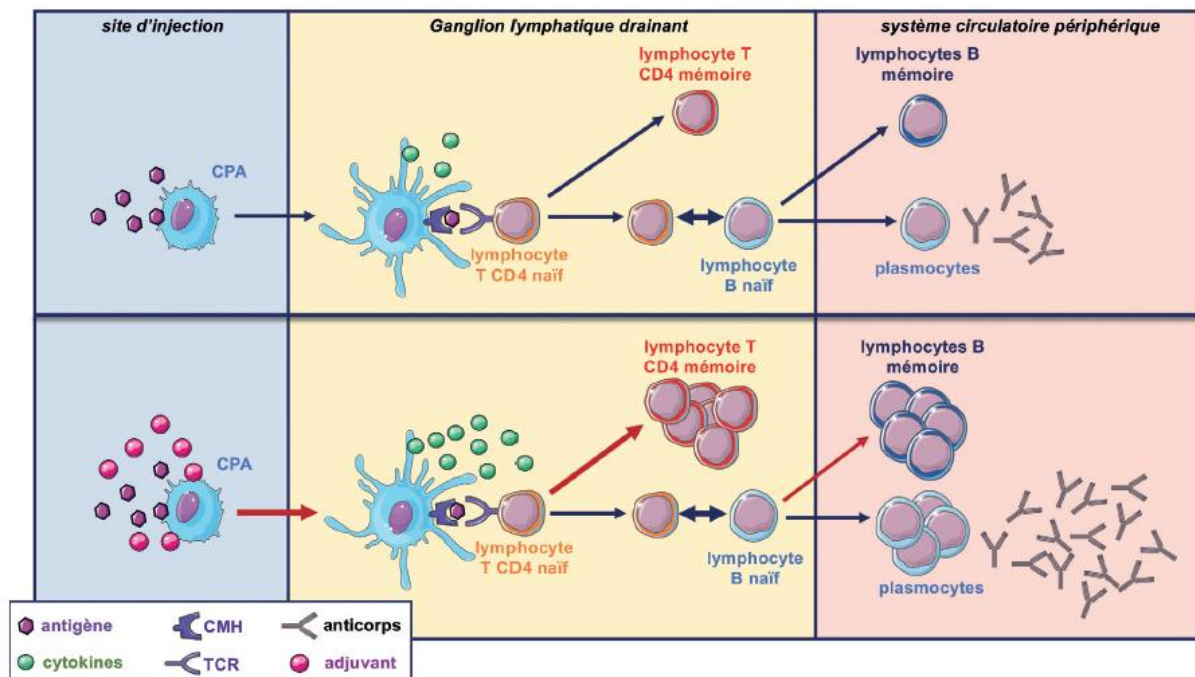


Figure 28 : Action des adjuvants (Miot et al., 2019).

## II.2.4.2.2. Vaccins vivants

### a. Vaccins atténués

L'agent infectieux présent dans le vaccin a gardé la capacité de se multiplier chez l'hôte, mais ne présente pas de caractère pathogène dans les conditions habituelles d'utilisation. Les principes actifs des vaccins vivants sont des virus, des bactéries ou des parasites dont le pouvoir pathogène est atténué ou a disparu à la faveur de mutations survenues soit spontanément, soit à l'occasion de passages répétés sur des animaux ou des cellules différents de ceux de l'espèce sensible, soit dans des conditions de culture infra-optimale, soit encore par l'effet d'agents physiques ou chimiques. Les principaux vaccins vivants sont ceux contre la rougeole, les oreillons, la rubéole, la fièvre jaune, la

varicelle, la tuberculose (vaccin BCG), la poliomyélite (vaccin oral), les gastroentérites à rotavirus ainsi que le vaccin contre le zona.

Chez les petits ruminants, quelques vaccins vivants atténués sont disponibles. Il s'agit des vaccins suivants :

- Chlamydie : Tecvax chlamydia®/Ovilis chlamydia ®
- Toxoplasmose : Ovilis® Toxovax
- Ecthyma contagieux : Ecthybel®
- Brucellose : Ovirev®

### II.3. Industrie agroalimentaire

#### II.3.1. Toxines bactériennes : exemple d'un bio-insecticide à base de *Bacillus thuringiensis* (*Bt*)

##### II.3.1.1. Description de l'espèce

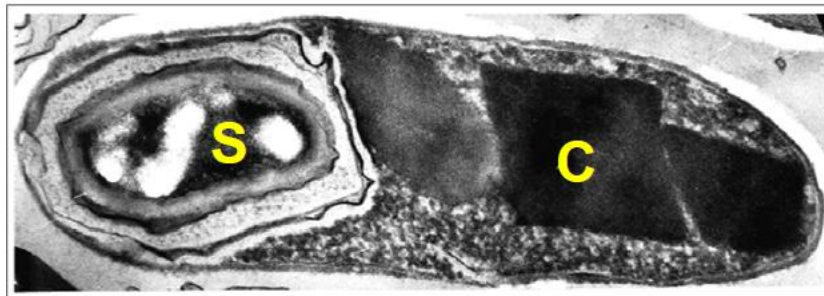
*Bacillus thuringiensis* est une bactérie en forme de bâtonnet, Gram-positif, anaérobie ou aérobie facultative que l'on retrouve dans de nombreux environnements. Les bactéries *Bt* sont également fréquemment présentes (sous forme de spores principalement) dans les sols, les gîtes à moustiques, les débris végétaux ou sur la surface des feuilles. Durant sa phase végétative (active), *B. thuringiensis* possède une longueur de 5 µm et une largeur de 1 µm et est pourvue de flagelles. Elle se distingue par la présence des mégaplasmides de tailles de 2 à 250 kb (McDowell et al., 1991) portant entre autres les gènes qui codent pour les protoxines Cry formant des cristaux protéiques (Figure 29a,b). *Bacillus thuringiensis* (*Bt*) produit lors de la sporulation ces inclusions parasporales constituées de cristaux protéiques, ayant une forte activité entomopathogène. Ils sont actifs sur une panoplie de larves d'insectes appartenant à différents ordres parmi lesquels les coléoptères (coccinelles), les lépidoptères (papillons) et les diptères (mouches).

Le cristal protéique peut contenir plusieurs toxines différentes et montrer des formes variées suivant sa composition en toxines (bipyramidale, cubique, ronde, etc.). En plus des protéines « Cry », certaines souches de *B. thuringiensis* produisent au cours de la phase de croissance végétative des protéines solubles douées également d'activité insecticide : il s'agit des protéines Vip1, Vip2, Vip3 et Vip4. Ces protéines Vips

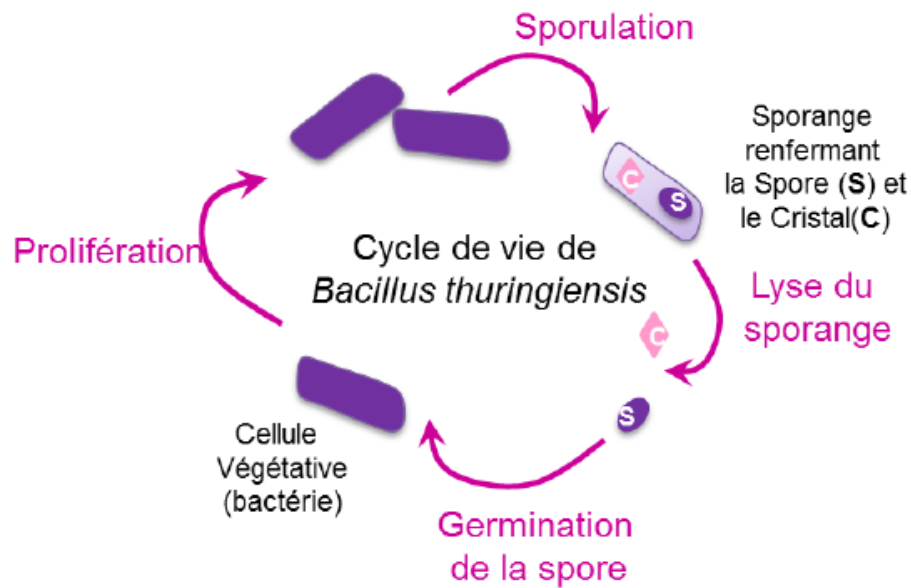
(Vegetative Insecticidal Proteins) sont connues comme des bioinsecticides de deuxième génération. Elles ne présentent aucune homologie avec les  $\delta$ -endotoxines et possèdent une activité insecticide sur un large spectre d'insectes. Jusqu'à maintenant, il y a environ 15 gènes *vip1*, 20 gènes *vip2*, 101 gènes *vip3*, et 1 seul gène *vip4* qui ont été isolés.

Les protéines Vip3 (80-90 kDa) sont actifs sur un large spectre de larves de lépidoptères tels qu'*Agrotis ipsilon* et *Spodoptera frugiperda*, alors que les protéines Vip1, Vip2 sont actives sur les coléoptères, essentiellement la chrysomèle des racines du maïs ou *Diabrotica virgifera*. L'étude de la distribution des gènes *vip1*, *vip2* a démontré qu'ils se trouvent dans environ 10 % des souches de *B. thuringiensis*.

La toxicité des protéines Vip1, Vip2 a été réalisée sur plusieurs espèces d'insectes appartenant à différents ordres (coléoptère, lépidoptère, diptère, hémiptère et nématodes). La toxicité s'est détectée pour plusieurs espèces de coléoptères, mais également pour l'espèce d'hémiptère *Aphis gossypii*



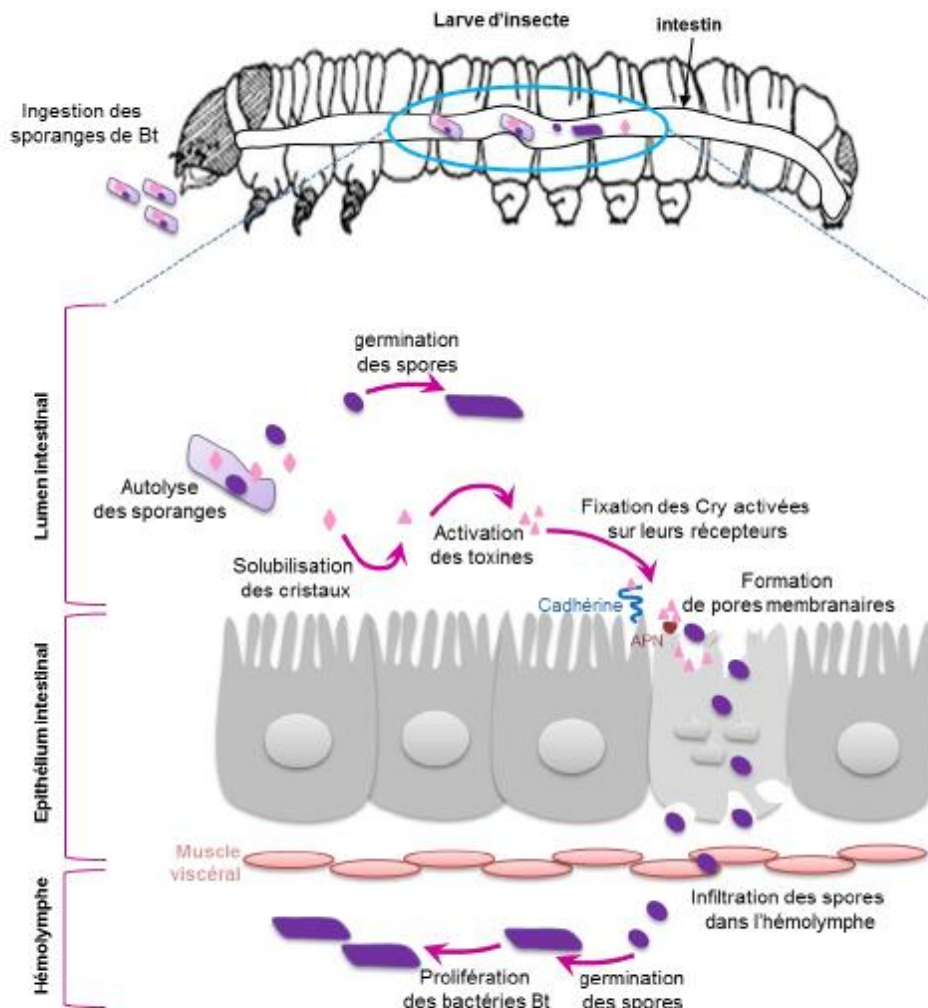
**Figure 29a** : Bactérie *Bacillus thuringiensis* subsp *kurstaki* contenant une spore (S) et des cristaux protéiques (C) (Sauka et al., 2010).



**Figure 29b** : Cycle de vie de *Bacillus thuringiensis*: En cas de stress, la bactérie *Bt* sporule. Pendant la phase de sporulation, les toxines Cry sont produites et sont agglomérées sous forme d'un cristal et la bactérie se transforme en une spore. La spore et le cristal seront enveloppés par une membrane protéique formant ainsi un sporange (Loudhaief, 2016).

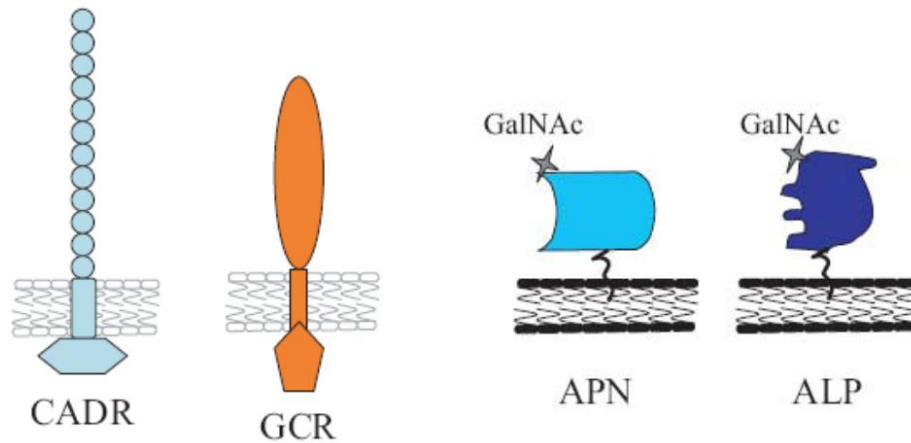
### II.3.1.2. Mode d'action sur les cibles

Les bioinsecticides *Bt* sont utilisés principalement pour tuer les larves des insectes cibles. Les sporanges de *Bt* une fois ingérés par l'insecte vont s'autolyser dans l'intestin et libérer les cristaux et les spores de *Bt* (Figure 30). Les spores vont germer et les cristaux vont être solubilisés sous l'action du pH intestinal alcalin. Les protoxines (avec une taille de 70 à 130 kDa selon la famille) sont ainsi libérées. Ces protoxines sont par la suite clivées par les protéases intestinales pour libérer le domaine N-terminal (c'est la toxine à proprement parler, de 60–65 kDa). La spécificité d'action des Cry en termes de toxicité aiguë semble à la fois être liée au pH et à la présence de protéases et de récepteurs spécifiques à la surface de l'épithélium intestinal (Vachon et *al.*, 2012).



**Figure 30 :** Schéma décrivant le devenir des sporanges de *Bt* et des toxines Cry dans l'intestin après leur ingestion par les larves d'insectes cibles (Loudhaief, 2016).

Une fois activées, les toxines vont interagir avec un ou plusieurs récepteurs membranaires des cellules épithéliales (Figure 31). Quatre principales familles de récepteurs sont décrites pour les toxines Cry. Deux représentent des récepteurs transmembranaires : les cadhérines (CADR), et les récepteurs glyco-conjugués (GCR). Les deux autres familles représentent des récepteurs ancrés dans les membranes par des glycosylphosphatidyl-inositol (GPI) : les aminopeptidasesN (APN) et les alcalines phosphatases (ALP). D'autres récepteurs peu étudiés, comme les ATPase synthases ou les actines, peuvent également être impliqués dans la fixation des toxines Cry1 ou Cry4.



**Figure 31 :** Représentation des principaux récepteurs membranaires des toxines Cry. Cadherine CADR, récepteur Glyco-conjugué (GCR), AminopeptidaseN (APN) et Alcaline phosphatase (ALP) (Bravo *et al.*, 2007).

Après fixation sur les récepteurs spécifiques (cadhérines épithéliales), ils forment des pores dans les membranes des cellules épithéliales du tube digestif. La formation de pores non sélectifs permettant la fuite des ions, des acides aminés et des sucres et permet aussi la pénétration et la germination des spores de *Bt*, ainsi que la prolifération de cellules bactériennes végétatives dans l'hémocèle, provoquant une septicémie chez l'insecte hôte et participant à sa mort dans les 24-72 heures qui suivent l'intoxication (Raymond *et al.*, 2010; Soberón *et al.*, 2009). Par ailleurs, ces pores provoquent la lyse des cellules épithéliales et la destruction de l'intestin et par conséquent la mort de l'insecte (Kirouac *et al.*, 2002; Vachon *et al.*, 2012). Dans tous ces cas, les altérations cellulaires se produisent rapidement après l'ingestion des sporanges de *Bt* et l'épithélium intestinal est détruit en quelques heures, provoquant ainsi un arrêt de la prise alimentaire.

Dans certains cas, les spores de *Bt* sont impliquées dans son entomopathogénicité. Il a été suggéré que l'effet toxémique des cristaux protéiques crée des conditions favorables au développement de la bactérie dans l'intestin des larves d'insectes affaiblies. Ensuite, les bactéries peuvent envahir l'hémolymphe et provoquer une septicémie. Il est probable que les spores agissent en synergie avec la toxine et celle-ci peut aussi résulter de leur germination dans l'intestin moyen avec la production d'une variété de facteurs pathogènes par les cellules végétatives tels que des  $\alpha$ -exotoxines (phospholipase C ou lécithinase), des  $\beta$ -exotoxines, des hémolysines, des

entérotoxines y compris certaines Protéines Insecticides Végétatives, les VIP, des chitinases, etc. Tous ces facteurs peuvent avoir un rôle dans le pouvoir entomopathogène contre les insectes dans des conditions naturelles, et contribuer au développement de la bactérie dans les larves d'insectes mortes (Gohar *et al.*, 2005).

Ces différentes protéines insecticides (protéines Cry) sont synthétisées au cours de la phase stationnaire de croissance et s'accumulent dans la cellule mère dans des inclusions cristallines parasporales, ce qui peut représenter jusqu'à 25% du poids sec des cellules sporulées. La quantité de protéines cristallines produite par une culture de *Bt* en conditions de laboratoire (environ 0,5 mg de protéines par ml) et la taille des cristaux indiquent que chaque cellule doit synthétiser environ  $10^6$  à  $2 \times 10^6$  de molécules de delta-endotoxines lors de la phase stationnaire et ce sous la forme de cristaux.

Les inclusions parasporales sont développées au cours de phases III à VI (8 à 12 h) de la sporulation. Le cristal parasporal de *Bt* a été observé durant l'engouffrement (phase III, 8 h) et possède un aspect cristallin à cette étape du développement. Le cristal atteint presque sa pleine grandeur au moment où l'exosporium apparaît (étape IV, 9 h) (Bechtel et Bulla, 1976).

### **II.3.2. Bactéries lactiques : exemple *Lactobacillus bulgaricus* et *Streptococcus thermophilus***

#### **II.3.2.1. Généralités sur les bactéries lactiques**

Les bactéries lactiques sont des cellules procaryotes, hétérotrophes et chimio-organotrophes. Elles sont Gram+, généralement immobiles, asporulées et ont des exigences nutritionnelles complexes pour les acides aminés, les peptides, les vitamines, les sels, les acides gras et les glucides fermentescibles.

Il est possible de les classer suivant la nature des produits du métabolisme bactérien obtenus à partir des glucides. En effet les bactéries homolactiques strictes produisent uniquement de l'acide lactique, alors que les bactéries hétérolactiques peuvent produire de l'acide acétique, de l'éthanol et du CO<sub>2</sub> en plus de l'acide lactique.

Onze genres bactériens figurent dans la catégorie des bactéries lactiques : *Aerococcus*, *Alloicoccus*, *Carnobacterium*, *Enterococcus*, *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Leuconostoc*, *Pediococcus*, *Streptococcus*, *Tetragenococcus* et *Vagococcus*. Les

bactéries du genre *Bifidobacterium* ne sont pas considérées comme des bactéries lactiques typiques, mais leur usage se répand en industrie laitière.

Les bactéries lactiques sont utilisées pour la fermentation d'un grand nombre de produits d'origine animale ou végétale. Seuls les cinq genres *Bifidobacterium*, *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Leuconostoc* et *Streptococcus* sont les plus employés dans la fermentation lactique

Les deux bactéries associées dans la préparation des produits laitiers ont pour rôle principal d'abaisser le pH du lait au point isoélectrique de la caséine (pH 4,6) de façon à former un gel (ou coagulum). Outre le goût acidulé qu'elles donnent au gel, elles lui assurent une saveur caractéristique due à la production de composés aromatiques (acétaldéhyde principalement, cétone, acétoïne, diacétyl). Enfin, par la production de polysaccharides (glucanes), certaines souches ont une action dans la consistance du gel. *Lactobacillus delbrueckii* sub sp. *bulgaricus*, ne produit que de l'acide lactique au cours de la fermentation du lactose. Il se développe bien à la température de 45 à 50 °C en acidifiant fortement le lait jusqu'à 1,8 pour cent (pH voisin de 4,5), voire, avec certaines souches, jusqu'à 2,7 pour cent d'acide lactique (pH 3,8 à 3,6). *Streptococcus salivarius*, sub sp. *thermophilus*, se développe bien de 37 à 40 °C, mais croît encore à 50 °C. Thermorésistant, il survit au chauffage à 65 °C pendant 30 minutes ou à 74 °C pendant 15 secondes. Nettement moins acidifiant que le lactobacille, il produit généralement de 0,5 à 0,6 pour cent d'acide lactique (pH voisin de 5,2). Certaines souches sont capables de supporter un pH de 4,3 à 3,8.

Ces deux espèces sont microaérophiles. Elles vivent en symbiose dans le yaourt. Elles produisent davantage d'acide lactique. Pour se développer, les bactéries ont besoin d'acides aminés et de peptides directement utilisables. Or, le lait n'en contient que de faibles quantités permettant seulement de démarrer leur croissance. Ensuite, le lactobacille, par son activité protéolytique, attaque la caséine qui libère les peptides permettant au streptocoque de poursuivre sa croissance. De son côté, le streptocoque stimule le lactobacille par production d'acide formique. Lorsque l'on ensemence du lait avec les bactéries du yaourt, le pH (6,6-6,8) est favorable au streptocoque qui assure le départ de la fermentation lactique. L'acidité, en se développant, devient défavorable au streptocoque qui est alors relayé par le lactobacille qui poursuit son activité fermentaire jusqu'à un pH d'environ 4,3 à 4,2.

Le streptocoque produit de l'acide lactique principalement sous la forme L(+), alors que le lactobacille donne surtout la forme D(-). A la fin de la fermentation, le tiers environ du lactose est transformé en acide lactique. Dans la fabrication du yaourt, l'utilisation du lactose se fait selon la voie suivante: une lactase hydrolyse le lactose en  $\beta$ -galactose et en D-glucose. Ce dernier est ensuite transformé en acide pyruvique puis en acide lactique pendant que le galactose s'accumule progressivement dans le lait sans être utilisé. Ainsi, dans un lait à 6,5 pour cent (en poids) de lactose, 100 g du yaourt obtenu contiennent environ, après 2 jours de conservation, 4 g de lactose, 0,05 g de glucose, 0,05 g d'oligosaccharide et 1,5 g de galactose. Tout d'abord le lactose du milieu extérieur est transporté à l'intérieur de la cellule grâce à une « perméase à lactose » LacS qui lui fait franchir la membrane cellulaire sous une forme libre. Une fois à l'intérieur le lactose (un diholoside) est hydrolysé par une  $\beta$ -galactosidase LacZ en glucose et galactose. La plupart des souches de *S. thermophilus* ne métabolisent ensuite que le glucose ; le galactose est alors excrété dans le milieu extérieur, souvent en échange de l'entrée du lactose. En fermentation laitière, le galactose s'accumule dans le lait ou le caillé

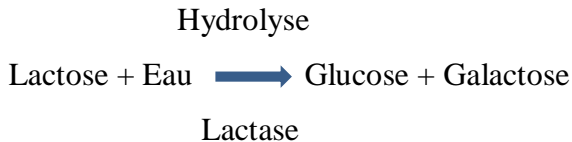
Deux systèmes de transport actifs des sucres sont présents chez les bactéries lactiques : le système phosphotransférase phosphène-pyruvate dépendant (PTS), qui couple le transport et la phosphorylation du glucide (phosphorylation en cascade), et le système perméase énergie-dépendant, qui fait pénétrer les glucides sous forme de sucres libres.

Il existe plusieurs voies de fermentations, dont la fermentation alcoolique, la fermentation lactique, la fermentation butyrique et la fermentation propionique. Les fermentations lactique sont les plus connues et les plus couramment utilisées par les microorganismes. La fermentation lactique est une réaction chimique entre des bactéries et du lait est un mode de production d'énergie. Les ferments se développent au profit du lactose (glucide du lait) et ils provoquent ainsi la formation d'acide lactique qui fait lentement coaguler la caséine (protéine du lait). La fermentation est arrêtée par la mise au réfrigérateur.

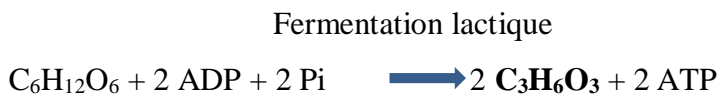
La production d'acide lactique provoque une acidification du milieu, qui permet l'élimination d'autres bactéries, éventuellement pathogènes. Elle permet donc la

conservation d'aliments. Cette transformation est un des plus anciens procédés de conservation des aliments.

En présence d'enzyme sécrétée par les bactéries lactiques ( $\beta$ -galactosidase), le lactose est hydrolysé en glucose et galactose selon l'équation suivante :



Puis le glucose est transformé à son tour en acide lactique par *lactate déshydrogénase*  
La réaction bilan de la fermentation lactique est :



Bien que *S. thermophilus* soit apte à fermenter sur cinq types de sucre différents (à savoir le lactose, le saccharose, le glucose, le galactose et le fructose), c'est sur lactose qu'il est le plus apte à fermenter. Le saccharose et le fructose sont transportés à l'intérieur de la cellule mais avec une efficacité moindre que celle du lactose (et avec un autre type de transporteur, nommé PTS phosphotransférase). Enfin le galactose et fructose ne sont fermentés que par un nombre limité de souches alors que toutes les souches transforment le glucose en acide lactique.

Chaque molécule de glucose provenant de l'hydrolyse du lactose, est ensuite métabolisée par la voie glycolytique, en deux molécules de pyruvate, 2 ATP et 2 H<sub>2</sub>O :  
glucose + 2 ADP + 2 P<sub>i</sub> + 2 NAD<sup>+</sup> → 2 pyruvate\* + 2 ATP + 2 (NADH + H<sup>+</sup>) + 2 H<sub>2</sub>O.  
En milieu anaérobie ou simplement pauvre en oxygène, une enzyme, la *lactate déshydrogénase* (Ldh), catalyse la transformation du pyruvate en L-lactate, tout en régénérant le NAD<sup>+</sup> : pyruvate + NADH + H<sup>+</sup> → L-lactate + NAD<sup>+</sup>

*S. thermophilus* est donc une bactérie homolactique obligatoire produisant très majoritairement (à plus de 95 %) du L-lactate comme produit final du métabolisme des sucres. Mais elle peut donner aussi dans des fermentations alternatives de l' $\alpha$ -

acétolactate, de l'acétoïne, de l'acétaldéhyde, du formate et de l'acétate. Seulement trois enzymes de dissipation du pyruvate ont été trouvées chez *S. thermophilus* :

- lactate déshydrogénase (Ldh) conduisant à la production de lactate
- pyruvate formate lyase (Pfl) ouvre des voies conduisant à la formation de formate et d'acétate
- l' $\alpha$ -AL synthétase (Als) est la voie de production de l'acétoïne.

La production d'exopolysaccharides.

### Glucose Acide lactique

Cette réaction est favorisée à une température de 45°C. Plus on laisse le lait fermenter longtemps plus le pH diminue, car la quantité d'acide lactique augmente et la solution devient donc plus acide.

Il existe deux voies principales de fermentation lactique:

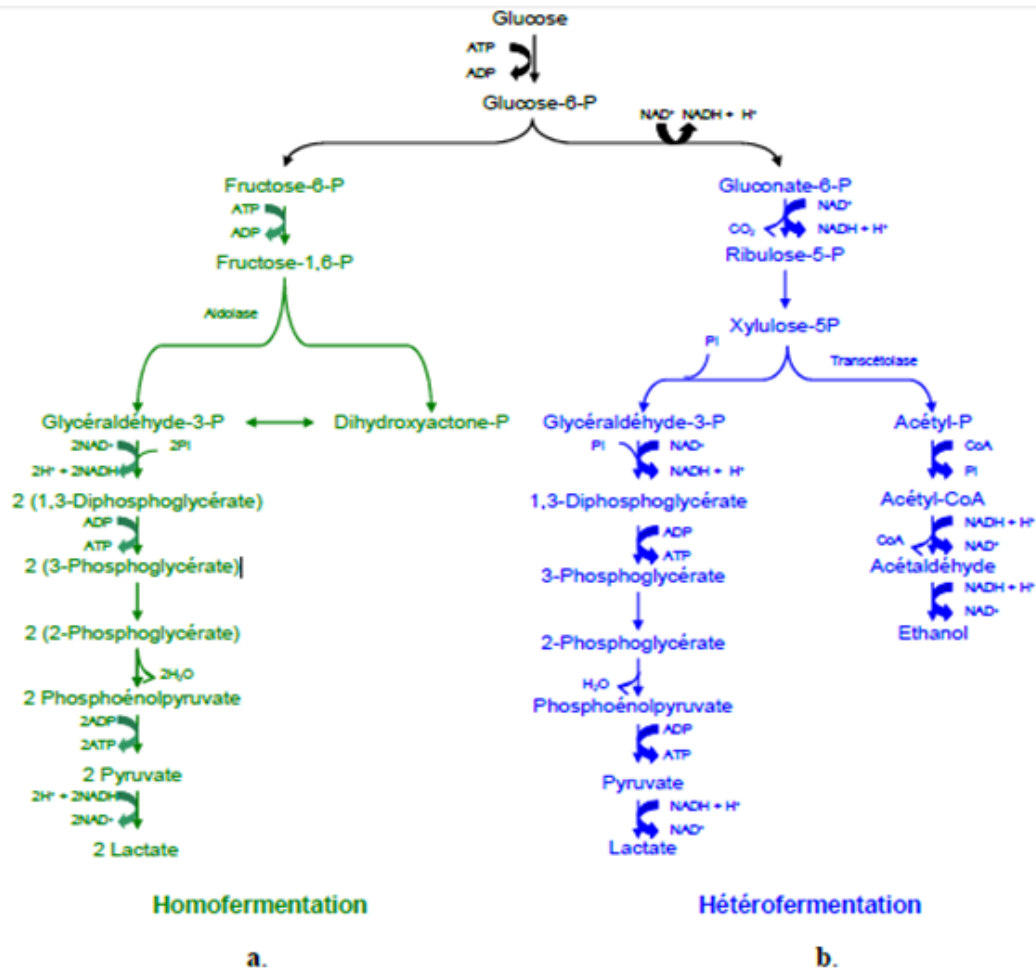
**homofermentation** : regroupe la voie de la glycolyse, aussi connue sous le nom de voie d'Embden-Meyerhof (EM) (Figure 32a), suivie de :

La conversion de 2 molécules de pyruvate en 2 molécules de lactate. Au cours de cette voie EM, ces bactéries dégradent le glucose, le fructose, le mannose, le galactose, le saccharose ou le lactose. Elle est surtout utilisée par les bactéries appartenant au genre *Streptococcus* et à certaines espèces de *Lactobacillus* comme *Lb. bulgaricus*, *Lb. casei*, *Lb. Caucasicus*, *Lb. lactis* et *Lb. plantarum* et de *Thermobacterium* comme *Thermobacterium yoghurti*.

**hétérofermentation** (Figure 32b), aussi appelée voie des pentoses phosphate (transcétolases) suivi de :

Dégradation des hexoses avec formation quasi stoechiométrique d'une molécule d'acide lactique, d'une molécule de CO<sub>2</sub> et d'une molécule d'éthanol.

Les sucres à cinq atomes de carbone ou pentoses, comme le fructose, peuvent parfois être fermentés et donnent alors une molécule d'éthanol et une molécule d'acide lactique.



**Figure 32 :** Représentation schématique des principales voies de fermentation des hexoses chez les bactéries lactiques

**ATP :** adénosine triphosphate

**ADP :** adénosine diphosphate

**NAD<sup>+</sup>/NADH, H<sup>+</sup> :** couple oxydant/réducteur du nicotinamide adénine dinucléotide

**P<sub>i</sub> :** phosphate inorganique

Outre ces produits, qui représentent plus de 80% des métabolites obtenus, on obtient également de l'acide acétique et du glycérol. Elle est surtout utilisée par les bactéries des espèces appartenant au genre *Lactobacillus* telles que *Lb. brevis*, *Lb. fermenti* et au genre *Leuconostoc*, telles que *Ln. mesenteroides* et *Ln. pentosaceus*.

### II.3.2.2. Métabolisme de protéines

La dégradation des protéines est due, soit à l'activité protéolytique bactérienne, soit à l'activation des protéases en milieu acide. Les bactéries lactiques provoquent une augmentation des protéines solubles dans le milieu et l'apparition de peptides et d'acides

aminés qui outre le fait qu'ils stimulent la croissance des microorganismes, interviennent dans la formation de certains composés aromatiques.

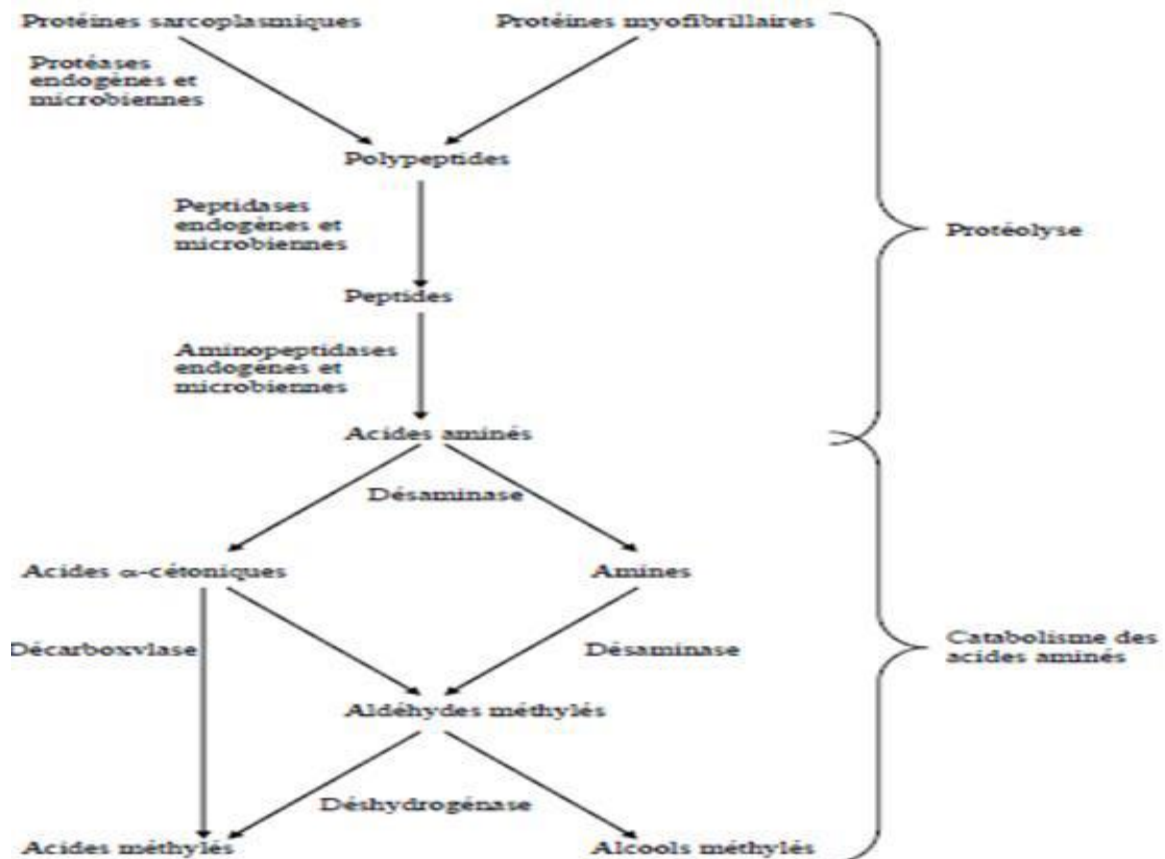
Du fait de leurs nombreuses autotrophies pour les acides aminés et de la pauvreté du lait en acides aminés, la croissance des bactéries lactiques dans ce milieu repose en grande partie sur leurs systèmes protéolytiques. Ce système multi-protéique fait intervenir en premier lieu.

- ✓ Catabolisme des protéines consiste en 2 principales étapes:

La protéolyse, qui couvre:

-une protéase de paroi puis différents systèmes de transport d'acides aminés et de peptides et de dégradation des peptides et des peptides en acides aminés. Après internalisation, ces peptides sont hydrolysés par tout un éventail de peptidases de natures et de spécificités variées conduisant à la libération d'acides aminés alors disponibles pour les synthèses protéiques la croissance des bactéries, en particulier dans le lait.

- ✓ Le catabolisme des acides aminés (des activités peptidases et amino-peptidases ont été rapportées chez *Lb. sakei*, *Lb. Cuvvatus* et *Lb. plantarum*. Le catabolisme des acides aminés peut résulter la formation d'autres produits dont les méthyles et les alcools méthyles (Figure 33). Certains lactobacillus, notamment *Lb. Sakre*, *Lb curvatus* et *Lb. Plantarum* sont dotées des leucines et valine amino-peptidases), contribuant ainsi à la formation de la flaveur du produit par les produit par les acides aminés et les petits peptides produits.



**Figure 33** : Principales étapes et enzymes participant dans la dégradation des protéines et dans le catabolisme des acides aminés.

### II.3.2.3. Métabolisme des lipides

Les propriétés lipolytiques sont généralement faibles chez les bactéries lactiques, les lactocoques sont considérés comme plus lipolytiques que *Streptococcus thermophilus* et les lactobacilles. Elles peuvent cependant présenter un intérêt pour certaines applications fromagères. D'une manière générale on distingue les estérases qui hydrolysent de façon préférentielle les esters formés avec les acides gras à chaîne courte (C2-C8) et les lipases qui sont actives sur des substrats émulsifiés contenant des acides gras à chaîne longue (>C8), ces enzymes sont impliquées dans l'hydrolyse de mono, di, et triglycérides

### II.3.2.4. Aptitude aromatisante

Les bactéries lactiques sont capables de produire de nombreux composés aromatiques (tels que : l'a-acétolactate, l'acétaldéhyde, le diacétyle, l'acétoïne et 2,3-butanediol,

l'éthanol, l'acétate, le formiate, etc.) principalement à partir du lactose, du citrate, des acides aminés et des matières grasses. Cette fonctionnalité est particulièrement importante lors de l'élaboration des laits fermentés, des fromages frais, crèmes et beurre, dont l'arôme principal est lié à cette activité microbienne

L'acide lactique confère au yaourt son goût acidulé. L'acétaldéhyde aussi joue un rôle principal. Il provient en grande partie de la transformation de la thréonine.

Le diacétyl contribue à donner un goût délicat, est dû à la transformation de l'acide citrique et, secondairement, du lactose par certaines souches de streptocoques. D'autres composés (acétone, acétoïne, butane-2-one, etc.) contribuent à l'équilibre et à la finesse de la saveur.

Le streptocoque thermophile produit de l'acétaldéhyde à partir du lactose ou de la thréonine. Cette bactérie lactique garantit une acidification rapide du lait lors de la fermentation lactique. Elle assure aussi une saveur particulière au produit en produisant du formate, de l'acétoïne (odeur de beurre), du diacétyl (note de beurre également).

#### **II.3.2.5. Polysaccharides**

La texture et l'onctuosité constituent, pour le consommateur, d'importants éléments d'appréciation de la qualité du yaourt.

Certaines souches bactériennes produisent, à partir du glucose, des polysaccharides qui, en formant des filaments, limitent l'altération du gel par les traitements mécaniques et contribuent à la viscosité du yaourt.

#### **II.4. Environnement: Bioremediation**

Avec l'accélération du développement économique, l'homme est de plus en plus responsable de la pollution de l'environnement. La diversité des produits d'origine industrielle conduit à une augmentation considérable du nombre de substances totalement étrangères au monde vivant, dites xénobiotiques. Certains de ces polluants ont contaminé les sols et proviennent des décharges, des installations industrielles, comme conséquence d'accidents de transport ou encore par le biais des rejets urbains et industriels ou en raison de pratiques agricoles. Les microorganismes telluriques éliminent plus ou moins rapidement les polluants organiques biodégradables, mais les métaux lourds (cadmium, cuivre, mercure, plomb et zinc) et les métalloïdes (sélénium et

arsenic) persistent dans l'environnement et s'accumulent inévitablement. Ils peuvent migrer vers les eaux de surface ou souterraines ou pénétrer la chaîne alimentaire *via* les végétaux pour se retrouver dans les animaux et éventuellement dans l'Homme (Nriagu et Pacyna, 1988).

La bioremédiation, c'est-à-dire l'emploi de procédés biologiques pour éliminer les polluants industriels qui contaminent le cycle biogéochimique des substances naturelles, est une option avantageuse pour diminuer la pression exercée sur l'environnement. Elle consiste à utiliser des systèmes biologiques pour réduire le niveau de pollution présents dans l'air, l'eau ou le sol. Ce sont des microorganismes ou des plantes qui sont normalement utilisés comme systèmes biologiques. Pour assurer leur croissance et/ou leurs besoins en énergie, les microorganismes peuvent les utiliser, en dégradant la plupart des substances chimiques. Ces processus de dégradation biologique peuvent exiger la présence de l'air, ou non. Dans certains cas, pour s'accroître ou pour obtenir de l'énergie, les organismes peuvent utiliser dans les voies métaboliques des molécules de substances polluantes. Dans ce cas on parle de cométabolisme, le microorganisme ne retire aucun bénéfice direct. Les chercheurs tirent avantage de ce phénomène pour l'appliquer dans le domaine de la bioremédiation. Complète, une biodégradation parvient à détoxiquer des polluants jusqu'au stade du dioxyde de carbone, de l'eau et des sels minéraux inoffensifs. Une biodégradation incomplète peut fournir des produits de dégradation moins toxiques que le polluant initial, mais pas forcément. Par exemple, la biodégradation du trichloro- ou du tétrachloro éthylène peut libérer du chlorure de vinyle qui est plus toxique et plus cancérigène que les composés initiaux.

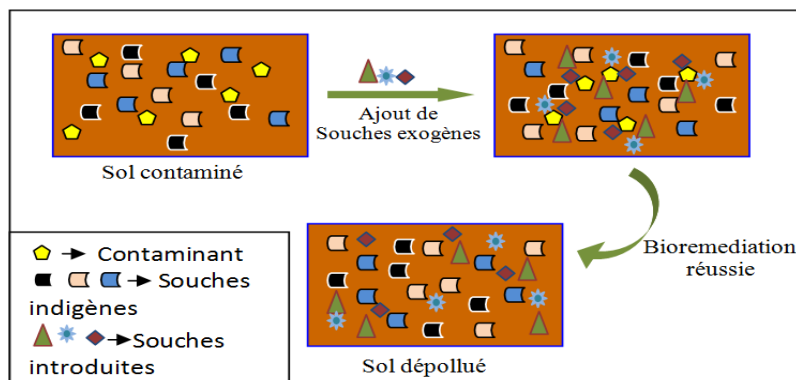
#### **II.4.1. Principe de la bioremédiation**

Le procédé de la bioremédiation consiste à activer la capacité naturelle que possèdent de nombreux organismes, la plupart des temps microscopiques (bactéries, microalgues, champignons), à dégrader les polluants en composés inertes, comme l'eau et le gaz carbonique. Ces organismes peuvent être indigènes (déjà présents dans la zone polluée), ou exogènes (ajoutés au milieu), ou encore être prélevés sur le site contaminé, cultivées au laboratoire puis réintroduits dans le sol (bio-augmentation). La bioremédiation se déroule généralement en condition d'aérobie, cependant l'application de systèmes de

bioremédiation en condition d’anaérobie permet la dégradation d’un certain nombre de molécules récalcitrantes. Les principales technologies utilisées dans la bioremédiation sont les suivantes:

#### II.4.1.1. Bioaugmentation

Cette technologie consiste à introduire des cultures de microorganismes à la surface du milieu contaminé dans l’objectif d’augmenter la biodégradation des contaminants organiques. Généralement les microorganismes sont sélectionnés sur la base de leur aptitude à dégrader les composés organiques présents dans le site à dépolluer. La culture peut comprendre une ou plusieurs espèces de microorganismes. Des éléments nutritifs sont généralement apportés dans la solution contenant les microorganismes. Cette suspension de microorganismes est apportée à la surface du sol dans les conditions naturelles ou injectée dans le site contaminé sous pression (Figure 34).



**Figure 34** : Schéma récapitulatif du principe de bioaugmentation (Goswami et *al.*, 2018).

Cette technologie est largement utilisée pour décontaminer les sites contenant des hydrocarbures, les microorganismes choisis sont des bactéries dotées d’une grande capacité de digestion de ces hydrocarbures.

#### II.4.1.2. Biofiltration

Elle consiste à l’utilisation d’un biofiltre pour traiter les émissions gazeuses : Le principe consiste à utiliser des microorganismes pour dégrader les polluants contenus dans l’air à traiter : la phase aqueuse (l’air contaminé) est mise en contact avec une phase aqueuse dans laquelle se développe la population microbienne, connue aussi sous

le nom de la biomasse. Dans une unité de biofiltration, l'air à épurer (à dépolluer) traverse d'abord un filtre et un humidificateur afin de supprimer les particules (poussières, graisses) présentes dans le gaz et d'amener le niveau d'humidité à 100%. L'air est ensuite introduit dans un réacteur (une cuve) contenant un garnissage formé de matériaux très poreux (très avide pour l'humidité). A la surface des particules qui constituent le garnissage se trouve un biofilm qui correspond à une pellicule d'eau contenant des microorganismes (bactéries et champignons) dont la fonction est de dégrader les polluants présents dans l'air à traiter (Figure 35). Cette technologie est par exemple utilisée pour traiter l'air polluée par le xylène ou par des composés azotés.

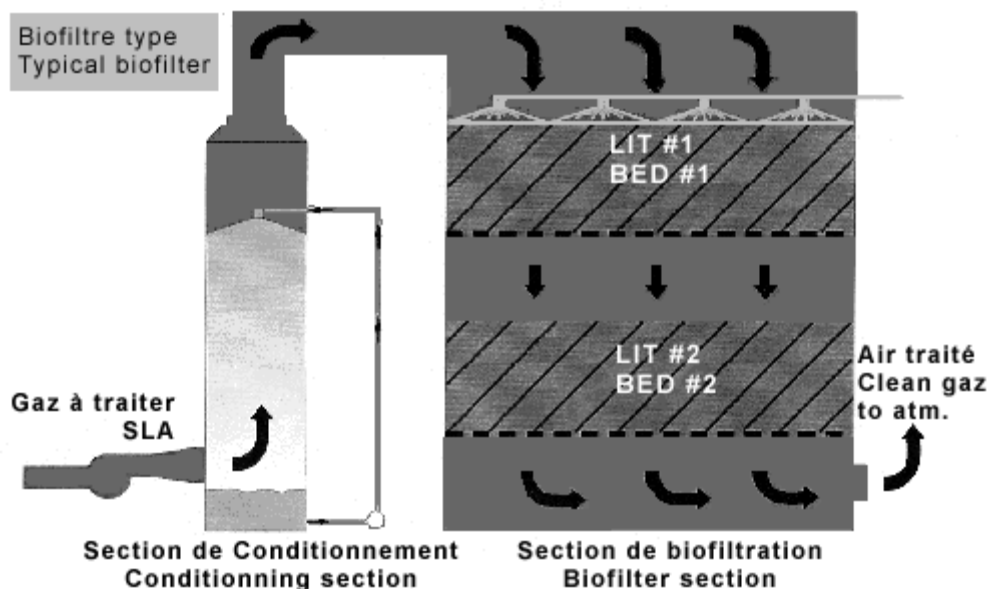
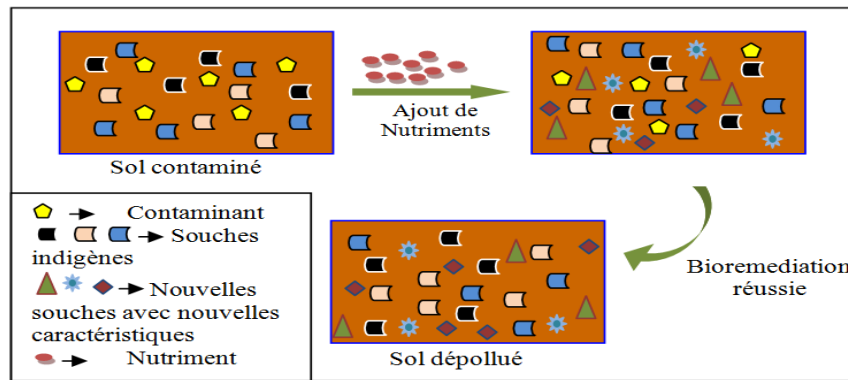


Figure 35 : Système de biofiltration

#### II.4.1.3. Biostimulation

Cette technologie consiste à stimuler l'activité des populations microbiennes indigènes (présentes dans le sol ou dans les eaux souterraines) par apport de nutriments et par ajustement des conditions du milieu (potentiel d'oxydo-réduction, humidité) (Figure 36).



**Figure 36 :** Schéma récapitulatif du principe de biostimulation (Goswami et *al.*, 2018).

#### II.4.1.4. Compostage

Il peut être défini comme un procédé biologique contrôlé qui assure la transformation et la valorisation des matières organiques (sous-produits de la biomasse, déchets organiques d'origine biologique) en un produit stabilisé, hygiénique, semblable à un terreau riche en composés humiques le compost. C'est la fermentation des ordures ménagères organiques (résidus alimentaires) et des déchets verts (feuillages, résidus de jardinage) afin de produire un compost réutilisable en agriculture ou dans le jardin pour fertiliser la terre. L'aération et l'humidité sont deux éléments indispensables pour entretenir les conditions d'une bonne fermentation. Le compostage peut se faire chez soi ou collectivement par des procédés industriels.

Ce procédé est utilisé dans le processus de bioremédiation des sols contaminés. Il consiste à mélanger des sols excavés avec des amendements organiques (compost) et les disposer en andins ou en tas trapézoïdaux espacés afin de favoriser la biodégradation du polluant chimique.

#### II.4.1.5. Biolixiviation

C'est la lixiviation favorisée par la voie biologique (généralement bactérienne). Elle correspond à une méthodologie de solubilisation des métaux lourds grâce à des bactéries acidophiles fonctionnant en présence ou en l'absence d'oxygène. Deux facteurs sont importants pour la biolixiviation: la température qui doit être comprise entre 25 et 35 °C. La taille des particules qui doivent être très proches de celle des bactéries. Ces bactéries sont chimiolithotrophes oxydent des substances comme le sulfure pour produire de l'acide sulfurique qui dissout les métaux du minerai.

#### II.4.2. Microorganismes utilisés en bioremédiation

Ils proviennent de milieux très variés et peuvent vivre dans des conditions extrêmes : des températures en dessous de 0°C ou au contraire, très élevées, dans des milieux inondés ou en plein désert, en présence d'un excès d'oxygène ou milieu anaérobie. En raison de leur pouvoir d'adaptation, ces microorganismes sont utilisés pour éliminer les composés xénobiotiques. Parmi les bactéries aérobies reconnues pour leur pouvoir de dégradation, nous pouvons citer celles appartenant aux genres *Pseudomonas*, *Alcaligenes*, *Sphingomonas* et *Mycobacterium*. Elles peuvent dégrader les pesticides, les hydrocarbures, les alcanes et les composés polyaromatiques. Souvent, elles utilisent le polluant comme source de carbone et d'énergie. Les bactéries anaérobies sont moins fréquentes que les aérobies. Cependant, elles présentent un grand intérêt dans la bioremédiation des polyphényls polychlorés, du trichloroéthylène et le 1,2 dichloroéthane.

## Deuxième Partie : Mycètes

### I. Généralités

#### I.1. Caractéristiques morphologiques, Cytologiques et Biochimiques des champignons (levures et moisissures)

##### I.1.1. Morphologie et structure des cellules

Les mycètes (champignons ou *Fungi*) sont des organismes eucaryotes, hétérotrophes, dont les cellules sont pourvues de paroi (comme les végétaux ou les bactéries) mais qui ne possèdent pas de chlorophylle (ils sont donc chimio-organotrophes). Leur appareil végétatif est diffus (thalle), dépourvu de racines ou de feuilles (ils se nourrissent donc par absorption directe des nutriments à partir du milieu) et ils forment des spores. On distingue : les macromycètes visibles à l'œil nu par leur appareil reproducteur (bolet, morille, pleurotes) et les micromycètes qui sont donc des micro-organismes le plus souvent invisibles à l'œil nu (moisissure : la forme pluricellulaire et les levures : la forme unicellulaire).

Organisation structurale des mycètes

Chez les champignons l'appareil végétatif est appelé le thalle, il est formé de cellules eucaryotes qui se caractérisent par l'existence d'une paroi rigide externe constituée principalement de polysides dont de la chitine, de la callose et des hémicelluloses.

##### ➤ Morphologie des moisissures

Chez les champignons filamenteux (moisissures) le thalle forme des filaments appelés hyphes qui peuvent être droits ou ramifiés. Certaines de ces hyphes sont cloisonnées (ou septées) alors que d'autres ne possédant pas de septum forment en quelque sorte une longue cellule continue (on parle de structure en siphon). Même lorsque les hyphes sont cloisonnés les septums présentent des ouvertures par lesquelles le cytoplasme peut circuler librement (Figure 37a,b), sauf au niveau des cellules reproductrices. L'ensemble des hyphes porte le nom de mycélium.

Chez les levures, qui sont unicellulaires, le thalle est constitué de cellules ovoïdes qui peuvent former des colonies (issues du bourgeonnement des levures) ou dans certains cas des filaments appelés pseudo-mycéliums (ex : Genre: *Candida*, Genre : *Geotrichum*)

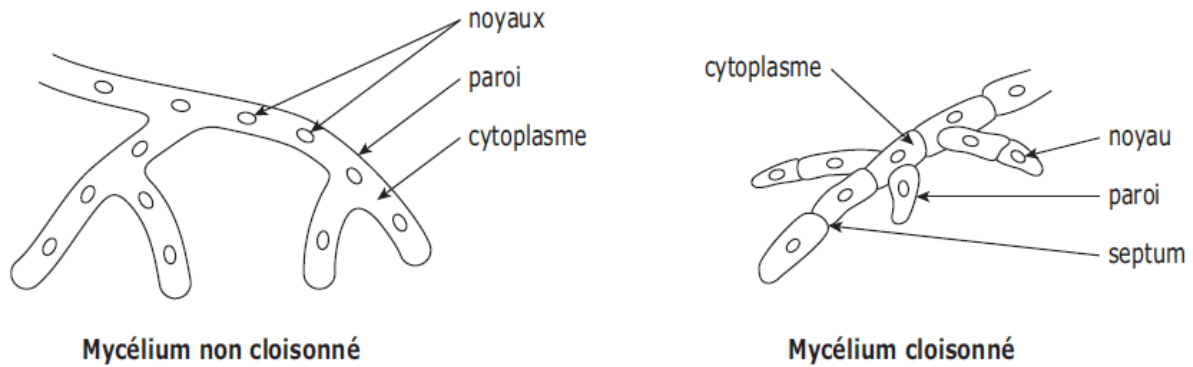


Figure 37a : Représentation schématique des filaments mycéliens

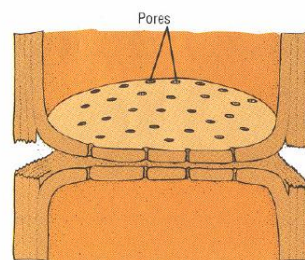


Figure 37b : Dessin d'un septum multiperforé

#### ➤ Morphologie des levures

Sont des champignons simples constitués d'une cellule unique apte à provoquer la fermentation des matières organiques animales ou végétales. Les levures occupent une place essentielle dans l'industrie alimentaire, elles participent à l'élaboration de nombreux produits alimentaires (brasserie, cidrerie, vinification, fromagerie), mais aussi à la revalorisation des déchets agricoles et industriels et à la production de protéines. Cependant, elles jouent un rôle négatif en contaminant et en dégradant les aliments ; certaines sont pathogènes pour l'homme ou les animaux. Ces microorganismes, de forme variable selon l'espèce (sphérique, ovoïde, en bouteille (Genre : *Pityrosporum*), triangulaire (Genre : *Trigonopsis*), ou apiculée c.-à-d. renflée à chaque bout comme un citron), mais généralement ovales, d'environ 6 à 10  $\mu$  et jusqu'à 50 $\mu$ . Leur taille varie entre 1 à 10  $\mu$ m de large pour 2-3 ou 20-50  $\mu$ m de longueur.

Les champignons (levures et moisissures) font partie d'un règne à part car ils n'ont pas de chlorophylle, se procurent leur matière organique selon trois modes de vie :

\* **Saprophytisme** (ou nécrotrophie) : ils se développent aux dépens de la matière organique végétale ou animale en décomposition ce qui permet son recyclage.

\* **Parasitisme** (ou biotrophie) : ils se développent aux dépens d'organismes vivants végétaux, des arbres et des animaux). Ils peuvent parasiter l'homme et les animaux: les mycoses.

- Ils peuvent aussi parasiter les végétaux et mettre en péril l'économie d'une région (ex : Le mildiou de la pomme de terre et de la vigne, l'ergot du seigle et de l'orge, différentes rouilles sur les céréales)

\* **Symbiotisme** : ils se développent grâce à leur association avec un autre organisme vivant : des plantes ce qui forme les mycorhizes ou des algues ce qui forme les lichens.

\* **Commensalisme** : Un champignon est dit « commensal » s'il tire profit de son hôte sans nuire à ce dernier (il s'en sert par exemple comme d'un support), mais sans non plus lui apporter d'avantage.

- **Composition cellulaire (Organites intracellulaires)**

Les mycètes possèdent un petit noyau. Ils possèdent entre 3 et 40 chromosomes différents. Les levures possèdent des plasmides

**Les mitochondries** ont des structures qui varient selon les différents règnes de mycètes. Les eumycètes ont des mitochondries à crêtes lamellaires, tandis que les mitochondries d'oomycètes ont des crêtes tubulaires.

**L'appareil de Golgi** des mycètes est très peu développé, et n'est souvent formé que d'un saccule.

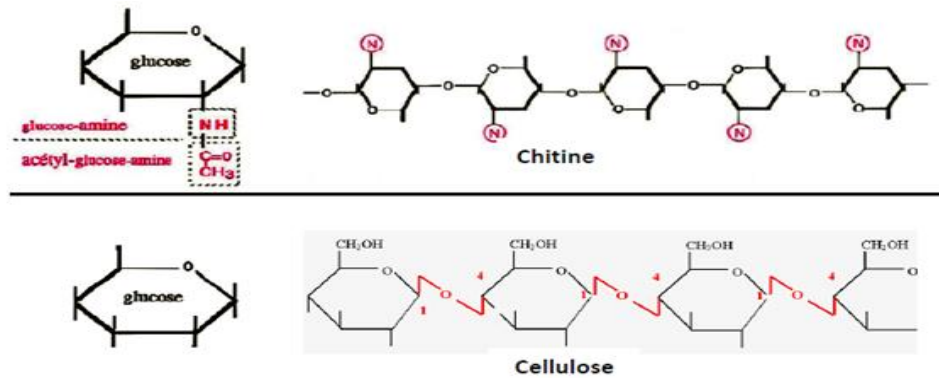
**Réticulum endoplasmique, gouttelettes lipidiques ou inclusions cytoplasmiques** : les réserves d'énergie sont représentées par le glycogène et le tréhalose.

**Vacuole** : constitue un important stock enzymatique.

### **I.1.2. Composition chimique de la paroi des champignons (levures et moisissures)**

#### **La paroi**

Elle mesure de 150 à 230 nm et est composée : 10 à 20% de protéines (dont près de la moitié sont des mannoprotéines (protéoglycanes), 80% de polysaccharides antigéniques (de la chitine : polycondensat linéaire de  $\beta$ -D-1-4- N Acetyl-glucosamine, mannanes, glucanes sont les représentants les plus importants) ; de la cellulose (polycondensat linéaire de  $\beta$ -D-1-4-glucose) ; des mannanes ou des glucanes; parfois de la mélanine (champignons noirs) (Figure 38).



**Figure 38:** Structure chimique de la paroi

Les champignons sont des microorganismes eucaryotes constitués d'une paroi cellulaire entourant la membrane plasmique ; elle est constituée d'une « couche externe » de mannoprotéines associés à des glucanes et une « couche interne » de glucanes associés à la chitine.

- Les mannoprotéines sont des macromolécules de protéoglycane constitués de 5 à 20% de peptides et de 80 à 95% de chaînes de D-mannose
- La chitine est une substance organique macromoléculaire, polymère constitué d'enchaînement de molécules N-acétyl-B-D-glucosamine liée par liaison glycosidique  $\beta$ -1-4, sa structure est identique à celle de la cellulose, mais le groupe hydroxyle (-OH) en 2 a été remplacé par un groupe acétylamine (-NH-CO-CH<sub>3</sub>)

La paroi est rigide et représente près de 20% du poids sec de la cellule. Par sa rigidité, elle donne à la cellule sa forme caractéristique.

Dans l'espace périplasmique on trouve des enzymes : invertases, phosphatases acides, B-glucosidases, B-glucanases de type  $\beta$ (1-3) et  $\beta$ (1-6), etc.

#### • **Membrane cytoplasmique**

Composée principalement de double couche de lipides (phospholipides, stérols, glycolipides) et de protéines, une partie hydrophile à l'extérieur et une partie lipophile à l'intérieur. Elle contient aussi de nombreux complexes protéiques dont les rôles sont variés, ex : enzymes protéases qui assurent le transport de substances du milieu extérieur vers le milieu intracellulaire et /ou inversement avec ou non transformation du substrat durant le passage (Figure 39).

Elle est très riche en stérols (ergostérol, zymostérol).

Le rôle des protéines : Ils sont impliqués dans le transfert de substances et dans les activités enzymatiques

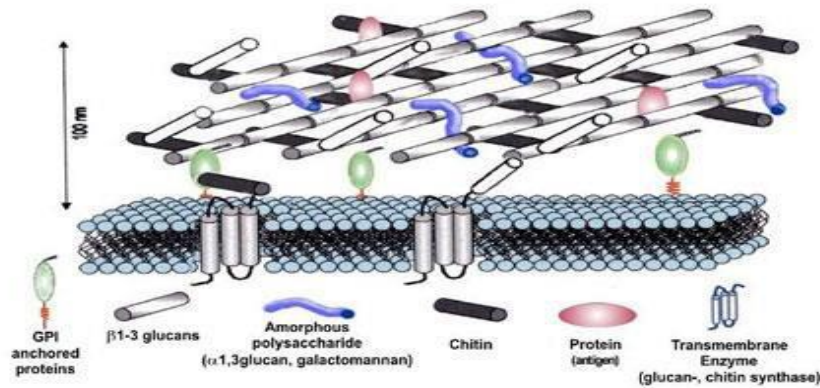


Figure 39: Schéma de la paroi et de la membrane d'une levure

## I.2. Classification et diversité des champignons

Avec l'avènement de la biologie moléculaire, la classification des organismes vivants a été révisée et modifiée. On utilise actuellement de plus en plus une classification dite phylogénétique qui regroupe les êtres vivants sur la base d'homologies de leur ADN (génotype). Alors que la classification traditionnelle établit des groupes ou taxons en fonction d'un simple critère de ressemblance globale (phénotype).

L'utilisation des outils de la phylogénétique a entraîné de profondes modifications dans la classification des champignons

Règne des **Fungi ou Eumycota** : Eumycètes : vrais champignons

**Du latin** : Fungus : champignons, **du Grec** : mukos : champignons

Différents rangs taxonomiques sont utilisés pour la classification des êtres vivants. Ces rangs hiérarchiques sont : le règne, l'embranchement ou division, la classe, l'ordre, la famille, le genre et l'espèce.

### Classification actuelle

➤ **Dans le règne des Eumycota** (champignons vrais), on distingue **5 phylums**.

–*Chytridiomycota* ou Chytridiomycètes

- Espèces aquatiques dont les spores portent un flagelle.
- Ancêtres de tous les autres champignons.

–*Zygomycota* ou Zygomycètes

- Espèces à spores non flagellées
- Hyphes non séparés par des cloisons.

–*Ascomycota* ou Ascomycètes

- Spores produites à l'intérieur de sacs (les asques)

- Projetées, à maturité, à l'extérieur par ouverture de l'asque.
- Basidiomycota* ou Basidiomycètes
- Spores se développent à l'extrémité de cellules spécialisées (les basides)
- Dispersées par le vent à maturité.
- Glomeromycota* ou Gloméromycètes
- Autrefois classés dans les *Zygomycota*
- Réunissent les champignons MA
- **Le règne des Straminipila** comprend 3 phylums qui dérivent probablement d'un groupe de protistes comme les diatomées et certaines algues dorées. Le plus important est celui des **Oomycota**

### Phylum Oomycota

### Phylum Hyphochytridiomycota

### Phylum Labyrinthulomycota

## II. Champignons d'intérêts biotechnologiques

### II.1. Valeur économique des mycètes

**Intérêt écologique :** Ce sont des décomposeurs de la matière organique du sol (recyclage des nutriments à l'état du CO<sub>2</sub>, N<sub>2</sub>, N<sub>2</sub>O, ions minéraux) capables de décomposer plusieurs substances : digestion du pétrole, digestion des plastiques, du bois, des déchets, etc.

**Intérêt économique et médical :** Alimentation humaine (champignons comestibles, production industrielle, etc.). Production de composés à usage médical (antibiotiques, fongicides, bactéricides, insecticides, enzymes, etc.).

**Industries agroalimentaires :** fermentation alcoolique : levures, affinage de fromage, pain, dépollution : dégradation des déchets, biotechnologies de champignons toxiques (mycotoxines) ou pathogènes pour l'homme, les animaux et les plantes.

### II.2. En Industrie agroalimentaire

#### II.2.1. Culture de mycètes pour consommation

Les champignons comestibles sont des aliments connus de nombreuses années (5000-4000 avant J.C), son utilisation reste primitive, base fondamentalement à la cueillette des champignons sauvage. Ils étaient décrits comme “ Aliment des dieux ” par des romains.

Ils sont gagnés une large acceptation et certaines espèces sont souvent considérées comme “Rois de la table” ou “Diamants de la cuisine”. La raison n’est pas seulement de son aspect délicieux, mais d’une façon traditionnelle ils sont une grande qualité.

Exemples d’espèces domestiques et comestibles (Figure 40) : *Ganoderma lucidum* (ling chin), *Poria cocos* (fulin) utilisé en Chine comme champignon médicinal, *Auricularia auricula* et *Auricularia polytrica*, *Flammulina veleupes*, *Lentinus edodes*, *Agaricus bisporus* (Zhanxi et Zhanhua, 2001). Les espèces de champignons toxiques sont citées dans la figure 41.

Les champignons comestibles sont particulièrement riches en un grand nombre des vitamines du groupe B (B<sub>1</sub>, B<sub>2</sub>, B<sub>3</sub>, B<sub>12</sub>), spécialement en Riboflavine et en Acide nicotinique. Ils contiennent aussi les montants de vitamines C et H en quantité modérée. Les champignons sont riches aussi en sels inorganiques tels que phosphore, potassium, sodium et calcium, soufre et oligoéléments qui ont un rôle capital pour le métabolisme humain, les éléments indispensables sont : le fer, cuivre, zinc, Iode, fluor, cobalt, chrome, etc. Ils contiennent tous les acides aminés essentiels (lysine, leucine sont les plus abondants, les acides aminés soufrés (méthionine et cystéine) en faibles quantités, l’acide glutamique et aspartique sont les plus abondants de tous les acides aminés), le chapeau est riche en acides aminés libres. La proportion (en acides aminés) dans le pied diminue avec le stade de maturité. Le deuxième constituant des champignons après l’eau, 40% de sucres totaux sur 100g de matière sèche ou en moyenne 4 à 6 % sur 100g de matière fraîche, sont digestibles à 85%. Les glucides assimilables ou solubles tel que les sucres simples (glucose, mannose, disaccharides, tréhalose), sucres complexes (glycogène). Les champignons constituent le seul aliment qui contient le glycogène, sa teneur dans le champignon est supérieure à la teneur dans la viande ou le poisson, il a un rôle dans la régulation de la glycémie. Les lipides constituent 20% du poids sec, digestible à 90%. L’acide linoléique et l’acide linoléique (30 à 70 % des acides gras totaux). Leur rôle dans l’organisme : ils constituent une source d’énergie, source d’acides gras et véhiculent les vitamines liposolubles.

Les champignons comestibles en Chine sont regardés comme médecine naturelle avec une haute valeur médicinales ; la plupart sont employé par les anciens docteurs voire même aujourd’hui pour le traitement des différentes maladies.

Beaucoup d’espèces des champignons comestibles peuvent être utilisé comme d’anti cancer car des polysaccharides de leur paroi cellulaire peuvent stimuler la formation des anticorps. Pourtant, ils ne peuvent pas directement tuer les cellules du cancer.

Il est connu que plus de 220 espèces de champignons ont une valeur médicinales mais la plupart d'elles ne sont pas encore utilisé jusqu'à maintenant d'où les champignons ont une grande potentialité dans l'application médicinale.

### II.2.2. Applications et utilisations thérapeutiques des champignons

La mycothérapie désigne les soins par les champignons, c'est une forme de médecine encore très peu connu et maîtrisée. Plusieurs espèces ont des propriétés anticancéreuse et contre toute sorte de maladies.

Exemples d'espèces :

- *Flamulina velutipes* (l'Enokitaké), *Hericium erinaceus* (l'Hericium), *Ganoderma lucidum* (Reishi), *Lentinus edodes* (Shiitaké), *Grifola frondosa* (Maitaké), *Agaricus blazei* Murr (l'ABM), *Tremela fuciformis* (le champignon blanc), *Armillaire mellea*, *Pleurotus eryngii* (pleurote de panicaut), *Tolypocladium inflatum*, *Coriolus versicolor*.

Ces champignons sont consommés en Chine et au Japon depuis des millénaires à la fois comme nourriture et comme médicament, ce sont des aliments immunostimulants. Ils nous aident à renforcer le système immunitaire, à combattre les attaques de germes pathogènes. Une prise régulière de ces champignons sous forme de poudre, d'ampoules ou de gélules permet de stimuler les réponses immunitaires de l'organisme.

#### II.2.2.1. Comment renforcer le système immunitaire

Les polysaccharides ( $\beta$ -glucanes) présentent dans la paroi de ces champignons produisent leurs effets anti-tumeurs en activant les réponses immunitaires de l'hôte par l'augmentation de l'activité des macrophages.

Les macrophages stimulés par les  $\beta$ -glucanes du Shiitaké et Maitaké sécrètent un facteur nécrosant anti-tumeur (TNF) ; Produisent de l'oxyde nitrique (NO) qui est un gaz à radicaux libres qui joue un rôle dans les réponses immunitaires, neurotransmission, et inhibition de l'agrégation des plaquettes ; Produisent de l'interleukine-1 et d'interféron  
Ainsi, les  $\beta$ -1,6-glucanes du Maitaké activent les cellules du système immunitaire ; stimulent les lymphocytes T, macrophages, cellules tueuses NK qui attaquent directement les cellules cancéreuses qui forment la tumeur.

- **Utilisations cliniques des  $\beta$ -glucanes**

L'utilisation des champignons dans la lutte contre les cancers s'est répandu en chine, en Corée, Japon, Russie, aux Etats-Unis et au Canada. Ils appartiennent à la famille des

Polyporacées, Mucronoporacées, et à d'autres familles. Au Japon, trois  $\beta$ -glucanes anti-tumeurs sont déjà mis sur le marché depuis une 20<sup>aine</sup> d'années.

- **Le Lentinane**, extrait du Shiitaké pour traiter le cancer de l'estomac
- **Le PSK** ou Krestine, extrait du *Coriolus versicolor* pour traiter les cancers du tube digestif, du poumon et du sein.
- **Le SPG** ou Schizophyllan, extrait du *Schizophyllum* commune pour traiter le cancer de l'utérus

### QUELQUES CHAMPIGNONS COMESTIBLES



**Figure 40:** Quelques espèces de champignons comestibles

### QUELQUES CHAMPIGNONS VENENEUX, VOIRE MORTELS



**Figure 41:** Quelques espèces mortelles

### II.2.3. Mycètes comme agents de fermentation alimentaire: Fermentation panaire par la levure *Saccharomyces cerevisiae*

#### II.2.3.1. Définitions

**La fermentation :** est une réaction biochimique consiste à libérer de l'énergie à partir d'un sucre (glucose, la plus part du temps).

La science qui traite la fermentation est la zymologie. La fermentation ne nécessite pas de dioxygène (O<sub>2</sub>).

**Le pain :** est le résultat d'une fermentation alcoolique par *Saccharomyces cerevisiae*, il est fabriqué par mélange de : la farine, de levure ou levain, de sel et d'eau.

#### II.2.3.2. Caractéristiques générales de *Saccharomyces cerevisiae*

Le métabolisme de la levure est majoritairement de type fermentatif même en présence d'une bonne oxygénation. Le volume de gaz carbonique produit lors de la fermentation panaire responsable de la levée de la pâte, dépend de la concentration en sucres fermentescibles préexistants dans la farine (oses et oligosides) mais aussi de la vitesse à laquelle le maltose est libéré sous l'action des amylases et des sucres ajoutés en boulangerie (saccharose, sirops de glucose).

Les sucres fermentescibles préexistants dans la farine représentent 0,1 à 0,2% de glucose et fructose, 0,2 à 0,3% de saccharose et 0,07% de maltose, sont très vite consommées par la levure, ils sont à l'origine de 1/3 environ de CO<sub>2</sub> nécessaire à la levée de la pâte.

*Saccharomyces cerevisiae* est incapable d'hydrolyser l'amidon ou les dextrines. Ces sucres doivent être hydrolysés par les  $\alpha$  et  $\beta$  amylases de la farine ou par ajout d' $\alpha$  amylases bactérienne ou fongique. L'activité fermentaire de la levure est optimale pour des pH compris entre 4 et 6.

En dehors des sources de carbone, la levure utilise les acides aminés des protéines de la farine pour couvrir ses besoins azotés limités. Pour son incorporation dans la pâte, elle peut être soit diluée dans l'eau de coulage (si cette dernière n'est pas trop froide), soit émiettee directement dans la farine. La levure de panification est constituée de cellules vivantes, elle doit être stockée au froid entre 4 et 6°C.

#### II.2.3.3. Action de la levure en panification

Son activité débute dès son incorporation dans la pâte et s'arrête 5 minutes après le début de la cuisson. Au cours du pétrissage, les cellules de levure vont préférentiellement utiliser les

sucres présents dans la farine (glucose et fructose notamment) pour produire les premières molécules de gaz carbonique (CO<sub>2</sub>) et démarrer leur activité fermentaires. Ensuite la levure utilise le maltose (sucre) qui résulte de l'action sur l'amidon de la farine des amylases préexistantes et de celles ajoutées au pétrin (améliorants). En absence d'air la fermentation conduit, en plus du gaz carbonique et de l'alcool éthylique, à développer un certain nombre de composés secondaires (acides, alcools supérieurs, esters, aldéhydes, etc. dont l'importance est très grande pour les caractéristiques organoleptiques des produits finis (aromes et goûts).

## II.2.4. Production de métabolites

### II.2.4.1. Protéines d'origine fongiques (exemple : Les enzymes)

#### Amylases (Hydrolyse de l'amidon)

L'amidon est la matière première de l'industrie alimentaire, utilisée en brasserie, en panification, en papèterie, pharmacie et textile. De nombreuses enzymes d'origine fongiques sont utilisées en fonction du produit d'hydrolyse souhaité.

#### - $\alpha$ - amylases

Diverses espèces d'*Aspergillus* principalement *A. oryzae*, ainsi que *Penicillium expansum* produisent ce type d'enzyme

#### - Amyloglucosidases : Sont notamment produits par *Aspergillus niger* et *A. foetidus*

#### Cellulases (Hydrolyse de la cellulose)

Les champignons sont des sources importantes de cellulases : *Aspergillus niger*, *Sporotrichum dimorphosporium*, *Trichoderma reesii* (activité importante sur la cellulose cristalline). Elles sont utilisées en pharmacie, en alimentation animale, en brasserie, utilisées ou employées pour l'extraction des produits des céréales et alginates des algues

#### Pectinases (Hydrolyse de la pectine)

Il existe toute une série d'enzymes dépolymérisant la pectine, *Aspergillus niger* produit les polygalacturonases, les pectines lyases, les pectines méthyl-estérases. Ces enzymes sont utilisés dans la préparation et la clarification des jus de fruits.

#### Lactases (Hydrolyse du lactose)

Les lactases sont des  $\beta$ -galactosidases hydrolysant le lactose en glucose et galactose. Les organismes producteurs sont : *Aspergillus niger*, *Absidia* sp.

### ✚ Les lipases

Elles dégradent les matières grasses animales et végétales, *Rhizopus delemia* est l'un des principaux producteurs, autres espèces telles que : *Absidia butleri*, *Aspergillus niger*, *Geotrichum candidum* et *Mucor lipolyticus*.

Elles sont utilisées en pharmacie, en fromagerie, dans l'industrie des détergents et en diagnostic médical (analyse des triglycérides (triacylglycerides : TAG)).

### ✚ Les protéinases (enzymes protéolytiques)

**Protéinases alcaline :** *Aspergillus oryzae*, *Aspergillus sojae*

**Protéinases acides :** *Mucor nichei*, *Aspergillus oryzae*, *Aspergillus niger*

**Protéinases neutres :** *Aspergillus oryzae* est la source fongique des protéinases neutres dont les applications sont importantes en boulangeries, dans les industries alimentaires humaines et animales, et dans les industries pharmaceutiques.

### ✚ Hydrolases diverses

Les ribonucléases produites par *Penicillium citrinum*, elles servent à la préparation des nucléotides à partir des acides nucléiques.

#### II.2.4.2. Production de vitamines

Utilisés dans le traitement des dermatoses, d'hypersensibilité ophtalmique à la lumière, contre les migraines et les crampes. Ex : riboflavine (*Ashbya gossypii*, *Eremothecium ashbyii*)

#### II.2.4.3. Alcools

**Ethanol :** produit par *Aspergillus niger* est un produit de base pour l'industrie chimique

#### II.2.4.4. Acides organiques

##### Acide citrique

La plus grande partie de l'acide citrique est produite par des moisissures (Plusieurs espèces d'*Aspergillus*, de *Penicillium*, de *Mucor*, etc.). Il peut également être produit par des levures du genre *Candida*.

Son utilisation est très vaste :

**Dans l'industrie alimentaire**, l'acide citrique est ajouté aux boissons gazeuses, confitures et aux bonbons pour leur donner une saveur légèrement acidulée.

- Il aide à la conservation de nombreux aliments en abaissant le pH

- Il sert d'antioxydant contre le rancissement des huiles et matières grasses, et contre le brunissement des fruits.
- Ajouté aux légumes et aux champignons avant la mise en conserve, il est ajouté également aux jus de fruits.
- **Dans l'industrie des cosmétiques**
- **Dans l'industrie des plastiques** : utilisé sous forme d'esters, dans la purification des métaux lourds grâce à son pouvoir chélatant
- **Dans l'industrie chimique** : production de détergents

### II.3. En industrie pharmacologique

#### II.3.1. Synthèse de médicaments (exemple. le polysaccharide K, produit chimique dérivé de *Trametes versicolor*).

##### II.3.1.1. Habitat et distribution

Le *Coriolus versicolor* ou *Trametes versicolor*, champignon médicinal est présent presque partout dans le monde et pousse généralement sur les restes de troncs morts de diverses espèces d'arbres et sous différents climats. Il est cultivé sur de la sciure de bois. Il est ensuite séché et réduit en poudre pour être traditionnellement utilisé en thé ou à des fins thérapeutiques et pour obtenir divers extraits à usage pharmacologique. Il est appelé champignon nuage en Chine ou communément « queue de dinde », ou « champignon arc-en-ciel ». Entre autres noms, le *Coriolus* est aussi couramment appelé « Yun-zhi ou Kawarakate » (Site web 2).

##### II.3.1.2. Classification

La queue de dinde appartient à l'ordre des *Polyporales*, à la famille des *Polyporaceae*, au genre *Trametes*, dont *Coriolus* est un synonyme. Les polyporacées jouent un rôle très important dans l'écosystème, car elles décomposent le bois et recyclent les nutriments et les minéraux afin qu'ils puissent être utilisés par d'autres organismes.

Le genre *Coriolus* est abondant en Europe et comprend sept à neuf espèces lignicoles. Son aspect ne correspond pas à la forme classique d'un champignon supérieur, car il forme des colonies avec une multitude de sporophores annuels de 2 à 6 cm de large. Ses sporophores fins, d'aspect velouté, se distinguent sur la partie supérieure par l'alternance de bandes glabres brunâtres en formes concentriques de différentes teintes ; les bords sont dominés par une bande blanchâtre indicatrice de croissance (Figure 42).

Depuis plusieurs siècles, *C. versicolor* est une espèce très prisée et d'intérêt médicinal. Il entre aujourd'hui dans la composition de médicaments largement utilisés au Japon, suite aux importantes études menées sur ses propriétés anticancéreuses au cours des trente dernières années. Ainsi, ses principaux constituants bio-actifs sont outre des polysaccharides, des stérols et des protéoglycanes. L'ensemble renforcerait les défenses immunitaires, serait antioxydants et réduirait les neuropathies des pieds et des mains.



**Figure 42:** Champignon *Trametes versicolor* (Site web 2).

#### **II.3.1.3. Propriétés de *Coriolus versicolor***

En Chine et au Japon, le *Coriolus versicolor* est une référence incontournable des manuels de médecine traditionnelle. Le Japon et la Chine ont extrait deux fractions polysaccharidiques de la queue de dinde (*C. versicolor*) – **PSP** (un polysaccharide-peptide) et **PSK** (Polysaccharide Krestin) – qui ont été approuvées comme médicaments. En 1990, le PSK représentait 25 % des médicaments anticancéreux utilisés au Japon.

Actuellement, elle est également utilisée comme ingrédient, qui peut être ajouté au café, au chocolat chaud, ou dans des yaourts ou des smoothies, comme c'est le cas pour d'autres champignons médicinaux tels que le Cordyceps ou le Reishi. Grâce aux méthodes d'extraction modernes, ses biomolécules actives peuvent être concentrées sans les dénaturer, ce qui les rend plus biodisponibles. L'extrait de queue de dinde est généralement commercialisé comme complément alimentaire sous forme de gélules (Site web 2).

#### **II.3.1.4. Utilisations thérapeutiques**

##### **II.3.1.4.1. Immuno-modulateur** (Site web 3)

*Coriolus versicolor* contient des glycoprotéines et des polysaccharopeptides (PSP) dont le bêta-glucane. Les études cliniques ont montré ses effets anti-viraux et en immunothérapie contre le cancer. Ainsi, les polysaccharopeptides ont augmenté la survie de 1 à 5 ans et la qualité de vie de cancéreux et de patients atteints d'hépatite ou autres maladies

chroniques. Son action passe par une activation des cellules de l'immunité, l'augmentation de l'expression des cytokines et chemokines dont le TNF- $\alpha$ . l'infiltration des cellules T au sein de la tumeur.

Le PSP induit également une immuno-surveillance vis-à-vis des tumeurs ce qui conduit à une réduction de la croissance des tumeurs et des métastases. D'autre part, il améliore la tolérance à la chimiothérapie.

Ce champignon agit également par ses propriétés anti-inflammatoires. En effet, l'inflammation chronique est connue comme facteur favorisant le développement de tumeurs. Ainsi, les études *in vitro* ont montré qu'il diminuait l'inflammation et avait un effet cytotoxique sur les cellules cancéreuses. Il aurait donc la capacité à inhiber l'expression de facteurs pro-tumoraux.

De plus, il permet l'apoptose de cellules cancéreuses (sein, mélanome) résistantes à d'autres traitements. Il supprime l'adhésion des cellules tumorales sur les cellules endothéliales et l'angiogenèse. Cependant, *Coriolus versicolor* est tout aussi intéressant sur d'autres cancers, tels que le cancer de l'estomac ou du côlon.

#### **II.3.1.4.2. Neuropathie**

Dans le cas de la maladie de Ménières qui aurait en partie pour cause une neuro-inflammation liée à un stress oxydatif, une supplémentation serait intéressante. Elle a permis d'augmenter la protection antioxydante via la Gluthation réductase et les sirtuines, et l'induction de vitagènes responsables du maintien de l'homéostasie cellulaire et donc de la vie.

#### **II.3.1.4.3. Action anti-virale / Infection à papillomavirus**

Il stimule la voie TH1 avec libération d'interleukines 2, de TNF et d'interférons, activant la réponse anti-virale. En rééquilibrant les voies TH/ TH2, il évite le développement d'allergies ou de maladies auto-immunes. Concernant l'infection à papillomavirus, l'application d'un gel à base de *Coriolus versicolor* durant 6 mois par des femmes atteintes ce virus, a entraîné dans 67% des cas, un test HPV DNA négatif contre 37,2% dans le groupe contrôle.

### **II.3.2. Production de métabolites secondaires: Pénicilline, Céphalosporine, Griséofulvine et Ergot.**

#### **II.3.2.1. Les antibiotiques**

Parmi un total de 10700 antibiotiques décrits dans le monde, environ 1600 proviennent des champignons.

- **Céphalosporines** : produite par *Cephalosporium acremonium*
- **Pénicilline** : produite par *Penicillium chrysogenum* (ou *Penicillium notatum*). Ces molécules inhibent la formation de la paroi bactérienne en intervenant dans l'étape terminale de la formation des peptidoglycanes
- **Griseofulvine** : *Penicillium griseofulvum*, active contre les dermatophytes

### II.3.2.2. Ergot

L'ergot (*Claviceps purpurea*) est un champignon appartenant à la famille des Clavicipitacées, qui parasite de très nombreuses plantes herbacées telles que le blé, le seigle, le riz, etc., On parle de bioagresseur. Le sclérote remplace physiquement la graine qui est habituellement produite par la plante, est une forme de résistance, riches en alcaloïdes responsables de l'ergotisme, en particulier l'acide lysergique dont est dérivé le LSD (Figure 43). L'intoxication par les alcaloïdes produits par l'ergot porte le nom d'ergotisme. Au moyen-âge, le « feu de Saint-Antoine » ou ergotisme était à l'origine de nombreux décès. Les principaux symptômes étaient une gangrène et/ou des convulsions. Devenues rares, les intoxications décrites aujourd'hui sont principalement iatrogènes, dues à un surdosage médicamenteux (traitement des migraines chez l'Homme). Des cas d'ergotisme sont encore observés dans les élevages où les animaux ingèrent des aliments contaminés (ensilage, pâtures). Les symptômes varient en fonction de l'espèce touchée et de la dose ingérée, mais on observe habituellement un mauvais état général, une baisse de production, une gangrène des extrémités, des avortements voire même de la mortalité.

Le sclérote (*Sclerotium clavus*), masse mycélienne noire violacée cassante, blanchâtre à l'intérieur, remplace le grain, puis tombe sur le sol où il se conserve l'hiver.



**Figure 43:** Différents sclérotés sur leur plante hôte (Jacquin, 2009)

### II.3.2.2.1. Biosynthèse des alcaloïdes

Les métabolites secondaires synthétisés par les champignons microscopiques, ne se limite pas aux antibiotiques. Ces microorganismes sont capables de produire des substances à activités pharmacologiques (des hormones, des récepteurs de substances animales et des substances comparables à des peptides médiateurs chez les vertébrés (insuline)). Les premiers produits d'origine fongique en médecine sont les alcaloïdes de l'ergot du seigle (fait partie des céréales à paille), utilisés en gynécologie et pour diverses autres indications.

Les alcaloïdes de l'ergot sont toxiques à fortes doses en provoquant des gangrènes (c'est le terrible feu de Saint-Antoine, provoqué au moyen âge par l'ingestion de farine contaminée par ce champignon). A des concentrations limitées, ces alcaloïdes se révèlent de précieux médicaments. Leurs propriétés obstétricales furent citées pour la première fois en 1565. L'entrée officielle de l'ergot dans la pharmacopée date de 1807. Les principales utilisations thérapeutiques sont : atonie, migraines, troubles circulatoires, insuffisance cérébrale, hypertension, maladie de Parkinson.

### II.3.2.2.2. Utilisation

Les alcaloïdes présentent des activités pharmacologiques très intéressantes et très variées:

- En 1582 il a été utilisé par les sages-femmes pour accélérer la délivrance, ensuite pour la réduction des hémorragies postnatales.
- L'ergométrine (aussi appelée ergobasine ou ergonovine) utilisé comme antihémorragique
- Le dérivé de l'ergométrine: la méthylergométrine qui est commercialisée sous le nom *Methergine*, utilisé pour ses effets thérapeutiques utéro-constrictives
- Les dérivés de l'ergot de seigle sont des molécules utilisées en particulier dans le traitement des crises de migraine

### II.3.3. Production de biomasse

La production de la biomasse a pour but de produire des protéines qui seront utilisés en alimentation animale (parfois humaines).

**II.3.3.1. Biomasse :** La biomasse microbienne brute « Protéines d'organismes unicellulaires » ou SCP (Single Cell Protein), peut être utilisée comme source d'alimentation humaine et animale. Le terme de biomasse désigne le matériel organique cellulaire des organismes mis en culture. Elle peut être une source de protéines, de vitamines, d'antibiotiques, de vaccins, etc.

Les sources de SCP sont la biomasse de levures et de bactéries (les levures et les champignons filamenteux sont plus promoteurs comme source de nutrition humaine que les bactéries).

**II.3.3.1.1. Biomasse de levures :** Les premières tentatives pour fabriquer des levures datent des années 1930. Depuis la fin de la seconde guerre mondiale, la motivation dans ce domaine est d'un côté la volonté de combler le manque chronique en protéines dans les pays en voie de développement et de l'autre, le recyclage des substances polluantes pour l'eau.

Les cellules de levures sont riches en vitamines B essentielles, leurs protéines contiennent peu d'acides aminés soufrés, et ne sont pas suffisamment équilibrées pour les besoins alimentaires humains ou animaux. Cependant, elles peuvent être additionnées à la farine de blé ou de maïs pour fournir des vitamines B, certains acides aminés, et constituer ainsi un aliment plus équilibré.

✓ **Matière première pour la fermentation :** La mélasse, issue de la canne à sucre (liquide visqueux et homogène de couleur marron foncé à noir) ou de betteraves à sucre (liquide visqueux et homogène de couleur marron), est la matière première de choix, elle a un prix compétitif et une teneur favorable en sucres autre que le carbone, à savoir l'azote, des vitamines et des oligo-éléments. Les mélasses sont obtenues par macération, puis par extraction chaude de la canne ou de betteraves, elles contiennent 40 à 50% de saccharose qui sera clivé par une enzyme (l'invertase) de *Saccharomyces cerevisiae* pour former des sucres fermentescibles (le glucose et le fructose). La transformation de la mélasse en masse cellulaire doit être réalisée sous contrôle de l'aération (elle doit être suffisante pour empêcher la formation de l'éthanol) et l'ajout en continu du sucre (qui doit rester inférieur à 100mg/l de glucose), car une concentration plus élevée en glucose exerce une répression catabolique conduisant à la production de l'éthanol.

**II.3.3.1.2. Biomasse de champignons filamenteux (moisissures) :** La production de biomasse par les champignons a commencé vers les années 1950, par l'utilisation de mycélium séché et débarrassé de son contenu en pénicilline de *Penicillium chrysogenum*, pour la nutrition animale. En effet, en 6 à 10 jours de développement, un champignon peut transformer 1000 g de glucides en 135 g de protéines (le porc ne produit que 41 g de protéines et le poulet 49 g pour 1000 g de glucides). Cette biomasse a un contenu total en azote qui peut dépasser 50% de la masse totale (à peine moins que la viande). Sa composition en acides

aminés est bien équilibrée, le taux en lipides est inférieur à 15% (deux fois moins que la viande), les phospholipides représentent 10 à 12% et le cholestérol est absent. Les hyphes rendent le produit fibreux, facteur important pour les nutritionnistes.

✓ **Matière première pour la fermentation** : L'objectif initial est de produire des protéines pour la nutrition animale, à partir de substrats bon marché, ou de récupération (cellulose, eau de traitement des céréales, effluents d'usine à papier). La culture doit être bien aérée. Après quelques jours de développement à 30°C, à un pH optimal, la masse mycélienne est récoltée par filtration ou centrifugation. Cette masse est traitée à la chaleur pour tuer le champignon et pour extraire la plus grande partie des acides nucléiques (résidus < à 1%). Ce mycélium pourra être mélangé à d'autres composés pour donner une série de produits finis.

## II.4. En agriculture

### II.4.1. Lutte biologique (Exemple. *Beauveria bassiana*, contre le doryphore dans la culture des pommes de terre ou contre une chenille responsable de la pyrale du maïs

La lutte chimique constitue la pratique dominante utilisée par les agriculteurs, et ce malgré ses nombreux effets sur l'environnement (insectes bénéfiques, oiseaux, poissons et invertébrés aquatiques) et sur la santé humaine (cancer et déséquilibre neurologique). L'utilisation irrationnelle des pesticides chimiques peut également contribuer au développement de résistances chez les insectes (Wright et Chandler, 1991). D'autres méthodes de lutte contre les insectes ravageurs sont possibles. Ces méthodes se regroupent en quatre grandes catégories : la lutte par amélioration génétique, la lutte physique, la lutte par les pratiques culturales et la lutte biologique

#### II.4.1.1. Aspects taxonomiques du champignon *Beauveria bassiana*

Le champignon *B. bassiana* est un mycète filamenteux naturel initialement décrit par Beauverie en 1911 sous le nom de *Botrytis bassiana*. Le genre a été établi par Veullemin (1912) et appartient à la classe des deuteromycètes et à l'ordre des hyphomycètes (Subramanian, 1983).

#### ✓ **Classification**

D'après Rehner et Buckley en 2005, *Beauveria bassiana* est classée comme suite :

**Règne** : Fungi

**Phylum :** Ascomycota

**Sous-phylum :** Pezizomycotina

**Classe :** Sordariomycete

**Sous-classe :** Hypocreomycetidae

**Ordre :** Hypocreale

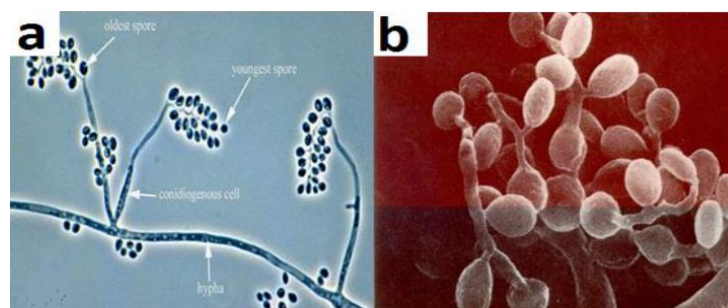
**Famille :** Cordycipitaceae

**Genre :** *Beauveria*

**Espèce :** *B. bassiana*

#### II.4.1.2. Morphologie

Le champignon *B. bassiana* est une espèce deuteromycète (hyphomycète), fréquemment retrouvée dans les sols du monde entier, il est d'origine terrigène, saprophyte ubiquitaire et pathogène pour de nombreux ordres d'insectes. Ce champignon forme des hyphes transparents et septaux de 3,5 µm de diamètre. Cette espèce produit des colonies cotonneuses de couleur blanchâtre à jaunâtre. Le genre est caractérisé par un conidiophore à base renflée et à extrémité terminale en zigzag formant de façon sympodiale de petites spores unicellulaires. Le conidiophore continue de croître après avoir donné naissance aux spores et chaque spore laisse une cicatrice en relief (aspect denticulé). Les bouquets de conidiospores donnent un aspect en "fausse tête" (Figure 44a,b). On distingue deux types de spores selon la présence ou l'absence d'oxygène: les conidiospores (1-4µm de diamètre) formées en présence d'air et les blastospores (2-3 µm de diamètre) en condition d'anaérobiose. Les conidiospores prennent une forme sphérique ou ovale tandis que les blastospores sont uniquement ovales. Les deux types de spores peuvent avoir le même effet pathogène sur les insectes infectés (Weiser, 1972 ; Lipa, 1975).



**Figure 44:** Morphologie de *B. bassiana* : (a) : Hyphes et mycélium de *B. bassiana*. (Par David Ellis, source: <http://www.mycology.adelaide.edu.au/..../beauveria.l.gif>); (b) : Spores de *B. bassiana* (Par John Bisselt Source : Site web 4).

### II.4.1.3. Mode d'action

Le champignon *B. bassiana* infecte l'insecte par contact et n'a pas besoin d'être ingéré par son hôte pour causer l'infection. En général, le processus d'infection de *B. bassiana* est divisé en quatre phases distinctes soit les phases d'adhésion, de germination, de différenciation et de pénétration (Figure 45). Ce champignon infecte l'insecte par pénétration directe à travers la cuticule ou entrer par le système respiratoire et la cavité buccale.

**La phase d'adhésion :** constitue la première étape du processus d'infection. Elle se déclenche par un mécanisme de reconnaissance et de compatibilité des conidies avec le tégument de l'insecte. Ce phénomène peut être déclenché par des polysaccharides fongiques extracellulaires, des lectines et des enzymes extracellulaires, permettant l'attachement de celle-ci (Boucias et Pendland, 1991).

**La phase de germination :** une fois en contact avec la cuticule, la spore produit un mucilage hygroscopique facilitant la germination des spores, et peut aussi créer un environnement favorable aux enzymes extracellulaires libérées par ces dernières.

**La phase de différenciation :** est une phase importante dans le processus d'infection. Au cours de cette phase, la spore germée produit une structure appressoriale terminale, qui sert de point d'ancrage et de ramollissement de la cuticule ce qui a pour effet de favoriser la pénétration de la spore (Magalhaes et *al.*, 1989).

Finalement, **la phase de pénétration :** consiste à la pénétration du microchampignon dans l'hôte à travers les orifices naturels, la cuticule ou par ingestion. En général, la cuticule de l'insecte est une barrière structurellement et chimiquement complexe pour la pénétration du champignon. L'épicuticule contient une protéine stable au phénol et est couverte d'une couche cireuse contenant des acides gras, des lipides et des stérols (Andersen, 1979).

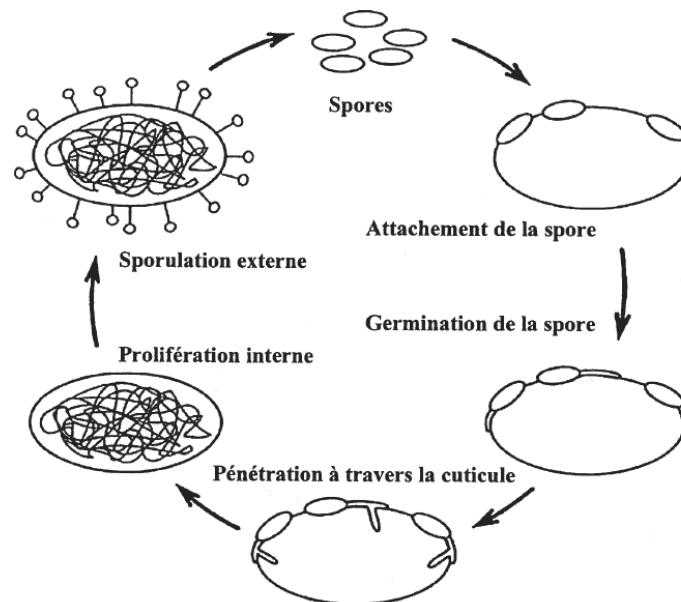
La procuticule (couche interne) contient de nombreuses fibrilles de chitine enfouies dans une matrice protéinique. Celle-ci peut représenter jusqu'à 70% du poids sec de la cuticule. Il n'est pas surprenant, vu la complexité de la cuticule, que les champignons entomopathogènes aient besoin d'une série d'enzymes hydrolytiques pour assurer la pénétration cuticulaire et fournir la nourriture nécessaire à la croissance. On connaît surtout la protéase. Cette enzyme a une forte activité sur la cuticule des insectes et est la protéine prédominante produite pendant la formation de l'appressorium (St Léger et *al.*, 1993).

La pénétration est réalisée par pression mécanique et hydrolyse enzymatique. L'hyphe fongique secrète des enzymes extracellulaires telles que les protéases, les lipases et les chitinases qui attaquent et dissolvent la cuticule permettant aux spores de pénétrer à travers la

cuticule et de se développer dans le corps de l'insecte. Ces enzymes correspondent aux différents polymères de la cuticule (protéines, chitine et lipides).

Les protéases sont les plus importantes enzymes extracellulaires et jouent un rôle primordial dans la pénétration (endoprotéases, aminoprotéases, carboxypeptidase) suivi par N-acétyl glucosaminidase puis les chitinases et lipases).

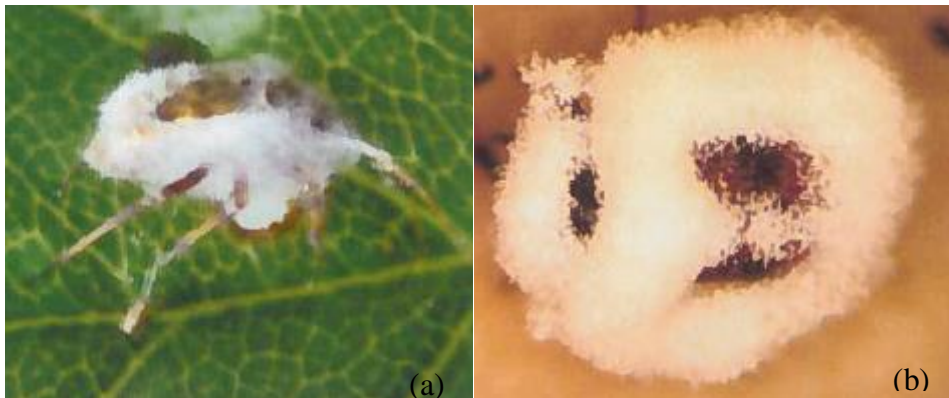
**Phase de dissimulation :** une fois la spore a franchi la cuticule et a percé l'épiderme adjacent de la cuticule, elle entre dans le système circulatoire ouvert de l'insecte « l'hémocoèle ». Le champignon se multiplie par la suite à l'intérieur de tous les organes de l'insecte hôte et il s'accroît sous forme de blastospore. Les spores utilisent le glucose ou les sucres sanguins (tréhalose :  $\alpha$ -D-glucopyranosyl-  $\alpha$ -D-glucopyranoside).



**Figure 45:** Schéma du cycle biologique de *Beauveria bassiana* (Sabbahi, 2008).

Le champignon secrète des métabolites toxiques non enzymatiques qui font des activités antibactériennes, antifongiques et insecticides. Ces métabolites (incluent la beauvericine, la bassianolide, la cyclosporine, la beauverolide, l'isarolide et l'oosporeine) peuvent accélérer le processus infectieux du champignon et affaiblir le système immunitaire de l'hôte. Elles permettent aussi au pathogène de surmonter la compétition des bactéries intestinales. L'insecte infecté est tué, le mycélium se forme par la suite dans l'intestin et les tubes de Malpighi en absorbant tous les nutriments, déshydratant l'insecte et le momifiant (Figure

46a,b). Il produit une masse, un feutrage mycélien blanc cotonneux appelé la muscardine blanche, les hyphes extérieurs produisent des conidies.



**Figure 46:** Production de mycélium de *Beauveria bassiana* sur le cadavre des principaux insectes ravageurs du fraisier. **(a)** : adulte de la punaise terne, **(b)** : adulte de l'anthonome de la fleur de fraisier (Sabbahi, 2008).

## II.4.2. Champignons mycorhiziens

### II.4.2.1. Généralités

Du grec myco ou mukos : champignons, et rhiza : racine. Une mycorhize est une association mutualiste à caractère symbiotique, entre un champignon et l'appareil racinaire d'un métaphyte. On distingue plusieurs types de mycorhizes; les deux types les plus répandus sont les ectomycorhizes et les endomycorhizes.

Le développement des mycorhizes nécessite une cascade d'événements parfaitement synchronisés :

- Coordination entre les génomes des deux partenaires
- Reconnaissance plante hôte-champignons
- Pénétration et infection des tissus racinaires
- Modification de la morphologie de la racine
- Réorganisation du métabolisme des symbiotes
- Régulation du fonctionnement des mycorhizes et l'intégration de ce nouvel organe dans la biologie de la plante entière.

Lors du stade pré-symbiotique, c'est un dialogue chimique entre le champignon et la racine compatible qui permet la rencontre des deux partenaires. Des exsudats racinaires (« branching factor ») de la plante hôte induisent la germination des spores, la croissance et la ramification de l'hyphe (Buée et *al.*, 2000), ce qui augmente les chances du champignon d'entrer en contact avec une racine. Ce composé induisant la ramification de l'hyphe a été isolé et identifié par Akiyama et *al.* (2005) comme étant une strigolactone, mais ce n'est pas

le seul composé induisant cette réaction, les flavonoïdes peuvent aussi avoir des effets sur la croissance du champignon même si cet effet est variable selon le couple plante-champignon (Scervino et *al.*, 2005). La perception de ces signaux chimiques et physiques par le champignon laisse supposer l'existence de récepteurs sur la membrane plasmique du champignon pour la transmission du signal et dont  $Ca_2^+$  pourrait jouer le rôle de 2nd messenger (Requena et *al.*, 2007). Par ailleurs, Kosuta et *al.* (2003) ont montré que le champignon aussi émet une molécule signal qui active un gène de réponse à la symbiose (ENOD11) chez la plante hôte. Dans cette communication complexe entre le champignon MA et la plante, il faut aussi citer les phytohormones (cytokinines, gibberellines, éthylène, acide abscissique, auxines et acide jasmonique), dont les concentrations dans les plantes peuvent varier selon la présence ou non du champignon, mais dont les fonctions ne sont pas toujours bien connues (Hause et *al.*, 2007).

#### II.4.2.2. Types de mycorhizes

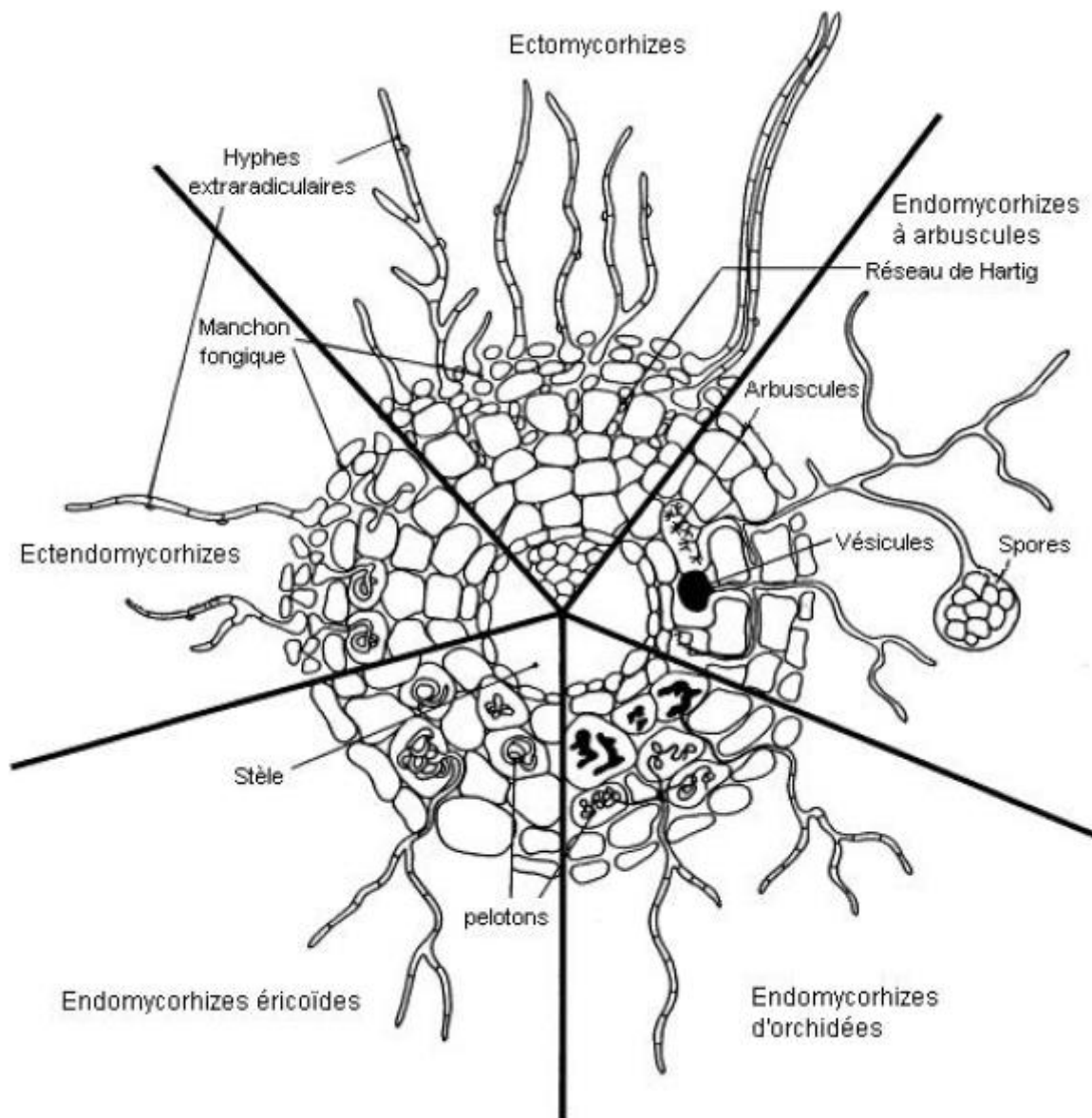
##### II.4.2.2.1. Ectomycorhizes

Les ectomycorhizes (ou mycorhizes ectotrophes) concernent 3% des espèces de Spermatophytes, essentiellement des arbres et arbustes (familles des Fagaceae, *Betulaceae*, *Salicaceae*, *Myrtiaceae* et des Pinaceae, notamment), des régions et boréales tempérées et montagneuses

Les champignons impliqués sont principalement des Basidiomycètes supérieurs (amanites, chanterelles, cortinaires, etc.), appartenant notamment à l'ordre des Agaricales (champignons formant un carpophore constitué d'un pied et d'un chapeau à lamelles). Quelques Ascomycètes forment également des mycorhizes; les plus connus sont la Truffe, Terfez, en symbiose obligatoire avec le chêne.

Chez les ectomycorhizes, les hyphes du champignon forment autour des racines de l'arbre un manchon (**manteau fongique**) ou une gaine d'aspect plus ou moins feutré atteignant quelques dizaines de micromètres d'épaisseur. De cette gaine rayonnent des hyphes dans le substrat, tandis que d'autres hyphes envahissent les espaces intercellulaires des assises externes du cortex, y formant le "**réseau de Hartig**" (Figure 47). Ces hyphes ne pénètrent pas dans les cellules et n'envahissent jamais la stèle. La racine mycorhizée subit des modifications morphologiques: elle perd ses poils absorbants, sa croissance en longueur est ralentie et elle adopte un aspect caractéristique, coralloïde, dendroïde ou noduleux.

La mycorhization montre une spécificité variable selon les champignons : certains ne peuvent entrer en symbiose qu'avec une seule espèce de plante, d'autres ont des partenaires plus diversifiés.



**Figure 47:** Différents types d'associations mycorhiziennes (Selosse et Le Tacon, 1998).

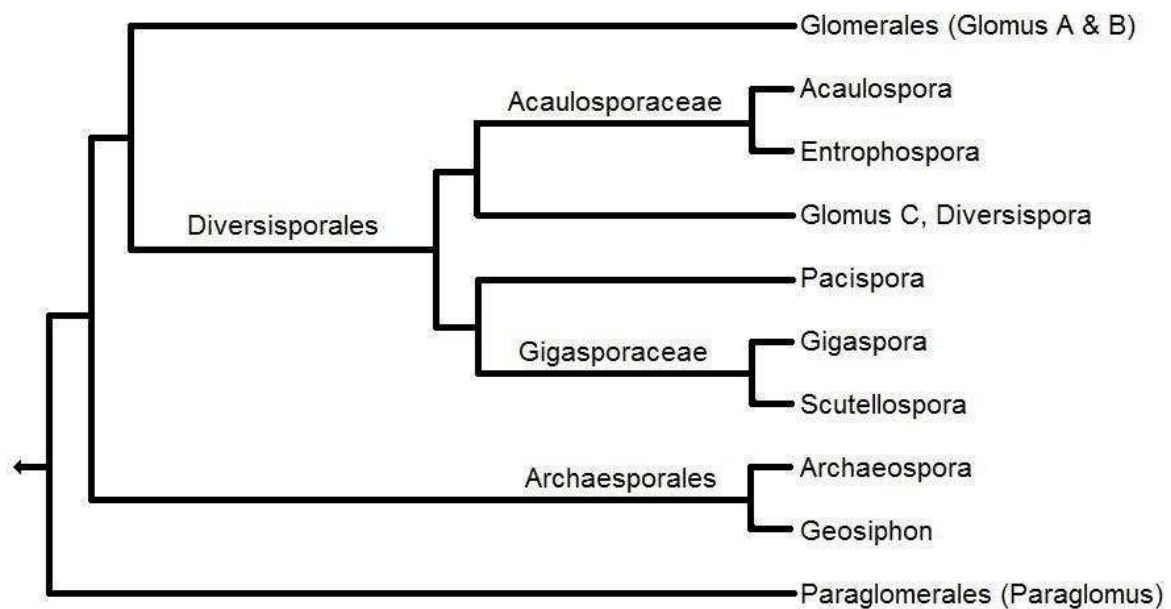
#### II.4.2.2.2. Endomycorhizes

Elles sont ainsi nommées parce que le champignon pénètre dans les cellules de l'hôte. On distingue plusieurs types selon la structure formée.

##### a. Les endomycorhizes à vésicules et arbuscules

C'est le type de mycorhize le plus largement répandu et le plus ancien qui auraient évolué avec les plantes terrestres depuis au moins 460 millions d'années et qui sont maintenant

incapables de survivre sans plante hôte (ce sont des symbioses obligatoires). Contrairement aux autres types de mycorhizes, ce sont des champignons aseptés faisant partie de l'ordre des Glomales (anciennement classé dans les Zygomycètes, il a été placé récemment dans un nouveau phylum : les Glomeromycètes (Schüßler et *al.*, 2001) (Figure 48). Ils sont capables de coloniser une large variété de plantes, de la majorité des herbacées à quelques espèces ligneuses (Ex : Peuplier, Eucalyptus). Les hyphes des champignons mycorhiziens arbusculaires (MA) se développent dans le cortex racinaire où ils forment des arbuscules intracellulaires et des vésicules (à partir de ces hyphes, des ramifications perforent la paroi cellulaire et pénètrent à l'intérieur de la cellule (ne dépasse pas la membrane plasmique), ensuite l'hyphe se ramifie plusieurs fois pour réaliser une structure qu'on appelle arbuscule intracellulaire.

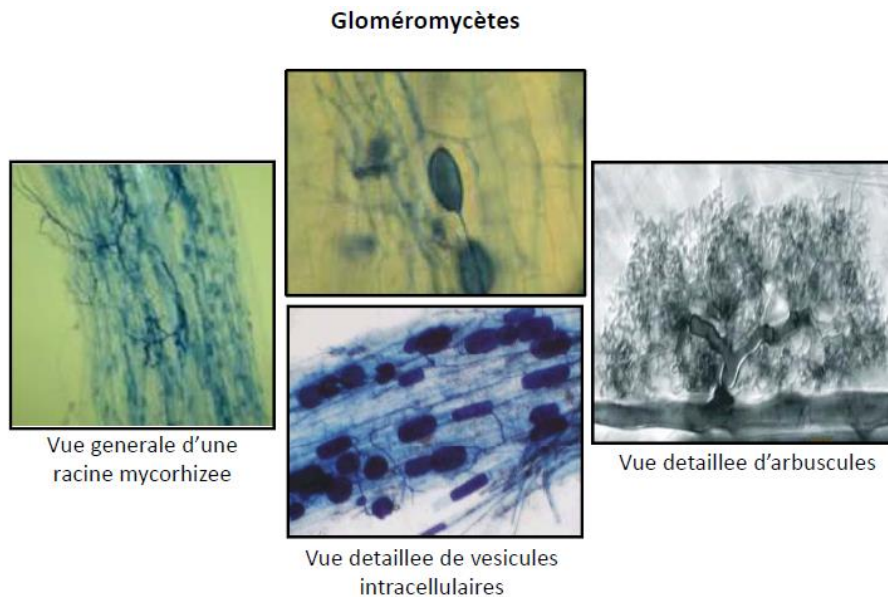


**Figure 48 :** Arbre phylogénétique des Glomeromycota basé sur l'analyse des séquences de la petite sous-unité ribosomale (Schwarzott et *al.*, 2001).

Certaines hyphes se dilatent à leur extrémités pour former de grandes ampoules inter ou intracellulaires, ce sont les vésicules : organes de réserves (Figure 47, 49).

Les arbuscules sont le lieu de contact et d'échanges d'éléments entre les deux partenaires et les vésicules constitueraient des organes de stockage. Des hyphes extraradiculaires se développent aussi sur plusieurs centimètres à l'extérieur de la racine, explorant le sol alentour, et pouvant porter une multitude de spores. Ces spores constituent

l'organe de reproduction et de dissémination typique des champignons MA, elles peuvent contenir des centaines de noyaux qui ne possèdent pas forcément le même matériel génétique. Le champignon ne forme pas de manteau fongique ni de modification morphologiques de la racine, les hyphes pénètrent dans la racine, se développent entre les cellules du cortex racinaire (parenchyme cortical). Ces hyphes progressent au niveau de la lamelle moyenne et surtout dans les méats. Elles forment un réseau d'hyphes moins structuré que celui de réseau de Hartig et qui n'est pas rigoureux.



**Figure 49** : Endomycorhizes à vésicules et arbuscules

### b. Les endomycorhizes à pelotons

Dans ce type le champignon pénètre dans les cellules de la racine mais ne forme que très rarement un réseau intercellulaire, l'infection se propage directement d'une cellule à une autre. Lorsqu'un hyphe pénètre dans une cellule du cortex racinaire il s'enroule plusieurs fois sur lui-même pour former un peloton. C'est le seul type de formation intracellulaire car il traverse la membrane plasmique. Ces mycorhizes sont essentiellement formés par des espèces d'Ascomycota et Basidiomycota (Figure 47).

- Les champignons endomycorhiziens **éricoïdes** sont principalement des ascomycètes tels que l'espèce : *Hymenoscyphus ericae* qui colonisent spécifiquement des plantes de la famille des Ericacées (des genres comme *Calluna*, *Erica*, *Vaccinium*, *Rhododendron*, *Gautheria*, etc.).

- Chez les champignons endomycorhiziens des plantes de la famille d'Orchidaceae sont des Basidiomycètes appartenant au genre : *Rhizoctonia*, *Sebacina*, *Tulasnella*, et *Russula*.  
Forme des endomycorhizes **orchidoïdes**.

#### II.4.2.2.3. Ectendomycorhizes (mycorhizes ectendotrophes)

Ce sont des mycorhizes présentant à la fois structures d'ectomycorhizes et des structures d'endomycorhizes. Les champignons ectendomycorhiziens forment un manchon fongique autour des racines et un réseau de Hartig intercellulaire mais en plus les hyphes pénètrent à l'intérieur des cellules. Ces hyphes intracellulaires sont soit sous formes de pelotons (ce type appelé mycorhizes arbutoïdes) soit sous formes d'hyphes très courts (mycorhizes monotropoïdes). Ces types de mycorhizes sont restreints à des genres de végétaux particuliers : les ectendomycorhizes arbutoïdes se trouvent chez les genres *Arbutus* et *Arctostaphylos* de la famille des Éricacées et les ectendomycorhizes monotropoïdes colonisent les plantes des *Monotropaceae*. Ces champignons ectendomycorhiziens sont des Basidiomycètes.

#### II.4.2.3. Fonctions des mycorhizes

Si la symbiose mycorhizienne arbusculaire est autant répandue dans le monde végétal, c'est parce qu'elle est bénéfique à la plante sous plusieurs aspects : en fournissant des nutriments à la plante, les champignons MA ont un effet fertilisant, ils jouent aussi un rôle dans la stabilité du sol et enfin, ils ont un effet protecteur vis-à-vis des stress abiotiques et biotiques.

- Le champignon s'échange de matière avec la plante ou l'arbre. L'arbre fournit au champignon les sucres élaborés lors de la photosynthèse (glucose, fructose, saccharose, etc.), ce dernier lui offre en échange des éléments nutritifs (les absorbent et les transfèrent à la plante) (Figure 50).

- Etant donné que les hyphes se répandent largement dans le sol, la surface d'absorption est beaucoup plus grande que celle occupée par les poils absorbants des arbres non mycorhizés.

- La zone d'exploitation du sol par les racines mycorhizées est plus importante que celle des racines non mycorhizées.

- Une meilleure résistance au stress hydrique.

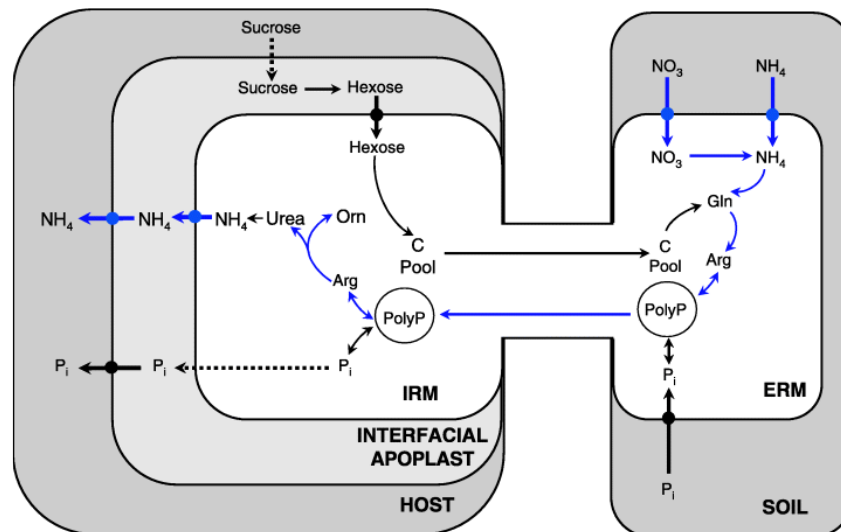
- Les mycorhizes protègent l'arbre des effets toxiques des polluants qui peuvent contenir des métaux lourds véhiculés par les eaux de pluie comme le chrome, le plomb, le nickel, cadmium, le mercure).

- Les champignons mycorhiziens synthétisent des phytohormones et des vitamines : auxines, gibbérellines, cytokinines et l'éthylène qui favorisent la croissance des plantes
- Amélioration de la structure du sol (qualité de l'humus) : Les hyphes fongiques ont la propriété d'agir sur la macroaggrégation des constituants du sol et donc sur la stabilité du sol (Tisdall et *al.*, 1991). La stabilité des sols est très importante dans la lutte contre l'érosion, la perte des nutriments et de la matière organique par lixiviation, qui entraînent une baisse de la productivité en agriculture (Schreiner et Bethlenfalvay, 1995). L'enchevêtrement des racines fines et du mycélium fongique joue un rôle physique dans la liaison des microaggrégats (diamètre < 250  $\mu\text{m}$ ) entre eux pour former des macroaggrégats (> 250  $\mu\text{m}$ ) stables, la stabilité de ces macroaggrégats étant corrélée à la longueur d'hyphes dans le sol (Miller et Jastrow, 1990 ; Tisdall, 1994). La liaison des microaggrégats est due à la production en grande quantité de polysaccharides par le mycélium extraradicalaire ; les champignons MA produisent en effet une glycoprotéine : la glomaline (Wright et Upadhyaya, 1998) qui influence la stabilité du sol et dont la concentration dans les sols dépend de la plante hôte et du champignon associé (Rillig et *al.*, 2002).
- L'association mycorhizienne joue un rôle déterminant dans les mécanismes de protection de la plante contre les attaques microbiennes. Le champignon secrète des antibiotiques tels que chloromycorrhizin A, mycorrhizin A efficace sur la flore microbienne tellurique pathogène.
- Les plantes mycorhizées ont une teneur tissulaire en N, P et K notablement plus élevée que les mêmes espèces non mycorhizées cultivées sur le même sol. On admet aujourd'hui que le champignon améliore l'alimentation minérale de la plante, en lui fournissant de grandes quantités de phosphore et d'azote.

#### ✓ Mécanismes d'échanges d'éléments nutritifs

Les structures intracellulaires que sont les arbuscules constituent le lieu d'échanges de nutriments entre la plante et le champignon. Au niveau de ces structures bien ramifiées, le champignon reçoit des produits carbonés issus de la photosynthèse (sucres et lipides) lui permettant de croître et de former du mycélium à l'extérieur des racines (extraradicalaire) à la recherche d'éléments nutritifs (phosphore, azote) qu'il transporte jusqu'à la plante (Figure 50).

Le cycle du champignon est complété lorsqu'il forme de nouvelles spores dans ce mycélium externe. L'échange et le transport des nutriments mettent en jeu un certain nombre de transporteurs membranaires. Le transport des phosphates par des plantes mycorhizées a ainsi particulièrement été étudié (Javot *et al.*, 2007) et un certain nombre de transporteurs de phosphate ont pu être identifiés sur la membrane périarbusculaire (Poulsen *et al.*, 2005) ainsi que sur le mycélium extraradiculaire (Benedetto *et al.*, 2005). Enfin, récemment, une attention particulière s'est portée sur le rôle des aquaporines en ce qui concerne le transport de l'eau et des nutriments entre les deux partenaires de la symbiose mycorhizienne arbusculaire (Uehlein *et al.*, 2007). Les aquaporines, présentes dans de nombreux systèmes biologiques, constituent un système de diffusion facilitée à travers les membranes qui sont ainsi perméables à différentes molécules de petites tailles ( $\text{CO}_2$ ,  $\text{NH}_3/\text{NH}_4^+$ ) pouvant être échangées entre le champignon et les racines.



**Figure 50 :** Transport et métabolisme de l'azote et du phosphore dans un système (racine de carotte transformée – champignon MA). L'azote inorganique ( $\text{NH}_4^+$ ,  $\text{NO}_3^-$ ) est prélevé par le mycélium extraradiculaire (ERM) du champignon, assimilé et incorporé dans les acides aminés (principalement arginine (Arg)). Arg est ensuite co-transporté avec des polyphosphates (PolyP), issus du phosphore inorganique ( $\text{P}_i$ ) prélevé par l'ERM, vers le mycélium intraradiculaire (IRM). Dans l'IRM, Arg est alors transformé en urée et ornithine, qui donnent, sous l'action de l'uréase et de l'ornithine aminotransférase, du  $\text{NH}_4^+$  qui peut être transféré à la plante hôte, de même que les phosphates. En échange, le pool de C non utilisé par la plante est transporté vers l'ERM. (Jin *et al.*, 2005).

### II.4.3. Biofertilisants, biopesticides, hormones de croissance

Le sol est un milieu vivant dans lequel évoluent de nombreux organismes. Sa qualité dépend en grande partie de l'activité de la diversité et de l'équilibre existant entre les différents organismes vivants qui le composent. Du plus grand au plus petit, chacun remplit des fonctions primordiales à la vie du sol, et donc à celle de la plante.

Pour assurer leur développement, les plantes ont besoin de lumière, de dioxyde de carbone ( $\text{CO}_2$ ), d'oxygène ( $\text{O}_2$ ) et d'éléments minéraux. Grâce à leur système racinaire, elles puisent ces ressources stockées dans le sol, afin de permettre leur nutrition, mais le sol ne joue pas uniquement le rôle de « réservoir à nutriments » pour les végétaux, il s'agit d'un écosystème complexe. Même s'il possède un capital nutritionnel conséquent, une fraction des apports servant à nourrir la plante peut être immobilisée, donc indispensable pour celle-ci. C'est à ce stade qu'interviennent les microorganismes du sol. Ils participent à des mécanismes permettant d'améliorer la biodisponibilité de nutriments, favorisant ainsi le développement de la plante (Figure 51).

#### II.4.3.1. Définition d'un biofertilisant

- 1- Les biofertilisants sont des solutions naturelles qui permettent d'obtenir un meilleur équilibre du sol. Leur utilisation, complète l'utilisation d'engrais (issus de la chimie minérale), et non remplacer leur usage.
- 2- Un biofertilisant est un produit contenant des micro-organismes vivants qui contribue à améliorer la croissance des plantes. Il optimise les fonctions du sol et sa fertilité grâce à l'action des micro-organismes qu'il contient.

De nombreux agriculteurs sont engagés dans une démarche d'agriculture respectueuse de l'environnement. Pour mener à bien leurs cultures, des solutions alternatives sont mises à leur disposition.

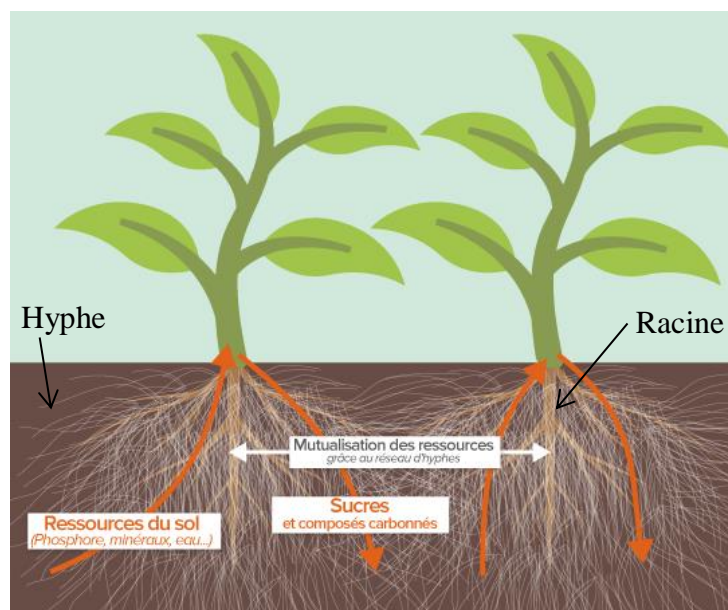


Figure 51: Symbiose mycorhizienne

### **II.4.3.2. Intérêt des champignons endomycorhiziens à vésicule et arbuscule**

La particularité du champignon endomycorhizien est d'entrer en symbiose avec la plante, c'est à dire qu'il s'associe avec celle-ci, et chacun des deux organismes en tirent un avantage. Les champignons mycorhiziens à arbuscules (CMAs) sont considérés comme des biofertilisants naturels du sol. Ils fournissent à la plante l'eau, le phosphore et l'azote, ainsi qu'une protection contre le stress biotique et abiotique

Une partie des ressources en phosphore du sol, qui étaient jusqu'alors indisponibles pour la plante car trop éloigné des racines, deviennent ainsi disponible grâce au réseau d'hyphes qui couvrent une grande surface du sol. De nombreux autres effets ont été observés sur les plantes grâce à l'action de la symbiose :

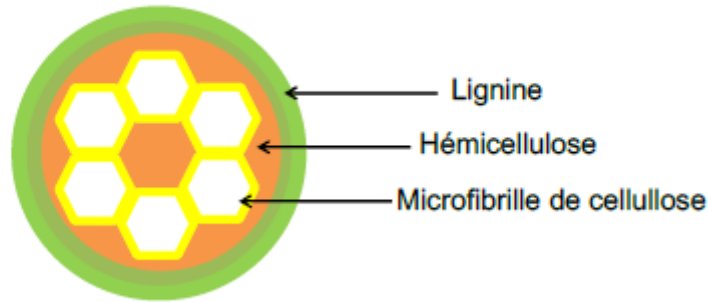
- Une meilleure résistance au stress hydrique, limitant les besoins en irrigation
- Une meilleure résistance au stress thermique (froid ou chaleur excessive)
- Un meilleur taux de survie au cours de l'acclimatation en sortie de pépinière
- Une meilleure tolérance à certains polluants (métaux, hydrocarbures, sels)
- Une influence profonde sur les micro-organismes de la rhizosphère, pouvant limiter l'apparition de certaines pathologies racinaires.
- une meilleure structuration physique du sol par l'effet agrégeant du réseau mycélien et des molécules qu'il secrète, en particulier la « glomaline »
- Une structuration des communautés bactériennes de la rhizosphère par l'intermédiaire notamment des exsudats du champignon
- Une contribution au fonctionnement intégré du sol, à travers ce que l'on appelle les réseaux mycorhiziens communs.

Les champignons mycorhiziens sont aussi utilisés comme un biopesticide

## **II.5. Environnement**

### **II.5.1. Champignons ligno-cellulolytiques**

Les parois végétales sont constituées de fibres de cellulose dont le réseau est inséré dans une matrice hémicellulosique. La lignine sert de ciment entre la cellulose et l'hémicellulose, conférant la résistance à la paroi végétale. La cellulose est donc étroitement associée ou reliée aux deux autres constituants de la biomasse lignocellulosique (Figure 52).

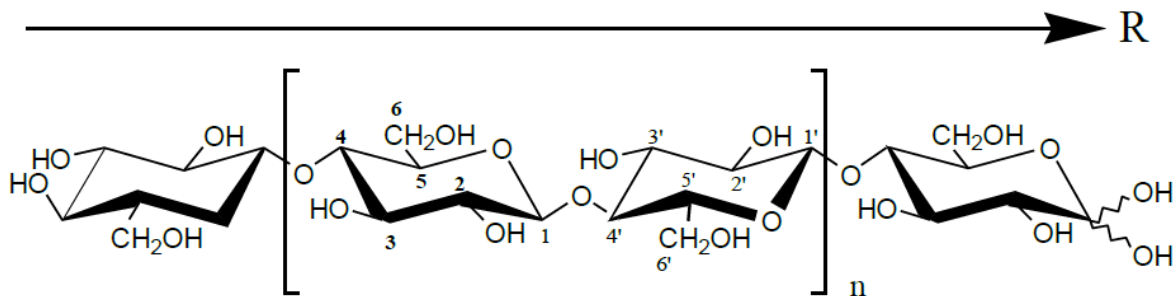


**Figure 52:** Représentation schématique d'une coupe transversale de parois végétales  
(Claisse, 2013)

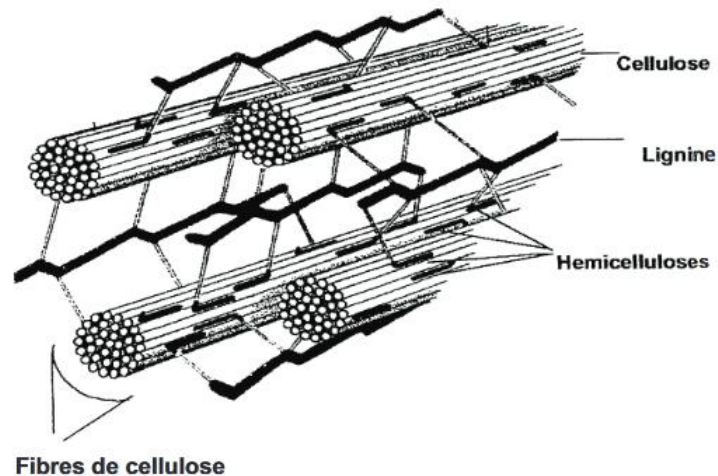
### II.5.1.1. Structure de la cellulose

La cellulose est un biopolymère lignaire, insoluble, constitué d'unités de glucose reliées entre elles par des liaisons  $\beta$ -1,4- glycosidiques (union répétée d'un hydroxyle anomère  $\beta$  d'un D-glucopyrannose avec l'hydroxyle C<sub>4</sub> d'une autre molécule de  $\beta$ -D-glucopyrannose, qui par conséquent subit une rotation de 180° par rapport au résidu glucose précédent. Le motif structural de base n'est donc pas le glucose, mais un « homodisaccharide » appelé le « cellobiose », les oligomères de glucoses liés en  $\beta$ -1,4 appelés « cellodextrines » (oligosaccharide fait de plusieurs unités de cellobiose) (Figure 53a,b ) (Sjoström 1993).

« anomère est la forme cyclique d'un ose ».



**Figure 53a :** Structure de la cellulose



**Figure 53b :** Représentation schématique des composants de la paroi cellulaire végétale des biomasses lignocellulosiques (Shleser, 1994)

#### II.5.1.1.1. Etapes enzymatiques de la dégradation de la cellulose par les moisissures (champignons)

La dégradation de la cellulose est réalisée par un complexe enzymatique appelé cellulase (Endo-1,4- $\beta$ -D-glucanases, Exo-1,4- $\beta$ -glucanases, 1,4- $\beta$ -glucosidases). Plusieurs étapes enzymatiques sont nécessaires pour dégrader la cellulose. Ainsi, l'endo-1,4- $\beta$ -D-glucanase est une enzyme qui brise les liens entre deux glucoses en présence de molécules d'eau. L'enzyme repère les liens en position 1 et 4 à l'intérieur du polymère. L'action de cette enzyme entraîne la production d'oligosaccharides, qui sont des polymères de glucose plus courts que la cellulose, mais de longueurs variables (fractionnement de la cellulose en fibres plus courts de cellodextrines). Ensuite, les exo-1,4- $\beta$ -glucanases (telles la cellobiohydase et d'autres exoglucanases) enlèvent les unités de glucose du polymère, en présence de molécules d'eau, à l'extrémité réductrice de l'oligosaccharide. La cellobiose, qui est un disaccharide, donc à deux molécules de glucose, résulte de cette réaction. (Les cellodextrines sont dégradés en cellobiose et cellodextrines de faible poids moléculaire). Finalement, les 1,4- $\beta$ -glucosidases hydrolysent la cellobiose de façon à donner des glucoses libres. Les cellobioses et cellodextrines peuvent être également hydrolysés par d'autres enzymes tel l'enzyme cellobiophosphorylase et l'enzyme cellodextrine phosphorylase respectivement (Stryer, 1988).

En conséquence, les sous-produits de la dégradation de la cellulose via des processus enzymatiques microbiens sont donc, le glucose, la cellobiose, le gluconolactone (qui peut agir comme inhibiteur en présence d'une forte concentration de glucose) et des oligomères de

glucose. Ces produits peuvent donc servir de sources organiques d'énergie pour les microorganismes présents dans la matière végétale et dans l'environnement.

### II.5.1.2. Processus de dégradation de la lignine

La lignine est un polymère naturel complexe irrégulier de nature phénolique ramifié plus ou moins méthoxylés, reliées entre elles par des liaisons éthers ou directement entre les atomes de carbone.

Trois monolignols entrent dans sa composition, l'alcool coniférylique, l'alcool coumarylique et l'alcool sinapylique. Ces trois monomères permettent de former toutes les lignines trouvées dans la nature. Ces précurseurs subissent plusieurs transformations ce qui entraîne un grand nombre de liaisons différentes nécessitant plusieurs étapes enzymatiques pour sa dégradation. Ces monolignols se trouvent en proportions variées selon les espèces et les tissus (Reid, 1995).

La lignine est extrêmement résistante à la dégradation. En formant des liaisons à la fois avec la cellulose et les hémicelluloses, elle crée une barrière à toutes les solutions ou enzymes, et empêche la pénétration des enzymes lignocellulosiques au sein de la structure lignocellulosique.

#### - Les enzymes ligninolytiques

Les champignons de la pourriture blanche dégradent la lignine en produisant 4 grandes familles d'enzymes extracellulaires. Ces enzymes possèdent la capacité d'oxyder des substrats de structures chimiques variées ayant des potentiels redox élevés (allant jusqu'à 1.4 V) et ce, de façon non spécifique. Cette propriété oxydative non-spécifique ainsi que leur potentiel redox élevé représentent des caractéristiques intrinsèques de ces protéines favorisant leur utilisation dans des biotechnologies environnementales. Ces quatre principaux types d'enzymes qui permettent une dégradation complète de la lignine sont : les lignine peroxydases (LiP), les manganèse peroxydases (MnP), les versatile peroxydases (VP) et les phénol-oxydases ou laccases (Dashtban et *al.*, 2010).

**La lignine peroxydase** (1,2-bis (3,4-dimethoxyphenyl) propane-1,3-diol : hydrogen-peroxide oxydoréductase, EC 1.11.1.14) découverte pour la première fois en 1983 chez *Phanerocheate chrysosporium*, a été identifiée chez plusieurs autres champignons de pourriture blanche du bois. Anciennement nommé lignase, agit de façon non-spécifique sur plusieurs molécules, dont la lignine, en association avec un co-facteur, le peroxyde d'hydrogène (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>). Un grand

nombre de champignons à pourriture blanche utilise cet enzyme. Ces enzymes de type oxydase catalysent l'oxydation de ces composés aux dépens du peroxyde d'hydrogène (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) et utilisent le peroxyde d'hydrogène comme accepteur d'électron (Kirk, 1988).

### Les phénol-oxydases ou laccases

Les laccases ((EC 1.10.3.2) ou *p*-diphénol dioxygènes oxydoréductases, sont des enzymes ayant une activité de type phénol-oxydase à cuivre qui catalysent l'oxydation des composés phénoliques et des amines aromatiques en utilisant l'oxygène moléculaire comme accepteur d'électron :  $4 \text{ Benzenediol} + \text{O}_2 \rightarrow 4 \text{ Benzosemiquinone} + 2\text{H}_2\text{O}$  (Baldrian, 2006).

### Mécanisme d'action des laccases

Différents mécanismes d'action ont été proposés pour expliquer le cycle catalytique des laccases (Baldrian, 2006; Claus, 2004). En effet, les laccases catalysent directement l'oxydation d'une grande variété de substrats phénoliques généralement des *p*-diphénols (Thurston, 1994), créant en présence d'oxygène des radicaux instables qui peuvent par la suite subir des réactions de polymérisation non enzymatique conduisant à leur dégradation (Yaropolov et al., 1994).

Ces enzymes peuvent également oxyder indirectement, les composés non-phénoliques de la lignine, *via* un médiateur (Bourbonnais and Paice, 1990), en raison de leur potentiel d'oxydoréduction très faible (de l'ordre de 0.4 à 0.8 V). Les composés non-phénoliques, comprenant des ortho et des para-diphénols, des aminophénols, des polyphénols, des polyamines, des lignines et des aryldiamines, aussi bien que quelques ions inorganiques, s'oxydent en leurs quinones correspondantes en passant par une étape de formation de radicaux phénoxy très instables et très réactifs et en réduisant l'O<sub>2</sub> en H<sub>2</sub>O (Durán et al., 2002).

## II.5.2. Biomining ou Biolixiviation

### II.5.2.1. Définition

La biolixiviation (appelée aussi lixiviation biologique ou lixiviation microbienne) est une technique d'extraction de métaux à grands intérêts économiques d'une roche, mettant en jeu des micro-organismes capables de convertir ces métaux de la forme solide à la forme soluble, qui pourront ensuite être extraits. Ces processus peuvent être dissociés dans les eaux des sites à déshydratation minière acide (bactéries mésophiles) ou des sources hydrothermales (bactéries thermophiles).

L'oxydation des minerais sulfurés par l'oxygène de l'air produit de l'énergie au cours d'une réaction naturellement accélérée par les microorganismes capables de se développer dans des conditions hostiles à toute autre forme de vie. La maîtrise de cette catalyse biologique a permis de concevoir des procédés complètent les moyens actuels d'exploitation des ressources minérales primaires et ouvrent des perspectives sur le long terme dont l'économie mondiale aura besoin pour satisfaire une demande croissante.

De nombreux métaux et métalloïdes sont indispensables au développement des sociétés humaines, qui ont exploité les gisements de divers éléments stratégiques depuis des siècles, voire des millénaires. Cependant, les êtres vivants dits supérieurs sont sensibles à la toxicité des métaux et métalloïdes, ainsi qu'à l'ensemble des écosystèmes contaminés. Les milieux riches en métaux et métalloïdes offrent cependant des niches écologiques favorables au développement de certains micro-organismes. La microflore de ces environnements est capable de résister à de fortes concentrations en métaux, et de nombreuses bactéries ou champignons peuvent utiliser des métaux et métalloïdes en tant que donneurs ou accepteurs d'électrons. Ils participent ainsi activement aux cycles biogéochimiques de ces éléments.

La transformation oxydo-réductrice des métaux et de leurs composés sulfurés est leur source d'énergie, et le CO<sub>2</sub> de l'air est leur source de carbone permettant de satisfaire leurs besoins métaboliques et de reproduction. Ce qui fait de ces microorganismes l'un des premiers maillons de la chaîne de la vie. Les deux principaux éléments chimiques minéraux dont les changements d'état d'oxydation servent à la croissance de ces microorganismes sont le soufre et le fer. Or ces deux éléments sont les constituants majeurs des gisements de minerais sulfurés qui recèlent une fraction importante de certains métaux de valeur économique. Le cuivre, l'or, l'uranium, le nickel et le cobalt sont les métaux dont une part de la production mondiale est le fait d'installations utilisant la biolixiviation.

#### **II.5.2.2. Procédés**

Les procédés mis en œuvre dans la technique de biolixiviation sont multiples, mais peuvent être regroupés en deux grandes familles : les procédés statiques et les procédés dynamiques, le but étant de récupérer le métal d'intérêt sous forme dissoute, qui sera ensuite précipité par extraction sur solvant ou par électrolyse (Habashi, 1970).

### II.5.2.2.1. Mode statique

Le principe est de faire transiter une solution acide, contenant les microorganismes, à travers un minéral issu directement d'une mine. Ces procédés sont surtout utilisés pour l'extraction du zinc, du cuivre, du nickel et du cobalt.

### II.5.2.2.2. Mode dynamique

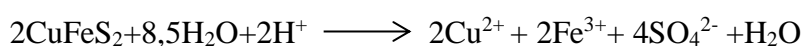
Le minerai préalablement broyé et mélangé à la solution microbienne, est mis sous agitation dans un réacteur, afin de faciliter les échanges gaz/liquide/solide.

### II.5.2.3. Application

Les microorganismes utilisés dans ces différents procédés agir suivant deux voies : la voie directe, où les réactions sont directement catalysées par les microorganismes, et la voie indirecte, où les réactions sont accélérées par l'acidification due à la formation d'acides organiques. La dégradation du minerai n'est donc pas réalisée directement par les microorganismes, mais par leurs produits, par la formation de complexes solubles entre les ions métalliques et les acides organiques.

La matrice cristalline de la pyrite peut contenir ou être associée à des métaux comme l'or, le cobalt, le nickel ou le cuivre qu'il est économiquement intéressant d'extraire par un traitement par biolixiviation. Ces métaux peuvent être présents sous forme de composés sulfurés ou sous forme élémentaire dans le cas de l'or, ou encore inclus dans le réseau cristallin de la pyrite qu'il faudra donc détruire au moins partiellement, pour récupérer le métal de valeur. Dans le cas d'autres métaux piégés par la pyrite, comme le cobalt, le traitement par biolixiviation conduit à leur solubilisation sous forme de sels de sulfate, et il est possible de les récupérer sélectivement à partir de la solution aqueuse produite par neutralisation à la chaux, précipitation chimique, extraction par solvant ou résine, etc.

Le cuivre, composant majoritaire de la chalcopyrite ( $\text{CuFeS}_2$ ) est dissous grâce à l'acide sulfurique excrété par *Thiobacillus thiooxidans*, ou par l'oxydation du fer ferrique ( $\text{Fe}_3^+$ ) généré l'oxydation du fer ferreux ( $\text{Fe}_2^+$ ) de *Leptospirillum ferrooxidans*. Le nickel, contenu dans la pentlandite  $(\text{Fe,Ni})_9\text{S}_8$  est extrait grâce à l'acide citrique ou l'acide oxalique produits par les champignons *Aspergillus niger* ou du genre *Penicillium*, le nickel étant nocif pour certaines bactéries. La réaction est montrée dans l'équation suivante :



L'arsénopyrite (FeAsS), contenant l'or, est solubilisé par voie directe, grâce à l'oxydation de *Thiobacillus thiooxidans*, l'or est ensuite complexé avec une solution de cyanure.

## Références bibliographiques

**Ahmad F., Ahmad I. et Khan M.S. 2008.** Screening of free-living rhizospheric bacteria for their multiple plant growth promoting activities. *Microbial Research*, 163 : 173-81.

**Anastasiadis I., Giannakou I., Prophetou-Athanasiadou D. & Gowen S. 2008.** The combined effect of the application of a biocontrol agent *Paecilomyces lilacinus*, with various practices for the control of root knot nematodes. *Crop Prot.*, 27, 352-361.

**Andersen S.O. 1979.** Biochemistry of insect cuticle. *Annual Review of entomol*, 24: 29-61.

**Angert E. R., Clements K. D. & Pace N. R. 1993.** The largest bacterium. *Nature* 362, 239–241.

**Akiyama K., Matsuzaki K., Hayashi H. 2005.** Plant sesquiterpenes induce hyphal branching in arbuscular mycorrhizal fungi. *Nature* 435: 824-827.

**Ashrafuzzaman M., Hossen F.A., Ismail M.R., Hoque M.A., Islam M.Z., Shahidullah S.M. et Meon S. 2009.** Efficiency of plant growth promoting Rhizobacteria (PGPR) for the enhancement of rice growth. *Afri. J. Biotechnol.*, 8 : 1247-1252.

**Baldrian P. 2006.** Fungal laccases-occurrence and properties. *FEMS Microbiol Rev* 30, 215-242.

**Barreto T. R. 2008.** Population densities and genetic diversity of actinomycetes associated to the rhizosphere of theobroma cacao. *Brazilian Journal of Microbiology*. Vol: 39.N: °3. 464-465.

**Bechtel D.B., and Bulla L.A.Jr. 1976.** Electron Microscope Study of Sporulation and Parasporal Crystal Formation in *Bacillus thuringiensis*. *J. Bacteriol.*, 127: 1472-1481.

**Benedetto A., Magurno F., Bonfante P., Lanfranco L., 2005.** Expression profiles of a phosphate transporter gene (GmosPT) from the endomycorrhizal fungus *Glomus mosseae*. *Mycorrhiza* 15: 620-627.

**Berggren I., van Vuurde J.W.L., et Martensson A.M. 2001.** Factors influencing the effect of deleterious *Pseudomonas putida* rhizobacteria on initial infection of pea roots by *Rhizobium leguminosarum* bv. viciae, *Appl. Soil Ecol.* 17: 97-105.

**Bergey D.H., & Holt J.G. 2000.** *Bergey's manual of determinative bacteriology*, 9. ed., [Nachdr.]. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins.

**Bezert G., Chappe P., Mourey A., Loubinoux B. 1996.** Action de *Bacillus* et d'actinomycètes sur les champignons du bleuissement du bois. *Bulletin des Académie et Société Lorraines des Sciences*: 1996, 35, n°3

**Bottini R., Cassan F., et Picolli P. 2004.** Gibberellin production by bacteria and its involvement in plant growth promotion. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 65:497–503.

**Boucias D. G. et Pendland I.C. 1991.** Attachment of mycopathogens to cuticle: The initial event of mycosis in arthropod host. In: *The Fungal Spore and Disease Initiation in Plants and Animals*. G. T. Cole and H. C. Hoch (eds.), Plenum, New York, 10) -128.

**Boulon J.-P. 2010.** Qu'est-ce que *Pseudomonas chlororaphis* souche MA342 bio-fongicide en traitement de semences de blé, triticale et seigle. *Phytoma Défense Végétaux*, 632, 10-12.

**Bourbonnais R., Paice M.G. 1990.** Oxidation of non-phenolic substrates: An expanded role for laccase in lignin biodegradation. *FEBS Lett* 267, 99–102.

**Bourlioux P. 2013.** Actualité du microbiote intestinal. *Académie de Pharmacie*.

**Bravo A., Likitvivatanavong S., Gill S.S., and Soberón M. 2011.** *Bacillus thuringiensis*: A story of a successful bioinsecticide. *Insect Biochem. Mol. Biol.* 41, 423–431.

**Brunner K. et al. 2005.** Improvement of the fungal biocontrol agent *Trichoderma atroviride* to enhance both antagonism and induction of plant systemic disease resistance. *Appl. Environ. Microbiol.*, 71, 3959-3965.

**Buee M., Rossignol M., Jauneau A., Ranjeva R., Bécard G. 2000.** The pre-symbiotic growth of arbuscular mycorrhizal fungi is induced by a branching factor partially purified from plant root exudates. *Molecular Plant-Microbe Interactions* 13: 693-698.

**Burdman S., Jurkevitch E., et Okon Y. 2000.** Recent advances in the use of plant growth promoting rhizobacteria (PGPR) in agriculture, *In: Microbial Interactions in Agriculture and Forestry*. N. S. Subba Rao and Y. R. Dommergues, eds., Science Publishers, Enfield, USA, Vol II, pp. 229-250.

**Castric P.A. 1977.** Glycine Metabolism by *Pseudomonas aeruginosa*: Hydrogen Cyanide Biosynthesis. *J. Bacteriol.* 130 : 826-831.

**Chater K.F. 2006.** *Streptomyces* inside out: a new perspective on the bacteria that provide us with antibiotics. *Phil. Trans. R. Soc. B*, 361, 761–768p.

**Chen L., Wang G., Bu T., Zhang Y., Wang Y., Liu M., and Lin X. 2010.** Phylogenetic analysis and screening of antimicrobial and cytotoxic activities of moderately halophilic bacteria isolated from the Weihai Solar Saltern (China). *World J. Microbiol. Biotechnol.*, 26, 879-888p.

**Cheng Z., Duncker B.P., McConkey B.J., et Glick B.R. 2008.** Transcriptional regulation of ACC deaminase gene expression in *Pseudomonas putida* UW4. *Can. J. Microbiol.* 54:128–136.

**Chet I., et Inbar J. 1994.** Biological control of fungal pathogens. *Appl. Biochem. Biotechnol.* 48: 37-43.

**Claisse N. 2013.** Préparation et modification d'oligosaccharides de cellulose par chimie douce bio-inspirée. Thèse Doc. Chimie organique. Université de Grenoble, France. 309p.

**Claus H. 2004.** Laccases : structure, reactions, distribution. *Micron* 35, 93–96.

**Constantinidis A. 1980.** “Steroid Transformation at High Substrate Concentrations Using Immobilized *Corynebacterium simplex* Cells,” *Biotechnology and Bioengineering*, Vol. 22, No. 1, pp. 119-136. [doi:10.1002/bit.260220110](https://doi.org/10.1002/bit.260220110)

**Costacurta A., et Vanderleyden J. 1995.** Synthesis of phytohormones by plant-associated bacteria. *Crit. Rev. Microbiol.* 21:1–18.

**Curl E. A., et Truelove B. 1986.** The rhizosphere, pp: 55-92. Springer Verlag, Berlin.

**Dashtban M., Schraft H., Syed T.A., Qin W. 2010.** Fungal biodegradation and enzymatic modification of lignin. *Int J Biochem Mol Biol* 1, 36–50.

**Davies F.L., et Williams S.T. 1970.** Studies on the ecology of actinomycetes in soil. 1/ The occurrence and distribution of actinomycetes in a pine forest soil. *Soil. Biol. Biochem.* 2: 227-238.

David Ellis, source: [http://www.mycology.adelaide.edu.au/..../beauveria l.gif](http://www.mycology.adelaide.edu.au/..../beauveria%20l.gif).

**Deravel J., Krier F., et Jacques Ph. 2014.** Les biopesticides, compléments et alternatives aux produits phytosanitaires chimiques (synthèse bibliographique). *Biotechnol. Agron. Soc. Environ.* 18(2), 220-232.

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

**Dodd S., Lieckfeldt E., & Samuels G. 2003.** *Hypocrea atroviridis* sp. nov., the teleomorph of *Trichoderma atroviride*. *Mycologia*, 95(1), 27-40.

**Dong H., Gusti A.R., Zhang Q., Xu J-L., Zhang L-H. 2002.** Identification of quorum-quenching *N*-acyl homoserine lactonases from *Bacillus* species. *Appl. Environ. Microbiol.* 68: 1754–1759.

**Dong L., Yang J., & Zhang K. 2007.** Cloning and phylogenetic analysis of the chitinase gene from the facultative pathogen *Paecilomyces lilacinus*. *J. Appl. Microbiol.*, 103(6), 2476-2488.

**Downes B.P., Steinbaker C.R., Crowell D.N. 2001.** Expression and processing of a hormonally regulated b-expansin from soybean. *Plant Physiol* 126:244–252

**Durán N., Rosa M.A., D’Annibale A., Gianfreda L. 2002.** Applications of laccases and tyrosinases (phenoloxidases) immobilized on different supports: a review. *Enzyme Microb Tech* 31, 907–931.

**Ecker J.R. 1995.** The ethylene signal transduction pathway in plants. *Science* ,268:667-675.

**El-Mehalawy A. et al. 2004.**Influence of Maize Root Colonization by the Rhizosphere Actinomycetes and Yeast Fungi on Plant Growth and on the Biological Control of Late Wilt Disease. *International journal of agriculture and biology*. Vol 6. N°:4. 599–605p.

**Fauvergue X., Rusch A., Barret M., Bardin M., Jacquin-Joly E., Malausa T., Lannou C. 2020.** Biocontrôle. Éléments pour une protection agroécologique des cultures. Éditions Quæ. ISSN : 1952-1251, ISBN (pdf) : 978-2-7592-3077-8

**Ferreira N. P., and Tracey R. P. 1984.** “Numerical Taxonomy of Cholesterol-Degrading Soil Bacteria,” *Journal of Applied Bacteriology*, Vol. 57, No. 3, pp. 429-446. [doi:10.1111/j.1365-2672.1984.tb01409.x](https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.1984.tb01409.x)

**Follett P. A., & Duan J. J. 2000.** *Non-target Effects of Biological Control*. Kluwer Academic Publishers, Boston.

**Frankenberger W.T.J., et Arshad M. 1995.** Phytohormones in soil. Microbial production and function. Marcel Dekker, New York, p 503.

**Getha K., Vikineswary S., Wong W.H., Seki T., Ward A., et Goodfellow M. 2005.** Evaluation of *Streptomyces* sp. strain g10 for suppression of Fusarium wilt and rhizosphere colonization in potgrown banana plantlets. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* Vol: 32. 24-32p.

**Glick B.R., Cheng Z., Czarny J., et Duan J. 2007.** Promotion of plant growth by ACC-deaminase producing soil bacteria. *Eur. J. Plant Pathol.* 119:329–339.

**Glick B.R., Patten C.L., Holguin G., et Penrose D.M. 1995.** Biochemical and genetic mechanisms used by plant growth promoting bacteria. *Imperial College Press, London.*

**Glick B.R., Penrose D.M., et Jiping L. 1998.** A model for the lowering plant ethylene concentrations by plant growth promoting bacteria. *J. Theor. Biol.* 190:63–68.

**Gohar M., Gilois N., Graveline R., Garreau C., Sanchis V., and Lereclus D. 2005.** A comparative study of *Bacillus cereus*, *Bacillus thuringiensis* and *Bacillus anthracis* extracellular proteomes. *Proteomics*, 5: 3696-3711.

**Goodfellow M., Williams S.T. 1983.** Ecology of Actinomycetes. *Ann Rev Microbiol.* Vol: 37 : 189-216p.

**Goswami M., Chakraborty P., Mukherjee K., Mitra G., Bhattacharyya P., Dey S., Tribedi P. 2018.** Bioaugmentation and biostimulation: a potential strategy for environmental remediation. *Journal of Microbiology & Experimentation.* 6 (5):223–231.

**Guarner F., Khan A.G., Garisch J., Eliakim R., Gangl A., Thomson A., Krabshuis J., Lemair T., Gonvers J.J. 2011.** Probiotiques et Prébiotiques. *World Gastroenterology Organisation Global Guidelines.* 28p.

**Gupta A., Gopal M., and Tilak K.V. 2000.** Mechanism of plant growth promotion by rhizobacteria. *Indian J Exp Biol* 38:856–862.

**Haas D., et Défago G. 2005.** Biological control of soil-borne pathogens by fluorescent pseudomonads. *Natra. Rev. Microb.* 1129.

**Habashi F. 1970.** Principles of Extractive Metallurgy, volume 2 Hydrometallurgy, Gordon and Breach, Science Publishers, New York,

**Hause B., Mrosk C., Isayenkov S., Strack D. 2007.** Jasmonates in arbuscular mycorrhizal interactions. *Phytochemistry* 68: 101-110. <https://doi.org/10.1016/j.phytochem.2006.09.025>

**Heydari S., Moghadam P.R., et Arab S.M. 2008.** Hydrogen Cyanide Production Ability by *Pseudomonas Fluorescence* Bacteria and their Inhibition Potential on Weed. *Proceedings "Competition for Resources in a Changing World: New Drive for Rural Development"*, Tropentag, Hohenheim.

**Hokkanen H.M.T. 1985.** Success in classical biological control. *Critical reviews in Plant Sciences* 3(1): 35-72.

**Holguin G., et Glick B.R. 2001.** Expression of the ACC Deaminase Gene from *Enterobacter cloacae* UW4 in *Azospirillum brasilense*. *Microb. Ecol.* 41:281–288.

**Howell C.R., Beier R.C., et Stipanovic R.D. 1988.** Production of ammonia by *Enterobacter cloacae* and its possible role in the biological control of *Pythium* preemergence damping-off by the bacterium. *Phytopathologia*, 78:1075- 1078.

**Idris A.H., Labuschagne N., et Korsten L. 2007.** Screening rhizobacteria for biological control of *Fusarium* root and crown rot of sorghum in Ethiopia. *Biol. Control.* 40:97–106.

**Javot H., Pumplin N., Harrison M.J. 2007.** Phosphate in the arbuscular mycorrhizal symbiosis: transport properties and regulatory roles. *Plant, Cell and Environment* 30: 310-322.

**Jin H., Pfeffer P.E., Douds D.D., Piotrowski E., Lammers P.J., et Shachar-Hill Y. 2005.** The uptake, metabolism, transport and transfer of nitrogen in an arbuscular mycorrhizal symbiosis. *New Phytologist* 168: 687-696.

**Joo G.J., Kang S.M., Hamayun M., Kim Na. C.I., Shin D.H., et Lee I.J. 2009.** *Burkholderia* sp. KCTC 11096BP as a newly isolated gibberellin producing bacterium. *J Microbiol.* 47:167–171.

**John Bisselt.** Source: [http:// www.vertigo.uqam.ca/./beauveria\\_bassiana\\_l.jpg](http://www.vertigo.uqam.ca/./beauveria_bassiana_l.jpg).

**Julio A. 2015.** Bactéries : anatomie fonctionnelle et classification médicale.

**Khan M. S ., Zaidi A., et Javed M. 2009.** Microbial Strategies for Crop Improvement. pp: 1-371. Springer-Verlag Berlin Heidelberg.

**Kirk T.K. 1988.** Biochemistry of lignin degradation by *Phanerochaete chrysosporium* dans Biochemistry and genetics of cellulose degradation. Aubert J.P., Beguin P., Millet J. (Eds.). Academic Press, Inc. Harcourt Brace Jovanovich, pp.315-332.

**Kirouac M., Vachon V., Girard F., Schwartz J.L., and Laprade R. 2002.** Amino acid and divalent ion permeability of the pores formed by the *Bacillus thuringiensis* toxins Cry1Aa and Cry1Ac in insect midgut brush border membrane vesicles. *Biochim. Biophys. Acta-Biomembr.* 1561, 171–179.

**Kloepper J.W., Ryn C.M., et Zhang S. 2004.** Induced systemic resistance and promotion of plant growth by *Bacillus* sp. *Phytopathol.*, 94: 1259-1266.

**Kosuta S., Chabaud M., Lougnon G., Gough C., Denarie J., Barker D.G., et Bécard G. 2003.** A diffusible factor from arbuscular mycorrhizal fungi induces symbiosis-specific MtENOD11 expression in roots of *Medicago truncatula*. *Plant Physiology* 131: 952-962.

**Kumari L., et Kanwar S-S. 2012.** Cholesterol Oxidase and Its Applications. *Advances in Microbiology*, 2012, 2, 49-65 <http://dx.doi.org/10.4236/aim.2012.22007> Published Online June 2012 (<http://www.SciRP.org/journal/aim>)

**Larpent J.P., et Sanglier J.J. 1989.** Biotechnologies des antibiotiques. Ed. Masson. Paris, p. 481.

**Lee C., and Liu W. 1992.** “Production of Androsta-1, 4-Diene-3, 17-Dione from Cholesterol Using Immobilized Growing Cells of *Mycobacterium* sp. NRRL B-3683 Adsorbed on Solid

Carriers,” *Applied Microbiology and Biotechnology*, Vol. 36, No. 5, pp. 598-603.  
[doi:10.1007/BF00183235](https://doi.org/10.1007/BF00183235)

**Leelasuphakul W., Sivanunsakul P., et Phongpaichit S. 2006.** Purification, characterization and synergistic activity of [beta]-1,3-glucanase and antibiotic extract from an antagonistic *Bacillus subtilis* NSRS 89-24 against rice blast and sheath blight. *Enzyme Microb. Technol.* 38:990-997.

**Lipa J.J. 1975.** White muscardines (*Beauveria* sp.). In an outline of insect pathology. Foreign Sei. Publ. Dept NCSTE!, Warsaw, Poland. 139-J42.

**Longa C. et al., 2009.** Evaluating the survival and environmental fate of the biocontrol agent *Trichoderma atroviride* SC1 in vineyards in northern Italy. *J. Appl. Microbiol.*, 106(5), 1549-1557.

**Loucif K. 2011.** Recherche des substances antibactériennes à partir d’une collection des souches d’actinomycetes .caractérisation préliminaires de molécules bioactives. Mémoire de magister de microbiologie, Université Mentouri – Constantine, 21p.

**Loudhaief R. 2016.** Effets des bioinsecticides à base de *Bacillus thuringiensis* sur la physiologie intestinale de la Drosophile. Univ. Nice Sophia Antipolis. France. 213p.

**Lucy M., Reed E., et Glick B.R. 2004.** Applications of free living plant growth-promoting rhizobacteria. *Anton. Leeuw. Int. J. G.* 86:1–25.

**Mackey K.R.M., and Paytan A. 2009. Phosphorus Cycle. 2009.** In book: Encyclopedia of Microbiology (pp.322-334). DOI:[10.1016/B978-012373944-5.00056-0](https://doi.org/10.1016/B978-012373944-5.00056-0)

**Magalhaes B.P., Butt T.M., Humber R.A, Shields E.J., et Roberts D.W. 1989.** Formation of appressoria in vitro by the entomopathogenic fungus *Zoophthora radicans* (Zygomycetes: entomophthorales). 1. Inv. Pathol. 55: 284-288.

**MacMillan J. 2002.** Occurrence of gibberellins in vascular plants, fungi, and bacteria. *J. Plant Growth Regul.* 20, 387-442.

**Maier R. M., Pepper I. L., et Gerba C. P. 2009.** Environmental microbiology. Academic Press: London. 598p.

**McQuilken M. et al., 2003.** Production of macrosphelide A by the mycoparasite *Coniothyrium minitans*. *FEMS Microbiol. Lett.*, 2009, 27-31.

**Mesoudi O. 2013.** Contributions à la caractérisation de souches d'actinomycètes productrices des métabolites antibactériens isolées de la sebkha de knadessa (BECHAR), Université Abou BakrBelkaid, Tlemcen. 84 p.

**Miller R.M., Jastrow J.D. 1990.** Hierarchy of root and mycorrhizal fungal interactions with soil aggregation. *Soil Biology and Biochemistry* 22: 579-584.

**Miot C., Poli C., Vinatier E., Jeannin P., Beauvillain C. 2019.** Vaccins, adjuvants et réponse immunitaire post-vaccinale : bases immunologiques. *Revue francophone des laboratoires*, n° 512. 11p.

**Mitter N., Srivastava A.C., Renu A.S., Sarbhoy A.K., et Agarwal D.K. 2002.** Characterization of gibberellin producing strains of *Fusarium moniliforme* based on DNA polymorphism. *Mycopathologia* 153:187–193.

**Neilands J.B., et Leong S.A. 1986.** Siderophores in relation to plant growth and disease. *Ann. Rev. Pl. Physiol.*, 37: 187-208.

**Nouioui I. 2014** phylogénie et évolution de genre *frankia* diplôme de doctorat université Cloude Bernard LYON .

**Oldroyd G.E., Engstrom E.M., et Long S.R. 2001.** Ethylene inhibits the Nod factor signal transduction pathway of *Medicago truncatula*. *Plant cell*. 13:1835–1849.

**Ongena M. & Jacques P. 2008.** *Bacillus* lipopeptides: versatile weapons for plant disease biocontrol. *Trends Microbiol.*, 16(3), 115-125.

**Ongena M., Giger A., Jacques P., Dommes J., et Thonart P. 2002.** Study of bacterial determinants involved in the induction of systemic resistance in bean by *Pseudomonas putida* BTP1. *Euro. J. Plant Pathol.*, 108: 187-196.

**Parthasarathi S., Kim C.J., Lee J.C., Sathya S., Manikandan M., Manikandan T. and Balakrishnan K. 2011.** Taxonomic characterization and UV/VIS analysis of antagonistic marine actinomycete isolated from South Pacific Coast of Philippines. *Int. J. Med. Res.*, 1: 99-105p.

**Patureau D. 1995.** Etude cinétique et physiologique d'une bactérie dénitrifiante en conditions aérobie, suivi d'un réacteur aéré, parfaitement mélangé, en culture pure et en culture mixte associée à une flore nitrifiante. Thèse de doctorat, Université de Toulouse

**Paul S., et Lelièvre J.D. 2018.** Le mécanisme d'action des vaccins, le rôle des adjuvants. in Collège des enseignants d'immunologie. Immunologie fondamentale et immunopathologie. Paris, 2e édition, Elsevier Masson; pp. 255-62.

**Penrose D.M., et Glick B.R. 2001.** Levels of 1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid (ACC) in exudates and extracts of canola seeds treated with plant growth-promoting bacteria. *Can. J. Microbiol.* 47:368–372.

**Pérez-García A., Romero D., & de Vicente A. 2011.** Plant protection and growth stimulation by microorganisms: biotechnological applications of *Bacilli* in agriculture. *Curr. Opin. Biotechnol.*, 22(2), 187-193.

**Perrings C., Williamson M., & Dalmazzone S. 2000.** *The Economics of Biological Invasions*. Edward-Elgar Publishing, Cheltenham.

**Peypoux F., Bonmatin J. M. et Wallach J. 1999.** Recent trends in the biochemistry of surfactin. *Appl. Environ Microbiol.* 51:553-563.

**Piano S., Neyrotti V., Migheli Q., et Gullino M.L. 1997.** Biocontrol capability of *Metschnikowia pulcherrima* against *Botrytis* postharvest rot of apple. *Postharvest Biol. Technol.* 11(3):131-140.

**Plassard C., Robin A., Le Cadre E., Marsden C., Trap J., Herrmann L., Waithaisong K., Lesueur D., Blanchart E., Chapuis-Lardy L., Hinsinger P. 2015.** Améliorer la biodisponibilité du phosphore : comment valoriser les compétences des plantes et les mécanismes biologiques du sol. *Innovations Agronomiques* 43 (2015), 115-138.

**Popp J., Petö K., & Nagy J. 2013.** Pesticide productivity and food security. A review. *Agron. Sustainable Dev.*, 33, 243-255.

**Portejoie S., Martinez J., Landmann G. 2002.** L'ammoniac d'origine agricole : impacts sur la santé humaine et animale et sur le milieu naturel. *INRA Prod. Anim.*, 15, 151-160.

**Poulsen K.H., Nagy R., Gao L.L., Smith S.E., Bucher M., Smith F.A., Jakobsen I. 2005.** Physiological and molecular evidence for Pi uptake via the symbiotic pathway in a reduced mycorrhizal colonization mutant in tomato associated with a compatible fungus. *New Phytologist* 168: 445-453.

([www.prophyta.de/fr/protection-des-plantes/anti-nematicide/mode-operatoire/](http://www.prophyta.de/fr/protection-des-plantes/anti-nematicide/mode-operatoire/)).

**Prakash A., Satyanarayana T., Johri B. N. 2012.** Microorganisms in Environmental Management. Springer, 819p.

**Prescott L.M., Harley J.P., Klein D.A. 2010.** Microbiologie. De Boeck: Bruxelles. 2<sup>ème</sup> éd. 1088p.

**Prescott L.M., Willey J. M., Sherwood L., Woolverton C. J., & Prescott L.M. 2013.** *Microbiologie*. De Boeck 4<sup>ème</sup> édition.

**Puglielli L., Friedlich L., Avi D. R., Setchell Kenneth S., Nagano C., Opazo A.R., Cherny K. J., Barnham J. D., Wade S., Melov D., Kovacs M., and Bush A. I. 2005.** "Alzheimer Disease  $\beta$ -Amyloid Activity Mimics Cholesterol Oxidase," *Journal of Clinical Investigation*, Vol. 115, No. 9, , pp. 2556-2563. [doi:10.1172/JCI23610](https://doi.org/10.1172/JCI23610)

**Rahman M.S., Ano T., et Shoda M. 2007.** Biofilm fermentation of iturin A by a recombinant strain of *Bacillus subtilis* 168. *J. Biotechnol.* 127:503-507.

**Raymond B., Johnston P.R., Nielsen-LeRoux C., Lereclus D., and Crickmore N. 2010.** *Bacillus thuringiensis*: an impotent pathogen, Trends Microbiol. 18: 189–194.

**Rehner R.A., et Buckley E. 2005.** A *Beauveria* phylogeny inferred from nuclear ITS and EF1-alpha sequences: Evidence for cryptic diversification and links to *Cordyceps* teleomorphs. Mycologia 2005 b ; 97(1) :84-98.

**Reid I.D. 1995.** Biodegradation of lignin. Can. J. Bot. 73 (Suppl.): S1011-S1018.

**Requena N, Serrano E., Ocón A., Breuninger M. 2007.** Plant signals and fungal perception during arbuscular mycorrhiza establishment. Phytochemistry 68: 33-40.

**Reyes M.E.Q., Rohrbach K.G., et Paull R.E. 2004.** Microbial antagonists control postharvest black rot of pineapple fruit. *Postharvest Biol. Technol.* 33(2):193-203.

**Richardson D.J., Berks B.C., Russell D.A, Spiro S., Taylor C.J. 2001.** Functional, biochemical and genetic diversity of prokaryotic nitrate reductases. Cell Mol Life Sci CMLS 58: 165–178.

**Rillig M.C., Wright S.F., Eviner V.T. 2002.** The role of arbuscular mycorrhizal fungi and glomalin in soil aggregation: comparing effect of five plant species. Plant and Soil 238: 325-333.

**Rosas-Garcia N.M. 2009.** Biopesticide production from *Bacillus thuringiensis*: an environmentally friendly alternative. *Recent Pat. Biotechnol.*, 3(1): 28-36.

**Roujeinikova A. 2008.** Crystal structure of the cell wall anchor domain of MotB, a stator component of the bacterial flagellar motor: Implications for peptidoglycan recognition. *Proc Natl Acad Sci* 105, 10348–10353

**Ryu R. et C.L. Patten. 2008.** Aromatic amino acid-dependent expression of indole-3-pyruvate decarboxylase is regulated by 4 TyrR in *Enterobacter cloacae* UW5. *Am. Soc. Microbiol.*, 19: 1-35.

**Ryu C.M., Farag M.A., Hu C.H., Reddy M.S., Wei H.X., Paré P.W., et Kloepper J.W. 2003.** Bacterial volatiles promote growth in *Arabidopsis*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 100: 4927-4932.

**Sabbahi R. 2008.** Utilisation du champignon entomopathogène *Beauveria bassiana* dans une stratégie de gestion phytosanitaire des principaux insectes ravageurs en fraiseraies. Thèse Ph.D. INRS. Armand-Frappier. Québec, France. 181p.

**Salisbury F.B., et Ross C.W. 1992.** Plant physiology. Wadsworth, Belmont, CA.

**Sauka D.H., Basurto-Ríos R.E., Ibarra J.E., and Benintende G.B. 2010.** Characterization of an Argentine isolate of *Bacillus thuringiensis* similar to the HD-1 strain. *Neotrop. Entomol.* 39, 767–773.

**Scervino J.M., Ponce M.A., Erra-Bassells R., Vierheilig H., Ocampo J.A., Godeas A. 2005.** Flavonoids exhibit fungal species and genus specific effects on the presymbiotic growth *Gigaspora* and *Glomus*. *Mycological Research* 109: 789-794.

**Schatz A., Savard K., and Pinter I.J. 1949.** “The Ability of Soil Microorganisms to Decompose Steroids,” *Journal of Bacteriology*, Vol. 58, No. 2, pp. 117-125.

**Schreiner R.P., Bethlenfalvay G.J. 1995.** Mycorrhizal interactions in sustainable agriculture. *Critical Reviews in Biotechnology* 15: 271-285.

**Schüßler A., Schwarzott D., Walker C. 2001.** A new fungal phylum, the Glomeromycota: phylogeny and evolution. *Mycological Research* 105: 1413-1421.

**Schwarzott D., Walker C., Schüßler A. 2001.** *Glomus*, the largest genus of the arbuscular mycorrhizal fungi (Glomales), is nonmonophyletic. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 21: 190-197.

**Schwartz A., Gruhl B., et Lobnitz M. 2003** et al. Development of the intestinal bacterial composition in hospitalized preterm infants in comparison with breast-fed, full-term infants. *Pediatr Res*; 54:393-9

**Seignalet J. 2004.** L'alimentation ou la troisième médecine. Paris: François-Xavier de Guibert.

**Selosse M., et Le Tacon F. 1998.** The land flora: a phototroph-fungus partnership? DOI:10.1016/S0169-5347(97)01230-5.

**Sjoström E. 1993.** Wood chemistry fundamentals and applications, New-York, Academic Press. *Critical Reviews in Biotechnology* 15: 271-285.

**Shleser R. 1994.** Ethanol Production in Hawaii. Prepared for the State of Hawaii, Department of Business, Economic Development and Tourism. Honolulu: Energy Division, Dept. of Business, Economic Development and Tourism, State of Hawaii. 1. Energy crops-Hawaii. 2. Alcohol as fuel-Hawaii. 3. Biomass energy-Hawaii. HD9502.5.B54.S4.1994

**Sibanda T., Leonard V., Mabinya L.V., Mazomba N., Akinpelu D.A, Bernard K., Olaniran. A. O., and Okoh A. I. 2010.** Antibiotic Producing Potentials of Three Freshwater Actinomycetes Isolated from the Eastern Cape Province of South Africa. *Int J Mol Sci*. Vol : 11. N° 7. 2612–2623p.

**Soberón M., Gill S.S., and Bravo A. 2009.** Review Signaling versus punching hole : How do *Bacillus thuringiensis* toxins kill insect midgut cells, 66, 1337–1349.

**Sommer F., et Backhed F. 2013.** The gut microbiota—masters of host development and physiology. *Nat Rev Microbiol*; 11: 227-38.

**Somers E., Vanderleyden J., et Srinivasan M. 2004.** Rhizosphere bacterial signalling: a love parade beneath our feet. *Crit. Rev. Microbiol.* 304:205–240.

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

**St Leger R.J.1993.** Biology and mechanism of insect-cuticle invasion by deuteromycete fungal pathogens. In : Parasites and pathogens of insects Vol.2. Beckage N.E, Thompson S.N., Federici B.A. (eds.). Academic Press Inc., New York, USA, pp.211-225.

**Stryer L. 1988.** Biochemistry 3<sup>e</sup> Ed., W.H. Freeman and Company, New York, 1089pp.

**Subramanian C.Y. 1983.** Hyphomycetes: taxonomy and biology. Accademic Press. New York, 28p.

**Tisdall J.M. 1991.** Fungal hyphae and structural stability of soil. Australian Journal of Soil Research 29: 729-743.

**Tien T.M., Gaskins M.S., et Hubbel D.H. 1979.** Plant growth substance produced by *Azospirillum brasilense* and their effect on the growth of pearl millet. *Appl. Environ. Micro.*, 37(5): 1016-1024.

**Timmusk S.N.S., Nicander B., Granhall U., et Tillberg E. 1999.** Cytokinin production by *Paenibacillus polymyxa*. *Soil Biol. Biochem.* 31:1847–1852.

**Tsakelova E.A., Klimova S.Y., Cherdyntseva T.A., et Netrusov A.I. 2006.** Microbial producers of plant growth stimulators and their practical use: a review. *Appl. Biochem. Microbiol.* 42:117–126

**Tisdall J.M. 1994.** Possible role of soil microorganisms in aggregation in soils. *Plant and Soil* 159: 115-121.

**Tabak S. 2007.** Interactions entre *Helicobacter pylori* responsable de maladies gastroduodénales et Bifidobacteries. Mémoire de magister, Université d’Oran.

**Tombolini R., Van Der Gaag D., Cerhardson B., & Janssoni J. 1999.** Colonization pattern of the biocontrol strain *Pseudomonas chlororaphis* MA 342 on barley seeds visualized by using green fluorescent protein. *Appl. Environ. Microbiol.*, 65(8), 3674-3680.

**Tombolini R., Van Der Gaag D., Cerhardson B., & Janssoni J. 1999.** Colonization pattern of the biocontrol strain *Pseudomonas chlororaphis* MA 342 on barley seeds visualized by using green fluorescent protein. *Appl. Environ. Microbiol.*, 65(8), 3674-3680.

**Tomioka H., Kagawa M., and Nakamura S. 1976.** "Some Enzymatic Properties of 3 $\beta$ -Hydroxysteroid Oxidase Produced by *Streptomyces violascens*," *Journal of Biochemistry*, Vol. 79, No. 5, pp. 903-915.

**Uehlein N., Fileschi K., Eckert M., Bienert G.P., Bertl A., Kaldenhoff R. 2007.** Arbuscular mycorrhizal symbiosis and plant aquaporin expression. *Phytochemistry* 68: 122-129.

**Vachon V., Laprade R., and Schwartz J.L 2012.** Current models of the mode of action of *Bacillus thuringiensis* insecticidal crystal proteins: A critical review. *J. Invertebr. Pathol.* 111, 1-12.

**Vijayakumar R. Muthukumar C., Thajuddin N., Panneerselvam A., and Saravanamuthu R. 2007.** Studies on the diversity of actinomycetes in the Palk Strait region of Bay of Bengal, India. *Actinomycetologica*, 21 (2), 59-65p.

**Van Loon L.C., Geraatset P.B.J., Linthorst H.J.M. 2006.** Ethylene as a modulator of disease resistance in plants. *Trends Plant Sci.* 11:184-190.

**Wang C., Knill E., Glick B.R., et Défago G. 2000.** Effect of transferring 1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid (ACC) deaminase genes into *Pseudomonas fluorescens* strain CHA0 and its *gacA* derivative CHA96 on their growth-promoting and disease-suppressive capacities. *Can. J. Microbiol.* 46:898-907.

**Williams P.M., et Sicardi de Mallorca M. 1982.** Abscisic acid and gibberellin-like substances in root nodule of *Glycine max*. *Plant Soil* 65: 19-26.

**Wright J.E., et Chandler L.D. 1991.** Laboratory evaluation of the entomopathogenic fungus, *Beauveria bassiana* against the boll weevil (Coleoptera : Curculionidae). *J. Invertebr. Pathol.* 58, 448-449.

**Weiser J. 1972.** *Beauveria* Vuill. In : Nemoci hmyzu. Naklad. Ceskoslov. Akademie, Prague, République tchèque, pp.361-377.

**Wright S.F, Upadhyaya A. 1998.** A survey of soils for aggregates stability and glomalin, a glycoprotein produced by hyphae of arbuscular mycorrhizal fungi. *Plant and Soil* 198: 97-107.

**Yazdi M. T., Zahraei M., Aghaepour K., and Kuma- ranpour N. 2001.** “Purification and Partial Characterization of Cho- lesterol Oxidase from *Streptomyces fradiae*,” *Enzyme and Microbial Technology*, Vol. 18, No. 4-5, pp. 410- 414. [doi:10.1016/S0141-0229\(00\)00337-9](https://doi.org/10.1016/S0141-0229(00)00337-9)

**Yamane T., Nakatani H., and Sada E. 1979.** “Steroid Biocon- version in Water-Soluble Organic Solvents:  $\Delta^1$ -Dehydroge- nation by Free Microbial Cells and by Cells Entrapped in Hydrophilic or Lipophilic Gel,” *Biotechnology and Bio- engineering*, Vol. 21, No. 11, pp. 2133-2145.

**Yaropolov A.I., Skorobogat’Ko O.V., Vartanov S.S., Varfolomeyev S.D. 1994.** Laccase. *Appl Biochem Biotech* 49, 257–280.

**Zehnder A.J.B., and Stumm W. 1988.** Geochemistry and biochemistry of anaerobic habitats, p 1-38. In A.J.B. Zehnder (ed.), *Biology of anaerobic microorganisms*. Wiley Interscience, New York, N.Y.

**Zumft W.G. 1997.** Cell biology and molecular basis of denitrification. *Microbiol Mol Biol Rev.* 61(4):533-616. DOI: 10.1128/mmbr.61.4.533-616.1997

### Sites web

Site web 1. [www.prophyta.de/fr/protection-des-plantes/anti-nematicide/mode-operatoire/](http://www.prophyta.de/fr/protection-des-plantes/anti-nematicide/mode-operatoire/).

Site web 2. <https://hifasdaterra.fr/champignons-medicinaux/coriolus-versicolor/>

Site web 3. <https://doctonat.com/coriolus-versicolor/>

Site web 4. [http:// www.vertigo.uqam.ca/..../beauveria\\_bassiana\\_1.jpg](http://www.vertigo.uqam.ca/..../beauveria_bassiana_1.jpg).

