**3- Matériel et méthodes**

Les bactéries du genre *Bacillus* sont largement utilisées comme biopesticides, pour augmenter le rendement des cultures agricoles. La caractérisation phénotypique et génotypique de ce genre bactérien est largement étudié, sur des bactéries isolées à partir de la rhizosphère des plantes cultivées dans des champs agricoles (Beneduzi *et al.,* 2008; Pamela *et al.,* 2010; Aris *et al.,* 2011). En revanche, le but principal du présent travail est d’étudier les capacités de phytostimulation et de biocontrôle, *in vitro* et *in situ,* des bactéries du genre *Bacillus*,isolées de divers environnements de l’Est Algérien, en l’occurrence, le lac salé; la source thermale et la rhizosphère d’une plante médicinale cultivée en serre.

**3.1- Échantillonnage**

Les échantillons explorés dans cette étude, sont prélevés stérilement, à partir de trois sites situés à l’Est Algérien, à savoir :

* L’eau du lac salé d’ Ain M’lila et la rhizosphère d’une plante située à sa proximité;
* L’eau de la source thermale d’Oued El Athmanya et le sol situé à sa proximité;
* La rhizosphere de la plante médicinale *Calendula officinalis*, cultivée en serre dans la région de Sétif.

**3.2- Analyses physicochimiques des échantillons prélevés**

Les analyses physicochimiques des échantillons du sol et d’eau prélevés dans cette étude, sont élaborées par le Laboratoire de Chimie des Sols, Agence Nationale des Ressources Hydrauliques, Antenne Régionale Est, Constantine (ANRH, Zone industrielle Palma, Constantine). Les analyses effectuées concernent les paramètres suivant: le pH, la conductivité électrique, le taux de la matière organique et la concentration de certains sels minéraux à savoir: le calcium, le magnésium, le sodium, le potassium, les sulfates et les chlorures.

**3.3- Isolement des bactéries du genre *Bacillus***

Un gramme de chaque échantillon d’eau et du sol prélevé, est dilué dans 9 mL d’eau physiologique stérile. Ensuite, la solution obtenue subit un traitement thermique à 80°C pendant 12 minutes. Ce traitement à la chaleur sert à éliminer toutes les formes végétatives et à récupérer la flore sporulée. 100µL de chaque dilution traitée sont inoculés à la surface du milieu gélosé Luria-Bertani (LB: annexe 1.1). Les boites sont, ensuite, incubées à 30°C pendant 24h et toute la flore bactérienne sporulée, aérobie anaérobies facultative, est obtenue (Seldin *et al.,* 1983). Celle-ci, correspond aux différentes bactéries formatrices d’endospores (endospore forming bacteria), y compris le genre *Bacillus*. Les souches bactériennes isolées sont, ultérieurement, conservées sur des billes à -80°C pour usage subséquent.

**3.4- Sélection de souches antifongiques**

La capacité des bactéries isolées à inhiber le développement de certaines moisissures phytopathogènes est testée, sur milieu Potato Dextrose Agar (PDA: annexe 1.2), en boites de Pétri. Les moisissures test sont: *Alternaria alternata, Aspergillus niger, Botrytis cinerea, Cladosporium cucumerinium* et *Fusarium oxysporum.* 5µL de suspension de chaque isolat (107cellules/mL) est déposés sur la gélose et un morceau de PDA contenant la moisissure préalablement développée, coupé par un perforateur stérile et déposé à 3.5 cm de distance par rapport à l’isolat testé. Des boites inoculées seulement avec des moisissures ont servi comme témoin. Les boites inoculées sont incubées à température ambiante pendant 2 à 7 jours, selon la moisissure testée. L’antagonisme développé est estimé par le calcul du pourcentage d’inhibition de la croissance des moisissures par rapport aux boites témoin, selon la formule: (Ct-C/C) x100 où Ct: la croissance de la moisissure en absence de l’isolat bactérien; C: la croissance de la moisissure en présence de l’isolat bactérien (Toure *et al*., 2004). Les moyennes ± déviations standards des taux d’inhibition sont calculés à partir de trois répétitions pour chaque moisissure et isolat bactérien testé.

**3.5- Identification des souches de *Bacillus* sélectionnées**

L’appartenance des bactéries isolées par traitement thermique au genre *Bacillus* est confirmée par des tests préliminaires, en l’occurrence: l’aspect microscopique, la coloration de Gram, le test oxydase, le test catalase (Madigan et Martinko, 2007) et la coloration de spore au vert de Malachite (Prescott *et al.,* 2007). L’identification moléculaire des bactéries isolées est réalisée par des analyses d’*ADN-16S* et du gène de la *gyrase A* (*gyr-A*: topoisomérase type II).

**3.5.1- Extraction de l’ADN**

L’ADN génomique est extrait à partir des cultures liquides des isolats de *Bacillus*, par le kit «Wizard Genomic DNA Purification Kit (Promega)», selon le protocole suivant: un millilitre de chaque culture bactérienne est d’abord centrifugé à 13.000-16.000 x g pendant 2 minutes et le surnageant obtenu est éliminé. Ensuite, le culot cellulaire récupéré est suspendu dans 480µL d’acide éthylène diamine tétra-acétique (EDTA 50mM). Après, 120µl de l’enzyme lytique (lysozyme) sont rajoutés et le mélange obtenu est incubé à 37°C pendant 30 à 60 minutes. De plus, 600µL de «nuclei lysis solution» sont rajoutés et mélangés par pipetage et la préparation est incubée à 80°C pendant 5minutes, puis refroidi à température ambiante. Les protéines sont éliminées par précipitation en rajoutant 200 µL de «protein precipitation solution», le mélange obtenu est incubé dans la glace pendant 5 minutes puis centrifugé à 13.000-16.000 x g pendant 2 minutes et le surnageant obtenu est récupéré. Par ailleurs, la précipitation et la réhydratation de l’ADN sont effectuées par transférer ce surnageant dans des tubes propres contenant 600µL d’isopropanol et les mélanger par inversion jusqu’à l’apparition des filaments d’ADN. Le mélange obtenu est centrifugé à 13.000-16.000 x g pendant 2 minutes et le surnageant est éliminé. Ensuite, 600 µL d’éthanol 70% sont rajoutés et la préparation est centrifugée à 13.000-16.000 x g pendant 2 minutes et le surnageant est éliminé. Après, l’éthanol est aspiré et le culot est séché (tube ouvert). Enfin, l’ADN extrait est réhydraté dans 100 µL de «DNA rehydratation solution», pendant une heure, à 65°C ou à 4°C pendant toute la nuit.

**3.5.2- Amplification des gens étudiés par PCR**

L’amplification des gènes étudiés est réalisée par utilisation des amorces *16SP0* (GAA GAG TTT GAT CCT GGC TCAG) et *16SP6* (CTA CGG CTA CCT TGTTAC GA) pour amplifier l’*ADN-16S* (Ventura *et al.,* 2001), et *gyr-A.f* (CAG TCA GGA AAT GCG TAC GTC CTT) et *gyr-A.r* (CAA GGT AAT GCT CCA GGC ATT GCT), pour amplifier la *gyrase A* (Roberts *et al.,* 1994).Le mélange réactionnel de PCR utilisé pour amplifier les deux gènes étudiés contenait: 10X taq buffer (2.5µl), 25M-MgCl2 (1.5µl), 10M-DNTP (0.4µl), amorce-f (1.25µl), amorce-r (1.25µl), taq polymérase (0.25µl) et l’eau (42.85µl). Le programme PCR, utilisé pour l’amplification de l’*ADN-16S* est le suivant: 94°C pendant10 min, puis 32 cycles de «94°C pendant1 min, 53°C pendant1 min, 72°C pendant 2 min» et enfin 72°C pendant10 min. Par ailleurs, le programme d’amplification de la *gyrase A* est le suivant : 94°C pendant 4min, puis 36 cycles de « 94°Cpendant1 min, 55°C pendant1 min, 72°C pendant 2min », et enfin 72°C pendant10 min.

**3.5.3- Purification de l’ADN**

Les produits de PCR sont purifiés par le kit «GFX PCR DNA and Gel Band Purification», suivant les instructions mentionnés. D’abord, 500 µl de «capture buffer type 2» sont rajoutés à 100 µl d’ADN extrait et mixer soigneusement. Ensuite, ce mélange est mis dans la petite colonne du kit, puis toute la préparation dans les grands épendorfs du kit, centrifugée à 16.000 x g pendant 30s et le surnageant obtenu est éliminé. 500 µl de «wash buffer type 1» sont rajoutés à la colonne, centrifugés à 16.000 x g pendant 30s et le liquide obtenu est jeté. Enfin, 50 µl de «elution buffer» sont rajoutés à la colonne, centrifugés à 16.000 x g pendant 30s et le surnageant contenant l’ADN purifié est récupéré dans des petits épendorfs.

**3.5.4- Séquençage des gènes amplifiés et traitement des séquences**

Le bon déroulement de l’extraction d’ADN et de l’amplification des deux gènes étudiés est vérifié par électrophorèse sur gel d’agarose (1%). Le séquençage des gènes étudiés est réalisé en utilisant les mêmes amorces décrites ci-dessus. Les séquences obtenues sont corrigées par le programme Bioedit (version 7.0.8.0). Les séquences corrigées sont déposées dans la banque de donnée «Genbank» et les numéros d’accession fournis, sont résumés dans le tableau 5 (partie résultats). L’identité de chaque souche bactérienne est déterminée par comparaison des séquences de gènes étudiés aux séquences précédemment publiées dans Genbank, en utilisant le programme BlastN.

**3.6- Détermination du taux de sporulation**

Pour la détermination du taux de sporulation, les isolats de *Bacillus* sont cultivés dans des fioles de 250 ml, contenant 50 ml du milieu optimum (milieu opt: annexe 1.3), comme décrit par Jacques *et al.* (1999). Les fioles sont incubées à 30°C, sous agitation de 180 rpm, pendant 72h. La suspension bactérienne obtenue est traitée par un choc thermique à 80°C pendant 12 minutes, puis refroidi immédiatement dans de l’eau froide. Ce traitement thermique sert à tuer toutes les formes végétatives et récupérer la flore sporulée. Des dilutions de la suspension bactérienne traitée sont réalisées dans de l’eau peptonée stérile (annexe 1.4) et leur concentration est estimée par la cellule de Burker. 100 µl des trois dilutions appropriées sont inoculés dans des boites, contenant du milieu (LB) gélosé et incubées à 30°C pendant 24h. Les boites sur lesquelles sont comptées 20 à 200 colonies sont prises en considération pour le calcul de la concentration de spores par millilitre de «milieu opt». Cette expérience est réalisée en trois répétitions.

**3.7- Détection de l’activité enzymatique**

Les activités enzymatiques sont évaluées qualitativement sur des milieux solides (annexe1.5, 1.6 et 1.7), contenant le substrat à dégrader, en l’occurrence: la chitine colloïdale, le lait lyophilisé et le carboxymethyl-cellulose (CMC), pour détecter la présence ou l’absence de la chitinase, la protéase et la cellulase, respectivement. La présence de l’activité enzymatique est apparue sous forme de halos claire autour des colonies bactériennes des souches de *Bacillus* testées (Ariffin *et al.,* 2006).

**3.8- Analyse des lipopeptides (LPs) par spectrométrie de masse couplée à l’HPLC**

La production des lipopetides (LPs) est réalisée par ensemencement des souches de *Bacillus* dans des fioles de 250 ml, contenant 50 ml de milieu opt (annexe1.3). Les fioles sont incubées à 30°C sous agitation de 180 rpm pendant 72h. Les cultures sont, ensuite, centrifugées à 15.000 x g pendant 20 min. Les lipopeptides (LPs) sont extraits sur la colonne C18 «solid-phase extraction cartridges- 900 mg, Alltech» et récoltés dans de l’acétonitrile (100%). Les extraits obtenus sont analysés par chromatographie liquide (HPLC) couplée au spectromètre de masse (MS): «HPLC Waters Alliance 2695/diode array detector, coupled with Waters SQD mass analyzer» (Nihorimbere *et al.* 2012). Le gradient d’élution utilisé dans ce travail permet la détection des trois familles de LPs. L’eau acidifiée par de l’acide formique 0.1% et l’acétonitrile (ACN) acidifié avec ce même acide (0.1%) sont utilisés comme phase mobile. Le débit d’élution est maintenu à 0.5 mL.min-1 et la température de la colonne à 40°C, avec un gradient de 35min, selon le programme suivant: (43%–80%), vol/vol ACN pendant 18 min; 100 %, vol/vol ACN pendant 9 min et 43 %, vol/vol ACN pendant 8 min. En premier temps, les composés sont déterminés sur base des temps de rétention des standards purifiés. Ensuite, l’identité de chaque homologue de LPs est confirmée sur base de la masse dans le «Single Quadrupole Mass Detection (SQD)», par des conditions d’electrospray ionisation, comme source de température (130°C); température de désolvation (250°C); flux de nitrogène (500 l/h) et voltage de cône (70 V). Le mode d’ion positif est utilisé pour l’analyse des trois familles parce qu’un signale élevé est obtenu par rapport au mode d’ion négatif.

**3.9-** **Identification de nouvelles molécules de fengycines**

Le surnageant de culture du *B. amyloliquefaciens* (ET) est obtenu dans le milieu «opt» (annexe1, 1.3), comme décrit ci-dessus dans la section 3.8. Ensuite, le pH a été ajusté à 2 par addition d’une solution HCl (6N), jusqu’à l’apparition d’un précipité blanc. Le mélange obtenu est centrifugé à 11.000×g pendant 10 min et le précipité est collecté, puis suspendu dans de l’acétonitrile (ACN 80%) pour obtenir les extraits de fengycines.

Les analyses de spectrométrie de masse couplée à l’HPLC (LC-MS), sont effectuées en utilisant le système HPLC «nanoHPLC Dionex Ultimate 3000», couplé à un «Amazon speed ETD mass spectrometer (Bruker Daltonics)». La colonne «Pepmap Acclaim 300 : C18, avec des particules de 3µm de diamètre, des pores de 300A° et des dimensions de 75 µm x 15 cm» est utilisée dans les analyses chromatographiques, à un débit d’injection de 0.3 µl/min. 20 µl d’extrait de fengycines sont injectés et la chromatographie est réalisée, en utilisant de l’acide formique (A: 0.1% v/v) et l’ACN (B: 20% et 80%), comme phase mobile, avec le gradient suivant: 00-05 min: 37.5% B; 05-27 min : 37.5-97.5% B (élution); 27-35 min: 97.5% B (élution); 35-44 min : 97.5-100% B (lavage); 44-45 min: 100-62.5% B (lavage); 45-55 min: 62.5-100% B (lavage); 55-65 min: 100-37.5% B (retour au conditions initiales); 65-85 min: 37.5% B. Une analyse complète MS est enregistrée dans le mode appelé «résolution améliorée», détectant les m/z qui varient entre 200 et 1.600. Les spectres MS.MS sont obtenus, en utilisant le mode dit «Xtreme scan» avec une méthode de fragmentation, type CID (collision induced dissociation, rampe de 0,6-0,8 v; temps de fragmentation équivalent de 40 ms). Les données sont traitées par le logiciel 4.0 (Data Analysis Bruker).

Le séquençage du cycle peptidique des fengycines est effectué après son ouverture par traitement à la base KOH. En fait, 50 µL d’extrait de fengycine sont concentrés par évaporation en un volume final de 10 µL et 10 µL de KOH (2 M) sont rajoutés. La préparation est incubée à 37°C sous agitation pendant une heure. Cette réaction est arrêtée par ajout de 2 µL de l’acide formique (pH 3.5). Les échantillons obtenus sont dilués 100 fois et 1 µL est injecté dans le spectromètre de masse. Les mêmes paramètres de LC-MS sont utilisés pour l’analyse des formes ouvertes de fengycines.

**3.10- Détection de la phytohormone, acide indole 3 acétique (IAA)**

Les isolats sont cultivés dans le milieu TGE (annexe 1.8), supplémenté de 5 mM de L-tryptophane, avec une agitation de160 rpm, à 30ºC pendant 4 jours. Les surnageants de culture sont obtenus par centrifugation des cultures bactériennes à 13.000xg pendant 5 min. La détection colorimétrique de l’IAA est effectuée en utilisant le réactif de Salkowski (RS):0.01 M FeCl3 dans 36% H2SO4 (Glickmann et Dessau, 1995). 300µl du RS sont rajoutés à 100µl de surnageant mis dans des cuvettes de spectrophotomètre. Ces cuvettes sont incubées dans l’obscurité, à température ambiante pendant 15 min. L’intensité de la coloration obtenue est mesurée par absorbance à 535 nm dans le spectromètre. Le milieu TGE-Trp sans bactérie mélangé avec le RS est utilisé comme témoin. La concentration de l’IAA/ml dans chaque culture est déterminée par comparaison à la courbe d’étalonnage (Aris *et al.,* 2011; Pamela *et al.,* 2010). Ce test est réalisé dans deux expériences indépendantes.

**3.11- Test de production des sidérophores**

Les précultures des souches bactériennes sont obtenues après 24h d’incubation à 30°C et 140 rpm, dans du milieu LB (annexe 1.1). Ces précultures sont lavées trois fois avec une solution saline (NaCl 0.9%) et des suspensions bactériennes à 107cellules/ml sont préparées. 5µl de chaque suspension bactérienne et 5µl d’NaCl 0.9% pour les boites témoin sont déposés à la surface du milieu Chrome Azurol S (CAS : annexe 1.9) Agar. Les boites de CAS sont incubées 1à 3 jours à température ambiante. La production des siderophores est indiquée par l’apparition d’un halo jaune-orange autour des colonies. Ce test est réalisé en trois répétitions (Husen, 2003).

**3.12- Test d’antagonisme sur milieu gélosé à base d’exsudats racinaires**

Comme les interactions les plus complexes et les plus importantes entre les plantes et les microorganismes se situent dans les racines et la rhizosphere, la capacité des souches de *Bacillus* à inhiber la croissance de certaines moisissures phytopathogènes sur milieu solide à base d’exsudats de racines est étudiée. Les exsudats racinaires (ER) de tomate, de courgette et d’haricot, sont obtenus par inoculation de 20 plantules de chaque légume dans 100 ml de solution de Hoagland's (annexe 1.10). Toutes les cultures sont incubées dans des serres à humidité (70%), 16h de lumière et à différentes températures, comme mentionné ci-dessous. Après 15 jours, les ER sont récupérés dans un volume final de 100ml, filtrés puis conservés à -20°C.

L’effet antifongique des *B. amyloliquefaciens* (ET), *B. atrophaeus* (6SEL) et *B. mojavensis* (9SEL) est testé vis à vis *Alternaria alternata*, sur des exsudats de tomate (*S. lycopersicum* cv. *Tondo rosso*), de courgette (*C. pepo* cv. *Xara*) et d’haricot (*P. vulgaris* cv. *Borlotto*), obtenus à 25°C. Par ailleurs, l’inhibition d’*Alternaria sp* et *F. oxysporium* par les souches *B. amyloliquefaciens* (9SRTS), *B. subtilis subsp spizezenii* (23SRTS) et *B. velezensis* (26SRTS), est testée sur des exsudats de tomates (*S. lycopersicum* cv. *Tondo rosso*) obtenus à différentes températures (15°C, 20°C, 25°C, 28°C et 35°C). Le test d’antagonisme effectué dans cette expérience est réalisé comme décrit ci-dessus.

**3.13- Production industrielle des spores de *Bacillus***

Les souches *B.amyloliquefaciens* (9SRTS); *B. atrophaeus* (6SEL) et *B. subtilis* subsp.*spizezenii* (23SRTS), sont produites à l’échelle industrielle dans un bioréacteur de 500 L (société Artechno, Liege-Belgium). Le milieu optimum (annexe 1.3), décrit par Jacques *et al.* (1999), est utilisé pour la production de spores de *Bacillus.* La fermentation est réalisée dans les conditions suivantes: T°=30°C, pH=7, vitesse d’agitation=140rpm et l’oxygène dissous (DO2=100%). La fermentation est arrêtée après 96h, durée de culture nécessaire pour que les souches bactériennes atteignent le taux de sporulation maximal.

**3.14-Effet *in situ* des souches de *Bacillus***

**3.14.1- Dans des conditions de pots**

Les trois souches *B.amyloliquefaciens* (9SRTS), *B* *subtilis* subsp*. spizezenii* (23SRTS) et *B. atrophaeus* (6SEL) sont utilisées dans le traitement des graines et/ou du sol. En effet, plusieurs lots sont préparés, à savoir: ST-GT (sol traité- graines traitées); ST-GNT (sol traité-graines non traitées); SNT-GT (sol non traité- graines traitées); SNT-GNT (sol non traité-graines non traitées= Contrôle). Deux variétés de pois chiches sont utilisées, en l’occurrence, *CV. Flipe 13 90* et *Mega grain tradind CO. (P): Kabuli.* Il est à noter que dans le cas deladeuxième variété, seulement le lot (ST-GNT) est testé, en utilisant le *B.amyloliquefaciens* (9SRTS) et le *B*. *subtilis* subsp. *spizezenii* (23SRTS).

Les graines sont lavées trois fois avec de l’eau distillée stérile et séchées sur du papier filtre stérile. Les graines sont, ensuite, traitées avec 10 ml de suspensions bactériennes à 107 spores/mL et semées dans du sol naturellement infecté avec le pathogène*Sclerotonia sclerotium*. Le traitement du sol est réalisé en pulvérisant les mêmes suspensions bactriennes dans les puits formés à la surface. Dans chaque pot de 30 cm de diamètre, six graines sont semées et les traitements effectués sont répété trois fois.

Les données concernant l’importance de la maladie et la taille des plantes sont mesurées après 30 jours de semis. Cette expérience est effectuée selon la méthode de Karimi *et al.* (2012), avec quelques modifications.

**3.14.2- Etude au champ**

Les tests en plein champ sont réalisés dans le terrain expérimental de Chaab-Elrssas, à Constantine (Algérie), dans la période de Juillet-Octobre 2013. Le champ est divisé en parcelles dont la surface est de 0.8 m2 avec un espace de 0.60m entre elles. Le compost naturel est rajouté dans chaque parcelle et des puis sont formés (65 puis/parcelle) pour semer les graines de pois chiche. 1 ml de suspension bactérienne (107 spores/mL) est pulvérisé dans chaque puis avant le semis des graines (cv. *Mega grain tradind CO. (P): Kabuli),*qui n’ont pas été traitées. Dans cette expérience, les souches *B.amyloliquefaciens* (9SRTS), *B*. *subtilis* subsp. *spizezenii* (23SRTS) et *B. atrophaeus* (6SEL) sont testées, en plus de la souche type *B. amyloliquefaciens* (S499), fournie par le Centre Wallon de Biologie Industrielle (CWBI). Toutes les pratiques agricoles sont appliquées (Abdel-Monaim, 2011).

**3.14.3- Analyses statistiques**

Le logiciel SAS (SAS Institute 2000) est utilisé pour toutes les analyses statistiques. L’effet du traitement du sol ou des graines avec les souches de *Bacillus* testées est évalué par le modèle générale linéaire (GLM). Les moyennes moindres carrées (LSM) et les erreurs standards sont calculées, selon la procédure de Duncan.