REPUBLIQUE ALGERIENNE DEMOCRATIQUE ET POPULAIRE
MINISTERE DE L'ENSEIGNEMENT SUPERIEUR ET DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE
UNIVERSITE DE MEDEA
FACULTE DES SCIENCES

MEMOIRE
Présenté pour obtenir le diplôme de master
En sciences de la nature et de la vie
Spécialité : microbiologie appliquée

Isolement et caractéristique des bactéries antibiorésidantes endophutes des racines de « Medicago Sativa »

Par :
-BACHENE Amira

Suivie par :
TAHRAOUI Samira Assia

M.BOUBAKERI Kamel	MCB	U.MEDEA	Président
Mme.BOUMEDIEN Farida	MCA	U.MEDEA	Examinatrice
Mme. BOUCHERMA Amina	MCB	U.Bab ezzouar	Promotrice
Mme.ZERGOUG Amina	MCB	U.MEDEA	Co-Promotrice

2023-2024

Remerciement

Au terme de ce travail du mémoire de master, les mots justes sont difficiles à trouver pour exprimer nos remerciements à « Allah » Le tout puissant de nous avoirdonnée la patience, la santé et surtout beaucoup de courage etde volonté pour accomplir etachever ce modeste travail pour enfin pouvoir le mettre entre vos mains.

Nos plus sincères remerciements vont spécialement à :

Notre promotrice Mme.Bouhrama Amina pour sa confiance,sa patience et son exigence dans le travail.

Notre co-promotrice Mme.Zrgoug Amina pour leurencouragement et leur efforts dans ce travail.

Nous tenons à remercier les membres du jury :

Le présidentdu jury M.Boubakeri Kamel qui nous afait L'honneur de présider ce jury.

Mme. Boumedien Farida Pour avoir accepté d'examiner ce travail.

Un très grand merci à tous nos enseignants qui ont assuré notre formation durant les cinq années d'étude.

Afin de n'oublier personne, nos vifs remerciements s'adressent à tous ceux qui nous ont aidés à la réalisation de ce modeste mémoire.



Dédicace

Louange à Dieu seul,

Ce modeste travail est dédié spécialement

À ma chère maman, ma raison de vivre, en témoignage de ma reconnaissancepour sa patience, son amour et ses sacrifices.

À mon cher papa pour son amour et son dévouement.

« À vous, mes parents, je dis merci d'avoir fait de moi celui que je suis aujourd'hui. Aucune dédicace ne pourra exprimer mes respects, mes considérations et ma grande admiration pour vous. Puisse ce travail voustémoigne mon affection et mon profond amour »

À mes chers frères « Houssem et Hichem », qui je le sais, ma réussite est trèsimportante à leurs yeux, Que Dieu vous garde pour moi.

À celui qui m'a indiqué la bonne voie en me rappelant que les self-made-man et les déterminés finiront toujours par réussir leur vie, à moi-même.

À mes amis, mes enseignants et pour ceux qui m'ont donné del'aide un jour, que Dieu vous paye pour tous vos bienfaits.

Pour finir, à tous ceux que j'aime et qui m'aiment,

je dédie ce mémoire

Samira





Dédicaces

Avec tous mes sentiments de respect, avec l'expression de ma reconnaissance, Je dédie ce travail à ma petite famille quim'a encouragé et soutenu durant mes études :

A mon cher papa MOHAMED

Mon fidèle compagnon dans les moments les plus délicats de ma vie. Qui peut être fierde trouver ici le résultat de longues années de sacrifices, merci pour les valeurs nobles, l'éducation et le soutien permanent venu de toi.

A ma chère maman SOUAD

Peu importe ce que je fasse ou je dise, je ne saurai jamais te remercier assez. Ton affection mecouvre, ta présence à mes côtés a toujours été ma source de force pour affronter les différents obstacle .

Merci pour ton soutien, ton encouragement et tes sacrifices que tu n'as cessé de me donner depuis ma naissance. Je vous dois ma réussite, sans vous, je n'aurais pas pu allersi loin.

A celle qui a toujours été à mes côtés mon adorable

sœur LAMIAA mon cher frère ANES LA FORCE DE

MA VIE

A Ma très chère grand-

mères FATIHAA mon cher

grand- père ramande

A mes oncles sidahmed Karim samail et à tous mes oncles et mes tantes, à tous mes cousins et cousines

A mes meilleures amies : MAISSA. AHLEM,

SALAT ,AICHAA ma chère binôme Samira avec

qui j'ai

passé d'agréables moments tout au long du travail.A tous mes amies sans exception

AMIRA





Résumé

L'association des plantes et des bactéries endophytes comprend une grande diversité de taxons bactériens et d'hôtes végétaux .L'antibiorésistance étant un problème mondial de plus en plus préoccupant, il est crucial de comprendre comment ces bactéries endophytes contribuent à la dissémination et à la persistance des gènes de résistance aux antibiotiques .Le but de cette étude est l'isolement et caractérisation des bactéries endophytes antibiorésistantes des racines de plante *Medicago sativa. L*. La démarche a été réalisée selon les caractères morphologiques et biochimiques en se basant sur une étude macroscopique et microscopique,le test de catalase, le type respiratoire , la CMI, la formation de biofilme .Les résultats ont montré une diversité parmi les isolats. L'étude macroscopique et microscopique des souches a montré une variété des caractères culturaux dans lequel les souches se présentent sous forme des bacilles à Gram négatif Et des cocci à Gram positive. Et ainsi l'observation une résistance aux antibiotiques chez 77%des isolats .Les bactéries endophytes de medicago sativa montre une capacité enzymatique variée Les résultat de notre étudemontre une formation de biofilme chez 47% des isolats et un tolérance au ph et au salinité basique chez toutes les souches.

Les mots clés : les bactéries endophytes, antibiorésistantes, medicago sativa.

Abstract

The association of plants and endophytes includes a wide variety of bacterial taxons and plant hosts .As antibiotic resistance is a growing global concern, it is crucial to understand how these endophytes contributeto the spread and persistence of antibiotic-resistant genes .The purpose of this study is the isolation and characterization of endophytes antibioresistant bacteria from the medicago sativa plant roots. L. The process was carried out according to the morphological and biochemical characteristics based on a macroscopic and microscope study, catalase test, respiratory type, IMC, biofilm formation .The results showed a diversity among the isolates. The macroscopic and microscope study of strains showed a variety of cultural characteristics in which strains present themselves as Gram-negative bacteria And Gram positive cocci. And so the observation of an antibiotic resistance in 77% of the isolates .The endophytes of medicago sitiva show a varied enzymatic capacity The results of our study show biofilm formation in 47% of the isolates and pH and basic salinity tolerance in all strains.

Keywords: bacteirale ndophytes, antibiotic resistant medicago sativa.

الملخص

الدراسة تناولت التحليل البيولوجي و الكيميائي للبكتريا لأندرويدية الموجودة في جذور نبات البرسيم (الصواريخ).تم دراسة خصائص مثل الكتالز.وسمة التنفس . وتشكيل فيلم البيولوجي مما اظهر تنوعا كبيرا بين الفصائل بكترية . وجدت الدراسة ان هذه البكتريا تظهر كبكتريا غرام ايجابي. مع مقاومة ملحوظة للمضادات الحيوية تصل إلى 77 %من الفصائل المدروسة.

بالإضافة إلى ذلك تبين النتائج إن هذه البكتريا تمتلك قدرات مثل تكوين البيوفيلم في47%من الفصائل والتسامح مع تغيرات PH. ونموذج البلاستيك الأساسي في جذور نبتات. تعتبر هذه النتائج مهمة لفهم كيفية تأثير هذ البكتريا على المقاومة للم

الحيوية و ادوار ها في البيئات النباتية مما يعزز من اهمية الدراسات البيولوجية و البيئة في هذا سياق.

الكلمات المفتاحية: البكتريا النباتية . المقاومة للمضادات الحيوية البرسيم

Table des matières

Remerciment

Résumé

Abstract

الملخص

Listes des figures

Listes des Tableaux

Listes des abréviations

Dédicaces 4
I.Antibiorésistantes 16
1. Définition : 16
2. Mécanismes de résistance 16
3. Caractéristiques : 17
4-Formation de biofilm : 18
5-Capacité d'adaptation rapide : 19
II. Bactéries antibiorésistantes d'origine hors milieu hospitalier : 19
1. Réservoirs des bactéries antibiorésistantes : 20
1.1.Eaux usées et systèmes aquatiques : 20
1.2.L'agriculture 21
1.3.Amendements organiques 22
1.4.Rejets agricoles 23
2. Modes de transmission : 23
2.1.Mode directe 24
2.2.Mode indirect 24
2. Densité et diversité : 27
3. Mode de transmission 28
3.1.Transmission verticale 28
3.2.Transmission horizontale 29

4. Interaction entre endophytes et plantes hôtes....32
4.1 Productions d'hormones végétales par des micro-organismes....33
4.2.Chez les bactéries....33
5. Les bactéries endophytes antibiorésistantes....34
5.1.Origine de la résistance....34
5.2.Implications écologiques et sanitaires....35
I. Matériel....38
1. Matériel non biologique....38
2. Matériel biologique....38
II. Les Méthodes....39
1. Dénombrement de la flore bactérienne....39
2. L'étude de la sensibilité des bactéries endosphériques aux antibiotiques....40
3. Détermination de la concentration minimale inhibitrice....41
4. Caractérisation des bactéries endosphériques....42
Caractérisation morphologique....42
Observation cellulaire....42
Caractéristiques biochimiques....43
Test catalase....43
Type respiratoire....43
Recherches des enzymes hydrolytiques....43
Formation de biofilm....45
Identification biochimique....46
Caractéristiques physiologiques....47
Thermo-résistance....47
Effets des paramètres environnementaux....47
1. Densité bactérienne de la communauté endophytes des racines de....50
Caractérisation biochimique....58
Test catalase....58
Type respiratoire....58
Sporulation....59
Criblage de l'activité enzymatique....59
5. Formation de biofilm :....67
6.2 Tolérance à la salinité :....69
8. Identification biochimique....71
Annexe 01 : Préparation et composition des milieux de culture pour 1litre....80

Liste des figures

Figure : 01	Cibles bactériennes et mécanisme de résistance aux antibiotiques.	03
Figure : 02	Les étapes de la formation et de la dispersion d'un biofilm bactérien	04
Figure : 03	Les différents modes de transmission de la résistance aux antibiotiques dans la chaîne alimentaire	09
Figure : 04	Les principaux voies pour minimiser la propagation de la résistance aux antibiotiques dans l'environnement	10
Figure : 05	Schéma représentatif de la distribution et la colonisation des bactéries endophytiques	11
Figure : 06	Modes de transmission des bactéries endophytes dans les plantes.	14
Figure : 07	Représentation schématique du cycle de rhizophages	14
Figure : 08	Les étapes de traitement des racines des plantes de Medicago sativa	20
Figure : 09	La galerie API 20 E	26
Figure : 10	Aspect morphologique des colonies obtenues après ensemencement par inondation sur milieu TSA1/10	29
Figure : 11	Réaction des isolats pour le test antibiogramme	30
Figure : 12	Observation microscopique à un grossissement X100 après la coloration de Gram	33
Figure : 13	Mise en évidence de la mobilité des isolats avec fermentation du mannitol sur milieu Mobilité-Mannitol	34
Figure : 14	Test d'enzyme amylase des souches isolées.	35
Figure : 15	Test d'enzyme amylase	36
Figure : 16	histogramme test d'enzyme lipase des souches isolées	37
Figure : 17	Test d'enzyme Lipase	38
Figure : 18	Test d'enzyme protéase des souches isolées.	39
Figure : 19	histogramme du test d'enzyme protéase des souches isolées	40
Figure : 20	Test d'enzyme pectinase des souches isolées	40
Figure : 21	Mise en évidence de la formation de biofilm par les isolats	41
Figure : 22	Tolérance des isolats testés à pHs différents	42
Figure : 23	Tolérance des isolats testés à différents concentration de NaCl	43
Figure : 24	Profil biochimique de l'isolat A10 sur la galerie API20E	44

Liste des tableaux

Tableau : 01	Classification des antibiotiques utilisés pour l'étude de l'antibiogramme	**21**
Tableau : 02	Densité de la flore bactérienne endophytes des racines en fonction du temps d'incubation.	**28**
Tableau : 03	Répartition des isolats selon la résistance aux familles d'antibiotiques testée	**31**
Tableau : 04	Taux de résistance des isolats par antibiotique.	**32**
Tableau : 05	Résultats de la Concentration minimale inhibitrice de l'antibiotique vis à vis les souches(CMI)	**32**
Tableau : 06	Résultats du profil biochimique de l'isolat galerie API20E	**44**

Liste des abréviations

TC	TICARCILLIN
E	ERYTHROMYCIN
CTX	CEFOTAXIME
RA	RIFAMPICIN
CZ	CEPHAZOLIN
CTR	CEFTRIAXONE
AK	AMIKACIN
FA	FUSIDIC ACID
CN	CEFALEXIN
IMP	IMIPENEM
API 20E	Analytical Profile Index 20 Essai
CMI	Concentration Minimale Inhibitrice
ADH	Adenine déshydrogénase
LDC	Lysine décarboxylase
ODC	l'ornithine-décarboxylase
PH	Potentiel d'hydrogène
ATB	Antibiotique
H	Heure
Ml	Millilitre
Mm	Millimètre
OMS	Organisation mondial de la santé
TSA	Gelose trypticase soja
TSB	Bouillon tryptone soja
CV	Cristal violet
EPS	Exo polysaccharides
Um	Micromètre
NACL	Chlorure de sodium
KCL	Chlorure de potassium
KOH	L'hydroxyde de potassium
G	Gramme
Fig	Figure
UFC	Unité Formant Colonie
CIT	Citrate
VP	Vosges-Proskauer
GEL	Gélatine

Introduction

L'antibiorésistance est devenue l'une des préoccupations majeures en agriculture et en santé publique au niveau mondial. La propagation des gènes de résistance aux antibiotiques compromet l'efficacité des traitements médicaux et vétérinaires, ainsi que la sécurité alimentaire. Dans ce contexte, les bactéries endophytes des plantes émergent comme des acteurs clés dans la dissémination et la persistance des résistances aux antibiotiques. Ces microorganismes, habitant les tissus internes des plantes sans leur causer de dommages apparents, peuvent héberger et transférer des gènes de résistance, contribuant ainsi à la complexité du problème de l'antibiorésistance.

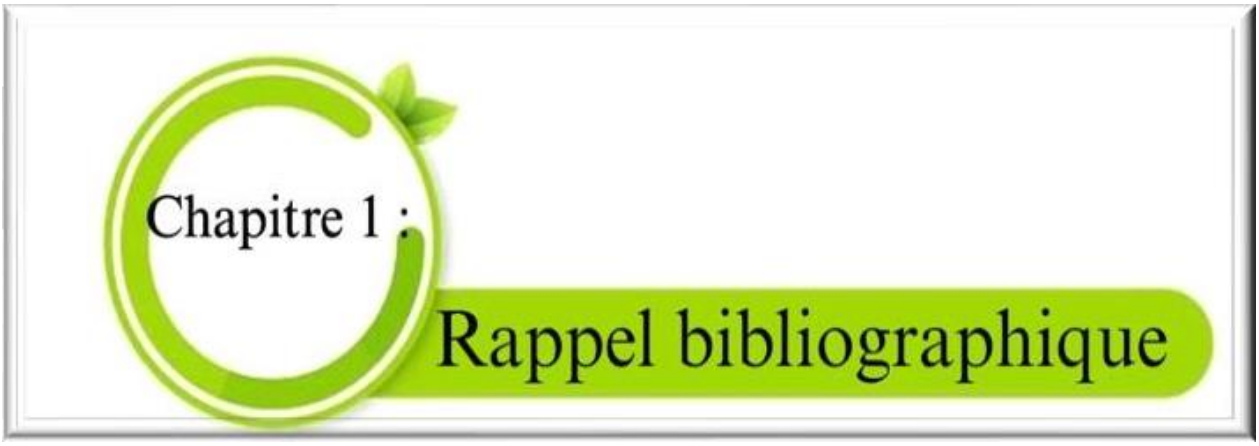
L'orge commun (*Hordeum vulgare L.*) a toujours occupé une place importante parmi les autres céréales en Algérie. Elle était à la tête des cultures et destinée à l'autoconsommation humaine. Son rôle dans l'alimentation animale a toujours été et reste fondamental. La rusticité de l'espèce, ses capacités d'adaptation aux irrégularités du climat algérien, ses qualités nutritionnelles voire ses vertus sur la santé humaine font d'elle une culture qui mérite une attention particulière. (Rahal-Bouziane, 2015).

Les plantes utilisées comme fourrage représentent un domaine d'étude particulièrement pertinent, car elles sont au cœur de la chaîne alimentaire des animaux d'élevage, potentiellement vecteurs de résistance. Comprendre le rôle des bactéries endophytes dans ces plantes revêt donc une importance cruciale pour évaluer les risques associés à l'utilisation d'antibiotiques en agriculture et pour développer des stratégies de gestion efficaces.

Dans le cadre d'une étude qui porte les bactéries endophytes des graines d'orge commun cultivée dans la zone aride d'El Meneaa de la wilaya Ghardaia nous avons comme objectif principal l'isolement, la caractérisation et l'identification des souches selctionnées pour les utiliser comme inoculum bactérien pour l'amélioration de la croissance et le

développement des plantes dans les zones arides.

Cette thèse se propose ainsi d'explorer la diversité, la distribution et les mécanismes de résistance des bactéries endophytes présentes dans les plantes utilisées comme fourrage. En combinant des approches de microbiologie, de génétique et de bioinformatique, nous visons à caractériser ces populations bactériennes et à identifier les déterminants de leur résistance aux antibiotiques. Une meilleure compréhension de ces mécanismes contribuera à orienter les pratiques agricoles vers une utilisation plus responsable des antibiotiques, préservant à la fois la santé publique et l'environnement.


Chapitre 1 :
Rappel bibliographique

I.Antibiorésistantes

1.Définition :

L'antibiorésistance ou la résistance aux antibiotiques est définie par l'inefficacité du traitement antibiotique sur l'infection bactérienne ciblée (Urekasante vidal, 2019). L'antibiorésistance peut être naturelle, elle concerne alors toutes les souches d'un genre ou d'une espèce et détermine le phénotype sauvage de résistance. Elle est alors portée par le chromosome et se transmet verticalement lors de la division cellulaire. La résistance d'une bactérie peut également être acquise. Elle est alors retrouvée dans une proportion plus ou moins importante des souches d'une espèce et est variable dans le temps. Dans ce cas, la transmission est verticale ou horizontale (entre bactéries via des éléments génétiques mobiles) (Vallet et al. , 2008) Chaque année, c'est près de 700 000 décès qui sont attribués à l'antibiorésistance dans le monde (OMS, 2018).

Lorsqu'une bactérie résiste à au moins trois familles d'antimicrobiens, on dit qu'elle est multirésistante aux antibiotiques (Magiorakos et al., 2012). Selon Siegel et al (2007), une bactérie est considérée comme multirésistante si elle peut résister à une ou plusieurs familles d'antibiotiques. Cette définition est souvent appliquée aux bactéries qui sont très importantes pour la santé publique. Très souvent, les phénomènes de résistances croisées ou de co-résistances accompagnent leur résistance (Clemente et al., 2015).

2. Mécanismes de résistance

Il existe quatre principaux mécanismes de résistance (Fig.1), il s'agit de : l'imperméabilité bactérienne, modification de cible, inactivation d'antibiotiques et efflux actif (Faublee ; 2010 ; Scott, 2009). **L'imperméabilité bactérienne** est impliquée dans la résistance naturelle des bacilles à Gram négatif aux glycopeptides (vancomycine), molécules de grande taille ne pouvant pas entrer dans les porines de la membrane externe de ces bactéries (Guillemot et al., 2006).

La modification de la cible de l'antibiotique entraine une perte d'activité de celui-ci, un exemple incontournable est la résistance acquise de *Staphylococcus aureus*. La bactérie possède une nouvelle protéine de liaison des pénicillines

(PLP), la PLP2A ayant très peu d'affinité pour les β-lactamines. La PLP2A est codée par le gène MecA, inclus dans un élément génétique mobile intégré dans le chromosome et appelé en anglais staphylococcus cassette chromosome mec ou SCCmec. (Hiramatsu et al .,2001).

L'inactivation enzymatique de l'antibiotique est le troisième mécanisme d'action et qui est très répandu (Davison et al., 2000). Par exemple, la bactérie *E coli* peut acquérir des gènes de résistance codant des enzymes nommées β-lactamases et capables d'hydrolyser le noyau β-lactame des β-lactamines, les transformant en produits inactifs. (Madec et al., 2012).

Permettent également d'éliminer l'antibiotique en dehors de la bactérie. Ce mécanisme de résistance est particulièrement impliqué dans les résistances naturelles et acquises de *P aeruginosa* **Les systèmes de pompes à efflux** aux antibiotiques. (Cabot et al.,2011). Les antibiotiques exercent inéluctablement une pression de sélection environnementale sur les populations bactériennes. Cette sélection de bactéries résistantes et pré-existantes peut avoir lieu en situation pathologique, au sein d'un foyer infecté (Veyssiere,2019).

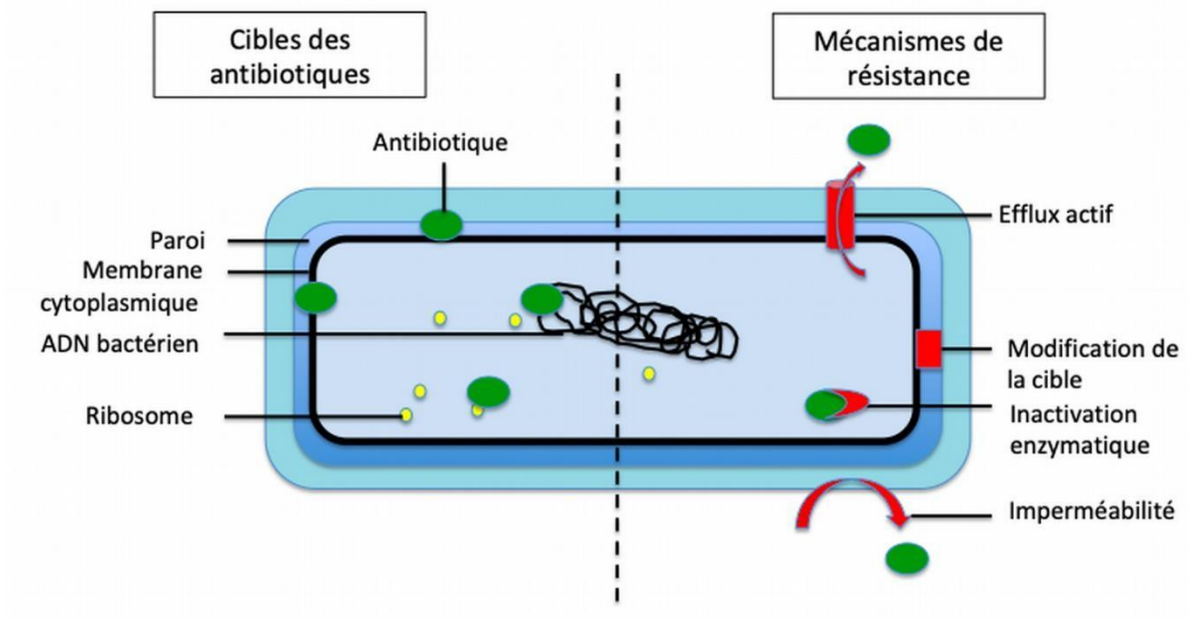


Figure (1) : Cibles bactériennes et mécanisme de résistance aux antibiotiques.(Emilie C.et *al*.,2019)

3. Caractéristiques :

Les bactéries antibiorésistantes présentent des caractéristiques qui leur permettent de survivre et de se multiplier en présence d'antibiotiques, ce qui rend

le traitement des infections qu'elles provoquent particulièrement difficile. Bien que sont très diverses mais elles peuvent présenter des caractéristiques communes.

4-Formation de biofilm :

La formation de biofilm (Fig.2) est effectivement une caractéristique commune à de nombreuses bactéries antibiorésistantes, bien qu'elle ne soit pas exclusive à celles-ci. Les biofilms sont des structures complexes composées de communautés de micro-organismes qui adhèrent aux surfaces et sont enveloppées dans une matrice extracellulaire qu'ils produisent. Cette matrice protège les bactéries des agents antimicrobiens, du système immunitaire de l'hôte et des conditions environnementales défavorables, contribuant significativement à leur capacité à résister aux traitements antibiotiques. Le biofilm renforce l'antibiorésistance pour un ensemble de raisons (Usui et *al*., 2023) :

Barrière physique : la matrice extracellulaire agit comme une barrière physique qui peut empêcher les antibiotiques d'atteindre les bactéries situées à l'intérieur du biofilm en concentrations suffisamment élevées pour être efficaces.

Hétérogénéité métabolique : Les bactéries au sein d'un biofilm présentent une variabilité métabolique, avec des cellules en différents états de croissance et d'activité. Les antibiotiques sont souvent moins efficaces contre les cellules en phase de croissance lente ou dormantes, qui sont plus communes dans les biofilms.

Echanges génétiques : Les biofilms facilitent l'échange de matériel génétique entre les bactéries par des mécanismes tels que la conjugaison et la transformation.

Réponse immunitaire altérée : La présence d'un biofilm peut interférer avec l'efficacité de la réponse immunitaire de l'ôte, réduisant l'élimination des bactéries pathogènes.

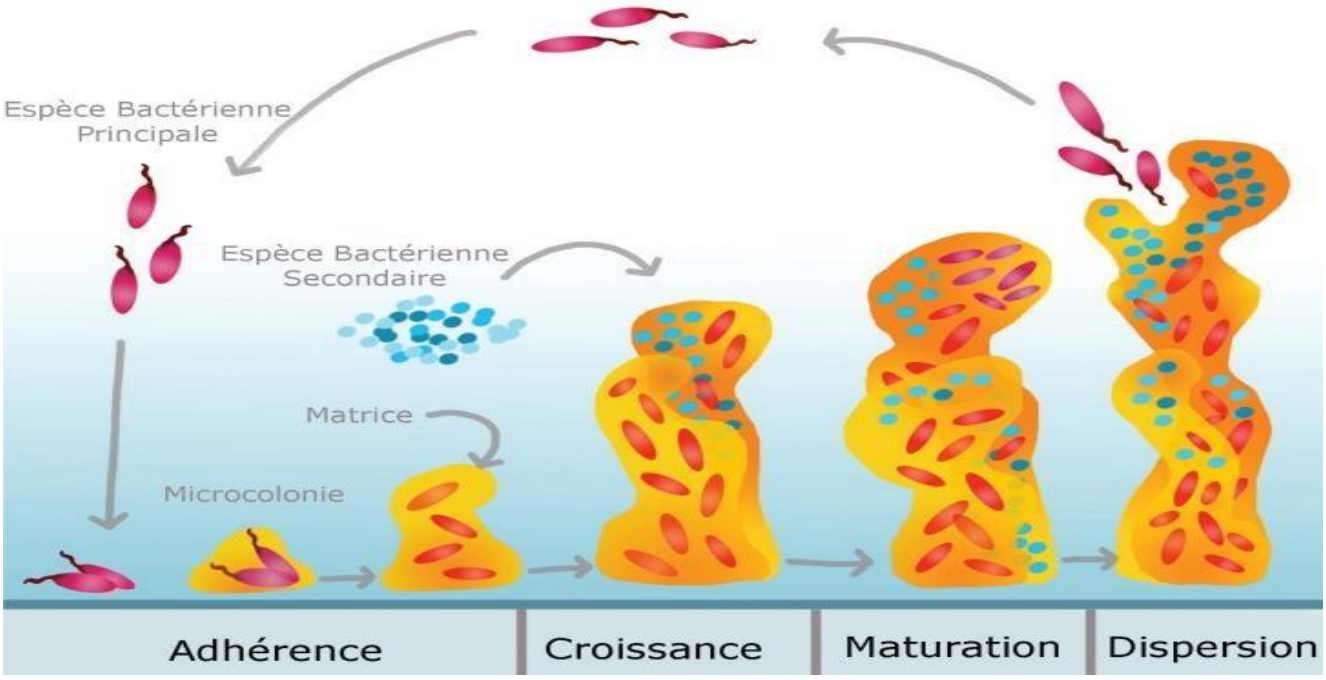


Figure (2) : Les étapes de la formation et de la dispersion d'un biofilm bactérien (Can,2024)

5-Capacité d'adaptation rapide :

Les bactéries antibiorésistantes peuvent rapidement accumuler des mutations génétiques qui leur confèrent une résistance à plusieurs antibiotiques. Cette capacité d'adaptation rapide est une clé de leur survie face à la pression sélective exercée par l'usage d'antibiotiques.

6-Diversité génétique et métabolique :

Les bactéries antibiorésistantes montrent une grande diversité génétique et métabolique, ce qui leur permet de s'adapter à une large gamme d'environnements et de sources de nutriments, augmentant leur capacité à survivre dans différents hôtes et niches écologiques.

II. Bactéries antibiorésistantes d'origine hors milieu hospitalier :

Les bactéries antibiorésistantes ne se limitent pas aux milieux hospitaliers, elles peuvent également se développer et se propager dans des environnements communautaires et naturels. Cette propagation est due à divers facteurs, notamment l'utilisation et la sur utilisation d'antibiotiques en médecine humaine

et vétérinaire, ainsi qu'en agriculture. La présence des antibiotiques dans l'environnement provoque une pression sélective qui entraîne une augmentation de la proportion de **bactérie résistante aux antibiotiques** (Igbinosa et Obuekwe ; 2014; Tacão *et al*., 2014 ; Sharma et al.,2016).

1. Réservoirs des bactéries antibiorésistantes :

1.1. Eaux usées et systèmes aquatiques :

La plupart des composés utilisés en médecine tel que les antibiotiques ne sont que partiellement métabolisés par L'organisme des patients, et sont, ensuite, déversés dans le système d'égout des établissements de soin, ou directement dans les eaux usées municipales avec les excréments qui s'écoulent vers les stations d'épurations. Ils peuvent traverser le système d'égouts, et se retrouver dans l'environnement, principalement dans le compartiment « eau » qui sera, ensuite, ingéré par les populations.

Certaines bactéries environnementales soumises à cette pression d'antibiotiques pourront développer des résistances par sélection ou par acquisition de gènes de résistance provenant de bactéries résistantes présentes dans leur biotope (Wintersdorff *et al*., 2016). Les bactéries pathogènes porteuses de résistances aux antibiotiques sont véhiculées dans l'environnement aquatique par les eaux usées (Guyomard-Rabenirina *et al*., 2017 ; Maheshwari *et al*., 2016 ; Rizzo *et al*., 2013). Le traitement des eaux usées permet d'abaisser leur charge bactérienne, mais ne l'élimine pas totalement, et ne semble pas éliminer les antibiotiques qui se retrouvent dans les boues de stations d'épuration (Jones *et al*., 2005 ; O'Brien & Dietrich, 2004).

Des bactéries résistantes sont présentes dans les égouts municipaux, dans les réservoirs d'aération, et dans le processus de digestion anaérobie des stations (Heuer *et al*., 2002). En Europe et aux États-Unis, beaucoup de bactéries porteuses de gènes de résistances ont été isolées dans les eaux usées, comme par exemples, des bactéries portant le gène *vanA* (résistance à la vancomycine) (Davison, 1999 ; Iversen *et al*., 2002), des bactéries portant le gène *AmpC* (Schwartz *et al*., 2003), des *Acinetobacter*, *Pseudomonas* et entérobactéries portant des gènesde résistance à la gentamicine (Heuer *et al*., 2002 ; Sharma *et al*., 2016), ou, encore, des bactéries résistantes à la tétracycline (Guardabassi *et al*., 2000). Une étude, menée en France par Bréchet sur les eaux usées urbaines et hospitalières, a mis en évidence que ces eaux usées sont riches en *E. coli* BLSE, avec une prédominance de CTX-M (Bréchet *et al*., 2014). En 2011, Jones a mené une étude sur la présence des *Campylobacter* dans les eaux usées en Angleterre, et a démontré que la quasi-totalité de *Campylobacter spp* (jusqu'à 99 %) ont été éliminés après traitement dans les stations d'épurations (Jones, 2001). Les taux d'élimination étaient de 95 à 99 % pour *E. coli*, *Pseudomonas spp* et *Enterococcus spp*. Pour les bactéries résistantes, le taux d'élimination était de 93,5 à 100%. Il n'y avait donc pas de différence significative entre les bactéries résistantes et non résistantes. Cependant, ces taux de réduction, qui paraissent, à priori, importants, s'appliquent sur une flore bactérienne initialement très abondante. Le nombre de bactéries en sortie de STEP reste donc, très souvent, élevé (Guyomard-Rabenirina *Et al*.,2017). Les stations d'épuration constituent des biotopes favorables au développement des BRAs (Everage *et al*,2014).

1.2.L'agriculture

La présence de bactéries antibiorésistantes dans l'agriculture est une préoccupation majeure en santé publique, car elle représente une voie importante par laquelle la résistance aux antibiotiques peut être transférée des animaux aux humains. L'utilisation d'antibiotiques en agriculture, que ce soit pour promouvoir la croissance, prévenir les maladies ou traiter les infections, a été identifiée comme un facteur contributif à l'émergence et à la propagation de la résistance aux

antibiotiques. I l est essentiel de considérer l'interaction complexe des éléments dans l'environnement physique (l'air, le sol et l'eau) avec des échanges inter espèces (entre les animaux d'un troupeau, les agriculteurs et les animaux, les volailles domestiques et les oiseaux migrateurs), dans les étapes de transformation (les activités agricoles, le transport et le stockage), et dans les modèles d'utilisation humaine (préparation des aliments, consommation de viande, et susceptibilité à l'infection) (Dantas et Sommer ; 2014 ; Landers *et al.*, 2012).

1.3.Amendements organiques

L'épandage de déchets organiques sur les terres agricoles est une pratique traditionnelle et répandue qui permet d'augmenter le contenu du sol en matière organique. De tels apports sont d'excellentes sources de nutriments qui peuvent être incorporés dans la plupart des programmes de fertilisation des sols, en adaptant le contenu disponible en azote ou phosphore du déchet aux besoins nutritifs de la récolte. Il existe deux manières d'amender les terres avec les déchets d'origine biologique, soit par utilisation directe des fèces (fientes de poules, lisier de porc, bouse de vache, …), ou après compostage.

L'utilisation brute de ces déchets apporte des bactéries antibiorésistantes dans l'environnement. Le fumier d'animaux étant un réservoir important de bactéries antibiorésistantes et de pathogènes (Ferens & Hovde, 2011 ; Heuer *et al.*, 2011a), le risque d'introduction de BRAs dans l'environnement est grand lors de leur utilisation en direct.

Ces bactéries antibiorésistantes sont retrouvées dans les fèces, même si ces animaux n'ont pas d'antécédents de traitement aux antibiotiques (Schwaiger *et al.*, 2009 ; Zhou *et al.*, 2010). Ceci suggère que certains animaux possèdent naturellement des bactéries intrinsèquement résistantes aux antibiotiques dans leurs voies gastro-intestinales (Stanton *et al.*, 2011). Une étude a pu confirmer que l'utilisation du fumier est beaucoup plus dangereuse que celle du compost de fumier de volaille pour l'environnement et l'homme (Yang *el al.*, 2016). l'utilisation des compost (généralement riches en carbone) contribuent au développement de hautes densités bactériennes qui peuvent fournir

des conditions favorables à l'échange de gènes de résistance (Heuer *et al*., 2011). Le compost représente une voie par laquelle les bactéries résistantes peuvent potentiellement, entrer dans le système alimentaire, *via* le sol, puis les cultures. L'utilisation du compost peut affecter la composition et les propriétés fonctionnelles des communautés microbiennes du sol (Binh *et al*., 2007 ; Jechalke *et al*., 2013). Une étude, menée par Udikovic-Kkolic (2014) montre que l'utilisation des composts de bovins et de porc augmente l'abondance des bactéries résiduelles du sol, résistantes aux antibiotiques. De même, l'utilisation régulière du compost de fientes de poules est un apport de bactéries résistantes et permet leur persistance dans les sols amendés (Zhao *et al*., 2017).

1.4.Rejets agricoles

Les rejets agricoles représentent une source de contamination directe des eaux douces et des eaux salées, mais, aussi, des eaux souterraines. Une étude sur les bactéries résistantes, et les gènes de résistances aux antibiotiques retrouvés dans les rejets d'élevages (bovins et porcins), et dans les effluents de stations d'épuration municipales, a montré que les bactéries résistantes aux antibiotiques, ainsi que les gènes de résistances, étaient très nombreux, avec une plus grande diversité de gène de résistance aux antibiotiques dans les effluents d'eaux usées que dans les rejets des élevages (Agga *et al*.,2015). La résistance à une grande variété d'antimicrobiens a, aussi, été trouvée chez les bactéries isolées d'eaux issues des activités agricoles, et d'abattoirs (Igbinosa, Osamuyimen O. Oviasogie *et al*., 2013 ; Igbinosa *et al*., 2011 ; Igbinosa & Odjadjare, 2015). Par conséquent, l'impact de la diffusion des bactéries résistantes, et des gènes de résistance, sur les écosystèmes naturels, *via* les rejets agricoles, n'est pas à négliger (Martinez *et al*., 2009).

2. Modes de transmission :

Les bactéries résistantes aux antibiotiques peuvent atteindre les humains soit indirectement le long de la chaîne alimentaire par la consommation d'aliments contaminés ou de produits dérivés de l'alimentation, ou bien suite au contact direct

avec des animaux colonisés/infectés ou des substances biologiques telles que le sang, l'urine, les selles, la salive et le sperme, entre autres (Chang et al., 2015). Étant donné l'interact ion directe des humains avec l'interface animal-écosystème, il est essentiel de prévenir la transmission zoonotique des bactéries résistantes aux antibiotiques et des gènes de résistance aux antibiotiques partir des réservoirs associés aux animaux d'élevage vers les humains.

2.1.Mode directe

Le contact direct se produit suite à une exposition immédiate des humains aux animaux et à des substances biologiques (telles que le sang, l'urine, les selles, le lait, la salive et le sperme), et favorise la dissémination rapide et facile des bactéries résistantes d'un hôte à un autre. Les travailleurs exposés professionnellement tels que les vétérinaires, les agriculteurs, les travailleurs d'abattoirs et les manipulateurs d'aliments, ainsi que ceux qui sont directement en contact avec eux, présentent un risque élevé d'être colonisés ou infectés par des bactéries résistantes aux antibiotiques (Marshall and Levy, 2011).

Bien que cette transmission n'ait pas initialement été perçue comme une menace au niveau de la santé de la population, il est maintenant reconnu que les travailleurs exposés et leurs familles constituent une voie probable d'entrée des bactéries résistantes aux antibiotiques et des gènes de résistance dans la communauté et les établissements de santé, où des échanges ultérieurs et l'acquisition de mécanismes de résistance sont évidents (Marshall and Levy, 2011).

2.2.Mode indirect

La population humaine peut être exposée de manière indirecte aux bactéries résistantes aux antibiotiques et aux gènes de résistance via le contact avec des produits alimentaires contaminés ou leur consommation (légumes, viande, œufs, lait et produits laitiers). Cette transmission indirecte à travers la chaîne alimentaire est un processus complexe et étendu (Fig.3). Récemment, de nombreux rapports ont décrit la présence de grandes quantités de bactéries résistantes aux antibiotiques et de gènes de résistance dans divers produits alimentaires (viande prête à consommer, viande cuite et lait en vrac) provenant de différentes sources

animales et à différents stades de la production alimentaire (Price et al., 2012 ; Coetzee et al., 2016 ; Liu etal., 2016).

Plusieurs études ont en outre identifié des bactéries résistantes aux antibiotiques similaires ou clonalement apparentées et des gènes de résistance d'origine animale dans des populations humaines sans exposition professionnelle, fournissant ainsi des preuves probables de transfert suite à la consommation et/ou à la manipulation des aliments (Acar and Moulin, 2006 ; Marshall and Levy, 2011).

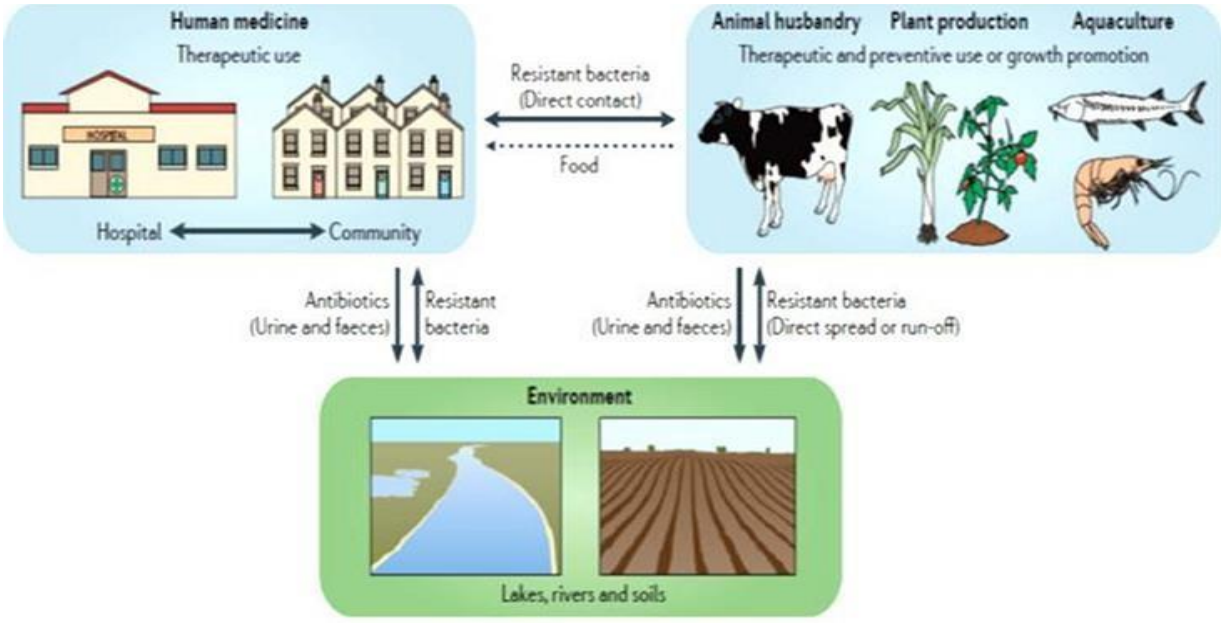


Figure (3) : Les différents modes de transmission de la résistance aux antibiotiques dans la chaînealimentaire (Andersson and Hughes, 2014).

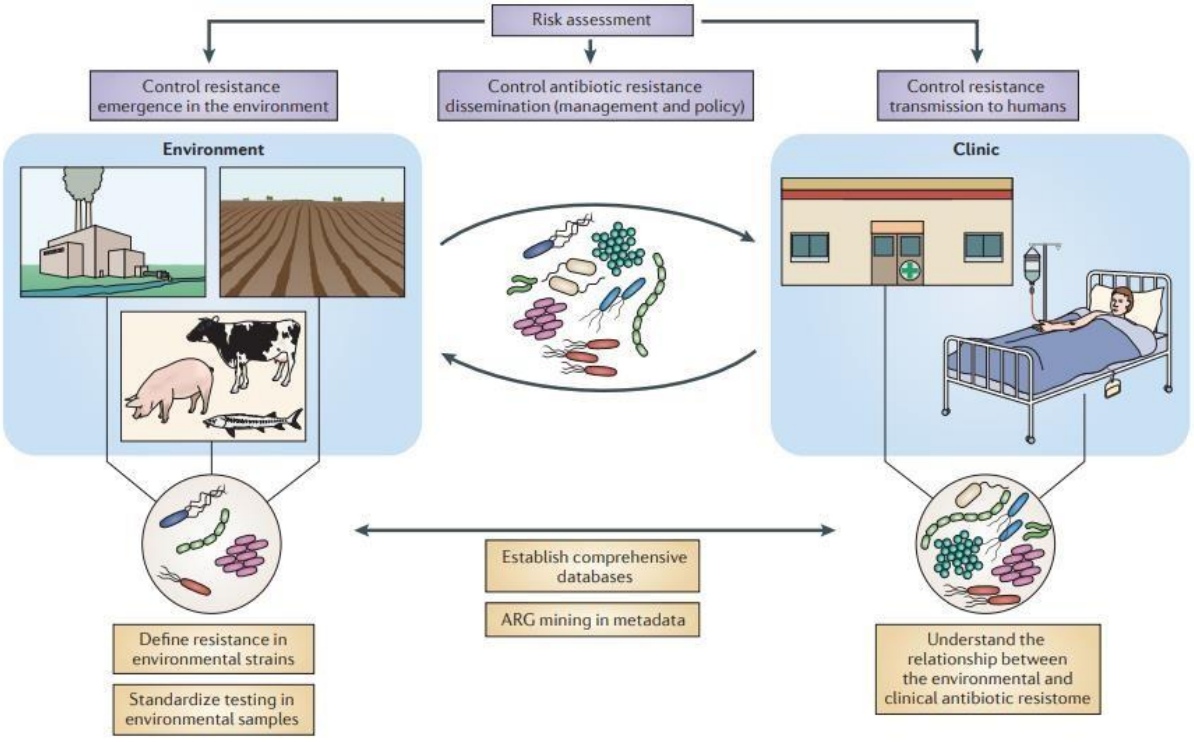


Figure (4) : Les principaux voies pour minimiser la propagation de la résistance aux antibiotiquesdans l'environnement (Berendonk et al.,2015)

III. Les bactéries endophytes 1.Définition et classificaion :

Les endophytes est un terme qui provient du latin ; endo (intérieur) et phyte (plantes), et qui a été attribué à un groupe hétérogène de micro-organismes (bactéries et champignons) qui vivent à l'intérieur des tissus de l'hôte sans montrer de signes externes d'infections, au moins durant une partie de leur cyclede vie et qui ne sont responsables d'aucune maladie (Saikkon et al.,2004), et qui sont isolés après stérilisation de la surface des plantes (Halman et al.,1997) et ne provoquent aucune modification morphologique tel que les nodules (Boyle, 2006). Récemment, Bulgarelli et al (2013) ont défini les endophytes comme étant le génome microbien qui existe à l'intérieur des organes des plantes. Les endophytes peuvent être classé en trois catégories (Fig.4) basant sur le mode de vie à l'intérieur des plantes (Hardoim et al.,2008).

Endophytes obligatoires : Ce sont des microorganismes qui habitent l'intérieur des tissus végétauxdurant toute leur vie et qui dépendent des métabolites des plantes pour vivre, ils sont originaires des graines.

Endophytes facultatives : Ce sont les microorganismes qui vivent à l'extérieur des plantes hôte pourau moins un stade de leur cycle de vie et qui

sont recrutés par la plante à partir de l'environnement extérieur.

Endophytes passives : Ce sont des microorganismes qui vivent à l'état libre et qui colonisent les plantes suite à une série d'évènements accidentels, et qui probablement ne participent pas à la promotion de la croissance des plantes.

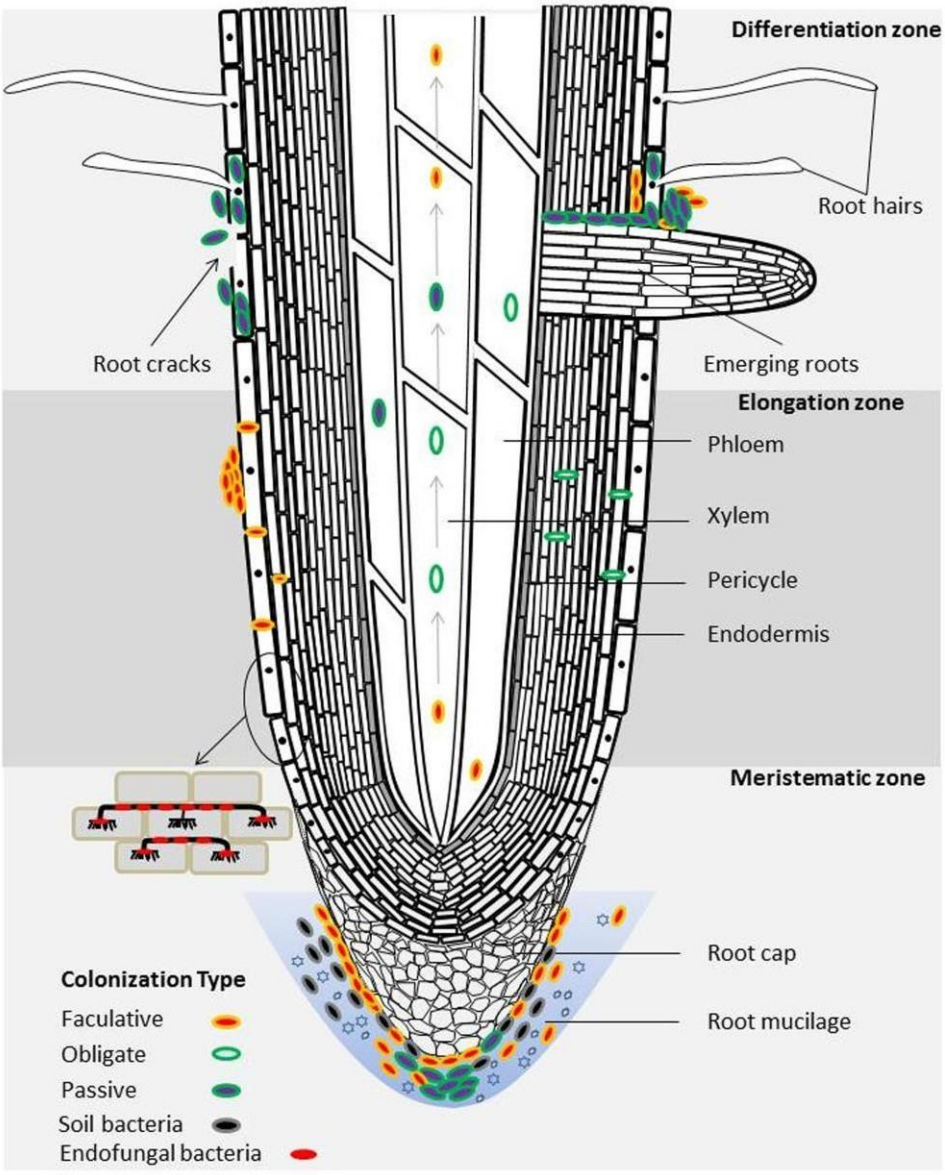


Figure (5) :. Schéma représentatif de la distribution et la colonisation des bactériesendophytiques (Compant et *al.*, 2008) et (Glaeser S., et *al.*, 2018).

2. Densité et diversité :

Les bactéries endophytes colonisent l'apoplaste des plantes, y compris les espaces intercellulaires des parois cellulaires et les vaisseaux du xylème des racines, des tiges et des feuilles.

Ils sont également présents dans les tissus floraux (Comant et al., 2011), les fruits (Demelo et al., 2012) et les graines (Troquitz et al., 2014). Bien que les endophytes puissent envahir la plante entière, la densité est plus grande dans les racines (Kukilinky,2004)

En fait, les populations bactériennes endophytes peuvent être de l'ordre de 107 UFC.g^{-1} de poids frais de racines, 10^4UFC g^{-1} de poids frais de tige et 10^3 UFC g^{-1} de poids frais de feuilles. Les organes reproducteurstels que les fleurs, les fruits et les graines sont occupés par un petit nombre de bactéries, dans de nombreux cas inférieurs aux limites de détection (Hallman et al., 1997). Cependant, cette estimation de la densité de la communauté bactérienne ne concerne que les formes cultivables et ne représente qu'une partie de la population bactérienne endophytes.

Les outils de biologie moléculaire jouent un rôle important dans l'étude de la diversité des endophytes. Hardoim et al (2015) ont établi une base de données sur le séquençage et l'attribution de toutes les séquences d'ARN 16S des bactéries endophytes. Après analyse, ils ont retrouvé des séquences appartenant à 23 phylums différents, dont 4 considérés comme les plus abondants, ce sont Protéobactéries, Actinobactéries,Firmicutes Bacteroidetes.

Les Protéobactéries contiennent à elles seules plus de 50 % des séquences d'ARN 16S assemblées. Dans ce phylum, le genre Gammaproteobacteria est le plus représenté, parmi lesquels Pseudomonas, Enterobacter, Pantoea, Sterotrophomonas, Acetobacter et Serratia. D'autre part, les genres endophytes tels que Streptomyces, Microbacterium, Mycobacterium, Arthrobacter (classe Actinobacteria), Bacillus, Paenibacillus et Staphylococcus (classe Firmicutes) sont les plus largement répandus parmi les bactéries.

3. Mode de transmission

Il existe deux modes de la colonisation des plantes par des bactéries (Fig.4):

3.1.Transmission verticale

La transmission verticale est définie globalement comme étant le passage d'un gène, un agent pathogène ou autre d'un parent à un descendant lors d'une reproduction. Ce mode de transmission concerne essentiellement les endophytes obligatoires. Les études qui supportent l'hypothèse de transmission verticale des bactéries à partir des graines vers les plantes se sont reposées sur la mise en évidence des chevauchements des bactéries endophytiques entre les graines et les semis (Lee,1996 ; Weber,2000).

3.2.Transmission horizontale

La transmission horizontale est propre aux champignons endophytes à reproduction sexuée. Elle se fait via des spores qui peuvent être disséminées par le vent, ou par un vecteur (insectes en général) et pénètrent indirectement (via les stomates ou les lenticelles) ou directement.

Les bactéries endophytiques, après plusieurs étapes, pénètrent et habitent l'intérieur des tissus végétaux grâces à un dialogue moléculaire qui s'installent entre plantes- bactéries (Mathesius et al., 2003 ; Rocha et al., 2007) et bactéries-bactéries (Elsari et al., 2001 ; Faure et al., 2009). Cette machinerie passe par trois principes étapes :

- **Reconnaissance et sélection**

Le recrutement des bactéries par les plantes commence par l'établissement d'une communication à travers les exsudats racinaires (Lugtenberg et Dekkers ;1999), ces derniers peuvent déterminer l'abondanceet la diversité des communiés bactérienne dans leur environnement adjacent (Brendsen et *al*.,2012). Les bactéries captent et répondent à ce signal à travers des systèmes de capture à un ou deux composants (Faure et al.,2009). Le système de capture à un composant est formé d'une seule protéine avec entrée et sort ie transmembranaire.

- **Adhésion**

Les bactéries arrivent sur les racines par affinité à des exsudats racinaires et s'attachent à la surface à l'aide des structures bactériennes tel que les flagelles, les fimbriae ou les Exo-poly-saccharides (EPS) qui facilitent leur adhésion au rhizoplan et même les premières étapes de colonisation de l'intérieur des tissus

végétaux.

Les LPS (Lipo-poly-saccharides) sont aussi impliqué dans l'adhésion des bactéries aux surface des

Plantes, en effet une étude réalisée par Balsanelli en 1998 sur la colonisation des plants de maïs par H seropédica a confirmé l'implication des LPS dans le processus d'attachement et de pénétration, après, ils ont montré que la liaison N-Acetyl Glucosamine des LPS est nécessaire pour l'établissement d'un contact avec les racines de maïs (Pelmont, 2005).

- **Pénétration**

Une fois les bactéries attachées sur la surface extérieure des plantes, elles pénètrent à l'intérieur des tissus par les racines latérales ou par d'autres ouvertures telles que les blessures au niveau des racines, Les stomates et les hydatodes au niveau des tiges et les feuilles (Soltner,2005). Ce sont les points d'accès pour les endophytes de type passive.

Les endophytes de type facultatif préfèrent modifier les cellules de la surface des plantes par la sécrétion d'enzymes hydrolytiques qui facilitent la dégradation de la barrière et la pénétration des bactéries.

La mobilité des bactéries à l'intérieur des plantes s'accompagne avec la sécrétion des enzymes cellulolytiques qui facilitent l'immigration des endophytes vers les parties aériennes (Soltner., 2005).

Malgré que les endophytes préfèrent loger les espaces intercellulaires, d'autre colonisent les espaces intra cellulaire des plantes (Hardoim et al., 2005).

D'autres bactéries atteignent l'espace intracellulaire à l'aide des enzymes de dégradation ou à travers un

« Rhizo-phagy » (Torres et al., 2012). La rhyzophagy (Fig.5) est un phénomène, ou les racines des plantes laissent des bactéries pénétrer à l'espace intracellulaire pour les manger et extraire par oxydation les nutriments nécessaires pour leurs développements.

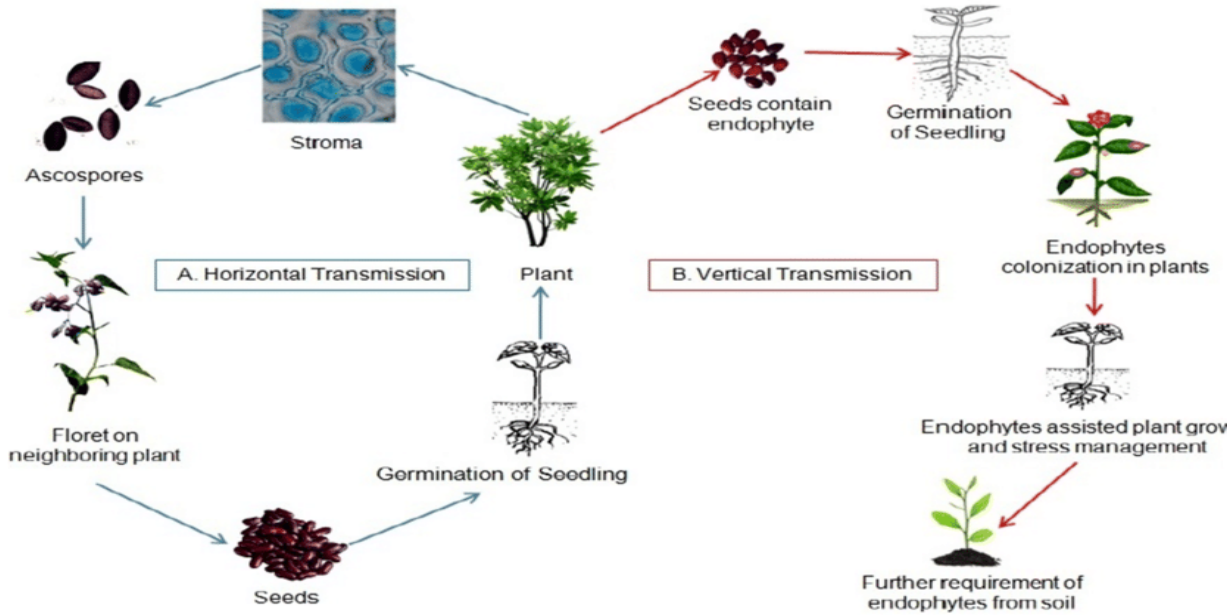


Figure (6) : Modes de transmission des bactéries endophytes dans les plantes. (Ravindra etal.,2021) (A) Horizontal transmission; (B) Vertical transmission.

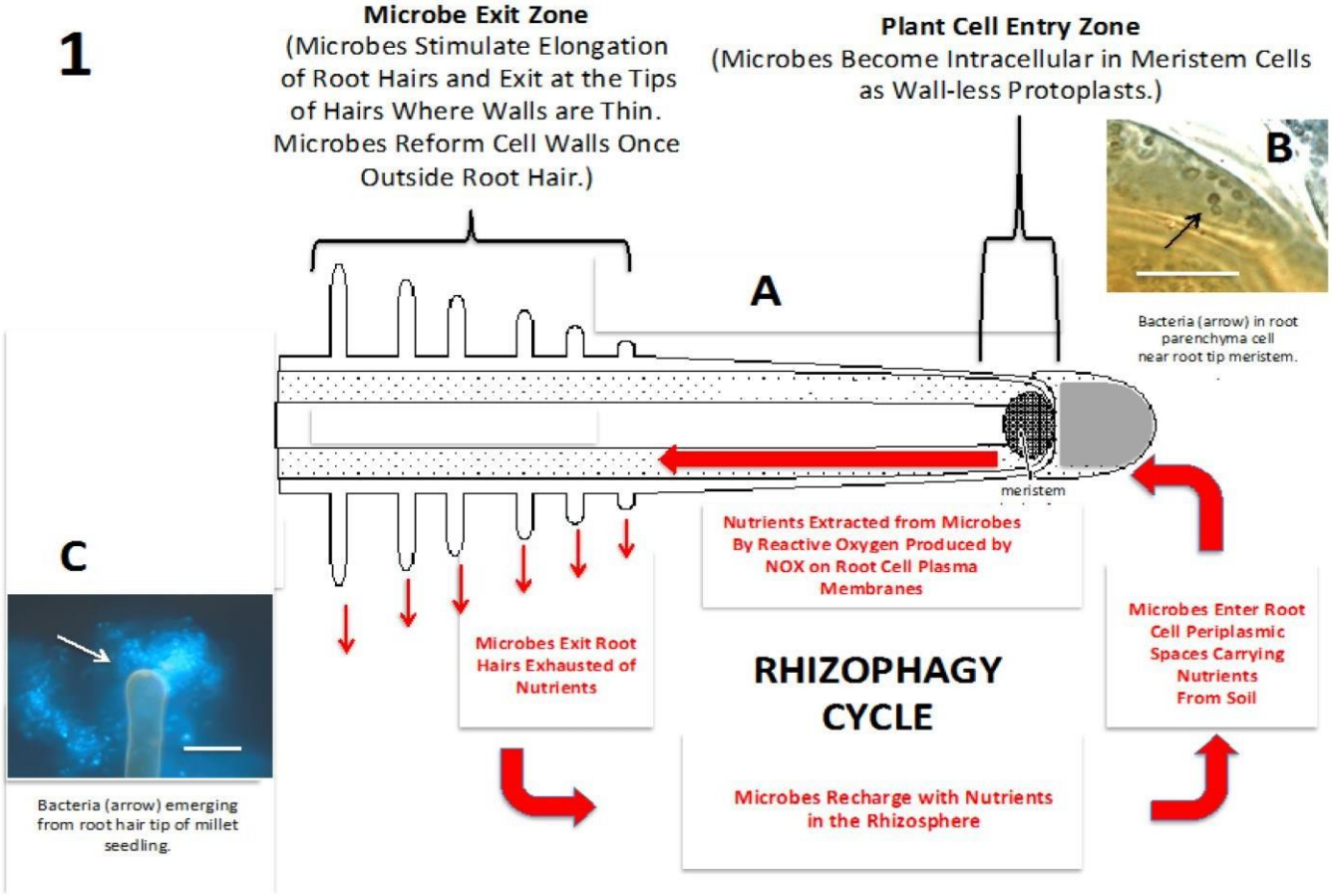


Figure (7) : Représentation schématique du cycle de rhizophages (White et al,2019)

Les microbes du cycle de la rhizophages alternent entre une phase intracellulaire à l'intérieur d'une plante et une phase libre dans le sol : Les microbes pénètrent dans les cellules racinaires au niveau du méristème apical et quittent les cellules racinaires à l'extrémité des poils racinaires. Les éléments nutritifs du sol sont acquis dans la phase libre dans le sol et extraits par oxydation dans la phase endophytique intracellulaire (1A). 1B illustre des bactéries dans l'espace périplasmique entre la paroi et la membrane d'une cellule à proximité du méristème apical des racines d'un plant d'agave. 1C représente des bactéries qui sortent de l'extrémité d'un poil racinaire d'un germe d'herbe.

4. Interaction entre endophytes et plantes hôtes

La relation entre l'hôte et les bactéries endophytes est complexe et varie en fonction de l'hôte et de sonendophytes. En réalité, les deux organismes synthétisent des composés métaboliques secondaires, qui nesont pas directement impliqués dans les processus de croissance. La fonction des métabolites secondairesdemeure mal compris. Cependant, leur grande diversité souligne leur rôle biologique, en particulier auniveau des interactions inter-organismes, et leur importance dans les voies de signalisation et de toxines.(Brader ; 2001). Il existe différentes façons dont la présence d'endophytes pourrait bénéficier aux plantes. L'endophyte produit des molécules impliquées dans la défense de la plante contre les insectes et les herbivores, telles que celles produites par l'endophytes coton *Phomopsis sp*. semble décourager les larvesde se nourrir de feuilles (Verma et al., 2008).

De nombreuses bactéries interagissent étroitement avec les plantes pour produire des produits métaboliques secondaires nécessaires à l'absorption des nutriments. En outre, certaines molécules agissent comme agents dans le développement de biofilms ou de toxines (Raaijmakers et al., 2010) ou fonctionnent comme noyaux dans la voie de signalisation hormonale (Mel Gonzalez et al., 2008). La production et la régulation de l'auxine et de l'éthylène par les hormones endophytes joue un rôle crucial dans les interactions bénéfiques entre les endophytes et les plantes, tant dans le développement des plantes que

dans la tolérance au stresses (e.g., lactic acid bacteria)

4.1 Productions d'hormones végétales par des micro-organismes

Les hormones végétales ne sont pas des métabolites exclusivement produits par les plantes. De nombreux micro-organismes présents dans les sols, champignons ou bactéries, pathogènes ou symbiotiques, peuvent également produire ces molécules (Costacurta and Vanderleyden, 1995; Tudzynski, 1997) tout en produisant des effecteurs perturbant l'homéostasie hormonale de la plante (Kazan and Lyons,2014).

Il a été estimé que 80% des micro-organismes présents dans la rhizosphère sont capables de produire de l'auxine (Patten and Glick, 1996), de manière à favoriser le développement des plantes ou diminuer leur résistance pour favoriser leur invasion (Glick, 1995; Jameson, 2000). La régulation et la signalisation hormonale de la plante ne peuvent donc pas être étudiées sans tenir compte de l'influence des micro - organismes. Sans réaliser un catalogue exhaustif de la production de phytohormones chez l'ensemble des microorganismes.

4.2.Chez les bactéries

Plusieurs bactéries sont capables de produire des hormones végétales (Kudoyarova et al., 2019).Le premier exemple notable se trouve chez les bactéries provoquant des galles chez les plantes, comme chez les Agrobacterium ou certains pathovares de Pseudomonas syringae, qui sont
connus de longue date pour produire des Auxines et des Cytokinines (Akiyoshi et al., 1987; Glickmann etal., 1998). Des CKs peuvent également être produites par Streptomyces turgidiscabies (Loria et al., 2006)ou encore Ralstonia solanacearum, qui est également capable de produire de l'éthylène (Valls et al., 2006). De façon similaire, les rhizobactéries favorisant la croissance des plantes peuvent produire des phytohormones, principalement de l'auxine (Spaepen and Vanderleyden, 2011) des CKs (García de Salamone et al., 2001) des Acide gibbérellique / Gibbérellines (Gupta et al., 2017), ou encore de l'éthylène via des Acide 1-aminocyclopropane-1-carboxylique déaminases (Glick, 2005).

Les deux hormones les abscisses et les gibbérellines produites par l'endophyte *Azospirillum lipoferum*

exacerbent les symptômes de stress causés par la sécheresse du maïs (*ZEA mays.L) (ANONYME,2012)*. En plus des régulateurs de croissance, les bactéries liées aux plantes produisent également des molécules qui imitent les effets des phytorégulateurs naturels en tant qu'analogues structurels (Brader et al., 2001). Certaines molécules ne sont pas produites par un seul organisme, mais par la combinaison de l'endophyte et de la plante. Par exemple, la présence d'une méthylobactériode affecte à la fois la quantité et la qualité des furanoïdes, qui donnent aux fraises leur saveur distinctive (Zabetakis ;1997)

5. Les bactéries endophytes antibiorésistantes

La résistance aux antibiotiques chez les bactéries endophytes est relativement moins étudiée par rapport aux milieux cliniques ou agricoles. Néanmoins, il y a une reconnaissance croissante de l'importance de comprendre comment la résistance aux antibiotiques peut se manifester et se propager chez les endophytes, en raison de leur potentiel d'échange de gènes de résistance avec des pathogènes bactériens.

5.1.Origine de la résistance

Les bactéries endophytes peuvent acquérir des gènes de résistance aux antibiotiques par transfert horizontal de gènes, soit à partir de bactéries du sol, soit d'autres micro-organismes présents dans l'environnement. Les pratiques agricoles, notamment l'utilisation d'antibiotiques et de pesticides, peuvent favoriser ce transfert. Cette antibiorésistance peut être à la suite de plusieurs facteurs :

Coévolution : Les bactéries endophytes ont souvent évolué en étroite association avec leurs plantes hôtes au fil du temps. Cette coévolution peut entraîner des adaptations spécifiques, y compris des mécanismes de résistance aux antibiotiques, pour s'adapter à l'environnement interne des plantes.

Transfert horizontal des gènes : Le transfert horizontal de gènes joue un rôle important dans l'évolution des organismes, en leur permettant d'acquérir de

nouvelles fonctions et de s'adapter à des environnements changeants. Ce transfert peut avoir deux origines :

- **Origine environnementale** : Les bactéries endophytes peuvent acquérir des gènes de résistance aux antibiotiques par transfert horizontal de gènes à partir d'autres bactéries présentes dans l'environnement.
- **Interaction avec d'autres micro-organismes** : Les bactéries endophytes peuvent échanger des gènes de résistance avec d'autres micro-organismes présents dans le microbiome des plantes, que soit des bactéries pathogènes ou des symbiotes.

L'environnement des plantes : L'environnement des plantes peut être soit dans la nature ou en milieu agricole.

- **Usage agricole d'antibiotiques :** Dans les cultures agricoles, l'utilisation d'antibiotiques peut exercer une pression sélective sur les bactéries endophytes, favorisant le développement de la résistance aux antibiotiques dans ces populations.

Les bactéries endophytes peuvent être exposées à des antibiotiques utilisés en agriculture pour d'autres applications que le contrôle des maladies, comme la croissance des plantes ou la protection contre les ravageurs. Cela peut entraîner une co-sélection de la résistance aux antibiotiques.

- **Mécanismes de résistance :** Les plantes produisent naturellement des composés chimiques, tels que les phytoalexines, pour se défendre contre les pathogènes. Les bactéries endophytes peuvent développer des mécanismes de résistance pour survivre face à des stresses.

5.2.Implications écologiques et sanitaires

La présence de bactéries endophytes résistantes aux antibiotiques dans les plantes pose plusieurs questions écologiques et sanitaires. D'une part, elle reflète la capacité de l'environnement à agir comme réservoir de gènes de résistance ; d'autre part, elle souligne le potentiel de transfert de ces résistances aux

pathogènes humains et animaux, notamment par le biais de la chaîne alimentaire . La consommation de légumes crus représente une voie d'exposition humaine aux bactéries trouvées dans le sol (Hassan *et al*., 2011 ; Marti *et al*., 2013). Un élément important pour garantir la salubrité des produits aux consommateurs est de maintenir des normes adéquates d'hygiène. En effet, il est nécessaire de s'assurer que les produits consommés ne soient pas en contact avec des agents pathogènes transportés dans un engrais brut utilisé comme fertilisant (lisier de porc, bouse de vache, fientes de poules…). Une étude menée sur les légumes rappelle l'importance de bien laver ceux-ci avant utilisation (Schwaiger *et al*., 2011).


Chapitre 2 :
Matériels et méthode

I. Matériel

1. Matériel non biologique

Durant notre stage de fin d'étude qui a été réalisé au niveau du laboratoire pédagogique de l'université YahiaFarès -Médéa, durant la période Mars-Juin 2024. Durant cette période nous avons utilisés des appareils (Annexe 1), des milieux de culture (Annexe 2) et des solutions (Annexe 3).

2. Matériel biologique

2.1.Broyats des systèmes racinaires des plantes

Pour la réalisation de notre étude nous avons utilisé des broyats des racines de *Medicago sativa* L cultivé (Figure 8.a) cultivées au niveau de la station expérimentale (Figure 8.b) de l'université des Sciences et de la technologie, Houari Boumedienne, El Menia (30°37'00.8"N, 2°52'47.0"E) (Figure 8.c) durant les périodes Janvier-Mars 2021/2022.Les plantules ont été placées dans des sachets stériles (Figure 8.a) et transportées au laboratoire dans les conditions de froid (+4C). Le système racinaire a été nettoyé par un lavage avec de l'eau distillée stérile et une solution saline (PBS), puis stérilisés par un trempage dans un bain d'éthanol 95° pendant 30 second es, suivie d'un bain d'hypochlorite de sodium (NaCIO 5,25%) pendant 2 minutes. Par la suite, les racines ont été lavé trois fois consécutives avec de l'eau distillée stérile. Afin de vérifier l'efficacité de la désinfection en surface, 5 morceaux des racines ont été ensemencées sur des milieux de culture TSA 1/10 (Annexe 3) et incubées pondant 24 à 48h à 25°C.

Les racines ont été coupées (Figure 08.b) puis laissées à séchées sous haute microbiologique puis broyer dans de PBS (Figure 08.c). Les broyats racinaires (endosphère racinaire) obtenus ont été mélangé avec du glycérol 80% en raison de 1V/1V et conservées à -20°C.

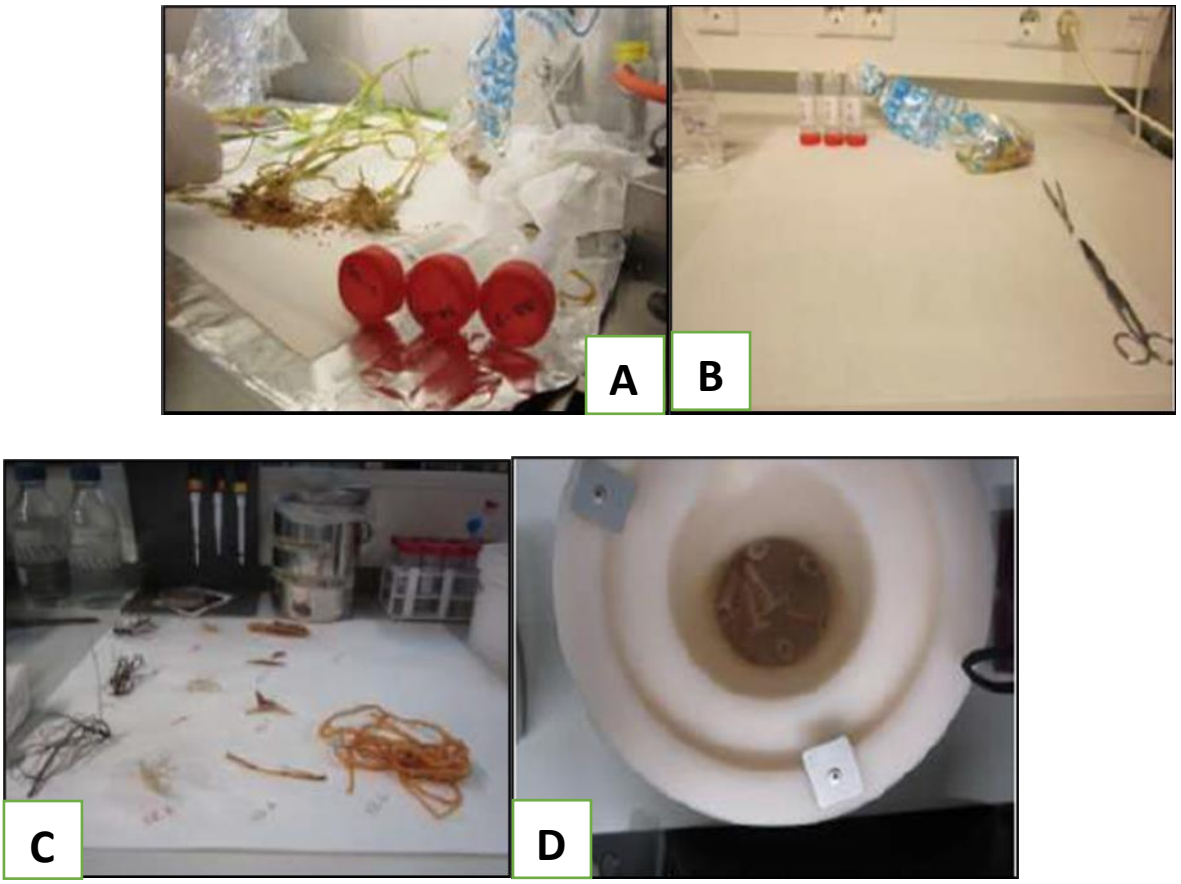


Figure (8) : Les étapes de traitement des racines des plantes de Medicago sativa (photos personnelles)

II. Les Méthodes

1. Dénombrement de la flore bactérienne

Pour l'isolement des bactéries présentent au niveau de l'endosphère racinaire, le broyat obtenu a été considérécomme la solution mère et une série de dilution a été réalisé..50µl de la solution mère et des dilutions 10^{-2} et 10^{-3} ont été étalé à la surface des boites de Petri contenant les milieux TSA 1/10 en raison de trois répétitions pour chaque milieu et pour chaque dilution.

Le dénombrement de la microflore bactérienne totale sur les boites contenant du milieu TSA1/10 a été réaliséchaque deux jours sur une période d'incubation de 15 jours à 25°C. Le nombre de colonies de la flore totale (UFC.mL^{-1}) a été calculé avec la loi de kass.

A partir des colonies formées une série de repiquages a été effectuée suivant la

méthode des stries d'épuisement jusqu'à l'obtention de cultures pures. Un code a été attribué à chaque isolat.

2. L'étude de la sensibilité des bactéries endosphériques aux antibiotiques

L'étude de la sensibilité aux antibiotiques à été réalisée par la méthode de diffusion sur milieu gélosé TSA1/10 selon les normes et les recommandations du comité de l'antibiogramme de la société française de la microbiologie (CASFM, 2008). Des colonies bien isolées et parfaitement identiques d'une culture jeune (18H) ont été raclé à l'aide d'une anse de platine à partir d'un milieu d'isolement approprié, puis l'anse a été déchargé dans 5 à 10ml d'eau physiologique stérile, puis la suspension bactérienne a été homogénéisé au vortex. L'écouvillon déchargé de l'inoculum est frotté sur la totalité de la surface gélosée, en stries serrées en répétant l'opération 2 fois, en tournant la boîte de 60° à chaque fois, sans oublier de faire pivoter l'écouvillon sur lui-même puis l'ensemencement est finie par son passage sur la périphérie de la gélose. A l'aide d'une pince bactériologique stérile, les disques d'antibiotique (Tab. 01) ont été pressés sur la gélose. Puis les boites ont été incubées à 37°C pendant 24H. Après la période d'incubation les diamètres des zones d'inhibition sont mesurés avec précision et comparés avec des valeurs critiques.

Tableau (1) : Classification des antibiotiques utilisés pour l'étude de l'antibiogramme

Famille	Antibiotique	Symbole	Charge du disque µg
Fusidanines	Fusidic Acid	FC	10
Aminosides	AMIKACIN	AK	30
Macrolides	Erythromycine	E	15
Rifamycines.	RIFAMPICIN	RA	5
Bêta-lactamines	IMIPENEM	IMP	10
Bêta-lactamines	TICARCILLIN	TC	75
Bêta-lactamines	CEFOTAXIME	CTX	30
Bêta-lactamines	CEPHAZOLIN	CZ	30
Bêta-lactamines	CEFALEXIN	CN	30
Céphalosporines	CEFTRIAXONE	CTR	30

3. Détermination de la concentration minimale inhibitrice

La concentration minimale inhibitrice est la plus petite concentration en antibiotique, en antifongique et /ouen principes composés actifs nécessaires pour inhiber la croissance d'un microorganisme (Denis et *al*., 2011).

La détermination de la CMI a été réalisée par la technique de micro dilution en milieu liquide (TSB). Une colonie jeune de chaque isolat des bactéries endosphériques qui ont montré une multi-résistance aux antibiotiques testés a été ensemencé dans 10 ml de TSB et incubée pendant 24h à 30°C sous agitation (150

rpm) en vue d'obtenir des inocula. Des prises de 200µl de chaque inoculum ont été introduites respectivement dans 2 ml de chaque antibiotique dilué dans le TSB à différente concentrations (0%, 20%,
……100%). L'ensemble a été laissé à incubé incubée pendant 24h à 30°C sous agitation (150 rpm) (Morohet *al*., 2008).

La détermination de la concentration minimale inhibitrice CMI à été effectuée à partir de la mesure de la turbidité induite par la croissance du microorganisme étudié. La CMI correspondra donc à la plus petite concentration pour laquelle il y a absence de turbidité. Par conséquent c'est le premier tube où la valeur di sera égale à df (di = df). Le taux de survie du microorganisme sera mesuré au spectrophotomètre réglé à 600 nm comme suit :

$$S = \frac{d_f - d_i}{D_f - D_i} 100.$$

Avec :

- **S** : Taux de survie du microorganisme en %.

- **df-di** : différence de densité optique dans la solution phénolique ensemencée avant et aprèsincubation à 37°C durant 18 heures.

- **Df-Di** : différence de densité optique sans extraits de Menthe avant et après incubation à 37°Cdurant 18 heures (Kra et *al*., 2001 ; Zrihi et *al*., 2007)

4. Caractérisation des bactéries endosphériques

La détermination des caractéristiques phénotypique des bactéries isolées a été réalisée à l'aide d'un ensemble des tests phénotypiques.

Caractérisation morphologique

Observation coloniale

Les colonies qui ont été ensemencé par stries et puis obtenues sur les différents milieux solides (TSA - Mac Conkey- Hinton Miller – Hektoen et LB) ont été observées d'abord à l'œil nu. L'étude macroscopique permet d'effectuer une première caractérisation, avec une orientation possible des résultats au cours de l'identification, elle est basée sur les éléments d'identification donnés par Joffin et Leyral (2006): la forme,la taille, l'opacité, l'élévation et l'aspect de contour et de surface.

Observation cellulaire

L'observation à l'état frais permet d'explorer la mobilité des cellules bactériennes et le mode de groupement et de faire une approche de leur morphologie (Bousseboua, 2002). Une petite goutte d'eau physiologique stérile à été déposée au centre d'une lame stérile, puis une partie d'une colonie bactérienne jeune (18H) à été prélevée par l'anse flambée et dissociée dans la goutte, une lamelle stérile a été ensuite appliquée sur la goutte en évitant la formation des bulles d'air. L'observation microscopique a été réalisée à l'objectif X40 puis X100 (Joffin et Leyral, 2005).

L'identification morphologique des colonies à l'état fixé consiste à une observation microscopique après coloration de Gram (Danois Gram en 1884). La coloration de Gram est une coloration différentielle de base permet de distinguer deux grands groupes bactériens en fonction de la composition de leurs parois et de leurs affinités aux différents colorants : des bactéries à Gram positifs colorées en violette et Gram à négatifsen rose, et elle permet aussi de déterminer la forme, la taille, l'arrangement, la nature biochimique de la paroi des cellules bactériennes, la vérification de la pureté de l'isolat et permet de visualiser les endospores bactériennes, leurs formes et leurs positionnements.

Caractéristiques biochimiques

Test catalase

La catalase est une enzyme antioxydante présente chez la plupart des bactéries aérobies strictes et anaérobies facultatifs. Elle empêche l'accumulation de l'eau oxygénée (H_2O_2) dans la cellule bactérienne dont l'action serait létale. Elle décompose l'eau oxygénée en eau et en oxygène selon la réaction : $H_2O_2 \rightarrow H_2O + ½\ O_2$.

Le test consiste à déposer sur une lame propre et sèche une goutte d'eau oxygénée, dans laquelle un petit prélèvement d'une colonie bactérienne jeune a été dissocié à l'aide d'une pipette Pasteur boutonnée. Un résultat positif se traduit par un dégagement immédiat des bulles de gaz (O_2) (Meyer et *al.*, 2004).

Type respiratoire

Le milieu de culture Mannitol-Mobilité a été utilisé pour l'identification présomptive des souches bactérienne est mise en œuvre pour l'étude de la fermentation du mannitol, la mobilité et la réduction du nitrate (enzyme respiratoire). Le test a été procédé par l'ensemencement de la colonie à l'aide d'une pipette Pasteur par piqûre centrale, jusqu'au fond du tube de gélose. Les tubes ont été incubés à 37°C pendant 24 H.

La fermentation du mannitol se traduit par un virage de la couleur du milieu de culture au jaune et les bactéries mobiles envahissent le milieu de culture à partir du point d'ensemencement (Merlet et al 2009).

Recherches des enzymes hydrolytiques

- **Lipase**

Les lipases sont largement répandues au sein de la plante bien qu'on les retrouve principalement dans les graines où les triglycérides et qui sont stockés dans des structures intracellulaires appelées oléosomes (ou *oil bodies*) (Beisson et al., 2001).

Sous l'action des lipases, ces triglycérides sont hydrolysés sous forme d'acides

gras dont le rôle est de fournir l'énergie nécessaire à la germination de la graine et au développement de la jeune plante (Adlercreutz et al., 1997).

La production des lipases par nos isolats a été testée sur le milieu de culture décrit par Sierra (1957) qui contient le Tween 80 (1%, v/v) comme source de lipide et qui est ajouté pour révéler l'activité estérasique. Le pH est ajusté à 7,4 (Carrim et *al.*, 2006). Après ensemencement en spot, les boites ont été incubées à 30C° pendant 48h. La présence d'une activité est traduite par l'apparition d'un halo clair autour des colonies.

- **Protéase**

Les protéases jouent un rôle significatif dans la minéralisation de l'azote dans le sol. C'est un processus important dans la disponibilité de l'azote et donc dans la croissance des plantes. (Petit et Jobin, 2005 ; Nannipieri et *al.*, 2011). Ils jouent également un rôle important dans la lyse de la paroi cellulaire des champignons phytopathogènes (Elad et Kapat ,1999).

La révélation de l'activité protéasique des isolats a été déterminée par ensemencement par spot des bactéries sur un milieu de culture additionné de lait écrémé. Après 48 h d'incubation à 28°C, l'apparition d'un halo transparent autour des colonies reflète la présence d'une activité hydrolytique protéolytique (Bach et Munch, 2000).

- **Pectinase**

Pour la mise en évidence des bactéries à produire la pectinase , un test sur un milieu gélosé à base de pectine à été réalisé. Les isolats bactériennes fraîches et âgées de 24h, ont été ensemencées par spot puis incubées à 30 °C pendent 48 h. Un résultat positif se traduit par l'apparition d'un halo clair autour des colonies (Stratilova et al., 1993)

- **Amylase**

L'amylase est l'enzyme qui a la capacité d'hydrolyser l'amidon. La synthèse des enzymes amylasiques par les bactéries permet une dégradation de la matière organique dans la nature et fournir des éléments minéraux que les plantes vont utiliser pour leur croissance (Raj et *al*., 2009).

La recherche de la présence de l'enzyme amylase chez nos isolats a été détectée sur milieu solide TSA additionnée d'amidon à 1%. Après un ensemencement des isolats par spot, les boites ont été incubées à 25°C pendant 5 jours. La révélation se fait par l'inondation des boites par une solution iodée (Lugol). L'hydrolyse de l'amidon se traduit par un halo clair autour de la colonie, contrairement aux zones contenant de l'amidon qui se colorent en bleu (Delarras, 2014). Le diamètre du halo d'hydrolyse est obtenu en soustrayant le diamètre de la colonie de celui diamètre total pour chaque isolat.

Formation de biofilm

La formation de biofilms est testée sur des microplaques en polystyrène (Zellkultur Testplatte 96U 1Stk, Suisse) stériles suivant la méthode d'O'Toole et al. (1999), avec quelques modifications. Les puits de la microplaque, préalablement remplis avec 100 µl de bouillon TSB-YE ou de TSB, sont ensemencés en triple(trois répétions par souche dans la même microplaque) avec 100 µl d'une suspension bactérienne fraiche de 18 h standardisée à une DO600 de 0,1, puis la microplaque est incubée à 30°C pendant 24 h. Six puits contenant 200 µl de bouillon stérile sont utilisés comme témoins. Le test d'adhésion sur microplaques est répété deux fois (deux expériences indépendantes). 1. 3.3. Coloration au cristal violet (0,1%) Après incubation, les suspensions bactériennes, dans les puits, sont aspirées soigneusement puis ces derniers sont rincés deux fois avec 200 µl de TS stérile. Les cellules adhérées sont fixées avec 200 µl d'éthanol à 96% (Sigma, Allemagne) pendant 15 minutes, puis l'éthanol est aspiré et les puits sont laissés sécher stérilement. Par la suite, les cellules fixées sont colorées avec 200 µl d'une solution de cristal violet (Biochem, Québec, Canada) à 0,1% (w/v) pendant 20 min, puis lavées avec 200 µl de TS stérile jusqu'à obtention d'une couleur claire du liquide de lavage. Enfin, le colorant fixé aux cellules est

solubilisé en ajoutant 200 µl d'acide acétique 33% (v/v) (Sigma, Allemagne).

La solution obtenue dans chaque puit est transférée dans une cuve de spectrophotomètre et la quantité de colorant fixé (indirectement la quantité de cellules fixées) est estimée par la mesure de l'absorbance à 595 nm (Spectrophotomètre, SPECORD 50 analytikajena, Allemagne).

Identification biochimique

La galerie API 20 E est un système standardisé pour l'identification des bacilles à Gram négatif non fermentaires et non fastidieux (ex. *Pseudomonas, Acinetobacter, Flavobacterium, Moraxella, Vibrio, Aeromonas,* etc.), combinant 8 tests conventionnels, 12 tests d'assimilation, et une base de données. La galerie API 20 E comporte 20 microtubes contenant des substrats déshydratés. Les tests conventionnels sont inoculés avec une suspension bactérienne saline qui reconstitue les milieux. Les réactions produites pendant la période d'incubation se traduisent par des virages colorés spontanés ou révélés par l'addition de réactifs. Les tests d'assimilation sont inoculés avec un milieu minimum et les bactéries cultivent seulement si elles sont capables d'utiliser le substrat correspondant. La lecture de ces réactions se fait à l'aide du tableau de lecture et l'identification est obtenue à l'aide du catalogue analytique ou d'un logiciel d'identification.

La première étape consiste à préparer la boite de la galerie par une répartition de 5ml de l'eau distillée dans les alvéoles pour créer une atmosphère humide. Après on dépose stérilement la galerie dans la boite d'incubation. Ensuit, c'est la préparation de l'inoculum. Pour cette étape on prélève à l'aide d'une pipette pasteur 1 à 4 colonies de morphologie identique qui sont de cultures jeunes et on la verse dans 2 ml de l'eaudistillée stérile. Après avoir homogénéisé notre suspension on passe au remplissage des tubes de la galerie (Fig.17), pour les tests CTI et VP et GEL on remplit le tube et la cupule et pour les autres tests on remplit uniquement les tubes. Certains tests nécessite l'anaérobiose (ADH, LCD, ODC, URE, H2S), pour crée cette dernière on remplit leur cupule avec de l'huile de paraffine. Au finale on ferme la boite d'incubation et on la place dans l'étuve a 37°C pendant 18 à 24 heures. Les réactions produites pendant la période d'incubation se traduisent par des virages colorés spontanés ou révélés par

l'addition de réactifs. La lecture de ces réactions se fait à l'aide du tableau de lecture, et l'identification est obtenue à l'aide du catalogue analytique.



Figure (9) : La galerie API 20 E (photo personnelle)

Caractéristiques physiologiques

Thermo-résistance

L'évaluation de la thermorésistance de nos isolats a été réalisé par ensemencement des isolats par stries sur milieu TSA puis incubés à une température de 44°C pendant 48h. La formation des colonies à la surface du milieu indique une thermorésistance de l'isolat.

Effets des paramètres environnementaux

La croissance des bactéries est sous l'influence de plusieurs paramètres physiologiques. Pour notre étude nous avons retenus les critères suivants : Tolérance à la température, le pH, la salinité et le stress hydrique**.**

La tolérance à la température a été réalisé à différentes températures de croissance (30, 40 et 60°C). L'influence du pH sur la croissance des bactéries a été réalisée par une série d'essais sur le milieu TSB ajusté par l'addition de HCl 1% et du KOH 1% pour obtenir trois valeurs de pH 4, 7 et 10.

L'effet de la concentration en NaCl sur la croissance des souches a été déterminé par la culture sur milieu TSA1/10 semi solide additionnés de NaCl pour avoir différentes concentrations 100mM ,200mM, 300mM,400mM, 500mM et1M.

Pour induire les différents niveaux de stress hydrique testés, des solutions de PEG à des concentrations croissantes (15g.L^{-1}, 30g.L^{-1}, 45g.L^{-1} et 60g.L^{-1}) ont été

additionnées au milieu TSA1/10 semi solide afin de déterminer la tolérante au déficit hydrique de nos isolats.

Les tests ont été réalisés sur des plaques de titration de 96 puits. La préparation de ces plaques 150µl de milieu TSB a été déposés dans chacun des puits et additionné de bleu de bromothymol qui est un indicateur de pH pour faciliter la lecture, ensuite les puits ont été ensemencés avec une suspension bactérienne jeune d'un DO i connue et incubée pendant 24h sous les différentes conditions. La lecture de la densité optique a été effectuée par spectrophotomètre à une longueur d'onde de 600nm.


Chapitre 3:
Résultats et discussion

1. Densité bactérienne de la communauté endophytes des racines de

Medicago sativa :

La détermination de la microflore totale des bactéries cultivables endophytes des racines de *Medicago sativa* a été effectué après une incubation de nos boites à 28±2°C pendant 15 jours avec un dénombrement des colonies chaque 48h (Tabl.xx).

Pour les échantillons collectés en 2021 (808), nous avons dénombré 161 10^4UFC.ml^{-1} après 48h d'incubation, puis 86 10^4UFC.ml^{-1} après 96h, 20 10^4UFC.ml^{-1} après 7J et 5 10^4UFC.ml^{-1} après 15 jours d'incubation.

Pour les échantillons collectés en 2022 (713), nous avons dénombré 62 10^4UFC.ml^{-1} après 48h d'incubation, puis 1010^{4}UFC.ml^{-1} après 96h, 15 10^4UFC.ml^{-1} colonies après 7J et 2 10^4UFC.ml^{-1} colonies après 15 jours d'incubation.

Tableau (2) : Densité de la flore bactérienne endophytes des racines en fonction du temps d'incubation.

Code échantillon	Dénombrement des colonies (10^4.UFC.ml^{-1})				
	48h	**96h**	**7jours**	**15 jours**	**Totale**
713	161	86	20	5	272
808	62	10	15	2	89
Vitesse de croissance	Rapide	Intermédiaire	Lente	Lente	316

Les résultats obtenus ont montré que la charge bactérienne de l'échantillon 713 est plus importante par comparaison à l'échantillon 808. Cette différence de densité est expliquée par la durée de stockage des échantillons. Il a été démontré que la durée de stockage peut influencer la charge bactérienne (Finnegan, 2005).

La densité bactérienne trouvée dans nos systèmes racinaires quel que soit

l'année de collection est jugéecomme étant faible par comparaison au nombre des communautés bactériennes cultivables dans 1 g de sol qui peut contenir 10^6 à 10^9 Bactérie Soltner, (2003) et dans 1 g de sol rhizosphérique (10^9 bactéries). Mais cette densité est dans les normes selon des études réalisées par Hardoim et *al* (2012) et qui ont trouvé que le nombre des bactéries à l'intérieur des semences ou dans les tissus intérieurs des plantes est mois important par aux autres compartiments. Cette diminution de densité est due probablement à la sélection que la plante exercée sur les communautés bactérienne qui peuvent habiter les tissus végétaux (Bulgarelli et al.,2010).

Selon les résultats obtenus (Tab.02), nous avons constaté qu'avec la prolongation du temps d'incubation, le nombre de colonies apparues diminue. Cela nous a permis de classer nos isolats en trois classes selon leur vitesse de croissance : Rapide, moyenne et lente.

Dans le groupe des bactéries à croissance rapide, nous avons regroupés les colonies qui ont apparue entre0 et 48h d'incubation. Nos résultats ont montré que l'échantillon 713 a plus de bactéries à croissance rapideque ceux de l'échantillon 808. La même observation est faite pour les bactéries à croissance intermédiaire. Les bactéries à croissance intermédiaire sont les bactéries apparues entre 48 et 96h d'incubation.

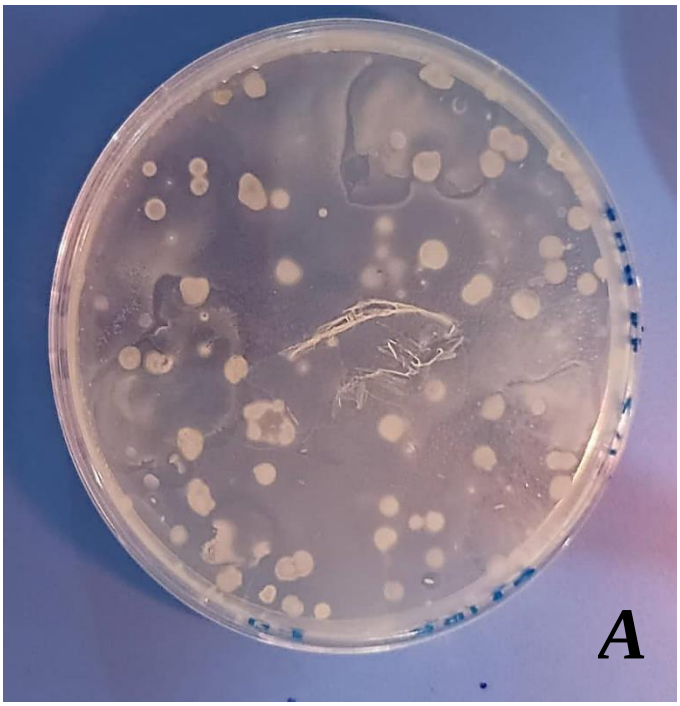
Pour les bactéries à croissance lente, c'est-à-dire, qui ont été dénombré entre 96 h et 15 jours d'incubation, nous avons trouvé que, l'échantillon 713 a plus de bactéries par rapport à l'échantillon 808.

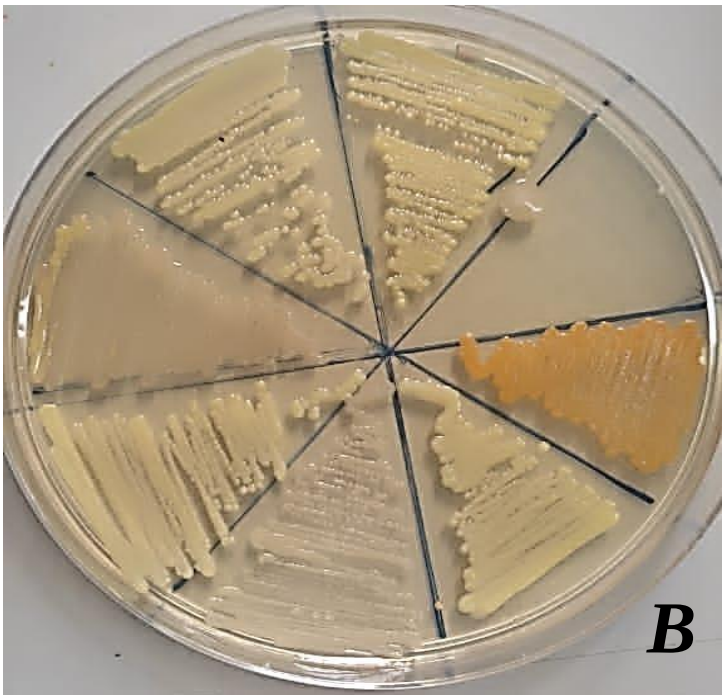
A partir des colonies formées (fig10.a) une série de repiquages (fig10.b) a été

effectuée suivant la méthode des stries d'épuisement jusqu'à l'obtention de cultures pures. Un code a été attribué à chaque isolat et une collection de 64 isolats a été choisi sur la base des critères morphologique des isolats.

Figure (10) : Aspect morphologique des colonies obtenues après ensemencement par inondation sur milieu TSA1/10 après 48h d'incubation à 28±2°C (a) et après purification par repiquage en stries (b).

2. Résistance aux antibiotiques





La détermination de la sensibilité aux antibiotiques a été réalisée par la méthode de diffusion sur gélose TSA. Les diamètres critiques sont définis pour chaque antibiotique par le Comité de l'Antibiogramme de la Société Française de Microbiologie (CASFM). Ces tests permettent de définir le profil de résistance d'unesouche bactérienne, ce qui est essentiel pour l'antibiothérapie.

La résistance de nos isolats aux antibiotiques a été testée avec 10 antibiotiques de six familles différentes. Dans un premier lieu, un résultat positif ou négatif (Fig.11) pour chaque isolat vis-à-vis un antibiotique a été déterminé par la formation d'une zone d'inhibition autour du disque d'antibiotique et puis dans le cas ou la bactérie est sensible à l'action de l'antibiotique, une mesure du diamètre de la zone est effectuée.

Les résultats que nous avons obtenus (Tabl.V) ont montré que 15 isolats sur 64 isolats testés sont sensibles à l'ensemble des antibiotiques testés. Les 49 isolats restantes (77%) sont résistants à au moins unefamille d'antibiotique.

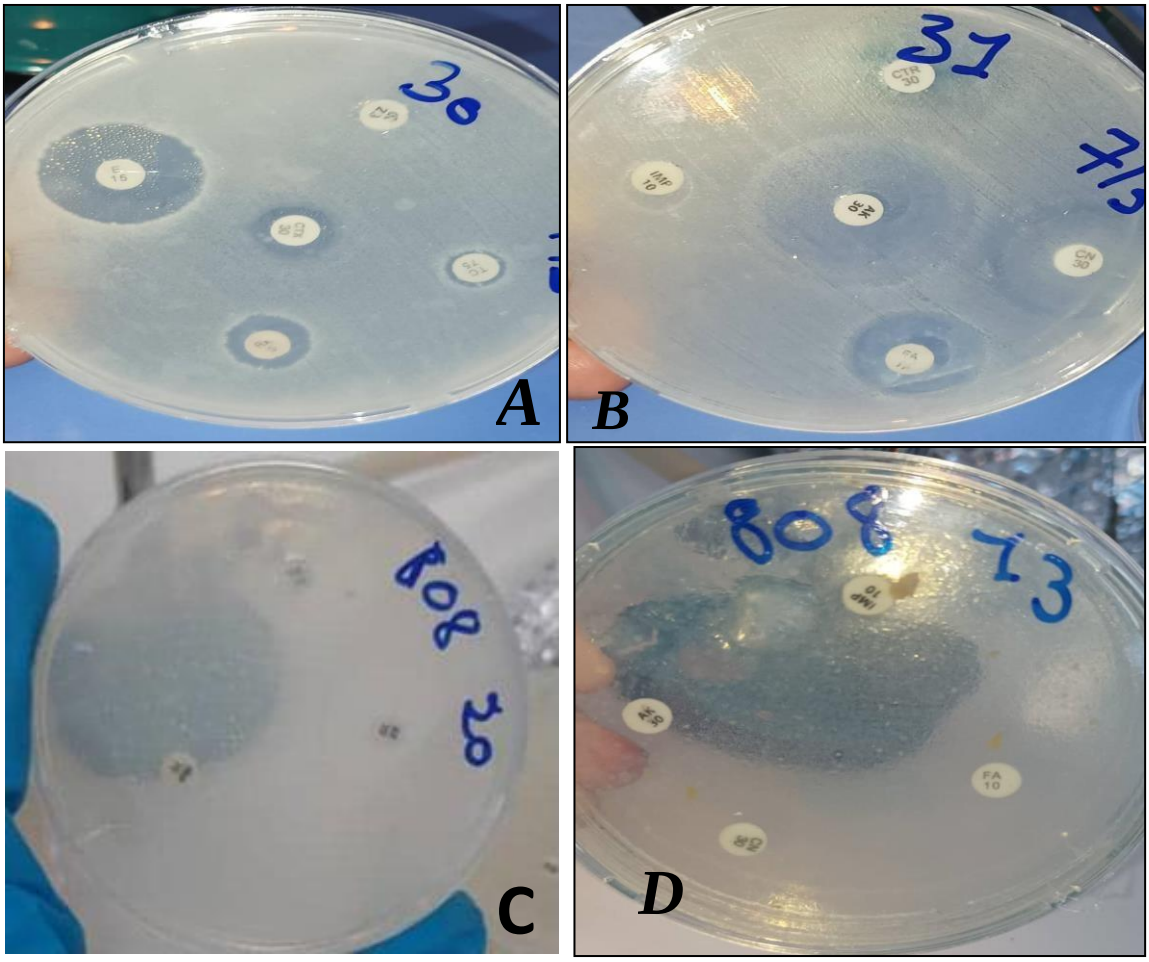


Figure (11) : Réaction des isolats pour le test antibiogramme.

a.b.isolats sensibles aux antibiotique.**c.d**.isolats résitantes aux antibiotique

Nos résultats (Tab.3) ont montré que sur les 49 isolats résistants aux antibiotiques, 24 isolats résistent à des antibiotiques appartenant à une seule famille d'antibiotique, 11 isolats résistent à des antibiotiques appartenant à deux familles d'antibiotiques, 2 isolats résistent à des antibiotiques appartenant à trois familles d'antibiotiques,10 isolats résistent à des antibiotiques appartenant à quatre familles d'antibiotiqueset 2 isolats résistent à des antibiotiques appartenant à cinq familles d'antibiotiques.

Tableau(3) : Répartition des isolats selon la résistance aux familles d'antibiotiques testées.

R1. Résistent à une seule famille d'antibiotique. R2. Résistent à deux familles d'antibiotique. **R3.**Résistent à trois familles d'antibiotique. **R4.** Résistent à quatre familles d'antibiotique. **R5.** Résistent àcinq familles d'antibiotique.

Résistance antibiotiques par famille	R1	R2	R3	R4	R5
Nombre d'isolats résistants	24	11	2	10	2
Pourcentage des isolats résistantes	49 %	23%	4%	20%	4%

La majeure partie de notre souchier (77%) a montré une résistance aux antibiotiques. La résistance des bactéries endophytes des plantes aux antibiotiques est due d'un côté à l'application du fumier animal et d'un autre côté l'irrigation avec l'eau usée. Ces pratiques agricoles sont appréciées pour leur contribution à l'agriculture durable en fournissant des nutriments essentiels et en conservant l'eau. Cependant, de nombreuses études ont démontré que ces pratiques potentiellement enrichir les bactéries résistantes aux antibiotiques (Wang et al.,2015 ; Cerqueira et al.,2019). Toutefois, il reste incertain si la résistance aux antibiotiques est un phénotype courant, indépendant de la colonisation environnementale, c'est -à-dire de lavie dans l'endosphère des plantes, ou bien si elle reflète une guerre biologique se déroulant à l'intérieur des tissus végétaux.

Nos résultats (Tabl.3) ont montré que nos souches présentent une forte résistance aux antibiotiques de la famille des bêtalactamines. En effet, 94% de

nos souches résistent à IMP, 67% résistent à CZ et 33% résistent à TC. Malgré que CN et CTX font partie de la famille des bêtalactamines mais la résistance à leur égard est moins importante, elle est respectivement de 14% et 16%.

Aussi, nous avons noté une forte résistance de notre souchier, soit 37% des souches résistent à FA (Famille des fusidanines) et dans une moins intense résistance, 27% de souches résistent à E et 22% résistent à RA. La plus faible résistance était trouvée avec CTR avec seulement 8%.

Tableau (4) : Taux de résistance des isolats par antibiotique.

TC. TICARCILLIN 75**. E**. ERYTHROMYCIN 15. **CTX**. CEFOTAXIME 30.**RA**. RIFAMPICIN5.**CZ**. CEPHAZOLIN 30
CTR. CEFTRIAXONE 30.**AK**. AMIKACIN 30.**FA**. FUSIDIC ACID 10.**CN**. CEFALEXIN 30.**IMP**.IMIPENEM10

ANB	CTR	E	AK	RA	FA	TC	CTX	CZ	CN	IMP
Famille	Céphalosporines	Macrolides	Aminosides	Rifamycines.	Fusidanines	Bêtalactamines				
Taux des isolats résistantes (%)	8	27	18	22	37	33	16	67	14	94

La résistance aux bêta-lactamines chez les bactéries est liée principalement à la production des ß- lactamases, mais des mécanismes de résistance non-enzymatiques sont également retrouvés (Bonnin et al., 2013b; Roca et al., 2012).

Un certain nombre de bactéries endophytes ont été signalées pour prévenir les effets délétères de certains pathogènes en produisant des composés antimicrobiens ou en induisant une résistance systémique chez la plante hôte (Kandel et al., 2017). Ainsi, l'invention de techniques de biocontrôle efficaces en utilisant des bactéries endophytes respectueuses de l'environnement ouvrira une nouvelle plateforme pour de futures études visant à répondre à la demande future d'agents

de biocontrôle agrobiologiques économiquement efficaces pour les plantes (Egamberdieva et al., 2017), ainsi que pour les systèmes agricoles.

3. Détermination de la concentration minimale

La détermination de la dose ou la concentration minimales inhibitrice (Tab.04) a été effectué pourl'ensemble de nos isolats avec l'antibiotique GECTAPEN (Benzylpenicilline sodique)

Tableau (5) : Résultats de la Concentration minimale inhibitrice de l'antibiotique vis à vis les souches(CMI)

CMI	100%	80%	60%	40%	20%
Nombre de souches	16	6	0	12	12

Nous avons trouvé que sur les 49 isolats testés sont des bactéries résistantes, la majeure partie de nos isolats (16 isolats) résiste à 100% de l'antibiotique testé, 6 isolats à 80%, 12 isolats à 40% et 12 isolats à
20% de l'antibiotique.

Les isolats qui résistent à 20% de l'antibiotique sont des bactéries très résistantes et peuvent détecter les antibiotiques dans leur milieu à des très faibles concentration Bien que ce caractère est très intéressant dans le domaine de l'agriculture et la lutte contre les pathogènes mais reste un état alarmant dans l'étude des bactéries antibiorésistantes chez les plantes

4. Caractérisation phénotypique

Caractérisation microscopique

L'aspect microscopique des colonies jeunes (24h) a été visualisé après coloration de Gram et observation microscopique à des grossissements de 40X et 100X. 37 de nos isolats ont présentés une forme bacille avec une coloration violette, ce qui nous renseigne que ces souches sont des bactéries Gram positifs (Fig .12a) contre 12 isolats seulement ont présentés une forme cocci avec une coloration rose, ce qui nous renseigne que ces souches sont des bactéries Gram

négatifs (Fig .12b).

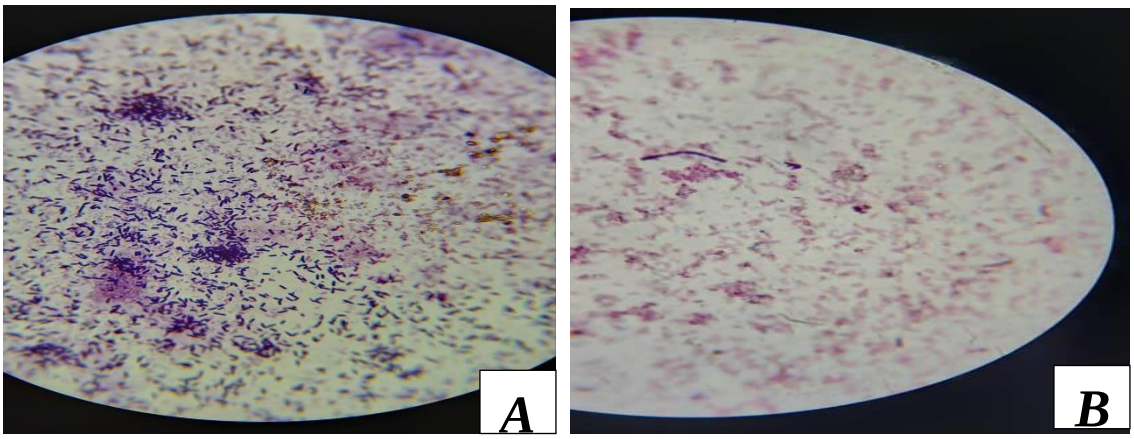


Figure (12) : Observation microscopique à un grossissement X100 après la coloration de Gram.

A : Gram positive , B: Gram negative

La diversité de Gram des bactéries endophytes des racines des plantes est un élément clé pour comprendre les interactions plantes-microorganismes et leurs implications écologiques et agronomiques. Les bactéries résistantes aux antibiotiques peuvent appartenir aussi bien aux groupes Gram-positifs qu'aux groupes Gram-négatifs. Cependant, certaines bactéries MDR particulièrement problématiques sont des Gram-positives tel que *Staphylococcus aureus.*

Aussi, les bactéries Gram-négatives MDR sont également très préoccupantes (*E col,P aeroginosa, A baumanii*). Une approche intégrée et multi facette est nécessaire pour contrôler et prévenir la propagation de ces pathogènes résistants.

Caractérisation biochimique

Test catalase

La catalase est une enzyme présente chez la plupart des bactéries aérobies strictes et anaérobies facultatifs. Elle décompose l'eau oxygénée formée, en eau et en dioxygène. Elle est considérée comme un moyen de survie dans les sols salins (Kim et al., 2005). La présence de cette enzyme s'exprime par un dégagement de bulles d'air, ce dégagement a été détecté chez la totalité de nos isolats. Les résultats obtenusdu test catalase ont montré que la totalité de nos souches se sont révélées positif donc nos souches sont desanaérobies facultatifs.

Type respiratoire

La détermination du type respiratoire et la mobilité de nos isolats à l'état frais a été confirmée par un ensemencement sur le milieu de culture mannitol-mobilité par piqure centrale. Les résultats obtenus montrent que 49 isolats sur les 49 isolats testés sont mobiles et envahissent le milieu de culture à partir du point d'ensemencement dans le tube qui se présente par un trouble (fig.13) .

La culture sur le milieu mannitol-mobilité nous informe aussi sur la capacité de nos isolats à fermenter le mannitol. La fermentation du mannitol se traduit par une acidification du milieu qui sera mise en évidencepar un virage de la couleur du milieu de culture du rouge (Rouge de phénol) au jaune. En effet sur les 49 isolats, 49 sont capable de fermenter le mannitol .Aussi, l'intensité de la couleur traduit une forte ou une faible capacité à fermenter le mannitol par les souches. En effet, les isolats S13, S20 ,S20 et S6 ont présenté la plus forte capacité de fermentation.

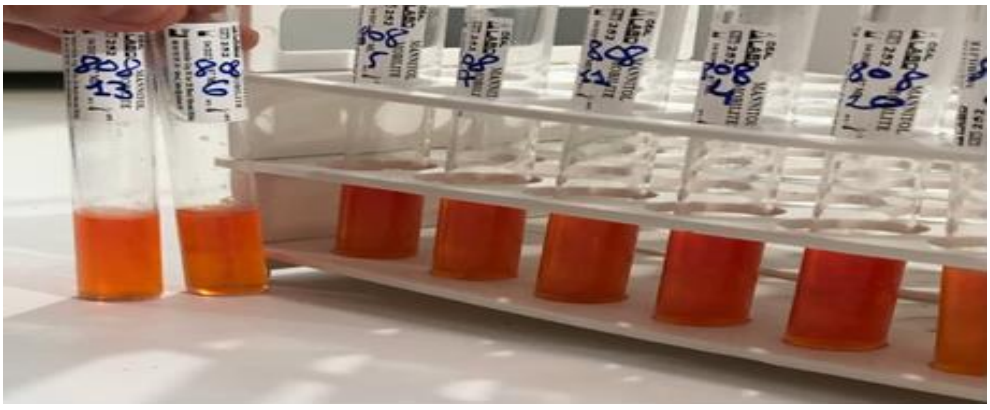


Figure (13) : Mise en évidence de la mobilité des isolats avec fermentation du mannitol sur milieu Mobilité-Mannitol

Sporulation

La croissance des colonies sur le milieu de culture après un traitement thermique à 80°C pendant 10 minutes exprime leur capacité à résister à des températures élevées et donc la possibilité de former des spores de résistance. Sur l'ensemble des 49 isolats ,34 isolats soit une proportion de 69% de nos isolats qui possèdent cette capacité Trois éléments principaux seraient responsables des températures : la déshydratation du

Protoplaste, la minéralisation et l'ajustement thermique. Selon Sugiyama (1951), les deux derniers facteurs qui entraînent une augmentation de la déshydratation sont responsables de la thermorésistance desspores. Les bactéries du genre Bacillus se distinguent principalement par leur sporulation (Vinter, 1987).

Criblage de l'activité enzymatique

Amylase

L'amidon est un polymère de glucose qui constitue le glucide principal des graines, son hydrolyse est catalysée par l'amylase qui fournit le glucose, le maltose et les dextrines. Cette enzyme joue un rôle très important. Le criblage de l'activité amylolytique de nos isolats sur milieu solide additionné d'amidon a montré que 98 % de nos isolats soit 48 souches possèdent une activité amylase positive. Celle activité positive a été traduite par l'apparition d'un halo autour de la colonie (fig.14)

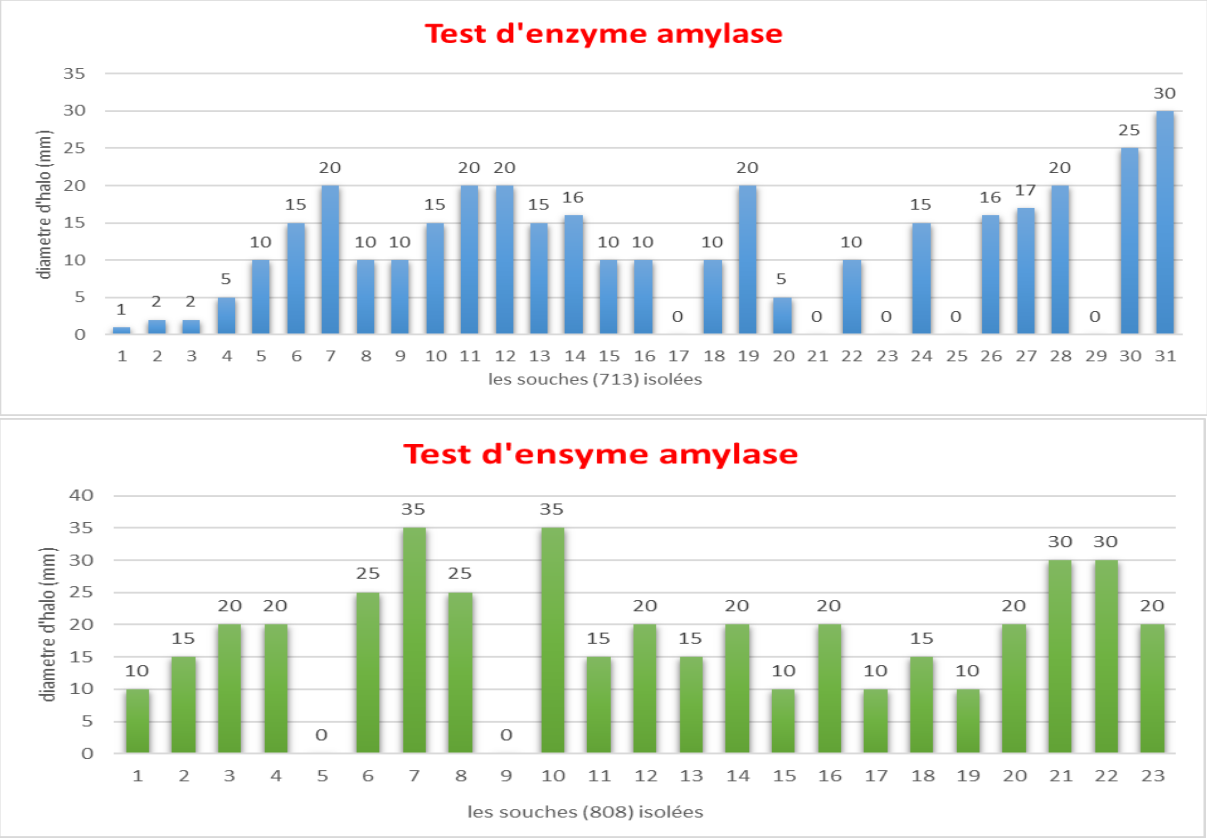


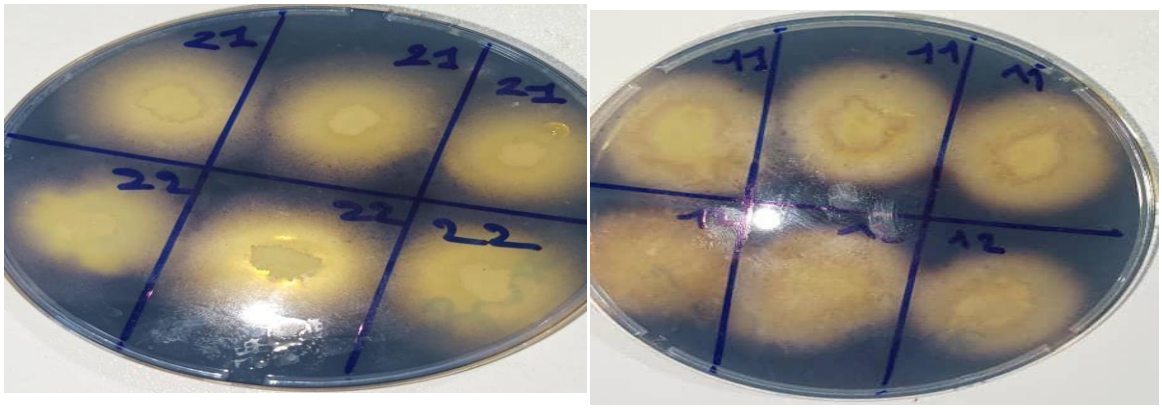
Figure (14): histogramme du test d'enzyme amylase des souches isolées.

Le diamètre du halo de dégradation peut nous informer sur l'intensité de cette activité, (fig.15) les isolatsont montré une meilleure activité avec un diamètre d'halo de lyse qui varient entre 15 et 47.5 mm.

La synthèse des enzymes amylasiques par les bactéries du sol permet une dégradation de la matière organique dans la nature en fournissant des éléments minéraux que les plantes exigent pour leur croissance.

Abed Hanane (2017) ; Shonkor et *al.* (2011) ont montré que les rhizobactéries sont capables de produiredes métabolites ayant un effet bénéfique sur la santé des plantes, les métabolites à activité antibiotiques (contre les phytopathogènes) et les enzymes extracellulaires (amylases, chitinases …etc.). Dans leur étude sur *Bacillus sp,* Obi et Odibo (1984) ont révélé une production de quantités considérables en α-amylases. La synthèse des enzymes amylasiques par les bactéries du sol permet une dégradation de la matière organique dans la nature en fournissant des éléments minéraux que les plantes exigent pour

leur croissance. Plusieurs auteurs (Whipps, 2001 ; Siddiqui, 2005 ; Viollet, 2010) ont trouvé que les Pseudomonas sont de productrices d'amylase et ce qui implique leur utilisation pour stimuler la croissance et la santé des plantes.



Figure(15) : Test d'enzyme amylase

Lipase

La production de lipases est influencée par la nature et la disponibilité de la source de carbone et d'azote. Les lipases peuvent agir en tant qu'hydrolases en milieu aqueux ou comme catalyseurs en synthèse organique. En tant qu'hydrolases, elles sont responsables du catabolisme des triglycérides et leurs substrats préférentiels qui sont les acides gras et le glycérol (Guzmán et al., 2008).

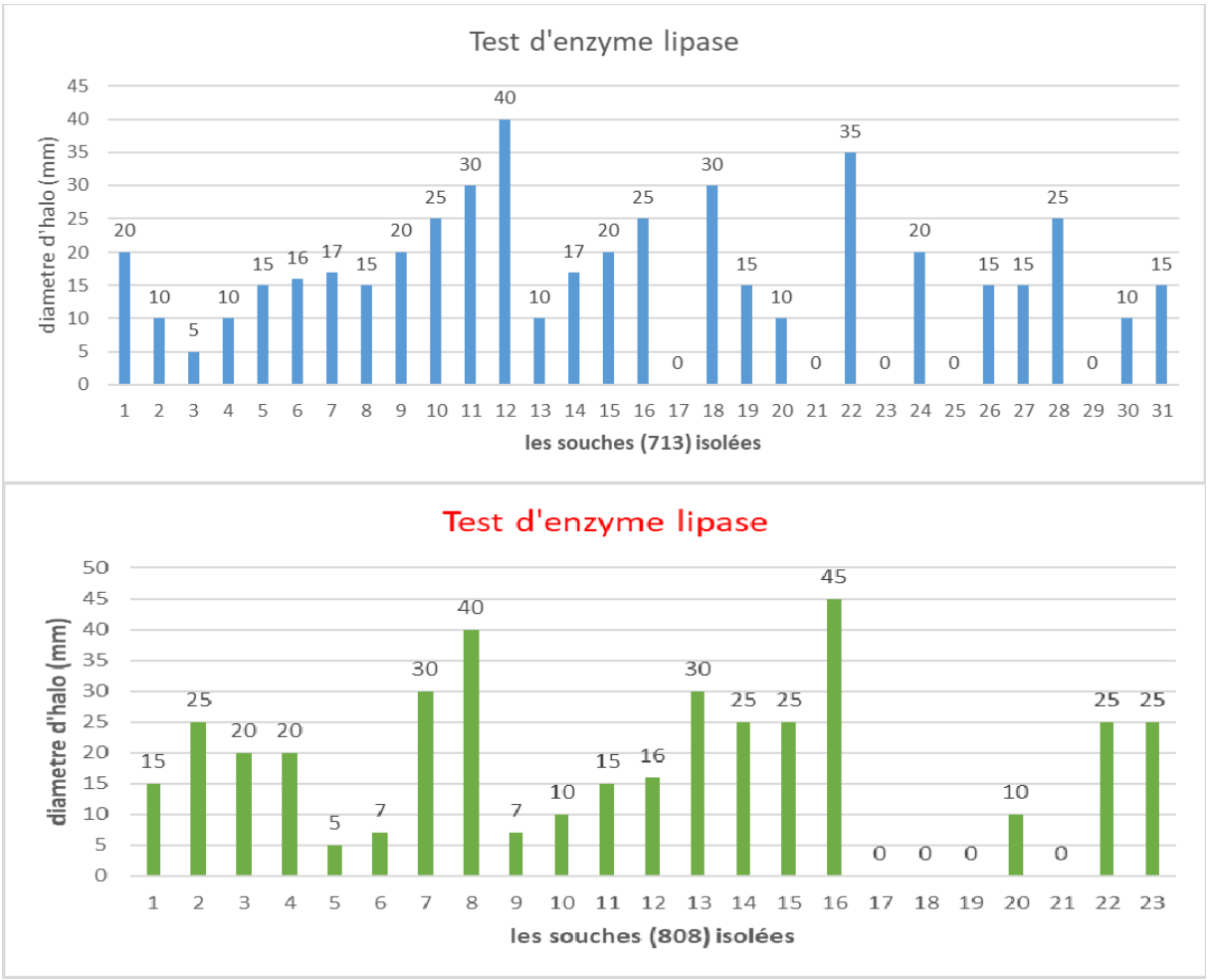


Figure (16) : histogramme test d'enzyme lipase des souches isolées

L'observation à l'oïl nu de la formation d'un halo autour des colonies ensemencé à la surface du milieu de culture (fig.16) a montré que 88% soit 43 isolats ont la capacité de dégrader la source lipidique additionnée au milieu de culture. Les colonies ont été entourées d'un halo opaque dû à la formation de cristaux de sel de calcium.

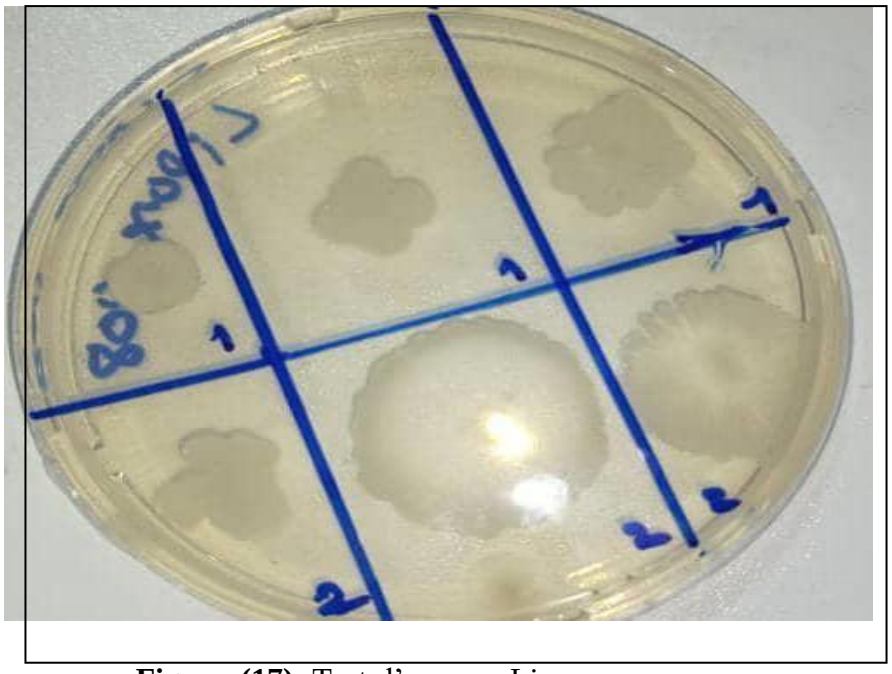


Figure (17): Test d'enzyme Lipase

Ceci a été souligné par Akanbi *et al.,* (2010) qui ont rapporté que de nombreuses bactéries appartenant au genre de *Bacillus* sont capables de produire une importante quantité d'enzymes lipolytiques. La synthèse des lipases et des estérases par les bactéries testées contribue à la dégradation de la matière grasse et par conséquent, ces bactéries pourraient donc participer au recyclage de la matière organique en fournissant les éléments nécessaires aux plantes. Les lipases sont largement répandues dans la nature où elles jouent un rôle physiologique important dans le métabolisme des graisses (Fickers et *al.*, 2008).

Protéase

Les protéases d'origine microbienne sont parmi les enzymes les plus secrétées (Ningthoujam et *al*., 2009). Les souches protéolytiques sont reconnues par la formation des halos translucides au tour des colonies

L'observation d'une zone claire autour de la colonie indique sa capacité à hydrolyser de la caséine (Protéine du lait). En effet, la majorité de nos isolats ,39 isolats ont montré une activité protéolytique (fig.18). Ces résultats permettant de considérer ces isolats comme des bactéries productrices de protéases exocellulaires, ce qui représente un point très positif pour leur production et caractérisation.

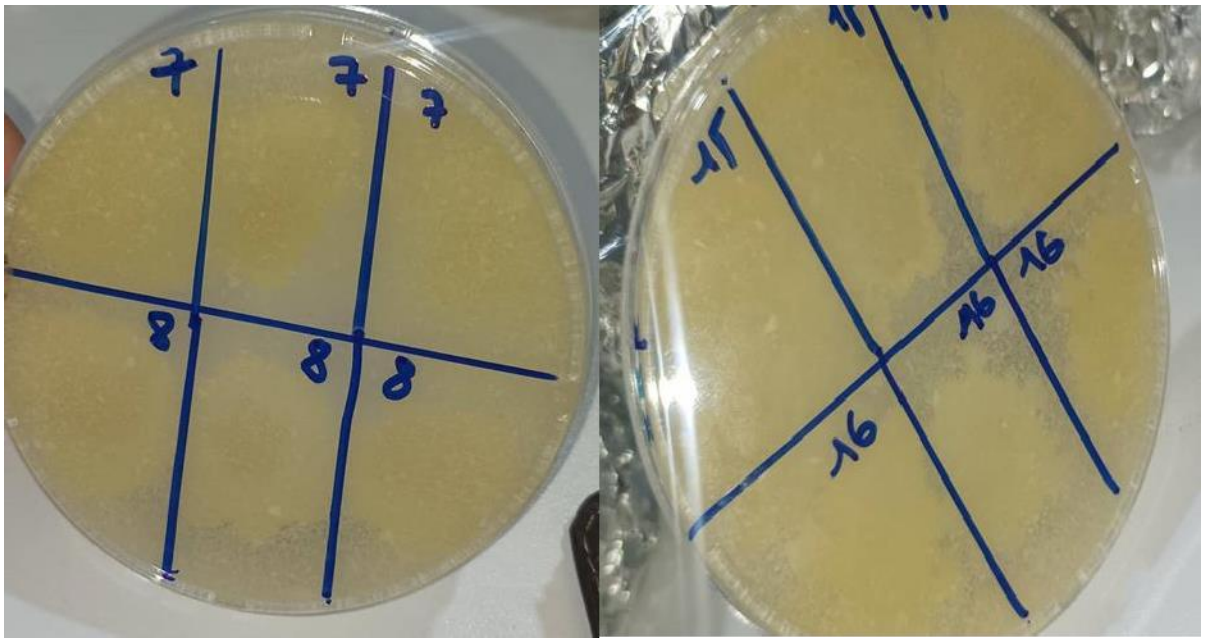
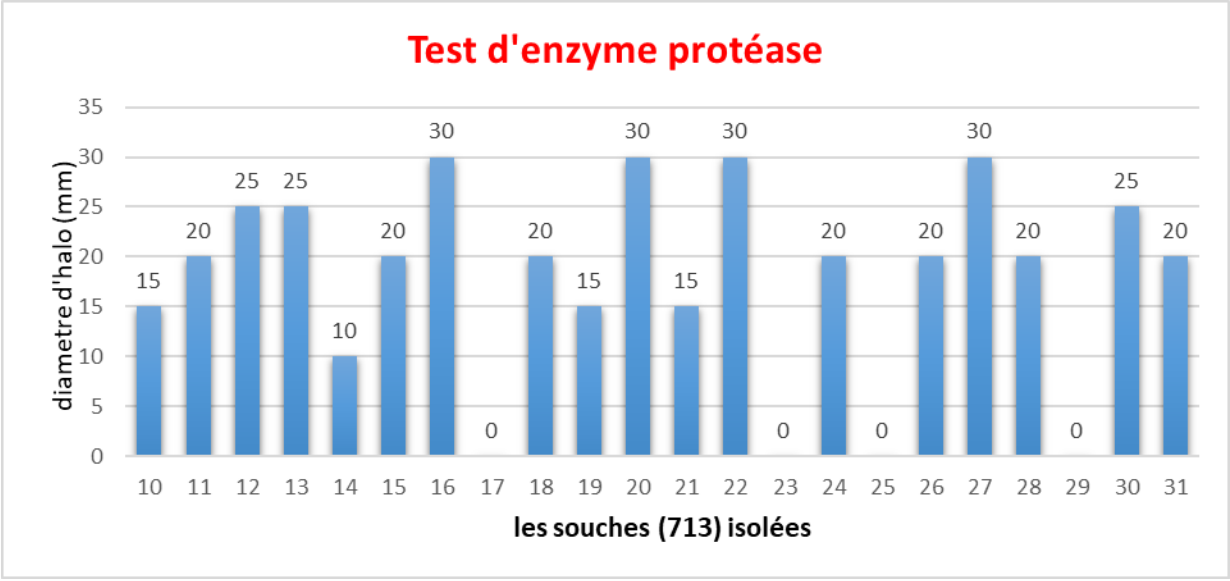


Figure (18) : Test d'enzyme protéase des souches isolées.

La production de la protéase se manifeste par la présence d'un halo autour des colonies indique sa capacité à hydrolyser la caséine (Protéine du lait). Cette zone claire a été observée chez 39 souches soit uneproportion de 79 % de nos isolats , la recherche de l'activité protéase déterminée par le calcul de l'indice de dégradation chez nos isolats. L'indice de dégradation nous a permis de constater que 14 isolats ont une forte dégradation de la caséine avec une indice de dégradation entre plus que 70% et pour l'isolat (6,13) a une moyenne dégradation de la caséine avec une indice de dégradation de 9%



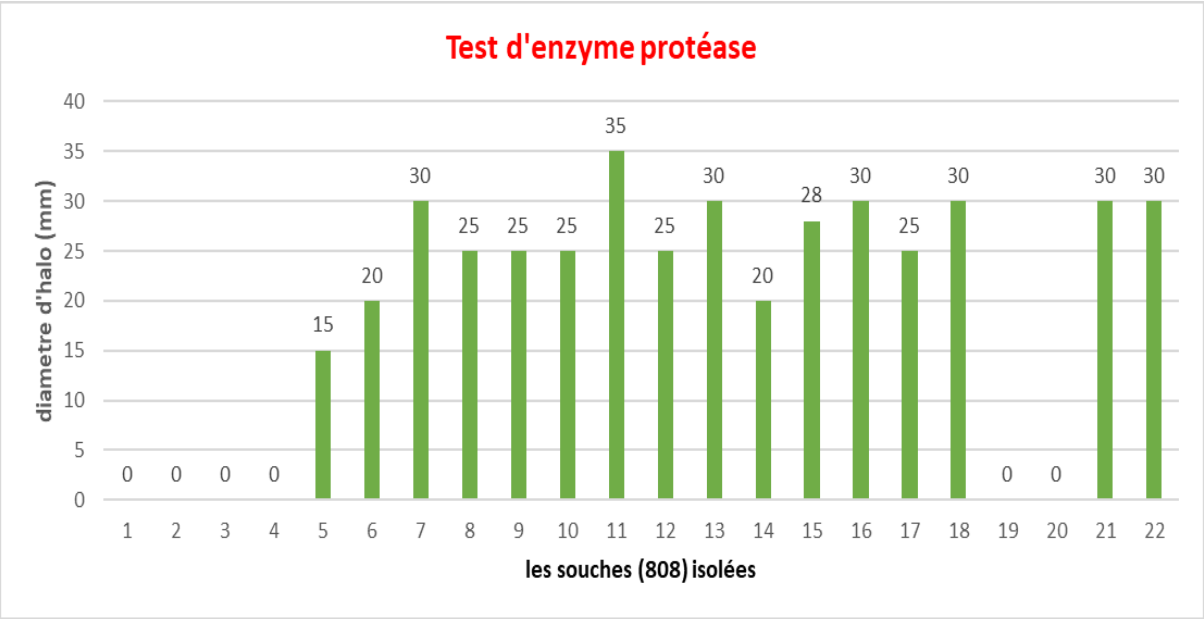
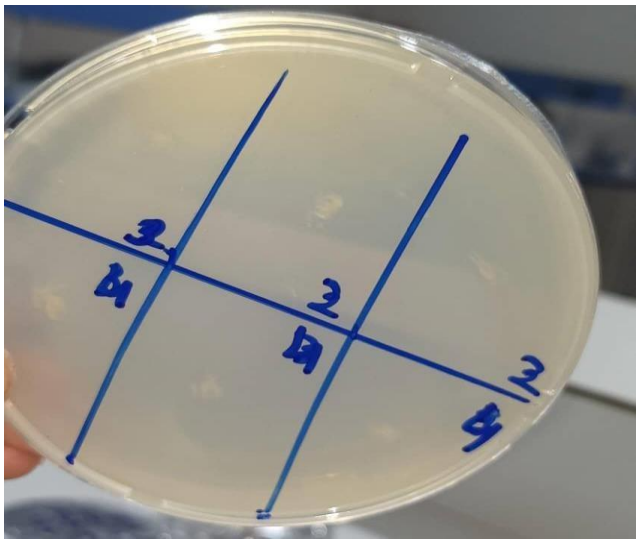


Figure (19) : histogramme du test d'enzyme protéase des souches isolées

Pectinase

La pectinase est une enzyme qui dégrade la pectine présente dans la paroi des cellules végétales composant les fruits et les légumes. La pectine favorise la digestion des glucides.La pectinase est utilisée dans diverses applications industrielles telles que la clarification du jus de fruit, l'extraction de l'huile végétale ou encore la vinification. En effet, elle permet d'améliorer la filtration, la consistance et la stabilité des produits finis.

L'ensemble de nos isolats(49) sont incapable de dégrader la pectine, les milieux restes solide parce que les souches testés sont incapable d'hydrolyser le pectine.(fig.20)



Figure(20) : Test d'enzyme pectinase des souches isolées

5. Formation de biofilm :

Le biofilm par définition est un ensemble de microorganismes, formé de la même espèce ou d'espèces différentes, qui vivent en symbiose et forment une communauté. Il est constitué d'un ensemble de cellules et de micro-colonies associées entre elles et à des surfaces biotiques ou abiotiques (Brangeret al., 2007 ; Bellifa, 2014). Le biofilm protège les bactéries et leur permet de survivre dans des conditions environnementales hostiles.

Les résultats obtenus, suivant une approche qualitative, ont permis de mettre en évidence la capacité de toutes les souches isolées à former des biofilms en microplaques à 96 puits après culture en TSB .

La bactérie va initialement adhérer sur une surface de polystyrène (plaque à 96 puits), se multiplier et produire un biofilm bactérien. Le CV colore les structures polysaccharidiques des bactéries incluses dans le biofilm et des bactéries sous forme planctonique. Un lavage à l'eau distillée permet d'éliminer l'excès de colorant ainsi que les bactéries planctoniques. L'intensité de la coloration est proportionnelle à la quantité de biofilm produite. Une mesure de la DO permet d'avoir une approche quantitative sur la capacité d'une bactérie à produire un biofilm (Vieu, 2014).

Les 23 isolats sur les 49 isolats étudiés soit 47% ont montré une coloration sur la microplaque ce qui implique qu'ils sont des producteurs de biofilm. L'intensité de la couleur formée par les isolats implique que 10 isolats (S1,S2,S6,S9,S10,S11,S12,S14,S15,S17) sont considérés comme possédant une forte capacité de formation de biofilm, les isolats (S3,S7,S8,S13,S16,S18,S19,S20,S21) ont une formation modérée. Par contre (S4,S5,S22,S23) a une faible capacité de produire le biofilm(fig.21)

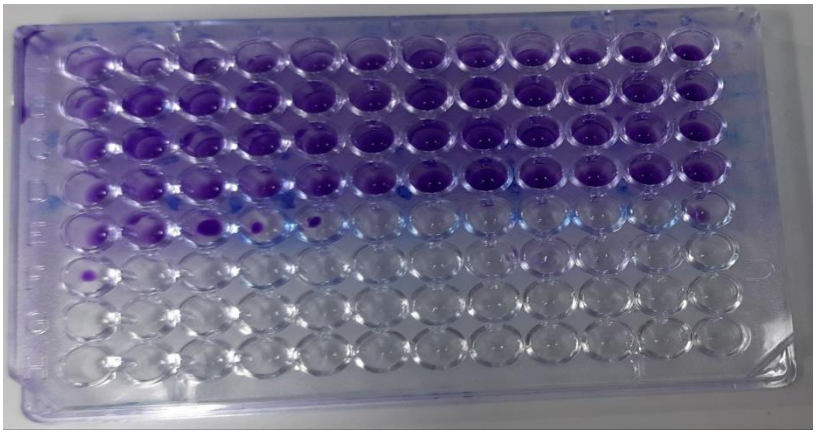


Figure (21) : Mise en évidence de la formation de biofilm par les isolats

6-Caractérisation physiologique :

6.1.Tolérance au pH :

Selon Woyessa et Assefa (2011), le pH joue un rôle essentiel dans l'activité microbienne et les populations présentes dans le sol. L'analyse de l'impact du pH sur la croissance et le développement des souches est concluante. Les 49 isolats étudiés ont démontré sont capables de pousser à pH 10. Ces souches sont donc considérées comme basophiles. On a observé une tolérance élevée chez les bactéries des graines d'orge à un pH de 7 , tandis qu'elle était faible à un pH de 4.(fig.22)

Les résultats obtenus ont montré que 20 isolats soit une proportion de 90% ont une bonne croissance à pH 10 avec une densité optique comprise entre 0,5 et 1 ce qui nous indique que ce sont des bactéries basophiles, et 15 isolats (66%) de nos isolats ont montré un optimum de croissance à un pH7 et seulement 2 isolats soit une proportion de 12.5% sont des acidophiles car leur optimum de croissance a été noté à un pH=4.

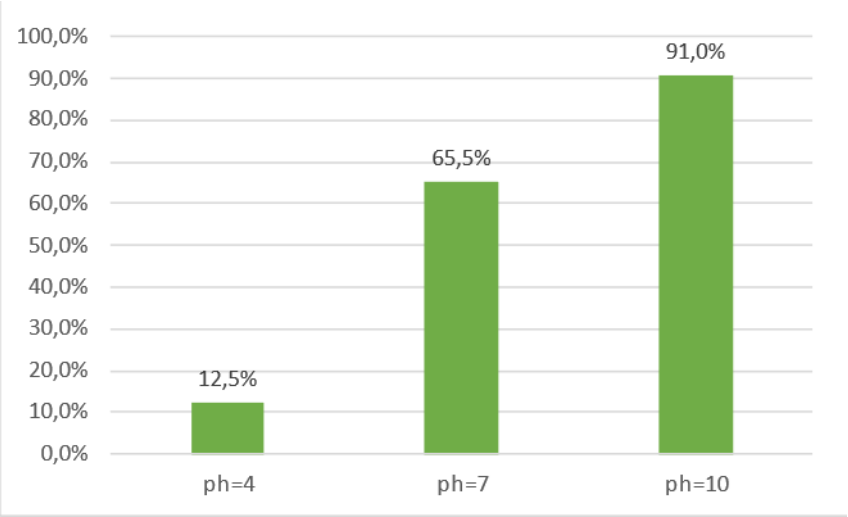


Figure (22) : Tolérance des isolats testés à pHs différents.

Au cours de notre étude, nous avons constaté que nos souches peuvent supporter des pH acides allant jusqu'à 6 et des Ph alcalins allant jusqu'à 10. Généralement, ces résultats obtenus sont en accord avec ce qui a été rapporté par Jordan (1984) qui a observé que des bactéries endophytes symbiotiques de la famille des Rhizobiaceae peuvent parfaitement supporter des pHs allant de 4,5 à 9.

La manière dont le pH influence la survie bactérienne n'est pas toujours clairement expliquée. Booth (1985) n'a fait que mentionner que le pH extracellulaire joue un rôle essentiel dans le métabolisme et la multiplication cellulaire. Cependant, il est possible de penser que l'effet des pH alcalins sur les bactéries peut se traduire soit par une ionisation des molécules, ce qui ralentit leur diffusion dans le cytoplasme. Selon les recherches de Tungan et Martin (1985), il est possible de modifier la solubilité des gaz ou la disponibilité des substances nutritives à l'égard des cellules bactériennes, tandis que Schwartzbord (1985) suggère d'inhiber certaines enzymes essentielles au métabolisme bactérien. Selon Parker (2002), qui a étudié l'impact des pH acides sur la croissance des bactéries, il a été observé que l'acidité entraîne une diminution de leur croissance.

6.2 Tolérance à la salinité :

Les résultats du test physiologique que nous avons réalisés pour évaluer la tolérance de nos souches à la salinité indiquent que les 49 isolats testés possèdent une croissent à tous les niveaux de stress salin provoqué par le NaCl.

Il ressort du test de l'effet de la salinité sur la croissance et le développement de nos isolats que la plupart possèdent une bonne croissance à toutes les concentration (100mM, 200Mm, 300Mm) avec une densité optique comprise entre 0,5 et 0,9. Par la comparaison des souches par rapport à l'effet de la salinité sur différent concentration on remarque une proportion de 58% soit 13 isolats qui ont une bonne croissance pour une concentration de 200Mm, et 37% soit 8 isolats pour une concentration de 300mM, une proportion de 31% soit 7 isolats pour une

concentration de 100Mm.

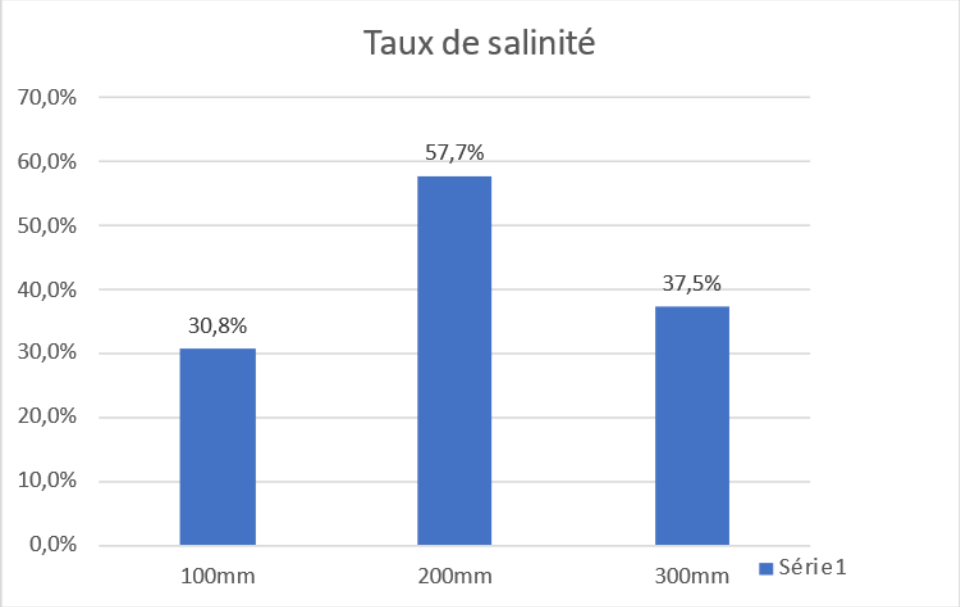


Figure (23) : Tolérance des isolats testés à différents concentration de NaCl

8. Identification biochimique

L'identification biochimique par la galerie API20E a été réalisée sur les 4 isolats 02 07 09 13 de code 713 on a choisis ceste isolats parque sont les plus résiste ou antibiotique . Après incubation, lalecture de la galerie (Fig.24) (Tab.04) a été réalisée en se référant au tableau de lecture. La galerie API20E nous a permisd'affiner nos résultats dans l'identification des souches.

Les quater isolats testés ont montré une réaction négative pour la majorité des tests et peu de réactions sont positives. Cette réaction nous a permis de confirme l'identification de nos isolats comme appartenant au genre Acinetobacter. Les résultats évocateurs d'acinetobacter spp sont la réaction négative du glucose du malibiose et de l'arabinose.

Les testes classique sont les plus souvent négative :

Absence de décarboxylase pour la lysine (LDC) chez la souche 02 preste pours les autres souches

L'ornithine (ODC) positive et l'arginine (ADH) négative pour la souche 13

Absence de désaminase pour la phénylalanine et le tryptophane.

Absence de thiosulfate réductase (H2S) pour les souches 07.09.13 préséance pour 02. de tryotophanase (IND) de désoxyribonucléase et de béta-galactosidase (ONOG) négative pour les souches 02.07 positive chez les souches 09.13 .

Préséance de gélatinasse chez 20.07.09 absence a la souches 13.

Le test de l'uréase, donne des réponses négative (Doughari et al. ; 2011 ; Hawkey et bergogne-Berenzin ,2006).



Figure (24) : Profil biochimique de l'isolat A10 sur la galerie API20E

Tableau (06) : Résultats du profil biochimique de l'isolat galerie API20E
-Négatif + positive

	ONPG	ADH	LDC	ODC	CIT	H2S	URE	TDA	IND	VP	GEL	GLU	MAN	SOR	RHA	SAC	MEL	AMY	ARA
02	-	+	+	+	+	+	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-
07	-	+	-	+	+	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-	+	-	-	-
09	+	+	-	+	+	-	-	-	+	+	+	-	-	-	-	+	-	+	+
13	-	-	-	+	+	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-


Conclusion

Les bactéries endophytes présentes dans les graines sont d'un intérêt considérable pour diverses industries, notamment pour l'agriculture biologique et durable. Parmi ces bactéries, les rhizobia, qui colonisent les nodules des légumineuses, sont particulièrement notables pour leur capacité à fixer l'azote atmosphérique, le rendant disponible pour les plantes.

Notre étude s'est concentrée sur l'origine des rhizobia colonisant les graines de soja. Elle s'est articulée autour de deux axes principaux : tout d'abord, l'isolement des bactéries endophytes des graines de soja avec une sélection spécifique des rhizobia, suivie de la caractérisation de ces isolats. Ensuite, nous avons évalué divers traits de promotion de la croissance des plantes (PGP), incluant des analyses enzymatiques, la capacité à produire des exopolysaccharides, la formation de biofilms, ainsi que la solubilisation du phosphate et la fixation de l'azote. Ces traits sont essentiels car ils permettent aux souches sélectionnées de fournir des nutriments essentiels aux plantes, favorisant ainsi leur utilisation en agriculture durable.

La densité bactérienne à l'intérieur des graines de soja est conforme aux normes et peut même être considérée comme élevée, étant donné la nature oligotrophe des graines. Nous avons isolé 64 souches, parmi lesquelles 49 ont été identifiées comme appartenant probablement au genre des rhizobia, en se basant sur des critères tels que l'aspect morphologique des colonies sur milieu YEMA, la réaction catalasique, la réaction négative à la coloration de Gram et la mobilité détectée sur le milieu mannitol.

Les souches sélectionnées se sont révélées être des biofertilisants efficaces en apportant des éléments nutritifs aux plantes .Un autre aspect crucial est leur capacité à produire des enzymes hydrolytiques, notamment des taux élevés d'amylase (98%) et de lipase (88%)



- **(Acar F , Moulin G.(2006).** Antimicrobial resistance at farm level. 25(2):775-92.
- **(Berendonk T.(2015)**. Tackling antibiotic resistance: the environmental framework. 10.1038
- **(Brader, G. N., 2001.; Compant, S. P.; Mitter, B.; Trognitz, F.);** Sessitsch, A.,Metabolicpotential of endophytic bacteria. *Current Opin. Biotechnol.* 27, 30-37.
- **(Burkholderia sp. strain PsJN)**. Appl. Environ.Microbiol. 71,1685–1693. doi: 10.1128/AEM.71.4.1685-1693.2005
- **(Compant, S., Kaplan, H., Sessitsch, A., Nowak, J., AitBarka, E., andClément, C. (2008).**
- Endophytic colonization of Vitis vinifera L. by Burkholderiaphytofirmans strain PsJN:from the rhizosphere to inflorescence tissues. FEMS Microbiol. Ecol. 63, 84–93. Doi :10.1111/j.1574-6941.2007. 00410.x
- **(Compant, S., Reiter, B., Sessitsch, A., Nowak, J., Clément, C., and AitBarka, E.(2005).**
- Endophytic colonization of Vitis vinifera L. by plant growth promoting bacterium
- **(Cerqueira, F.; Matamoros, V.; Bayona, J.; Elsinga, G.; Hornstra, L. M.; Piña, B**. Distribution of antibiotic resistance genes in soils and crops. A field study in legume plants (Vicia faba L.) grown underdifferent watering regimes. Environ. Res. 2019, 170, 16−25.
- **(De Melo, A. G., Levesque, S., and Moineau, S. (2012).** Phages as friends and enemies in food
- **(processing. *Curr. Opin. Biotechno)l.*** 49, 185–190. doi: 10.1016/j.copbio.2017.09.004
- **(D.MOHAMMEDI) .Classification et mode d'action des antibiotiquesDisponible sur :**
- **https://sofia.medicalistes.fr/spip/IMG/pdf/classification_et_mode_d_action_des_antibiotiques**
- **.pdf**
- **(Glaeser, S. P., Imani, J., Alabid, I., Guo, H., Kumar, N., Kämpfer, P., et al.**

(2016). NonpathogenicRhizobium radiobacter F4 deploys plant beneficialactivity independent of

- its host Piriformosporaindica. ISME J. 10, 871–884.doi : 10.1038/ismej.2015.163.
- **(Glick, B. R. 1995.)**The enhancement of plant growth by free living bacteria. *Can. J.Microbiol.* 41:109– 117.
- **(Gupta, S.S. (2003).** Chemotactic response of plant-growth-promoting bacteria towards rootsof vesicular-arbuscular mycorrhizal tomato plants. *FEMS Microbiol. Ecol*. **45**(3):219-
- 227.
- **(Gupta R , Gupta N et Rathi P. (2004)**. Bacterial lipases: an overview of production, purification and biochemical properties. *Appl Microbiol Biotechnol*. 64, 763–781.

proposed role in plant growth.TrendsMicrobiol.16,463–471.

- **(J. Hallmann, A. Quadt-Hallmann, W.F. Mahaffee, J.W.**)KloepperBacterial endophytes inagricultural crops.
- **(Lee, J. C.; Strobel, G. A.; Lobkovsky, E.; Clardy, J.,)**Torreyanic acid: Aselectively cytotoxic quininedimmer from the endohytic fungus *Pestalotiopsismicrospora*. *J. Org. Chem.*
- 1996, 61, 3232-3233.
- **(Mainardi, JL). Mécanismes d'action et de résistance aux antibiotiques. Faculté deMédecine, Université Paris-Descartes.**
- **Accessible à: http://www.infectiologie.com/UserFiles/File/formation/desc/desc2015**
- **action-et- resistance-atb-mainardi.pdf.**
- **(Marshall M , Levy B.(2011).** Food animals and antimicrobials: impacts on human health. 24(4):718-33
- **(Naas T). Les modes de transmission des résistances bactériennes [en ligne]. Colloque L'antibiorésistancechez l'homme et l'animal. Faculté de Médecine Paris.**
- **2014, disponible sur : http://social-sante.gouv.fr/IMG/pdf/Modes_de_transmission des_resistances_ bacterienn es.pdf.**
- **(OMS) | De nouvelles données révèlent l'existence de niveaux élevés de résistance aux antibiotiques dans le monde [Internet]. WHO. [cité 2 févr 2019]. Disponible sur: http://www.who.int/mediacentre/news/releases/2018/antibiotic-resistance-found/fr/ consultéle 12/02/2022**

- **(Pelmont J. (1993).** Bactéries et environnement. Presse Universitaire de Grenoble, 899 p.Illmer P. and Schnner F. (1992). Solubilization of inorganic phosphate by microorganisms isolated from forest soils. *Soil Biol. Biochem*. 24: 389- 395.
- **(Résistance aux antibiotiques: un lien avec l'usage ancien de pénicilline dans lesélevages - 30/11/2017 - ladepeche.fr [Internet]. [cité 2 févr 2019]. Disponible sur:**
- https://www.ladepeche.fr/article/2017/11/30/2695116-resistance-antibiotiques-lienusage- ancien-penicilline-elevages.html
- **(Résistance aux antibiotiques ; Dossier réalisé en collaboration avec Jean-Luc Mainardi,**
- **unité 1138 Inserm/Sorbonne Université/Université Paris Descartes/Université Paris**
- **(Hardoim,P.R.,Van,O.,verbeek,L.S.,van,E.,lsas,J.D.,2008).**Properties of bacterial endophytes and their
- **Diderot, équipeStructures bactériennes impliquées dans la modulation de la résistance aux antibiotiques , (2018) Disponible sur : https://www.inserm.fr/dossier/resistance-antibiotiques/ consulté le**
- **12/01/2022**
- **(Raaijmakers, J. M.; de Bruijn, I.; Nybroe, O.; Ongena, M.,)** Naturalfunctions of lipopeptides from
- *Bacillus* and *Pseudomonas*: More thansurfactants and antibiotics. *FEMS Microbiol. Rev.* 2010, 34, 1037-1062.
- **(Soltner D.,** ***2005.)*** Les grandes productions végétales. Céréales. Collection sciencesettechniques agricoles. 20è édition. Paris. France, pp 21-55.

(Verma, V.; Sudan, P.; Kour, A.), Endophytes: A novel source forbioactive molecules. *Proc. Indian*

- *natn. Acad.* 2008, 74, 73-86.

- **(Weber, D.; Gorzalczany, S.; Martino, V.; Acevedo, C.; Sterner, O.;Anke, T.)**, Metabolites fromendophytes of the medicinal plant *Erythrina cristagalli*. *Z. Naturforsch*2005, 60 c, 467-477

- **(Wilson, D. 1995).**Endophyte - the evolution of a term, and clarification of its use anddefinition.*Oikos*, 73: 274-276.

- **(Wang, F.-H.; Qiao, M.; Chen, Z.; Su, J.-Q.; Zhu, Y.-G**). Antibiotic resistance genes in manure-amended soil and vegetables at harvest. J. Hazard. Mater. 2015, 299, 215−221.

- **(Ure kasanté Vidal). La résistance aux antibiotiques[en ligne]..**
- **Disponible sur : https://eurekasante.vidal.fr/medicaments/antibiotiques/resistanceantibiotiques.html; consulté le 15/02/2022**

- **(Zabetakis, I.),** Enhancement of flavour biosynthesis from strawberry(*Fragaria* x *ananassa*)callus cultures by *Methylobacterium*species. *Plant Cell Tiss. Organ. Cult.* 1997, 50,
- 179-218.


Annexe

Annexe 01 : Préparation et composition des milieux de culture pour 1litre

TSA à amidon 1%
TSB 3g
Amidon 10g Agar 15g TSA 1/10 TSB 3g Agar 15g

Gélose au lait

Peptone Lait écrémé Agar	5g 12g 18g

TSA tween80

TSA	200ml
Tween80	80 goutte

Mannitol et mobilité

Mannitol	2g
Peptone	20g
Nitrate K Rouge de phénol 4% Agar	1g 4ml 4g

Gélose au sang
TSB.....3g
- Agar.....15g
- Sang.....15ml

Annexe 2 : Matériel non biologique (l'appareillage)

Appareillage	Verreries	Autre matériel
Autoclave (nüve)	Becher	Anse de platine
Bain marie (nüve)	Boite de pétrie	Papier aluminium
Balance de précision électrique (Kern)	Erlenmeyer	Papier parafilm
Etuve bactériologique (nüve)	Fiole	Pince en platine
Microscope optique (Motic)	Flacons	Cryotube
Réfrigérateur	Lames et lamelles	Tube Eppendorf
Congélateur	Tubes à essai	Spatule
Plaque chauffante agitante (Stuart)	pipette jaugée	Bec Bunsen
PH-mètre	Eppendorf	Gants jettable
Agitateur rotatif shaker vortex	Marqueurs	

agitateur magnétique	Barreau aimanté	
Spectrophotomètre	Micropipettes	
Centrifugeuse	Portoir pour tubes	
Filtre 0.45 µm		
Seringue		

Annexe 3 : Coloration de Gram

La coloration de Gram	**La technique**
La coloration de Grama été réalisée selon la technique suivante :	• Sur une lame, fixer à la chaleur une culture bactérienne ; • Recouvrir la lame avec la solution de violet de gentianependant une minute; • Ajouter du lugol pendant 30 secondes ; • Décolorer avec de l'alcool 95°, puis rincer à l'eau ; • Faire une contre coloration en utilisant la fuschine et laisseragir 20 à 30 secondes; • Laver à l'eau ; • Après séchage, soumettre la lame à une observationmicroscopique à immersion (x100). Les bactéries à Gram positif apparaissent en violet etles bactéries à Gramnégatif en rose.