

REPUBLIQUE ALGERIENNE DEMOCRATIQUE ET POPULAIRE
MINISTERE DE L'ENSEIGNEMENT SUPERIEUR ET DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE
UNIVERSITE MOHAMED BOUDIAF – M'SILA

MEMOIRE

présenté

A LA FACULTE DES SCIENCES ET DES SCIENCES DE L'INGENIORAT
DEPARTEMENT DE BIOLOGIE

pour obtenir

**Le Diplôme des Etudes Supérieures en Biologie
(DES)**

OPTION : **MICROBIOLOGIE**

par

HAMLAOUI, L.; DEHOUM, H. et CHEBABHI, K.

THEME :

**Contribution à l'étude de la lutte biologique des champignons
phytopathogènes par l'utilisation de *Bacillus* sp.**

Encadré par :

M^r HENDEL N.....M.A.C.C.

Remerciement

Avant Tout on remercie mon Dieu qui nous a donné la force et le courage d'achever ce travail.

On tient à remercier l'ensemble du personnel du département de Biologie surtout les enseignants pour l'aide qu'ils ont fournit durant toutes nos années d'études.

On tiens surtout à exprimer nos profondes reconnaissance a nôtre encadreur Mr: HENDEL N. d'avoir guider et diriger ce travail dans le bon sens et pour les conseils valeureux.

On tiens a remerciés M^r GHADBANE et M^{me} BENSEMANE pour leurs aide durant ce travail.

On remercie toute personne ayant contribué de près ou de loin à la réalisation de ce mémoire.

Sommaire

Intrroduction	1
CHAPITRE I La lutte biologique	
1.1. Définitions	3
1.2. Historique	3
1.3. Les stratégies d'application.....	6
1.4. Principes de technique de lutte biologique.....	6
1.5. Les étapes du développement de la lutte biologique.....	8
1.6. Les mécanismes d'actions.....	8
1.6.1. La compétition nutritive.....	8
1.6.2. Antibiose ou formation de substances antibiotiques.....	9
1.6.3. Occupation de la même niche écologique.....	9
1.6.4. Autres mécanismes.....	9
1.7. Les méthodes de lutte biologique.....	9
1.7.1. Lutte biologique par utilisation de prédateurs.....	9
1.7.2. Lutte biologique par utilisation des parasitoïdes	9
1.7.3. La lutte biologique par utilisation de la résistance variétale.....	9
1.7.4. La lutte biologique par utilisation d'insecticides botaniques.....	10
1.7.5. lutte biologique par utilisation des microorganismes	10
1.8. Importance de la lutte biologique	10
CHAPITRE II Le genre <i>Bacillus</i>	
2.1. Caractères généraux et classification.....	12
2.2. Nutrition et croissance.....	12
2.3. Ecologie.....	13
2.4. Groupes écophysiologiques.....	14
2.5. Pouvoir pathogène	14
2.6. Sensibilité aux antibiotiques.....	14
2.7. Caractères physiologiques.....	14
2.8. Technique d'isolement.....	16
2.9. Caractéristiques de quelques espèces du genre <i>Bacillus</i>	16
2.10. Mode d'action de <i>Bacillus</i> spp, dans la lutte biologique contre les maladies fongiques des plantes.....	16
Conclusion	20
Références bibliographiques	21

Introduction

Plusieurs agents pathogènes dont essentiellement les champignons réduisent les potentiels de production des plantes. Ils sont à l'origine des maladies de feuilles, de racines, de fruits ou des maladies systématiques provoquant des dépérissements généralisés.

La Fusariose vasculaire (*Fusarium oxysporum*) occupe 40 à 70 % de la flore fusarienne tellurique totale. L'agent pathogène produit quelques substances toxiques pour les plantes, comme la lycomarasmine et l'acide fusarique qui entraîne le flétrissement et d'autres substances enzymatiques pectinolytiques et cellulolytiques. La verticillose (*Verticillium dahliae*) est une maladie très répandue dans la région méditerranéenne. Elle affecte l'ensemble des cultures maraîchères, l'olivier, les arbres fruitiers à noyau et certaines plantes ornementales, et provoque des dommages importants allant jusqu'à la destruction entière des récoltes. Le pythium vasculaire (*Pythium tracheiphilum*) affecte les feuilles et les racines de certaines plantes, telle la salade, réduisant ainsi leur croissance. Les dépérissements de l'avocatier causés par *Phytophthora cinnamoni*, provoquent des dégâts importants dans les vergers. Les *Monilnia* et les *Botryotinia* constituent deux genres importants de champignons comportant notamment des agents de pourriture et de momifications des fruits.

Les céréales sont contaminées dès avant la récolte par une mycoflore dite du « champ » qui comprend un grand nombre d'espèces appartenant surtout aux genres cellulolytiques *Alternaria*, *Chaetomium*, *Cladosporium*, *Epicoccum*, *Fusarium*, *Trichoderma* ...

Au cours du stockage, une flore composée de champignons moins cellulolytiques et plus osmophiles, qui provoquent une acidification du substrat : ce sont essentiellement les *Aspergillus*, *Eurotium*, des *Penicillium* et les mucorales (*Absidia*, *Mucor*, *Rhizopus*). Les moisissures des graines et des farines peuvent provoquer de graves toxicoses, parfois mortelles.

La lutte chimique contre ces agents phytopathogènes est le moyen le plus couramment utilisé. Cependant, elle présente une certaine limite à cause la pollution de l'environnement et l'apparition de la résistance progressive des pathogènes à certains fongicides.

La lutte génétique, par l'utilisation de variétés végétales résistantes, a donné des résultats efficaces. Elle reste toujours insuffisante, surtout après l'apparition de nouvelles races de pathogènes capables de surmonter la résistance de l'hôte.

La possibilité de maîtriser cette microflore nuisible sans affecter l'équilibre de l'environnement à d'autres méthodes facultatives. L'exploitation de microorganismes antagonistes (biopesticides) paraît intéressante pour les phytopathologistes.

Notre travail vise l'utilisation de la bactérie du genre *Bacillus* comme agent de lutte biologique contre les champignons phytopathogènes. Il comprend :

- Une définition de la lutte biologique.
- Classification du genre *Bacillus*.
- Quelques exemples traitant l'utilisation du *Bacillus* spp comme agent de lutte biologique.

CHAPITRE I :

LA LUTTE BIOLOGIQUE

1. La lutte biologique

1.1. Historique:

La naissance de l'idée fondamentale de l'utilisation des inoculums microbiens dans le contrôle biologique remonte à plus d'une soixantaine d'année (Toua, 1996). En 1800 Erasmus DARWIN édita un livre (phytologie) sur l'agriculture et le jardinage dans lequel il souligna le rôle des ennemis naturels dans la réduction des parasites (Van Lentern, 2006).

Au début du 19^{ième} siècle, la lutte biologique soulevait beaucoup d'enthousiasme en raison du succès obtenu par la coccinelle *Rodolia cardinalis* en Californie. La lutte biologique est séduisante sur le plan scientifique et écologique. Son image plait au grand public. Malgré cela, les succès commerciaux d'agents de lutte biologique ont été peu nombreux dans ce siècle (Vincent *et al.*, 2000).

En 1926, l'étude de Sanford, sur les facteurs influençant la pathogénicité de la bactérie *Streptomyces scabies*, a montré que des microorganismes saprophytes pouvaient entraîner une diminution de l'intensité des symptômes causés par ce phytopathogène. Quelques années plus tard, Weindling montra que le champignon *Trichoderma lignorum* parasitait d'autres champignons de sol (Lepoivre, 2003).

En 1963, Risbeth a utilisé pour le biocontrôle de la maladie pourridiée des résineux, causée par *Fomes annosus*, l'agent cryptogamique *Peniophora gigantea* (Reddy, 1991). Ce champignon est l'un des premiers agents de lutte biologique qui a été commercialisé. Son utilisation reste courante jusqu'à présent (Toua, 1996). Il a été le premier succès pratique de la lutte biologique au sens strict (Corbaz, 1990). A partir de cette période, de nombreux chercheurs ont orienté leurs travaux vers l'utilisation d'antagonistes microbiens contre d'autres microorganismes phytopathogènes (Toua, 1996). En 1974, apparaît le premier livre consacré exclusivement à la lutte biologique (Corbaz, 1990).

Actuellement, plusieurs préparations bactériennes sont commercialisées et utilisées avec grand succès (tableaux : 1 et 2).

Tableau 01: Agents de lutte biologique (bactéries) commercialisés pour la lutte contre les agents pathogènes du sol.

Antagonistes	Espèces ciblées	Noms commerciaux	Compagnies	Pays
<i>Agrobacterium radiobacter</i> Souche 34	<i>Agrobacterium tumefaciens</i>	Galltrol-A Norbac 84-C Nogall Diegall	AgBioChem IPM Labs Blo-Care Technology Bio-Care	USA
<i>Bacillus subtilis</i>	<i>Fusarium</i> , <i>Rhizoctonia</i> , <i>Aspergillus</i> <i>Pythium</i> , <i>Phytophthora</i> , <i>Alternaria</i> spp., <i>Sclerotinia</i> , <i>Verticillium</i> <i>Streptomyces scabies</i>	HiStick N/T Epic Companion Kodiak Rhizo-Plus, System, Bio-T	MicroBio Group MicroBio Group Grovrth Products Gustafson KFZB Biotechnik Helena Chemical Alron Chemical	USA, Suède
<i>Burkholderia cepacia</i> type Wisconsin	<i>Rhizoctonia</i> , <i>Pythium</i> , <i>Fusarium</i>	Deny Blue Circle, Precept	Stine Microbial Products	USA
<i>Pseudomonas cepacia</i>	<i>Rhizoctonia</i> , <i>Pythium</i> , <i>Fusarium</i>	Intercept	Soil Technologies	USA
<i>Pseudomonas fluorescens</i>	<i>Pseudomonas tolaassii</i> <i>Fusarium</i>	Conquer	Mauri Foods	USA, Australie
<i>Ralstonia solanacearum</i>	<i>Ralstonia aracearurn</i>	PSSOL	Natural Plant Protection	France
<i>Streptomyces griseovirides</i>	<i>Fusarium</i> spp., <i>Alternaria</i> <i>Pythium</i> spp et <i>Botrytis</i> spp <i>Botrytis</i> spp., <i>Pythium</i> spp.,	My costop	Kemira Agro	USA, UE

Tableau 02 : Agents de lutte biologique commercialisés pour lutte contre les agente pathogènes de la phyllosphère et de post – récolte

Antagonistes	Espèces ciblées	Noms commerciaux	Compagnies	Pays 1
<i>Bacillus subtilis</i>	Oidium, mildiou, cercosporiose ealternarios .mildiou pomme de terre, pourriture brune , feu bactérien	Sérénade	AgrOuest	USA
<i>Pseudomonas chlororaphis</i>	<i>Fusarium</i> et autres maladies foliaires	Cedomon	BioAgriAB	USA
<i>Pseudomonas fluorescens</i>	<i>Erwinia amylovora</i> , dégât du froid	BlightBanA506	Plant Health Technogies	USA
<i>Pseudomonas syringae</i>	<i>Botrytis cinerea</i> , <i>Penicillium</i> spp., <i>Mucor</i> <i>piriformis</i> , <i>Geotrichum</i> <i>candidum</i>	BIO-save100 BIO-save1000 BIO-save-110	EcoScience Corp	USA

1.2. Définitions:

Selon, l'Organisation Internationale de la Lutte Biologique (O.I.L.B), crée en 1948 : la lutte biologique est l'utilisation des organismes vivants pour prévenir ou réduire les dégâts causés par les ravageurs et les agents phytopathogènes (insectes, phanérogames, champignons, bactéries), (Lepoivre, 2003).

L'Agence de la Protection de l'Environnement (A.P.E) des Etats-Unis considère que la lutte biologique vise à contrôler l'agent pathogène au moyen d'agents de lutte biologique, ou antagonistes : bactéries, virus, champignons (Lepoivre, 2003).

En 1968, la National Academy of Science des Etats-Unis d'Amérique donne une définition plus large : « toute action mettant en jeu des organismes en modifiant l'hôte, y compris les méthodes culturales, qui permettent de diminuer, par voie directe ou indirecte, les dommages causés par un parasite ». Selon Garrett, la lutte est plutôt limitative et correspond à la première idée qui consiste à combattre une maladie ou un ravageur au moyen d'un autre organisme selon un schéma. Chez les entomologistes, « toute condition réduisant la survie ou l'activité d'un parasite, par l'introduction de tout organisme vivant, qui se traduit par une diminution des pertes causées par le parasite » (Corbaz, 1990).

Gilbert (2001) définit la lutte biologique comme : « l'utilisation d'organismes vivants afin de réduire la densité de population ou l'impact d'un organisme, ravageur particulier, en le rendant moins abondant ou moins dommageable » et la propose sous diverses modalités : Lutte biologique classique (utilisation d'antagonistes exotiques contre des ravageurs ou pathogènes exotiques ou indigènes), lutte biologique inoculative. (Introduction périodique d'antagonistes en nombre limité), et lutte biologique inondative (Introduction massive et périodique d'antagonistes) (Gilbert, 2001).

La lutte biologique est présente dans tous les écosystèmes. Elle est la propre manière de la nature pour garder le nombre d'organismes parasites aux niveaux bas, la terre verte et la production suffisante de biomasses par les plantes (Van Lentern, 2006).

1.3. Les stratégies d'application

Jusqu'à présent, les stratégies mises en œuvres pour combattre les maladies des plantes cultivées se basent essentiellement sur la protection chimique et l'utilisation des plantes résistantes. Les dernières années, les méthodes de lutte biologique s'étendent même dans les systèmes agricoles de production intensive. (Toua, 1996).

Les stratégies d'application en lutte biologique consistent en l'exploitation des biocides inertes qui constituent l'approche « biopesticides », et l'exploitation de biocides autonomes qui renferment des agents de lutte, microbiens ou animaux (Vincent *et al.*, 2000).

Les agents de lutte biologique sont utilisés principalement : dans la lutte biologique contre des invertébrés ravageurs à l'aide de prédateurs, de parasitoïdes et de pathogènes et dans le contrôle de mauvaises herbes à l'aide d'herbivores et de pathogènes. Ils sont également utilisés dans la lutte biologique contre les agents phytopathogènes à l'aide de micro-organismes antagonistes et avec la résistance induite chez les plantes (Gilbert, 2001).

1.4. Principes de technique de lutte biologique :

Les techniques de lutte biologique font appel à deux principes :

- La réduction de l'inoculum infectieux pendant la phase de conservation ou de survie du pathogène; et/ou l'interférence avec le processus d'infection de la plante hôte.
- Le contrôle biologique des agents pathogènes s'exerce en détruisant l'inoculum infectieux, en l'inactivant ou réduisant sa virulence, (Toua, 1996).

1.5. Les étapes du développement de la lutte biologique

Les étapes nécessaires pour passer d'un phénomène naturel d'antagonisme entre deux microorganismes à un biopesticide opérationnel sont nombreuses (**figure1.1**); elles doivent être considérées globalement, chacune d'elles étant essentielle et complémentaire des autres, ce processus de développement est confronté à des exigences biologiques, techniques, économiques et réglementaires imposées par l'industrie , l'utilisateur, le consommateur et les instances officielles d'homologation des produits sanitaires (Lepoivre , 2003) .

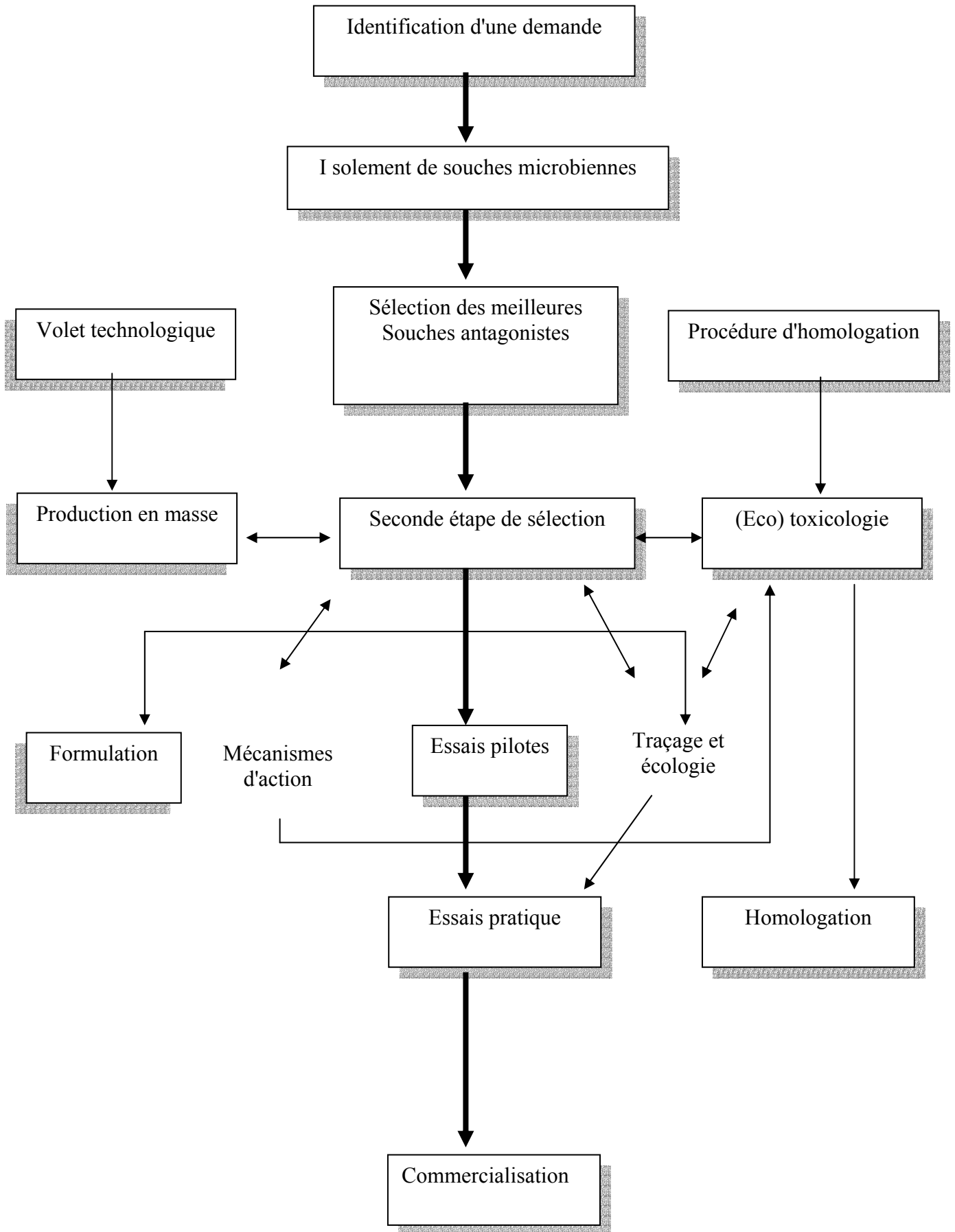


Figure 1.1: Les étapes nécessaires au développement d'un agent de lutte biologique (Lepoivre , 2003)

1.6. Les mécanismes d'actions :

Dans la lutte biologique ou le biocontrôle, les antagonistes sont des agents biologiques qui possèdent un potentiel d'interférence dans le processus de vie et de virulence des agents phytopathogènes (Toua, 1996). L'antagoniste, ou le mécanisme d'action, est une étape importante dans le développement de la lutte biologique (Lepoivre, 2003) ; selon Lugtenberg *et al.* (1994), pour qu'un agent microbien doive être utilisé en biocontrôle, il doit présenter deux critères fondamentaux :

- Il faut qu'il produise des facteurs protecteurs qui, d'une manière ou d'une autre, portent préjudice sélectivement au pathogène en question (production d'antibiotiques, enzymes de dégradation des cellules du photogène....).
- Il doit être présent au site adéquat et au moment opportun et convenable, pour délivrer ou produire en degré optimal le ou les facteurs protecteurs (Toua, 1996).

La protection conférée par un agent de lutte biologique s'appuie sur un ou plusieurs mécanismes d'action tels que la compétition pour les éléments nutritifs (l'oxygène, l'espace), l'antibiose, le parasitisme, la diminution de l'agressivité du pathogène et l'induction de la résistance chez la plante (Lepoivre, 2003),

Ces mécanismes sont expliqués comme suit :

1.6.1. La compétition nutritive:

La compétition pour les éléments nutritifs entre en jeu lors qu'il y simultanément consommation du même composé par plusieurs microorganismes. Pour être un compétiteur efficace, un agent antagoniste doit être capable d'utiliser rapidement et efficacement les éléments nutritifs présents en faible concentration sur les organes de la plante. Le phénomène de compétition peut être suggéré lorsqu'il y a (Lepoivre, 2003) :

- Corrélation entre la capacité de l'agent antagoniste à coloniser le site à protéger (ou la densité cellulaire de cet agent au site d'action) et le niveau de protection.
- Levée de l'inhibition de la croissance du pathogène après ajout de substances nutritives.
- Absence de protection de la plante si l'agent pathogène est inoculé en premier lieu.

1.6.2. Antibiose ou formation de substances antibiotiques :

La sécrétion de substances antibiotiques par les microorganismes est un phénomène fréquent. Certains métabolites sont capables d'interférer avec la germination, la croissance mycélienne et la sporulation des agents phytopathogènes ; par exemple : *Bacillus subtilis* produit l'iturine contre les maladies de post récolte (Lepoivre, 2003 ; Vincent *et al.*, 2000).

1.6.3. Occupation de la même niche écologique :

La tendance est de rechercher, comme antagoniste, soit une souche virulente de la même espèce que le pathogène (Gourgaud et Sanglier, 1992), soit une autre espèce du même genre que le pathogène : *Erwinia herbicola* contre *E. amylovora*, un *Rhizoctonia* sp contre *R. solani* (vincent et al., 2000).

1.6.4. autres mécanismes :

Les mécanismes d'adhérence sont complexes et s'appuient notamment sur les propriétés physicochimiques de surface des microorganismes et de la plante hôte. On a montré une relation entre la protection de la tomate vis-à-vis de *Botrytis cinerea* par *Bacillus subtilis* et fixation de cette souche bactérienne (Lepoivre, 2003)

1.7. Les méthodes de lutte biologique :

Il existe plusieurs méthodes de lutte biologique :

1.7.1. lutte biologique par utilisation de prédateurs :

Les prédateurs tuent leurs proies pour satisfaire leurs besoins nutritifs.

On distingue 02 types de prédateurs :

- les premiers sont des spécialistes en lutte biologique, les familles les plus utilisées sont certaines espèces de *Syrphidae*, *Coccinellidae*etc.
- les secondes sont plutôt généralistes et peuvent utiliser d'autres sources de nutrition non animale comme les champignons ou des matières végétales.

En lutte biologique certaines espèces des groupes des acariens et des insectes appartenant à l'ordre de coléoptères, dermoptère, hémiptère, neuroptère sont les plus utilisés. (Kouassi, 2001).

1.7.2. lutte biologique par utilisation des parasitoïdes :

Les parasitoïdes sont des entomophages qui pour compléter leurs cycles de vie tuent leurs hôtes. En lutte biologique, les trois ordres les plus utilisées sont les hyménoptères (87,3%) les diptères (12,5%) et les coléoptères (0,2%). Il existe des hyperparasitoïdes, lesquels sont parasitoïdes des précédents. (Kouassi, 2001).

1.7.3. La lutte biologique par utilisation de la résistance variétale:

La résistance variétale est la capacité pour une variété de plante d'obtenir une bonne productivité malgré la présence de ravageurs. Deux mécanismes sous-tendent à ce concept: l'antixénose, quand la plante par sa physiologie, sa morphologie ou sa phénologie

repousse ou amoindrit les dommages causés par le ravageur, et l'antibiose quand la plante est capable de produire une substance pouvant empêcher le développement du ravageur.

1.7.4. La lutte biologique par utilisation d'insecticides botaniques:

Plus de 59 familles et 188 genres de plantes sont utilisés pour la répression des insectes ravageurs. Ces plantes contiennent des substances qui ont des propriétés anti-appétantes, répulsives ou même insecticides. Généralement, à part quelques propriétés intéressantes comme la répulsion ou la dissuasion de prise alimentaire, cette méthode est similaire à la lutte classique par utilisation de substances chimiques.

1.7.5. lutte biologique par utilisation des microorganismes :

Comme les bactéries, les champignon et les virus (Corbaz, 1990).

1.8. Importance de la lutte biologique :

La lutte biologique est née d'un certain échec de la lutte chimique, essentiellement dû à de nombreux abus, à la présence des résidus ainsi qu'à une absence de vue globale des différents problèmes; en particulier l'impact sur l'environnement. Les traitements chimiques deviennent dans certains cas insupportables sur le plan économique (Corbaz, 1990). Pour ces raisons la lutte biologique est une alternative viable de la lutte chimique (Kouassi, 2001).

La lutte biologique présente beaucoup d'avantages comme (**tableau 1.2**) :

- exposition fortement réduite de cultivateur et de personnel de jet aux pesticides toxiques.
- manque de résidus sur le produit lancé sur le marché.
- manque d'effet phytotoxique sur les plantes et aucun avortement prématuré des fruits et des fleurs. En conséquence souvent des augmentations de rendement sont obtenues quand la lutte biologique est appliquée.
- la lutte biologique est permanente, une fois un bon ennemi normal – toujours un bon ennemi normal.
- la lutte biologique est appréciée par le grand public à cause de sa sécurité et sa réussite.
- faible risque de la nourriture, de l'eau et de la pollution environnementale.
- contribution à la production acceptable de nourriture.
- contribution à la protection ou même à la biodiversité.
- aucun résidu de pesticide sur la nourriture.

Une comparaison de de la lutte chimique et la lutte biologique est résumée dans le **tableau 1.1**:

Tableau 1.1 : comparaison des données sue l'exécution de la lutte chimique et biologique.

	Lutte chimique*	Lutte biologique
– nombre d'ingrédients examinés.	> 1 million.	2.000
– rapport de succès.	1 : 200.000	1 : 10
– coûts développementaux.	400 millions d'US\$.	2 millions d'US \$.
– temps développemental.	10 ans.	10 ans.
– avantage / rapport coûté.	1 : 2	20 : 1
– risque de résistance.	grand.	petit.
– spécialité.	très petit.	très grand.
– effets secondaires nocifs.	beaucoup.	peu

*les données de la lutte chimique proviennent du matériel fourni par l'industrie des pesticides.

D'après (Internet Book of Biological. Control) Version 3, March 2006).

Tableau 1.2: Avantages et inconvénients de l'utilisation des agents microbiens en comparaison avec les fongicides chimiques (In Campbell. 1989).

Désignation	Produits chimiques	Agents microbiens
Coûts et investissements		
Recherche et développement	20 millions US \$	0,8 - 1,5 millions US \$
Qualité et acquisition du marché	40 millions US \$	1,5 millions US \$ / année
Données toxicologiques	10 millions US \$	0,5 millions US \$
Elaboration de brevets	Bien établi	en voie d'établissement
Découvertes	Sélection de 15.000 pour dentifier un produit	Sélection rationnelle pour une maladie spécifique déterminée
Efficacité		
Spectre d'activité	Généralement large	Généralement étroit
Résistance	Souvent développée	non connue
Type d'action	Préventive et curative	Préventive et curative
Santé		
Santé des opérateurs	Peuvent être nocifs	Risque très faible
Impact environnemental	Accumulation dans les chaines alimentaires	Risques très faibles Très faible à inexistant
Residus	Intervalle avant récolte souvent recommandé après traitement	Les récoltes sont utilisées sans risque

CHAPITRE I :
LE GENRE *BACILLUS* SP

2. Le genre *Bacillus*

2.1. Caractères généraux et classification:

Le genre *Bacillus* englobe des bactéries à Gram positif, les cultures âgées peuvent apparaître à Gram négatif. Les *Bacillus* sont des bâtonnets droits à extrémité carrée ou arrondie; de taille variable de 0.5-2.5 x 1.2-10 μ . Leur GC% est de 32 à 69. Ils forment des endospores (figure,2.1). Le plus souvent mobiles, à flagelles péritriches. Ils sont aérobies, parfois facultatifs, et catalase positif (Prescott *et al.*, 2003).

Plusieurs espèces du genre *Bacillus* forment des capsules dont parfois l'acide glutamique comme chez *B. megaterium*, et *B. subtilis*. Les capsules de *B. pumilus*, *B. circulans*, *B. mycoides* et d'autres contiennent l'hydrate de carbone (tableau, 2.1).

Le genre *Bacillus* appartient à la classe des *Bacilli*, de l'ordre des *Bacillales*, et à la famille des *Bacillaceae*. Toutefois, la classification utilisée couramment est basée sur la morphologie et la position de la spore. Elle subdivise le genre *Bacillus* en 03 groupes :

Groupe I : constitué de bacilles à Gram positif présentant une spore centrale ou terminale, sphérique ou ovoïde ne déformant pas la cellule. Ce groupe est divisé en 02 sous-groupes ; le groupe IA constitué de bacilles d'un diamètre supérieur à 1 μ m et contenant *B. anthracis*, *B. cereus*, *B. megaterium*, *B. mycoides*, *B. thuringiensis*, *B. pseudomycoides* et *B. weihenstephanensis* ; et le groupe IB rassemblant les Bacilles d'un diamètre inférieur à 1 μ m : *B. coagulans*, *B. firmus*, *B. licheniformis*, *B. subtilis* et *B. pumilus*.

Groupe II : constitué des espèces à Gram variable présentant une spore ovoïde, centrale ou terminale, déformante : *B. circulans*, *B. stearothermophilus*

Groupe III : constitué de bacilles à Gram variable et présentant une spore sphérique, déformante, terminale ou subterminale : *B. fusiformis*, *B. globisporus*....

2.2. Nutrition et croissance:

La plupart des espèces du genre *Bacillus* sont des chimiohétérotrophes, capables à la respiration et utilisent une variété de composés organiques simples (sucres, acides aminés, acides organiques). Dans certains cas, elles fermentent également les hydrates de carbone par réaction mixte qui produit typiquement le glycérol et le butanediol. Quelques espèces telle que *B. megaterium*, n'exigent aucun facteur organique de croissance; d'autres exigent des

acides aminés, des vitamines B, ou les deux. La majorité sont des mésophiles avec une température optimale entre 30 et 45 C°, mais le genre contient également un certain nombre d'espèces thermophiles avec température optimale plus de 65 C°.

Au laboratoire, dans des conditions optimales de croissance les espèces du genre *Bacillus* montrent des temps de génération d'environ 25 minutes (Todar, 2003)

2.3. Ecologie

Le microbiologiste Russe Winogradsky considère que les *Bacillus* font partie de la flore naturelle du sol. Ils deviennent métaboliquement actifs quand les substrats appropriés pour leur croissance sont disponibles, et forment des spores quand les éléments nutritifs sont épuisés. Ce dernier phénomène est accompagné par la production d'antibiotiques.

Puisque la plupart des *Bacillus* peuvent efficacement dégrader une série de biopolymères (protéines, amidon, pectine), on assume qu'ils jouent un rôle dans les cycles biologiques de carbone, et de l'azote (Todar, 2003).

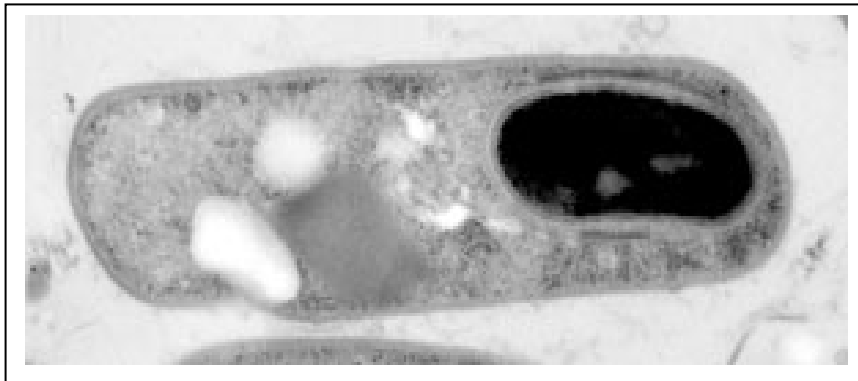


Fig. 2.1 : *Bacillus megaterium* avec son endospore (Todar, 2003)

2.4. Groupes écophysiologiques:

Les membres des espèces du genre *Bacillus* sont divisés en divers groupes écophysiologies:

- Acidophiles : *B. acidocaldarius* , *B. coagulans*
- Alcalophiles: *B. alkalophilus*
- Halophiles: *B. pasteurii*, *B. pantothenicus*
- Psychrophiles : *B. insolitus*, *B. marinus*, *B. megaterium*.
- Thermophiles: *B. schlegelii*, *B. stearothermophilus*
- Dénitrifiants : *B. azotoformans*, *B. cereus*. *B. licheniformis*
- Fixateurs de l'azote : *B. macerans*, et *B. polymyxa*
- Producteurs des antibiotiques : *B. brevis* (gramicidine, tyrocidine), *B. cereus* (cerexine), *B. pumilus* (pumulin), *B. subtilis* (difficidine, subtiline, mycobacilline)

Les *Bacillus* producteurs d'antibiotiques partagent une gamme complète d'activité antimicrobienne: la bacitracine, pumiline, laterosporine etc., sont efficaces contre les bactéries à Gram positifs; la colistine et la polymyxine sont efficaces contre les Gram négatives; la difficidine a un large spectre. La mycobacilline et la zwittermicine sont antifongiques (Todar, 2003).

2.5. Pouvoir pathogène :

Le genre *Bacillus* renferme des espèces pathogènes des insectes comme *B. larvae*, *B. popilliae*, *B. lentimorbis*, *B. thuringiensis*. D'autres espèces pathogènes pour les animaux ; *B. cereus*, *B. circulans*, *B. anthracis*, ont été isolées des infections humaines (Todar, 2003).

2.6. Sensibilité aux antibiotiques:

Les *Bacillus* sont généralement sensibles à l'acide clavulanique, l'amoxicilline, la gentamicine, l'amikacine, la tétracycline. Ils sont souvent résistants à la lincomycine, colistine et fréquemment à la fosfomycine (Todar, 2003).

2.7. Caractères physiologiques:

Les caractéristiques générales du genre *Bacillus* sont résumées dans le tableau 2.1 :

Tableau 2.1 : caractéristiques des *Bacillus* (Guiraud, 1998)

	<i>B. alvei</i>	<i>B. circulans</i>	<i>B. macerans</i>	<i>B. polymyxa</i>	<i>B. anthracis</i>	<i>B. cereus</i>	<i>B. firmus</i>	<i>B. lentus</i>	<i>B. licheniformis</i>	<i>B. megaterium</i>	<i>B. pantothenicus</i>	<i>B. pumilus</i>	<i>B. subtilis</i>	<i>B. thuringiensis</i>	<i>B. brevis</i>	<i>B. pasteurii</i>	<i>B. sphaerisus</i>	<i>B. coagulans</i>	<i>B. stearothermophilus</i>
Groupe selon Priest	I	I	I	I	II	II	II	II	II	II	II	II	II	II	III	IV	IV	IV	IV
Morphologie sporale*	2	2	2	2	1	1	1	1	1	1	1/2	1	1	1	2	3	3	1/2	2
Position de la spore	C/T	C/T	T	C/T	C	C	C	C	C	C	T	C	C	C	C/T	T	T	C/T	T
Culture anaérobie	+	V	+	+	+	+	-	-	+	-	+	-	-	+	-	-	-	+	-
Acide sur glucose	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	V	-	-	+	+
Gaz sur glucose	-	-	+	+	-	-	-	-	V	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Mobilité	V	V	+	+	-	V	V	V	+	V	-	+	+	V	+	+	+	+	+
Retard sur glucose	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Acétoïne	+	-	-	+	+	+	-	-	+	-	-	+	+	+	-	-	-	V	-
Indole	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	V	-	-	-
Citrate	-	V	-	-	V	V	-	-	V	+	V	+	V	V	V	-	V	-	-
Amidon	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	-	-	-	+	+
Caséine	+	V	-	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	V	V	V	V
Gélatine	+	V	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	V	V	-	+
Lécithine	V	-	V	V	+	+	-	-	-	-	V	-	-	+	V	-	-	-	+
Uréase	-	V	-	-	V	V	-	+	-	V	-	-	-	V	-	+	V	-	V
Nitrate	-	V	+	+	+	+	+	-	+	V	V	-	+	+	V	V	-	V	V
Culture à 45 °C	V	+	+	V	-	V	V	-	+	V	+	+	+	+	+	-	V	+	V
Culture à 55 °C	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	V	-	V	-	-	+	+
Culture à 65 °C	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+

*selon Bergey's Manual : groupe 1= spore ovale non déformante ; groupe 2 = spore ovale déformante ; groupe 3 = spore sphérique déformante.

V : variable ; C : spore centrale ; T : terminale

2.8. Technique d'isolement:

Les espèces du genre *Bacillus* sont facilement isolées et aisément développées au laboratoire. La technique la plus simple est d'exposer un échantillon de sol dilué à 80 °C pendant 15 minutes pour les formes sporulantes aérobies, puis l'étaler sur gélose nutritive et l'incuber à 37°C pendant 24 heures ou quelques jours. Les premiers caractères d'identification renferment la catalase positive, Gram positif et la formation de spores (Toudar, 2003)

Pour la numération ou l'isolement en milieu solide, les milieux les plus utilisés sont la gélose glucosée au pourpre de bromocrésol (BCP) (=DTA : Dextrose Triptone Agar) ou le lait gélosé.

La numération en milieu liquide se fait sur bouillon glucosé au BCP (=DTB) ou bouillon TSB (tryptone Soya broth). La numération des formes végétatives doit faire appel à des milieux plus sélectifs ou différentiels.

La culture des *Bacillus* isolés s'effectue facilement sur les milieux de culture classiques comme le bouillon nutritif ou la gélose nutritive ordinaire (Guiraud, 1998).

2.9. Caractéristiques de quelques espèces du genre *Bacillus*:

Bacillus coagulans :

Inclue des souches acidophiles .les spores sont présentes dans les sols. Peut se multiplier dans les aliments acides.

Bacillus macerans:

La plupart de ses souches fixent N₂ dans des conditions anaérobies. Dégrade les polysaccharides des pectines. Quelques souches modérément thermophiles. En outre a été trouvé dans les fruits conservés à PH 3,8.

Bacillus polymyxa:

Colonies mycoïdes, visqueuses. Synthétise la capsule, dégrade la pectine et les polysaccharides végétaux, fixe l'azote dans les conditions anaérobies. Les spores communes. Produit l'antibiotique polimyxyine.

Bacillus cereus :

Bactérie aéro-anaérobie thermophile (certaines souches peuvent se développer à 6°C), très répandue dans le sol, sur les végétaux, en particulier les céréales, la peau de animaux

..etc. (Guiraud, 1998). *B. cereus* est utilisée dans la lutte biologique contre la rouille du poireau (Gourgau et sanglier, 1992).

Bacillus thuringiensis:

Se distingue de *Bacillus cereus* par pathogénicité pour des insectes de lépidoptère, et la formation de spore. Elle forme le principal insecticide biologique commercialisé à grande échelle (Gourgau et sanglier, 1992).

Bacillus megaterium:

Cellule de grande taille, génératrice de spores, aérobies. Se développe dans le milieu minimal sans aucun facteur supplémentaire de croissance. Les spores sont communes dans le sol.

Bacillus pumilus:

Les spores ubiquistes, se reproduit dans le sol plus fréquemment que ceux *Bacillus subtilis*.

Bacillus subtilis.:

De génome contenant 4.2 millions de paires de bases, *B. subtilis* n'est pas pathogène pour l'homme et ne produit pas d'endotoxines et peut être facilement cultivé dans des fermenteurs de volume important. Le problème majeur de l'utilisation de *B. subtilis* est la faible expression des gènes. Seulement quelques protéines ont pu être produites à taux supérieur à 1% de la totalité des protéines cellulaires. *B. subtilis* dégrade la pectine et les polysaccharides végétaux. Se développe dans un milieu minimal sans facteurs de croissance. Endospores communes. Une grande partie d'informations sur la biologie, la biochimie et la génétique de la cellule Gram positive, sont dérivées de l'étude de *B.subtilis* (Gougau et Sanglier, 1992 ; Prescott *et al.*, 2003).

2.10. Mode d'action de *Bacillus* spp, dans la lutte biologique contre les maladies fongiques des plantes:

Les *Bacillus* sont des agents de base dans la lutte biologique. Ils ont un grand potentiel d'être intégrés dans le système de gestions des parasites. Le potentiel du système de gestion intégrée est défini comme la gestion des parasites par la combinaison biologique, culturale, physique et outils chimiques d'une manière à minimiser les risques économiques, de santé et de l'environnement. La combinaison des agents de lutte biologique dans lutte des maladies

des plantes dépend de l'interaction avec l'hôte, le plus généralement par colonisation ou établissement sur le phyllosphère ou le rhizosphère, ou par induction de la résistance. Ce-ci est clairement affecté par l'environnement; les mélanges peuvent confronter les pathogènes à différents modes d'action. (Jacobsen, 2004).

Dans un contexte de lutte biologique contre des pathogènes des végétaux, *Bacillus* spp utilise beaucoup de moyens dont les antibiotiques, enzymes, ou d'autres métabolites actifs et antagonistes :

- **Le biocontrôle de *Fusarium moniliforme* par *B. subtilis* RRC 101 (5.994.117) *in vitro* :**

B. subtilis inhibe les mycètes *in vitro* sur le milieu de PDA (Potato Dextrose Agar), des zones d'initiation ont été observées avec des isolats de *Fusarium moniliforme* après 3 à 7 jours d'incubation dans l'obscurité à 25 à 27°C. D'autres champignons ont été également inhibés : *Pythium* sp, *Rhizotonia solani*, *Cladosporium* sp. Le fait que *B. subtilis* étant endophytique, une expérience faite sur les racines de jeunes plantes de maïs cultivée en pot, infectée par *Fusarium moniliforme*, a montré que la bactérie empêche non seulement le mycète de coloniser la plante mais elle a également réduit la quantité de *Fusarium* à 50 % quand la plante est cultivée sous régime d'arrosage normale (Bacon *et al.*, 2001) .

- **Le biocontrôle de la rouille d'arachide et la pourriture du citron par *B. subtilis* AF₁ *in vitro* :**

Parmi les N-Acétyl Glucosaminidases (NAGase) de cette bactérie, une protéine de 67 KDa a démontré un potentiel chitinolytique. Cette protéine a inhibé effectivement la croissance d'*Aspergillus niger* et a réduit la germination de la conidie de *Puccinia arachidis* à 96%. Dans un essai biologique sur des feuilles détachées infectées par *Puccinia arachidis* la NAGase a donné une réduction de la fréquence des lésions, causées par la rouille, de plus de 60 %.

NAGase étaient également fortement efficace dans la réduction de la pourriture du citron causée par *Aspergillus niger*. (Van Lentern, 2006).

- **Inhibition de *Fusarium oxysporum* par *B. subtilis* L194 *in vitro* :**

L'extrait de la souche bactérienne lysée a été testé par la méthode de diffusion des puits pour une activité antifongique. Des substances purifiées de l'extrait présentaient des caractéristiques de lipopeptides ont montré une activité antifongique contre différentes souches de *Fusarium oxysporum* ; mais non actives contre les bactéries pathogènes. (Ben Slimène *et al.*, 2006) .

- **Inhibition de *Rhizoctonia solani*, *Pythium aphanidermatum* par *B. megaterium*² in vitro :**

B. megaterium 153.2.2 s'est avéré chimiotactique aux exsudats de la graine de soja, de tomate, notamment en réponse de la présence d'acides aminés: alanine, asparagine, glutamine, serine. Cette bactérie est concurrentielle et sa persistance permet de combattre les germes pathogènes tels que : *Rhizoctonia solani* et *Pythium* spp (Nelson, 2004).

- **Inhibition de la croissance de *Pythium aphanidermatum*, *Pythium ultimum* par *B. cereus* UW 85 :**

Les associations de microorganismes-plantes peuvent empêcher le développement des microbes pathogènes avant l'infection. *Bacillus cereus* UW85 produit au moins deux antibiotiques : zwittermycine A et kanosamine qui jouent un rôle dans la suppression de *Pythium ultimum*. Le premier présente une large activité contre les oomycètes et les bactéries cependant, la kanosamine est moins active contre ces champignons. Ces antibiotiques augmentent de quantités par les exsudats de graine et de jeunes plantes (Nelson, 2004).

- **Le *Bacillus subtilis* O5T 713 sous une forme de produit commercialisé :**

C'est un produit à base de *B. subtilis* OST713. Il est actuellement disponible comme poudre maniable, ce produit est annoncé pour avoir un spectre d'activité incluant plus de 40 maladies des plantes telles que la pourriture grise (*B. cinerea*), *R. solani*, *Pythium ultimum* et plusieurs maladies. La bactérie est présumée de travailler par un certain nombre de modes d'action tels que : la concurrence, parasitisme, antibiose (Belanger, 2001).

- ***B. subtilis* var amylolytique *faciens* FZB24 :**

Ce produit est un mélange de *B. amylolyquefaciens* et *B. subtilis* pour le biocontrôle des diverses maladies fongiques dans les récoltes non alimentaires, mais seulement en serres chaudes et pour les plantes. Ce produit est lancée sur le marché par le laboratoire FZB Biotechnique en Allemagne et apparaît efficace (Belanger, 2001).

Conclusion

Pour des raisons économiques, les systèmes agricoles visent l'amélioration des productions par l'intensification des cultures, cette dernière est souvent accompagnée par une mauvaise maîtrise des techniques culturales, l'absence d'une fertilisation judicieuse et une mauvaise couverture phytosanitaire. Ces facteurs contribuent à l'augmentation des potentiels infectieux des sols et l'aggravation des maladies qui limitent la qualité et la quantité des productions agricoles. Parmi les agents de ces maladies les champignons pathogènes, la lutte contre ces agents pathogènes apparaît plus efficace par l'utilisation d'agents de lutte biologique ; des microorganismes tel que la bactérie *Bacillus*

La lutte biologique est née d'un certain échec de la lutte chimique, et a prouvé qu'elle forme une alternative viable de la lutte chimique à raison de ses avantages concernant les enjeux économiques ainsi que l'équilibre biologique et environnemental et a cause que les méthodes de lutte biologique sont en extension même dans les systèmes agricoles de production intensive.

Par ailleurs, la lutte biologique ne peut convenir à toutes les situations de maladies, il y à plusieurs cas vu la lutte biologique ne peut fonctionner comme dans la cas de la punaise terne.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

1. Bacon, C.W., Yates, I.E., Hinton, D.M., and Meredith, F. (2001). Biological control of *Fusarium moniliforme* in Maize. Environmental Health Perspectives; vo1 09:325-332.
2. Belanger, R.R. (2001). Biological control in greenhouse systems Annu. Tour. phytopathol, 39:104-125.
3. Ben Slimène, I., Tabben, O., Aouani, M.L. and Limam, F. (2006). Production de lipopeptides antifongiques par une souche de *Bacillus subtilis*. X^{ièmes} journées scientifiques –AUF– Constantine. 8-11 Mai 2006, 215-216.
4. Corbaz, R. (1990). Principes de phytopathologie et de lutte contre les maladies des plantes. Presses polytechniques et universitaires ramandes. Première édition, 205p.
5. Gilbert, M. (2001).SC:EIB, lutte biologique et écologie spatiale. (<http://www.ulb.ac.be/>)
6. Guiraud, J.P. (1998). Microbiologie alimentaire. DUNOD,Ed. Paris, 301-305pp.
7. Jacobsen, B.J., Zidack, N.K. and Larson, B.j. (2004).The role of *Bacillus* based biological control agents in integrated pest management systems. Plant diseases. Phytopathology, 94: 1275 -1275.
8. Kouassi, M. (2001). La lutte biologique : une alternative viable à l'utilisation des pesticides.Vertig O –La revue en science de l'environnement sur le Web ,Vol 2 No2. (<http://www. Vertigo.uqam.ca/>)
9. Gourgaud, L.M. and Sanglier, J.J. (1992). Biotechnologie. DOIN Ed., Paris, 564 -569pp.
10. Lepoivre, P. (2003). Phytopathologie : Bases moléculaires et biologiques des pathosystèmes et fondements des stratégies de lutte. De Boeck. Ed. Première édition. .125-291-292.
11. Manjula, M., Kishore, G.K., and Podile, A.R. (2004). Whole cells of *Bacillus subtilis* AF1 proved more effective than cell free and chitinase based formulations in biological control of citrus fruit rot and groundnut rust. Can. J. Microbiol, 50: 737-744.
12. Nelson, E.B. (2004). Microbial dynamics and interactions in spermosphere. Ann. Rev. Phtopathol., 42: 271-309.
13. Prescott ,L.M., Harley, J.P. and Klein, D.A. (2003). Microbiologie. Edition De boeck Ed. 2^{ième} édition française, 525-526PP.
14. Todar, k. (2003). Online textbook. Emertitus, University of Wisconsin-Madison. Department of bacteriology. (<http://www.textbookofbacteriology.net/>).
15. Toua, D. (1996).Essais d'utilisation de *Pseudomonas fluorescens* antagonistes dans le biocontrole de *Fusarium oxysporum* f.sp. *lycopersici* et *Verticillium dahliae* sur tomate et

dans la promotion de la croissance végétale. Thèse pour l'obtention de diplôme de magister en sciences agronomiques. El-Harrach,8-14 pp.

16. Van Lenteren, J.C. (2006). IOBC Internet Book of Biological Control , 3:14-39p.
17. Vincent, C., Panneton, B., and Lessard, F.F. (2000). La Lutte physique en phythoprotection. Institut National de la Recherche Agronomique,12p.

Résumé

La lutte biologique par l'utilisation de microorganismes est un moyen efficace pour réduire les maladies causées par plusieurs champignons phytopathogènes.

Cette nouvelle méthode apparaît fréquemment efficace dans le cas d'utilisation d'espèces du genre *Bacillus*. Cette efficacité est due à plusieurs substances sécrétées par la bactérie : des métabolites, des enzymes ou des antibiotiques.

Parmi les avantages de la lutte la lutte biologique, on peut citer, l'élimination des effets secondaires des pesticides sur l'équilibre de l'environnement et surtout l'élimination de la pollution et la toxicité provoquer par les produits de la lutte chimique.

La lutte biologique reste toujours au cours de développement ; donc il est souhaitable de poursuivre les travaux concernant la compréhension, le développement et ainsi la détermination d'autres mécanismes en jeu.

Mots clés : lutte biologique, biocontrôle, *Bacillus* sp.

:

Bacillus

:

Bacillus sp.

: