



Réf :/UAMOB/FSNVST/2024

MEMOIRE DE FIN D'ETUDE
EN VUE DE L'OBTENTION DU DIPLÔME DE MASTER

Domaine : SNV. Filière : Sciences biologiques.

Spécialité : Microbiologie Appliquée.

Présenté par :

BOURAHLA Samah & SAIDI Dania

Thème

**Etude de la flore microbiologique des graines
du *Pinus halepensis*.**

Soutenu le : 25/06/2024

Devant le jury composé de :

Nom et Prénom

Grade

Mme BACHOUCHE

MCB

Univ. De Bouira

Présidente

Mr. KADRI N

Professeur

Univ. De Bouira

Promoteur

Mme. BACHIRI T

MCB

Univ. De Bouira

Co-promotrice

Mme. MEDBOUA C

MCB

Univ. De Bouira

Examinatrice

Année Universitaire : 2023/2024

Remerciement

Au début, nous souhaitons adresser nos remerciements les plus sincères aux personnes qui nous ont apporté leur aide et qui ont contribué à l'élaboration de ce mémoire.

Nous tenons à remercier chaleureusement notre promoteur Mr KADRJ.N pour son soutien et sa guidance tout au long de ce projet de recherche.

Nos remerciements les plus sincères vont à Mme BACHIRJ.T, notre Co-promotrice qui nous a toujours accueillies avec une grande sympathie et bienveillance tout au long de ce travail. Son encadrement exceptionnel, son aide et ses remarques constructives, nous ont été très précieux. C'est grâce à elle que nous sommes parvenues à achever ce travail. Merci pour votre disponibilité et votre écoute.

Nous tenons à remercier également à exprimer notre gratitude à Mme BACHOUCH.E.N pour avoir gracieusement accepté de présider ce jury, ainsi qu'à Mme MEDBOUA.CH pour avoir accepté de faire partie du jury et d'évaluer notre travail.

Nos sincères remerciements vont également aux ingénieurs des laboratoires SNVST en particulier Mme GHERBI.F qui a apporté sa pierre à l'édifice et qui sans elle, ce travail n'aurait jamais vu le jour.



Dédicace

*Du profond de mon cœur, je dédie ce modeste travail à tous ceux qui me sont chers. À mon défunt grand-père **Guidou**, j'espère que de là où il est doit être extrêmement fier de cet accomplissement.*

*À mes **chers parents**, mes héros qui ont toujours cru en moi, même lorsque je doutais de moi-même, votre persévérance, votre dévouement et votre amour pour l'instruction ont été mes plus grandes sources de motivation. Papa, Mama, Que cette réussite soit l'exaucement de vos vœux tant formulés, le fruit de vos innombrables sacrifices. Ce succès est autant le vôtre que le mien.*

*À mon seul et unique frère **Ramzi**, que je n'échangerai pour rien au monde, à qui je souhaite la réussite dans son baccalauréat et dans d'autres succès.*

*À ma très chère tante **Nawel**, ma Tatati d'amour, ma complice, ma confidente, ta présence à mes côtés et ton support inconditionnel ont été les moteurs qui m'ont propulsée vers de nouveaux horizons.*

*À ma famille élargie, à mes grands-parents, à mes tantes, oncles, cousins et cousines, en particulier **Lydia** et **Samer**, dont le soutien et les encouragements ont été une source de force et de courage.*

*À mes sauveurs **Ines** et **Akram**, qui m'ont toujours conseillée, épaulée et aidée au mieux et qu'ils se sont investis dans ce travail tout autant que moi.*

*À **SAIDI Dania** mon cher binôme et copine, avec qui j'ai partagé ce voyage académique. Aujourd'hui, nous célébrons l'aboutissement de ce projet, fruit de notre collaboration fructueuse. Je suis infiniment reconnaissante d'avoir partagé cette étape importante avec toi. Merci pour tout. Je te souhaite un avenir brillant, rempli de succès et de bonheur.*

*À tous mes proches **Celena**, **Elina**, **Hiba**, **Noureddine** et **Youcef** merci pour votre soutien je vous dédie ce mémoire en souvenirs des bons moments passés ensemble.*

Samah



Dédicace

À Dieu Tout-Puissant,

Pour Ta grâce infinie, Ta guidance constante et Ta protection tout au long de mon parcours. Merci de m'avoir donné la force, la sagesse et la persévérance nécessaires pour accomplir ce travail.

À ma chère mère

La lumière de mes jours, la source de mes efforts. Merci pour ton amour, ta patience infinie, tes sacrifices, tes précieux conseils et pour toute ton assistance et ta présence dans ma vie. Merci pour tout ce que tu fais et pour tout ce que tu es.

À mon cher père

Ma fierté, mon modèle, mon héros, l'épaule solide et mon exemple éternel qui a attendu avec patience les fruits de sa bonne éducation. Merci pour ta présence, ton soutien indéfectible, tes encouragements constants, pour toutes les valeurs que tu m'as transmises et pour ta foi inébranlable en mes capacités.

Papa, Maman, je ne pourrais jamais vous remercier assez d'avoir fait de moi ce que je suis aujourd'hui.

À mes chères sœurs Katia et Lyna

Pour votre innocence, vos rires et votre joie de vivre qui m'ont apporté tant de bonheur. Je serai toujours à vos côtés.

À toute ma famille : grand et petit

À mes grands-parents décédés

Vous êtes toujours présent dans mon cœur et mes pensées, et ce travail est dédié à votre mémoire.

À mon défunt grand père Saïd, ton sourire et ta bonne humeur me manquent. Je n'oublierai jamais tout ce que tu as fait pour moi, merci « Jeddi ». Je te promets de garder ton souvenir bien vivant dans mon cœur.

À mes chères amies

Asma, Lilia, Yamina, Thafrara, Celia, Leticia, Sara et fadhma, qui ont partagé mes joies, mes peines et mes succès. Votre amitié est un trésor que je chérirai toujours.

À toutes les personnes qui m'aiment et à celles que j'aime. Et à ceux qui m'ont soutenu et qui ont cru en moi et m'ont encouragé.

Enfin, je dédie ce travail à mon binôme et meilleure copine Samah, Pour ton soutien indéfectible, ta collaboration inestimable et ton amitié précieuse tout au long de ce projet. Ton engagement, ta patience et ta détermination ont été les éléments clés de notre réussite. Merci pour ton travail acharné et les moments de camaraderie que nous avons partagés et que je n'oublierai jamais.

Dania

Sommaire

| | |
|--|----|
| INTRODUCTION | 1 |
| I REVUE DE LA LITTERATURE | 3 |
| I.1 Généralités sur le <i>P.halepensis</i> | 4 |
| I.1.1 Biogéographie et Répartition | 4 |
| I.1.2 Description botanique de la plante | 5 |
| I.1.3 Exigences écologiques de l'espèce | 6 |
| I.1.4 Phytochimie de <i>P.halepensis</i> | 7 |
| I.1.5 Les propriétés pharmacologiques de <i>P.halepensis</i> | 8 |
| I.2 Le microbiote des plantes | 11 |
| I.3 Généralités sur les enzymes | 12 |
| I.3.1 Les enzymes | 12 |
| II Partie II : Matériels et méthodes | 14 |
| II.1 Objectif du travail | 15 |
| II.2 Echantillonnage | 15 |
| II.3 Isolement et purifications des souches | 16 |
| II.3.1 La recherche des bactéries a Gram positif | 16 |
| II.3.2 La recherche des bactéries a Gram négatif | 17 |
| II.4 Identification des souches | 17 |
| II.5 Extraction des protéines | 17 |
| II.5.1 Protéines extracellulaires | 17 |
| II.5.2 Protéines intracellulaires | 17 |
| II.6 Dosage des protéines | 18 |
| II.6.1 Mode opératoire | 18 |
| II.7 Mise en évidence de l'activité enzymatique | 18 |
| II.8 Mise en évidence de l'activité antibactérienne | 18 |
| III RESULTATS | 20 |

| | | |
|---------|--|----|
| III.1 | Les souches bactériennes..... | 21 |
| III.1.1 | La recherche des Gram positifs..... | 21 |
| III.1.2 | La recherche des bactéries a Gram négatif | 22 |
| III.2 | Extraction et dosage des protéines : | 23 |
| III.3 | Résultats de la mise en évidence des activités enzymatiques..... | 25 |
| III.4 | Résultats de l'activité antibactérienne :..... | 26 |
| IV | DISCUSSION..... | 27 |
| V | Conclusion et perspectives..... | 30 |
| | REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES..... | 32 |
| | ANNEXES..... | 40 |

Liste des figures

| | |
|--|----|
| Figure 1 Aire de répartition du pin d'Alep dans le monde et en Algérie. | 5 |
| Figure 2: Schéma représentatif des différentes parties de pin d'Alep. | 6 |
| Figure 3: Abondance relative des bactéries et archées des sols de France métropolitaine | 11 |
| Figure 4: Carte géographique illustrant les différents lieux de récolte des cônes de <i>P.halepensis</i> au niveau de la wilaya de Bouira. | 15 |
| Figure 5: Récapitulatif des étapes d'isolement à partir des graines. | 16 |
| Figure 6 : Pourcentages des souches à Gram + et Gram – isolées..... | 21 |
| Figure 7: Les colonies des souches appartenant au genre A : <i>Bacillus</i> et B : <i>Staphylococcus</i> sur milieu Chapman | 22 |
| Figure 8 : Les colonies des souches appartenant au genre A : <i>Pseudomonas</i> et B : <i>Klebsiella</i> sur milieu EMB..... | 23 |
| Figure 9: Le pourcentage des souches isolées à partir des graines de <i>P.halepensis</i> | 23 |
| Figure 10: La teneur en protéines des extraits des souches a Gram négatif | 24 |
| Figure 11: La teneur en protéines des extraits extracellulaires des souches a Gram positif... .. | 24 |
| Figure 12: Résultat de l'activité protéolytique | 25 |
| Figure 13: Résultat de l'activité cellulolytique | 25 |
| Figure 14: Le taux d'activités enzymatiques des extraits protéiques extracellulaires de chaque souche. | 26 |
| Figure 15: Résultat de l'activité antibactérienne des extraits protéolytique contre <i>Staphylococcus aureus</i> | 26 |

Liste des abréviations

pH: Potentiel Hydrogène

LC/MC: Chromatographie Liquide Couplée A La Spectrométrie De Masse

GC/MS: Chromatographie Gazeuse Couplée A La Spectrométrie De Masse

DPPH: 2,2-Diphenyl-1-Picrylhydrazyl

FRAP: Ferric Reducing Ability Of Plasma

Gélose EMB: Éosine Méthylène Bleu

Gélose MRS: Gelose Man, Rogosa Et Sharpe

BN: Bouillon Nutritif

CC: Cœur Cerveille

TSI: Le Triple Sugar Iron

LAC: Lactose

GLU: Glucose

PBS: Phosphate-Buffered Saline

SDS: Sodium Dodecyl Sulfate

INTRODUCTION

Les interactions complexes entre les plantes et les micro-organismes jouent un rôle fondamental dans la santé et la productivité des écosystèmes terrestres. Le microbiote des plantes, un ensemble diversifié de bactéries, champignons, virus et autres microbes, colonise différentes parties des plantes telles que les racines (rhizosphère), les feuilles (phyllosphère) et même l'intérieur des tissus végétaux (endosphère) [1]. Ce microbiome végétal influence des processus clés tels que la nutrition, la croissance, la protection contre les pathogènes et la réponse aux stress environnementaux.

Parmi les espèces végétales étudiées, le Pin d'Alep (*Pinus halepensis*) qui a été décrit pour la première fois en 1755 par Duiiamel sous le nom de *Pinos hiero, soliviitana*, puis en 1768 par Philip Miller sous le nom de *Pinus halepensis* [2] occupe une place particulière. Cet arbre, largement répandu dans le bassin méditerranéen, est bien adapté aux conditions climatiques de cette région, caractérisées par des étés chauds et secs et des hivers doux et pluvieux [2]. Le Pin d'Alep joue un rôle crucial dans la prévention de l'érosion des sols, la protection des bassins versants et la conservation de la biodiversité. Sa capacité à pousser sur des sols pauvres et rocheux en fait une espèce idéale pour la reforestation et la réhabilitation des terrains dégradés [3].

L'intérêt scientifique pour le Pin d'Alep s'étend également à ses propriétés biochimiques, notamment l'activité enzymatique de ses extraits protéiques. Les enzymes extraites du *P.halepensis* jouent des rôles essentiels dans divers processus métaboliques, tels que la dégradation des polysaccharides complexes en sucres simples, essentiels pour la nutrition et la croissance des plantes. Certaines de ces enzymes possèdent des propriétés antioxydantes, protégeant les cellules végétales contre les dommages oxydatifs causés par des stress environnementaux[4]. Ces enzymes présentent également des applications potentielles dans divers secteurs industriels, notamment l'agroalimentaire et la production de biocarburants [5].

Outre, les propriétés biochimiques et microbiologiques de pin d'Alep peuvent être essentielle pour le développement de pratiques agricoles durables et la conservation des écosystèmes naturels [6]. Dans ce contexte nous avons orienté notre étude sur la caractérisation microbiologique des graines de *P.halepensis* étant donné qu'elle est la partie alimentaire de la plante en suivant la démarche expérimentale suivante :

- Isolement et identification des souches bactériennes à partir des échantillons des graines de *P.halepensis*.

- Extraction des protéines bactériennes et dosage de celle-ci.
- Evaluation de certaines activités enzymatiques des extraits bactériens obtenus afin de mieux comprendre les fonctions et les capacités métaboliques des micro-organismes présents dans les graines de *P.halepensis*.

PARTIE I

REVUE DE LA LITTERATURE

I.1 Généralités sur le *P.halepensis*

Le pin d'Alep (*P.halepensis*) est un des arbres les plus communs dans l'ouest du bassin méditerranéen, où il occupe environ 3,5 millions d'hectares [2]. C'est l'espèce la plus commune dans les reboisements pour la conservation des sols. C'est une espèce qui supporte très bien la sécheresse et supporte mal les autres facteurs à savoir les sols pauvres, climat aride, etc. Elle colonise à peu près toutes les stations subhumides et semi-arides.[2]

Selon NAHAL.I (1962) [2] le *P.halepensis* appartient à :

- Embranchement : Phanérogames.
- Sous embranchement : Gymnospermes.
- Classe : Conifères.
- Ordre : Coniféroles pinoidines
- Sous ordre : Abiétales
- Famille :Pinaceae.
- Genre : Pinus.
- Sous genre : Eupinus.
- Espèce : *Pinus halepensis*.
- Nom scientifique : *Pinus halepensis*.
- Nom commun : Pin d'Alep
- Nom arabe: Sanaoubar al-halabi

I.1.1 Biogéographie et Répartition

Le pin d'Alep est largement répandu sur le pourtour méditerranéen, c'est une espèce qu'on trouve essentiellement en région méditerranéenne occidentale et en divers points du bassin méditerranéen oriental. Ses forêts occupent plus de 3,5 millions d'hectares [2] et s'étendent de l'Afrique du Nord (Maroc, Algérie, Tunisie et Libye) et du Moyen Orient (Syrie, Liban, Jordanie, Palestine et Turquie), jusqu'en Europe méridionale méditerranée (Grèce orientale, Croatie, Italie du Nord, Est de la France et Espagne orientale)[7]

Les régions forestières d'Algérie abritent un nombre important de pins d'Alep, représentant environ 35 % de la couverture totale. Ces arbres majestueux se trouvent dans divers endroits et

régions du pays tels que Sidi-Bel-Abbès, Saïda, Tlemcen, Tiaret, Médéa, Monts des Bibans, Monts des Oulad Nail, les Aurès, région de Tébessa[2](figure 1).

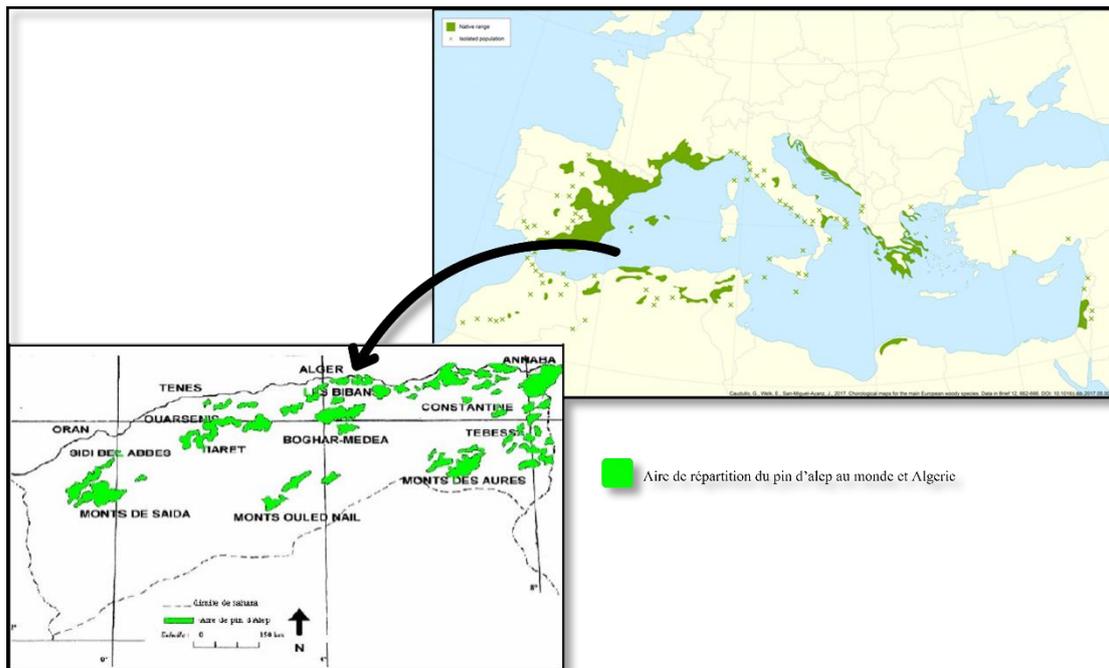


Figure 1 Aire de répartition du pin d'Alep dans le monde et en Algérie.

I.1.2 Description botanique de la plante

Le pin d'Alep est un arbre toujours vert, sa hauteur totale est comprise entre 10 et 27m, sa longévité n'excède pas 150 ans. Au tronc tortueux, irrégulier et branchu (figure 2)[2].

I.1.2.1 L'Écorce

Riche en tannin, l'écorce est d'abord lisse de couleur argentée, puis devient crevassée avec des écailles de couleur gris-brunâtre [2].

I.1.2.2 Les aiguilles

Sont appariées par paires dans le brachyblaste (rarement 3 à 5), de forme filiforme, molles, vert jaunâtre, ayant une épaisseur inférieure à 1 mm d'épaisseur, avec 6 à 10 cm de long [2]

I.1.2.3 Les bourgeons

Non résineux, ils sont cylindriques, allongés, à écailles brunes libres frangées de blanc[2].

I.1.2.4 Cônes

Oblongs roussâtres, de 6 à 7 mm, très nombreux et ramassés autour des bourgeons à l'extrémité des rameaux, à maturité, les sacs polliniques libèrent un pollen très abondant emporté par le vent (anémogamie)[2].

I.1.2.5 Les rameaux

Ils sont vert clair, puis gris clair, assez fins, polycyclique car cet arbre fait souvent une seconde pousse la même année [2].

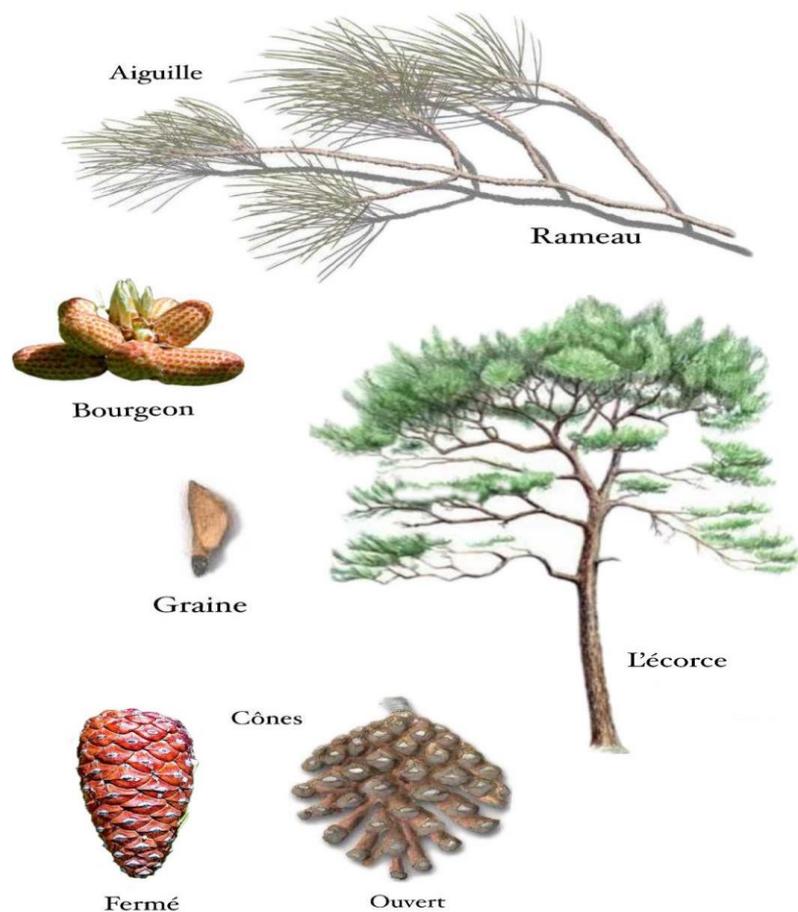


Figure 2: Schéma représentatif des différentes parties de pin d'Alep.

I.1.3 Exigences écologiques de l'espèce

Le pin d'Alep (*Phalepensis*) est un conifère emblématique du bassin méditerranéen, remarquable pour sa résilience et son adaptation aux conditions climatiques parfois rudes de la région [2].

- Climat : Son développement optimal se situe dans le bioclimat semi-aride à hiver frais. Abondant dans la variante à hiver frais où se trouve la majeure partie de ses peuplements. On peut néanmoins le trouver dans des variantes chaudes, douces, tempérées [2].
- Pluviosité : 220 à 1000 mm ; optimum 450 à 500 mm dans les régions bien arrosées, il préfère les stations chaudes et bien drainées [2].
- Température : La moyenne des minima de mois n'est pas inférieure à 0°. Minima absolus : -15° à -18°C à condition que le froid soit de courte durée.
- Vent : craint les embruns et les brumes [2].
- Milieu édaphique : Accepte les terrains calcaires à structures graveleuses, bruns steppiques et non les argileux [2].

Le *Pinus halepensis* ne montre aucune préférence pour la composition de la roche mère ou les niveaux de pH du sol. Il prospère dans les zones calcaires abondantes, peut s'adapter aux sols argileux, mais évite les sols à faible rétention d'eau, comme le sable profond [2].

I.1.4 Phytochimie de *P.halepensis*

le pin d'Alep est un arbre intéressant d'un point de vue phytochimique, ce qui signifie qu'il produit une variété de produits chimiques comme :

I.1.4.1 Les vitamines

L'huile de pin est riche en vitamines essentielles ; Il s'agit notamment des vitamines : E, F (connues pour leurs propriétés physiologiques élevées et antiacides), B1, B2, B3, vitamine pro A (bêta-carotène) et d'autres caroténoïdes[8].

I.1.4.2 Les éléments minéraux

L'huile de pin d'Alep contient du magnésium, du zinc, du fer, du cuivre et de l'iode. De plus, il contient du calcium, du phosphore et du manganèse. Ces composants, qui ont un impact positif sur la santé, sont en surabondance dans les graines de *P.halepensis*. [8]

I.1.4.3 Les lipides

L'analyse de la fraction lipidique polaire des graines de *P.halepensis* Mill du nord de l'Algérie est un sujet d'étude qui a idéalement à identifier et séparer différentes classes de glycolipides et de phospholipides des graines à l'aide de la chromatographie liquide et de la spectrométrie de masse (LC/MS). Les graines ont montré une forte teneur en lipides, avec un taux plus élevé de glycolipides que de phospholipides. [9]

Ces glycolipides jouent un rôle important dans divers processus biologiques et peuvent avoir des propriétés thérapeutiques potentielles en raison de leur composition en acides gras[9].

Une autre recherche a étudié le profil lipidique des graines de *Pinus halepensis* Mill, les résultats obtenues montrent la richesse en acides insaturés : l'acide linoléique (30 % à 59 %), l'acide oléique (17,4 % à 34,6 %) et d'autres acides saturés comme l'acide palmitique (8,75 %), myristique, myristoleique, palmitoléique, margarique, margaroleique, stéarique, linoléique, arachidique et eicosénoïque, ont été également détectés mais à des faibles teneurs. Les graines de pin contiennent entre 19,8 % et 36,7 % d'huile, entre 14,25 % et 26,62 % de protéines et entre 7,8 % et 8,6 % d'humidité ; de plus les éléments prédominants présents dans les graines sont le phosphore, le potassium et le magnésium. [10]

I.1.4.4 Huiles essentielles :

L'hydrodistillation (GC/MS) des vertèbres de *P. halepensis* a donné 0,3 % d'huile essentielle. Le profil chromatographique a montré que cette huile était majoritairement composée d'hydrocarbures sesquiterpéniques. Plus de 22 composés ont été identifiés, représentant 92,38 % de l'huile totale. Le composant majeur de notre HE est l'oxyde de caryophyllène (48,15%) [11].

I.1.4.5 Les acides aminés :

L'huile de pin contient également jusqu'à 5% de substances azotées, dont 90% sont les acides aminés, parmi lesquels 70% sont des amino-acides essentiels[8]

Les principaux acides aminés sont : l'acide glutamique (5,5% de poids sec) et l'arginine (4,0%) comprenant environ un tiers (environ 33%) des protéines de graines[12]

I.1.5 Les propriétés pharmacologiques de *P.halepensis*

De multiples études pharmacologiques menées par Fekih N et al.2014 [13] également par Kadri et ses collaborateurs en 2014 [14] ont confirmé que *P.halepensis* présente un large spectre d'activités biologiques liées à sa composition chimique

I.1.5.1 Activité antibactérienne

Une étude a mené à explorer la composition chimique des huiles essentielles de *P.halepensis* et à évaluer leurs activités antibactériennes qui a été extraite par hydrodistillation à partir des parties aériennes de *P. halepensis*. L'huile essentielle de *P. halepensis* a montré une forte activité antibactérienne contre des bactéries telles que

Staphylococcus aureus, *Klebsiella pneumoniae*, *Salmonella enterica Spp*, *Arizonae*, *Listeria innocua*, *Proteus mirabilis* et *Bacillus cereus* grâce à sa richesse en β -caryophyllène[15][13].

Cependant, elle n'était pas active contre *Escherichia coli* et *Pseudomonas aeruginosa*[15][13].

I.1.5.2 Activité antifongique

Une autre étude a visé le test d'activité antifongique de l'huile essentielle de pin d'Alep extraite par hydrodistillation. Cette dernière montre une activité antifongique contre chacun des *Aspergillus flavus*, *Aspergillus niger*, *Fusarium oxysporum* et *rhizopus stolonifer* évaluée par la méthode de diffusion en disque [11].

I.1.5.3 Activité anti-angiogénique

Une étude s'est intéressée par la recherche de l'activité anti-angiogénique de la fraction lipidique (lipides neutres, glycolipides, phospholipides) des graines de *P.halepensis* in vitro sur les cellules endothéliales, et in vivo sur la membrane chlorioallantoïque de l'embryon de poussin.

Les résultats suggèrent que la fraction lipidique (les lipides neutres, les glycolipides et les phospholipides) des graines de *P.halepensis*, présente des effets anti-angiogéniques. Il a été remarqué que l'activité anti-angiogénique des phospholipides et les glycolipides, faisant partie des fractions testées, a été plus forte que celle liées aux fractions lipidiques neutres[14].

I.1.5.4 Activité antioxydante

Des chercheurs ont extrait des polysaccharides à partir des graines de *P.halepensis* en utilisant différents solvants de précipitation tels que l'acétone, l'éthanol et le propanol. Ils ont ensuite évalué l'activité antioxydante de ces extraits. Les résultats ont montré que l'extrait obtenu avec de l'acétone présentait la plus forte activité antioxydante, mesurée à l'aide de méthodes telles que le test DPPH et le test FRAP. Ces polysaccharides pourraient donc être considérés comme une source potentielle d'antioxydants naturels, utiles pour lutter contre le stress oxydatif dans le corps. [16]

En plus de l'activité antioxydante, les chercheurs ont également étudié d'autres propriétés biologiques des polysaccharides extraits des graines de *P.halepensis*. Voici un aperçu des résultats :

I.1.5.5 Activité anti-inflammatoire :

Les extraits de polysaccharides ont montré une capacité à inhiber la dénaturation des protéines, ce qui suggère un potentiel anti-inflammatoire.

Ils ont également montré une activité anti protéinase, ce qui peut être bénéfique pour réduire l'inflammation.[16]

I.1.5.6 Activité anticoagulante :

Les polysaccharides ont été testés pour leur effet sur la coagulation sanguine. Ils ont montré une activité anticoagulante, ce qui pourrait avoir des implications dans la prévention des troubles de la coagulation.[16]

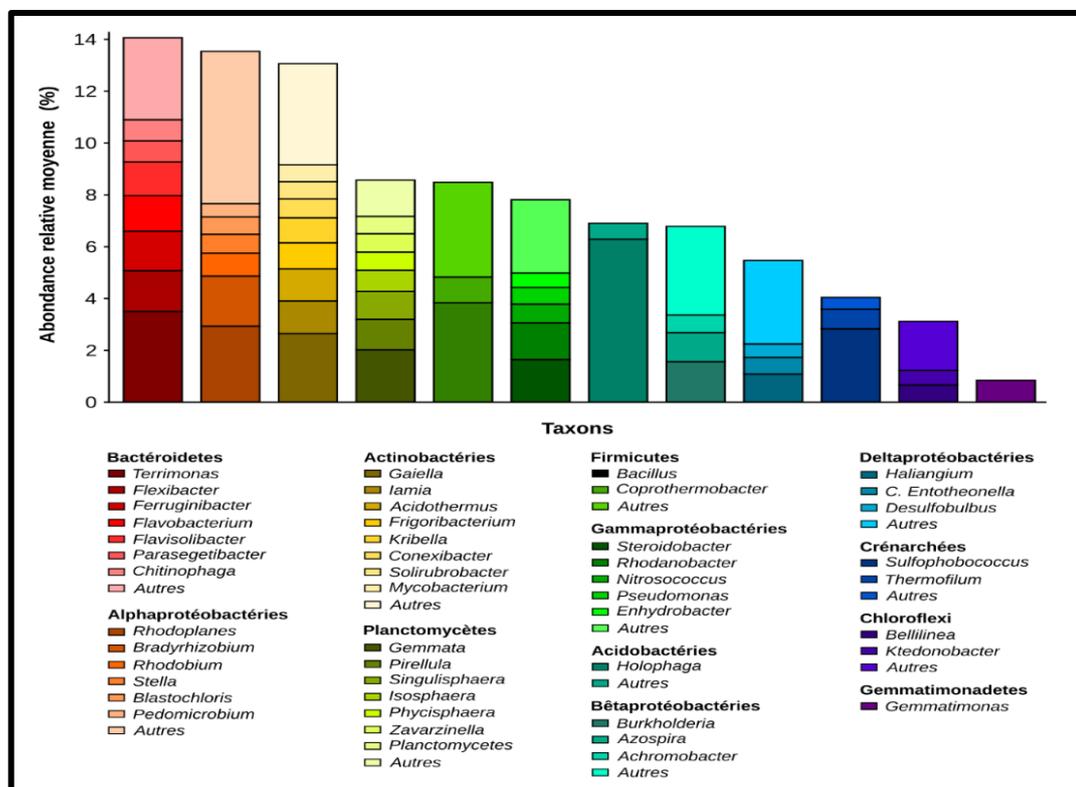
D'autres études ont démontré le potentiel hépato et néphroprotecteur [17], neuroprotecteur [18] et insecticide[19], ainsi qu'une activité herbicide[20] de l'huile essentielle de *P.halepensis* et des extraits de pins et de composés provenant du genre *Pinus* en particulier.

I.2 Le microbiote des plantes

Le microbiote des plantes est un ensemble complexe et diversifié de micro-organismes qui vivent à l'intérieur et à la surface des plantes. Ces micro-organismes comprennent principalement des bactéries, des champignons, des oomycètes et des archées qui interagissent avec la plante, étendent son répertoire génétique et contribuent à sa survie [21].

La composition du microbiote des plantes varie considérablement selon plusieurs éléments : son génotype, les caractéristiques de son environnement (type de sol, climat et autres facteurs environnementaux) et la capacité génétique des micro-organismes environnants à interagir avec celle-ci (**figure 3**) [22].

À titre d'exemple, le microbiote trouvé autour d'un plant de riz cultivé en Asie diffère en termes d'abondance et de diversité de celui autour d'un plant de blé cultivé en Afrique. Les deux varient considérablement. Notamment dans le blé les bactéries du phylum *Bacteroidetes* prévalent sur les *Proteobacteria* [23], mais pour le riz, c'est l'inverse [24]



catégorie « Autres » correspond à la somme de tous les genres de chaque phylum représentant moins de 0,5% des séquences d'ADN servant à l'identification des micro-organismes.

Figure 3: Abondance relative des bactéries et archées des sols de France métropolitaine [22]

Une seule étude a été réalisée sur la flore microbienne des graines de *Pinus halepensis* a révélé qu'*Escherichia coli* était l'espèce la plus fréquemment isolée [25].

I.3 Généralités sur les enzymes

Les enzymes sont des macromolécules protéiques de masse moléculaire élevée (de 10 à 1000 kilo daltons), capable de catalyser des réactions chimiques en stimulant leur vitesse d'au moins 10^6 fois, par rapport à la réaction en leur absence[26]. Elles sont également présentes dans les cellules de tous les organismes vivants, où elles remplissent un rôle essentiel dans un certain nombre de processus métaboliques. Les enzymes sont aussi responsables de la décomposition de molécules complexes en molécules plus assimilables[27]. Les enzymes microbiennes sont privilégiées par rapport aux sources végétales et animales en raison de leur production économique, de leur consistance, de leur facilité de modification et d'optimisation. Elles sont comparativement plus stables que les enzymes d'origine végétale ou animale. En outre, elles présentent une gamme plus large d'activités catalytiques et la plupart des enzymes actuellement utilisées dans l'industrie sont d'origine microbienne[28]. Il en existe environ 200 sur le marché. Parmi elles, 130 sont employées dans des processus industriels. Un grand nombre d'enzymes spécifiques jouent un rôle important dans les processus physiologiques (la digestion, la conduction nerveuse, la synthèse d'hormones, ...etc), ainsi que dans un certain nombre de processus industriels, tels que les industries alimentaires (jus, lait, paille, plats cuisinés...), pharmaceutique (antibiotiques, vitamines...) et de nettoyage (traitement de l'eau, détergents, lessives) [29]. Les enzymes bactériennes sont les plus utilisées du fait que les bactéries peuvent croître plus rapidement que les espèces fongiques et ont donc un potentiel dans les applications industrielles [30].

I.3.1 Les enzymes

I.3.1.1 Les protéases

Les protéases ou peptidases sont des enzymes protéolytiques qui catalysent l'hydrolyse de liaisons peptidiques. Dans certains cas, les enzymes sont extrêmement spécifiques et hydrolysent une unique liaison peptidique d'une protéine donnée. Dans d'autres cas, les peptidases hydrolysent plusieurs liaisons peptidiques qui présentent une séquence ou conformation déterminée[31]

Les protéases peuvent être produites par les bactéries, les moisissures et les levures. Les protéases d'origine bactériennes sont essentiellement de la subtilase, produites par *Bacillus subtilis* et quelques genres apparentés. Celle-ci est très stable et résistante à l'action des détergents. Par ailleurs, elle est naturellement excrétée dans le milieu, ce qui facilite sa purification [32]. Les bactéries psychotropes du lait et en particulier, *Pseudomonas fluorescens* et *P. putida* produisent des métallo protéases thermorésistantes utilisées en particulier pour la

coagulation du lait et pour l'affinage des fromages [33]. Pour les moisissures, il s'agit essentiellement de *Aspergillus oryzae*. Certaines levures peuvent également produire la protéase tel que *Aureobasidium pullulans* [34].

I.3.1.2 Les lipases

Les lipases ou Tri-acyl-glycérol hydrolases (EC3.1.1.3) sont une classe particulière des hydrolases d'esters carboxyliques. Ces enzymes catalysant en présence d'eau, le clivage des liaisons esters des triglycérides libérant des acides gras et successivement des diglycérides, des monoglycérides et dans certains cas du glycérol. Ils peuvent aussi, dans les conditions appropriées, catalyser la réaction inverse d'estérification[35].

Il existe des lipases microbiennes, produits par des bactéries du genre : *Achromobacter*, *Alcaligenes*, *Arthrobacter*, *Bacillus*, *Burkholderia*, *Chromobacterium* et *Pseudomonas*. [35]

I.3.1.3 Les cellulases

Les cellulases désignent un groupe d'enzymes qui agissent ensemble pour hydrolyser la cellulose en sucres simples [36] elles sont principalement produites par des micro-organismes (bactéries et champignons)[37] mais également par des organismes représentant le règne animal, notamment des insectes, des mollusques, des nématodes et des protozoaires[38].

Les cellulases sont des hydrolases qui catalysent le clivage des liaisons β -1,4glycosidiques dans la cellulose avec un apport concomitant d'eau au point de clivage. Même si un seul type de liaison chimique est présent dans la cellulose, des enzymes ayant différents modes d'action sont nécessaires pour la dégradation complète du polymère récalcitrant et insoluble. Dans la nature, un seul organisme peut produire les enzymes nécessaires à la dégradation complète de la cellulose, bien que l'action synergique de plusieurs organismes est également été suggérée. [39]

PARTIE II

Matériels et méthodes

II.1 Objectif du travail

Notre étude a pour but la caractérisation de la microflore bactérienne présente dans les graines de pin d'Alep (*P.halepensis*).

Cette étude a été réalisée au niveau du laboratoire de microbiologie de la faculté SNV-ST de l'université de Bouira.

II.2 Echantillonnage

Dix échantillons de cônes de *P.halepensis* ont été récoltés au cours de la période allant de février à avril 2024 dans plusieurs régions de la wilaya de Bouira (**figure 05**).

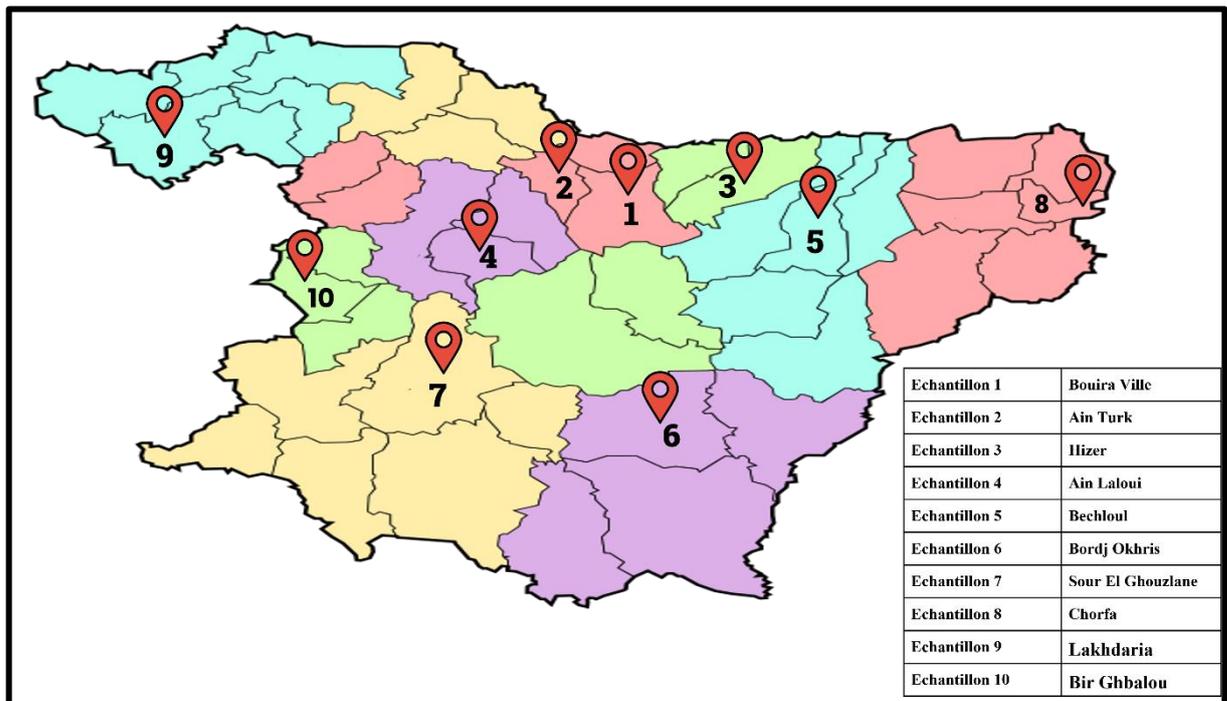


Figure 4: Carte géographique illustrant les différents lieux de récolte des cônes de *P.halepensis* au niveau de la wilaya de Bouira.

Tous les échantillons ont été récoltés sur des arbres matures choisis au hasard. Une ouverture mécanique à l'aide d'une pince métallique a été appliquée pour extraire les graines.

Avant de procéder à l'isolement des souches, tous les échantillons ont été soumis à un procédé de désinfection de surface afin d'éliminer la flore exogène. Devant le bec les échantillons ont été placés dans un bain d'eau de Javel à une concentration de 10% pendant 2 minutes (annexe 01). Ensuite, pour éliminer toute trace d'eau de Javel résiduelle, deux rinçages successifs ont été effectués avec de l'eau distillée stérile. Puis, les échantillons ont été soigneusement séchés avec du papier Whatman stérile [40].

II.3 Isolement et purifications des souches

Après la désinfection des graines, 1g de chaque échantillon a été mis dans 9 ml de l'eau peptonée tamponnée stérile et dans 9 ml dans le bouillon nutritif stérile, 2g de chaque échantillon ont été mis dans 5 ml d'eau physiologique stérile (**annexe 01**) et 5 ml d'eau distillée stérile. Chaque tube a été agité pendant cinq minutes à l'aide d'un vortex afin d'assurer une distribution homogène des graines. Les tubes contenant le bouillon nutritif et l'eau peptonée tamponnée ont été incubés à 37°C durant 24 heures. Tandis que les tubes contenant l'eau distillée et l'eau physiologique ont été placés dans un réfrigérateur à une température de 5°C durant 24 h[41].

Après incubation des échantillons, nous avons procédé à l'isolement des microorganismes. Pour cela, environ 200 µL de chaque tubes ont été ensemencés dans des boîtes contenant différents milieux sélectifs : gélose EMB, gélose MRS, gélose mac conkey, gélose Chapman (**Annexe 02**). Après incubation à 37°C pendant 24h, toutes les colonies morphologiquement différentes ont été repiquées sur des géloses sélectives.

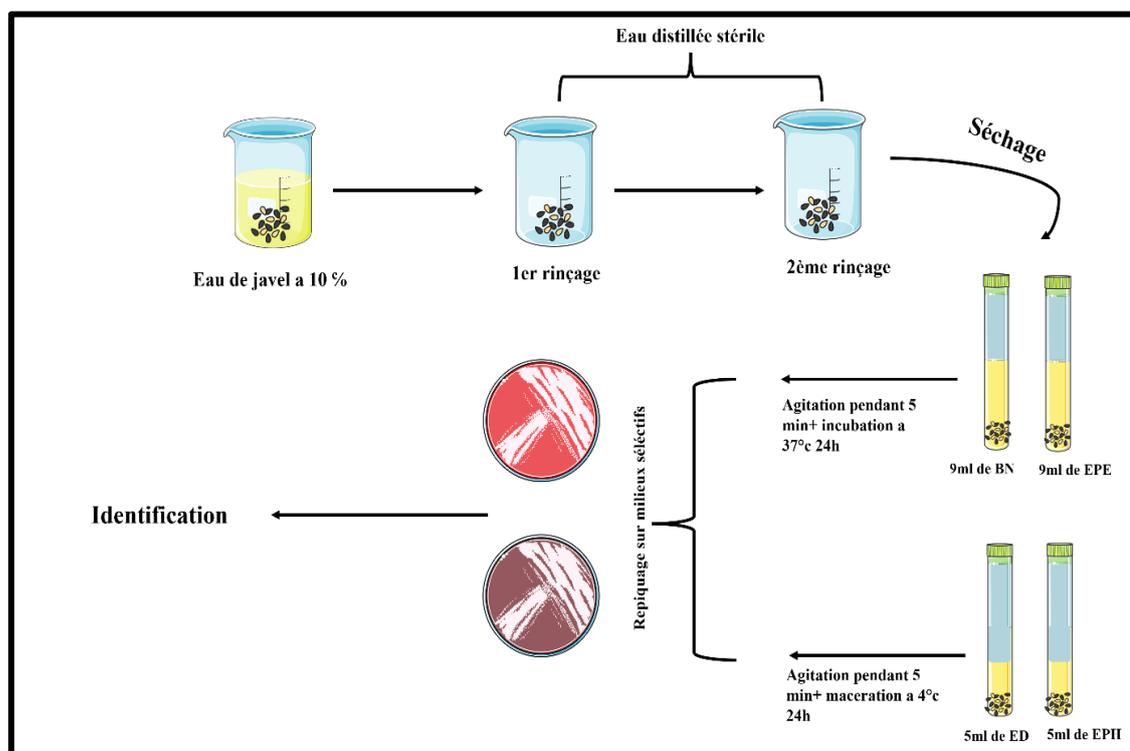


Figure 5: Récapitulatif des étapes d'isolement à partir des graines.

II.3.1 La recherche des bactéries à Gram positif

L'isolement est effectué par l'ensemencement d'environ 200µL de chaque échantillon en surface des géloses MRS et Chapman. L'incubation est faite à 37°C pendant 24 heures.

II.3.2 La recherche des bactéries a Gram négatif

L'isolement est effectué par l'ensemencement d'environ 200µL de chaque échantillon en surface de la gélose Mac Cockney. Ensuite, purifié sur la gélose EMB.

Pour obtenir des colonies bactériennes pures une étape de purification est nécessaire après leur croissance sur les milieux sélectifs. Cette étape implique plusieurs repiquages successifs sur les mêmes milieux sélectifs, permettant d'éliminer toute contamination par d'autres micro-organismes et d'obtenir des colonies composées d'une seule souche bactérienne pure.

II.4 Identification des souches

Les colonies présumées ont été identifiées en se basant sur une observation macroscopique permettant d'observer la couleur, la taille et l'aspect des colonies et microscopique (coloration de Gram (**annexe04**) et l'état frais (**annexe03**) pour étudier la mobilité et la morphologie des bactéries) suivie de l'emploi d'une galerie biochimique classique composée des milieux Citrate de Simmons, TSI, oxydase, test catalase, et milieu Mannitol-mobilité et une orientation avec le milieu CHROM-AGAR.

II.5 Extraction des protéines

II.5.1 Protéines extracellulaires

Les colonies appartenant à différentes espèces bactériennes ont été placées dans 20ml de bouillon nutritif puis incubées à 37°C pendant 24h. Par la suite, chaque suspension a été placée dans des tubes coniques stériles et centrifugé à 7000 tours à 4°C pendant 20 minutes. Après centrifugation, le surnageant a été récupéré dans des tubes Eppendorf stériles[42].

II.5.2 Protéines intracellulaires

Après avoir incubé les colonies bactériennes dans 20 ml du bouillon cœur cerveau à base d'arginine à 37°C pendant 24 h, chaque suspension a été placée dans des tubes coniques stériles et centrifugés à 7000 tours à 4°C pendant 20 minutes. Après centrifugation et élimination du surnageant, deux lavages successifs avec 1ml du tampon phosphate salin (PBS) ont été appliqués sur les culots. Chaque lavage a été suivi d'une centrifugation (7000 tours, 4°C, 20 min) et élimination du surnageant.[42]

Pour les souches à Gram (-), 1ml de SDS a été ajouté directement aux tubes après la centrifugation, puis incubé à 37°C pendant 2min pour assurer la lyse des cellules et la libération des protéines. Après 2 minutes d'incubation, les tubes ont été centrifugés à 4°C durant 20 min, puis l'extrait protéique a été récupéré dans des tubes Eppendorf stériles. Tandis que pour les

Gram (+), on a ajouté d'abord 1ml de lysozyme pour chaque tube puis incubé à 37°C durant 1h [43]. Après incubation, nous avons ajouté 1ml de SDS pour les tubes puis une centrifugation a été effectuée. L'extrait protéique a été récupéré dans des tubes Eppendorf stériles[42].

II.6 Dosage des protéines

Le dosage des protéines a été effectué selon la méthode de Bradford [44]. Cette dernière utilisée pour le dosage des protéines est basée sur le changement de couleur du bleu de Coomassie, qui se manifeste par un changement d'absorbance lorsqu'il forme des complexes avec les acides aminés basiques (arginine, histidine, lysine) et les acides aminés hydrophobes présents dans les protéines.[45]

II.6.1 Mode opératoire

Le réactif de Bradford a été préparé en diluant 100 mg de bleu de Coomassie G-250 dans 50 ml d'éthanol absolu et 100 ml d'acide phosphorique. Le volume final a été porté à 1 L avec de l'eau distillée.

Un volume de 1000 µl du réactif de Bradford a été ajouté à 20 µl de chaque extrait protéique préparé avec des dilutions convenables. Le mélange a été vortexé et l'absorbance a été mesurée après 5 min d'incubation à 595 nm [45]. Une courbe d'étalonnage établie par la BSA (**annexe 08**) a été utilisée pour la quantification des protéines[45].

II.7 Mise en évidence de l'activité enzymatique

L'extrait protéique préalablement obtenu a été utilisé pour la mise en évidence de quelques activités enzymatiques. La méthode consiste à imbiber des disques stériles dans les différents extraits puis les déposés sur des boites contenant différents milieux : milieu gélosé à base de lait écrémé qui permet la mise en évidence de l'activité protéolytique[46], milieu gélosé à base de l'amidon pour la recherche de l'activité amylolytique et un milieu gélosé à base de D- cellobiose pour l'activité cellulolytique[46][47](**Annexe 05**). Toutes les boites ont été incubées à 37°C pendant 48h.

II.8 Mise en évidence de l'activité antibactérienne

Les extraits protéiques obtenus, on fait l'objet d'une étude de l'activité antibactérienne. Pour cela, nous avons imbibé des disques stériles de 6mm dans les différents extraits, ensuite déposés sur des boites contenant le milieu Muller-Hintonensemencées avec deux souches différentes : *Escherichia coli* ATCC 25922 (**annexe 09**) et *Staphylococcus aureus* ATCC 6538 (**annexe 09**). Puis, les boites ont été incubées à 37°C pendant 24h [48]. L'activité

antibactérienne se manifeste par l'apparition d'une zone claire autour des disques supérieurs à 6 mm.

RESULTATS

III.1 Les souches bactériennes

Un total de 10 échantillons de cônes de *P.halepensis* ont été récoltés dans différentes régions de la wilaya de Bouira. Les échantillons ont été préparés en utilisant de l'eau peptonée, de l'eau distillée stérile et du bouillon nutritif ainsi que de l'eau physiologique. Les résultats ont révélé la présence de 35 souches bactériennes distinctes dans l'ensemble des échantillons (**Annexe 06**) dont 67% bactéries à Gram positif et 33% de bactéries à Gram négatif.

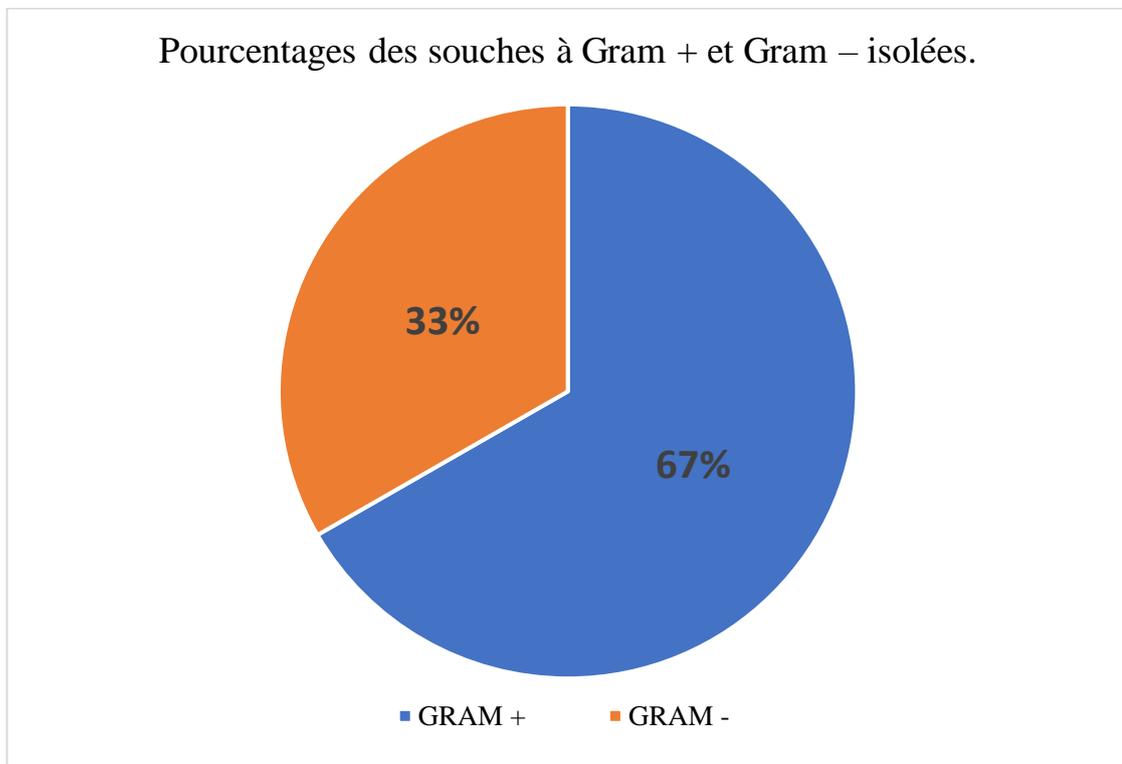


Figure 6 : Pourcentages des souches à Gram + et Gram – isolées.

III.1.1 La recherche des Gram positifs

Après l'ensemencement et l'incubation 24 h à 37°C sur Chapman, certaines colonies petites de couleur crémeuse sont apparues, elles étaient rondes avec un contour régulier. La coloration de Gram a révélé qu'il s'agissait de bactéries à Gram positif, prenant la forme de coques, avec un virage de couleurs du milieu. Sur la base de ces caractéristiques et des résultats de sa galerie biochimique et de l'orientation du chromagar (**Annexe 06**), nous avons suspecté qu'il s'agissait de souches appartenant au genre *Staphylococcus* (**figure 07**). D'autres sont apparues grandes de couleur crémeuse. Elles étaient plates, irrégulières. La coloration de Gram a révélé qu'il s'agissait d'une bactérie à Gram positif, prenant la forme de bacilles. Sur la base de ces caractéristiques et des résultats de sa galerie biochimique (**Annexe 5**) nous avons suspecté que c'est une souche appartenant au genre *Bacillus* (**figure 07**).

Sur le milieu MRS des colonies rondes et lisses de couleur blanche à crème sont apparues. La coloration de Gram a révélé qu'il s'agissait des bactéries à Gram positif, prenant la forme cocci. En se basant sur ces caractéristiques et des résultats des tests biochimiques (**Annexe 5**) nous avons suspecté que ce sont des souches appartenant au genre *Staphylococcus*.

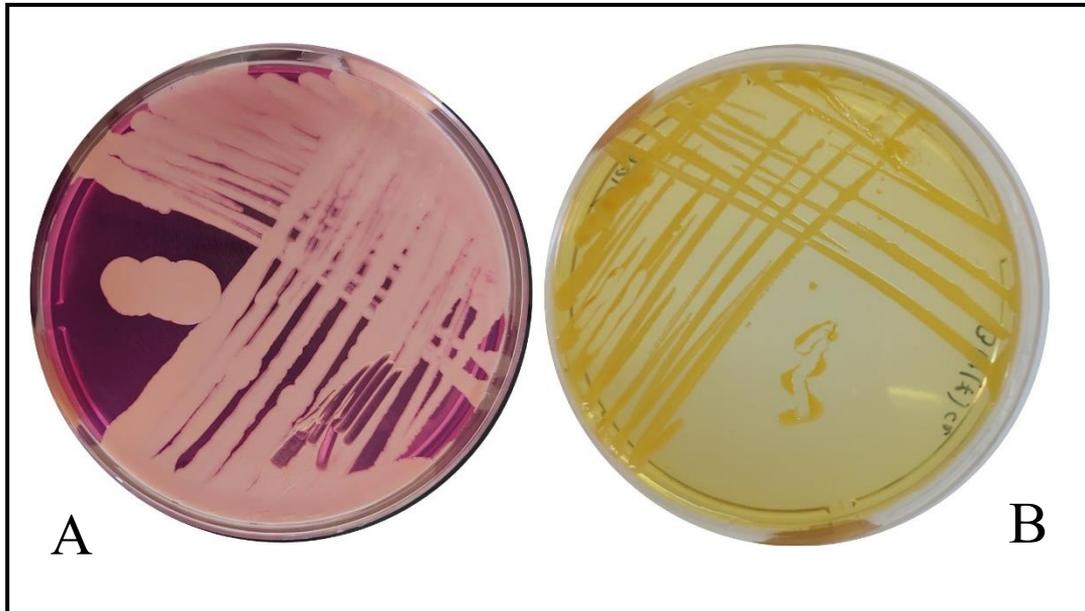


Figure 7: Les colonies des souches appartenant au genre **A** : *Bacillus* et **B** : *Staphylococcus* sur milieu Chapman

III.1.2 La recherche des bactéries a Gram négatif

Parmi les colonies repiquées sur EMB, certaines sont apparues grandes, muqueuses et luisantes de couleur rose. La coloration de Gram a révélé qu'il s'agissait de bactéries à Gram négatif, prenant la forme de bacille. Sur la base de ces caractéristiques et des résultats de sa galerie biochimique et de l'orientation du chromagar (**Annexe 06**), nous avons suspecté qu'il s'agissait de souches appartenant au genre *Klebsiella* (**figure 08**). D'autres colonies apparaissent incolores à légèrement beige, de tailles relativement grandes. La coloration de Gram a révélé qu'il s'agissait de bactéries à Gram négatif, prenant la forme de bacille. Sur la base de ces caractéristiques et des résultats de sa galerie biochimique et de l'orientation du chromagar (**Annexe 06**), nous avons suspecté qu'il s'agissait de souches appartenant au genre *pseudomonas*(**figure 08**). D'autres étaient de couleur rose à pourpre avec un centre plus foncé. La coloration de Gram a révélé qu'il s'agissait des bactéries à Gram négatif, prenant la forme de petits bâtonnets. Selon ces caractéristiques et les résultats de sa galerie biochimique (**Annexe 5**), nous avons émis l'hypothèse qu'il s'agissait d'une souche appartenant au genre *Enterobacter*.



Figure 8 : Les colonies des souches appartenant au genre **A : *Pseudomonas*** et **B : *Klebsiella*** sur milieu EMB

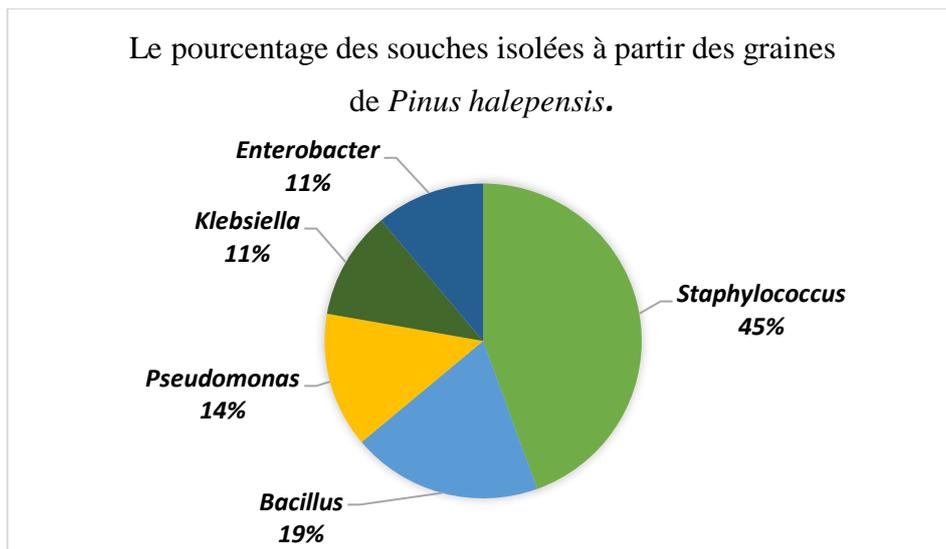


Figure 9: Le pourcentage des souches isolées à partir des graines de *P.halepensis*.

III.2 Extraction et dosage des protéines :

Le dosage des protéines extraites a été effectué avec un spectrophotomètre. Les extraits intracellulaires montrent un pourcentage élevé en concentration des protéines qui varie entre

60 % a 90 % (**figure 7**) tandis que les extraits extracellulaires présentent des pourcentages respectifs de 4% a 16% (**figure 8**).

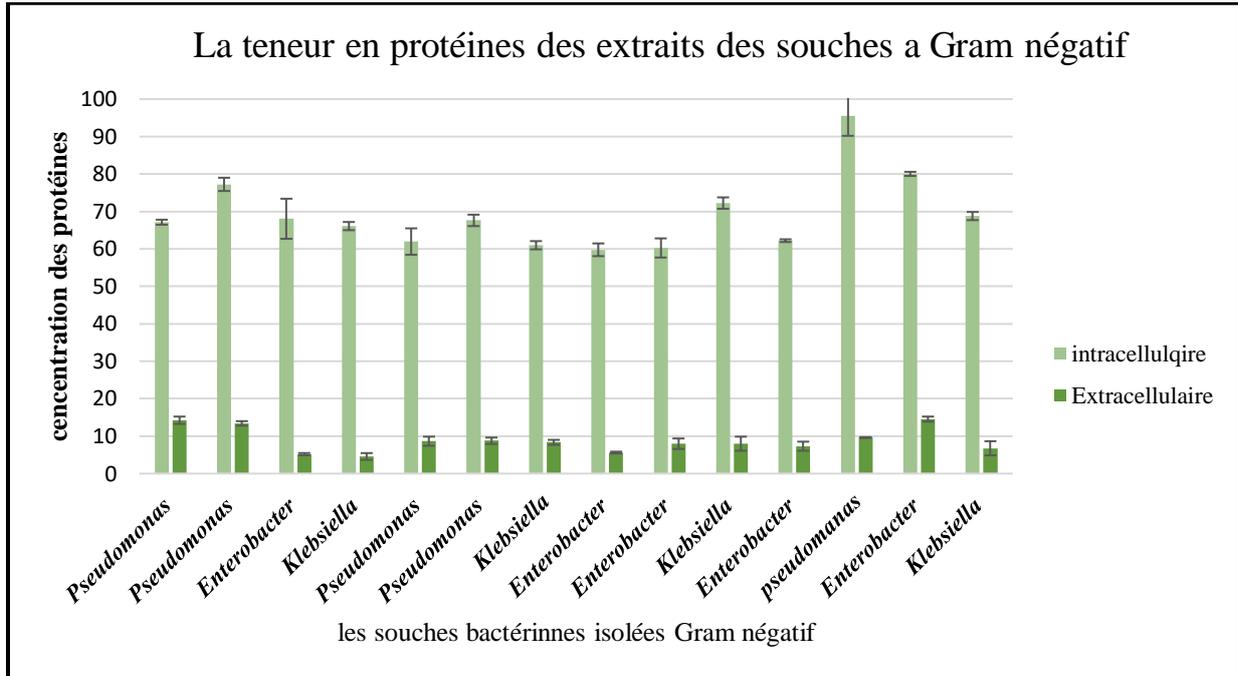


Figure 10: La teneur en protéines des extraits des souches a Gram négatif

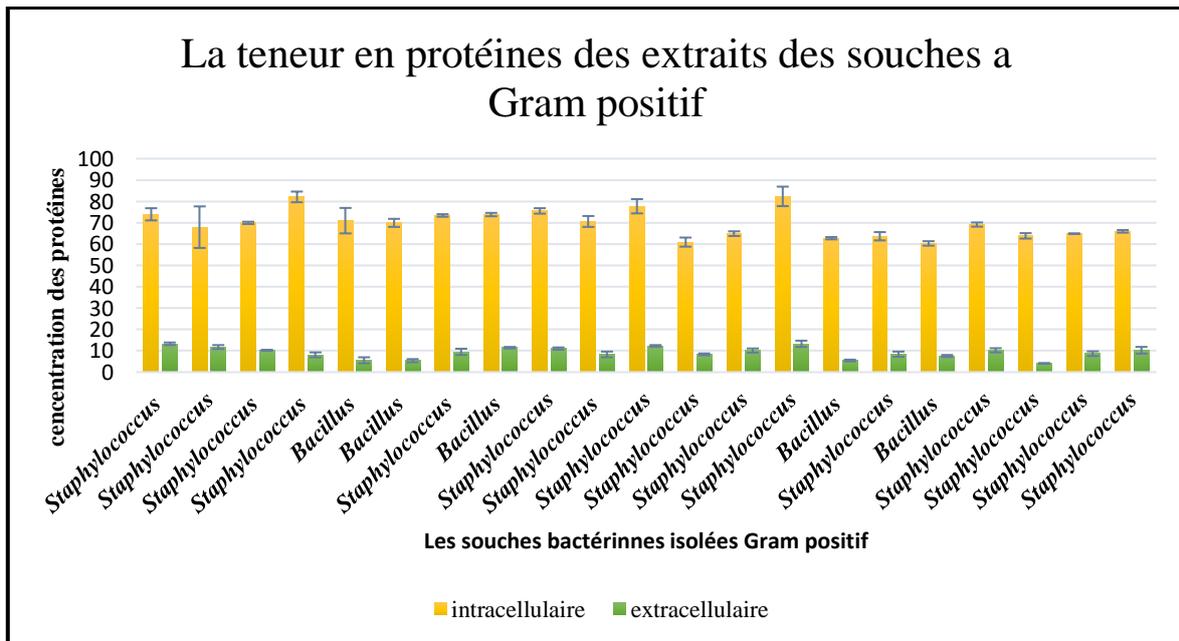


Figure 11: La teneur en protéines des extraits extracellulaires des souches a Gram positif

III.3 Résultats de la mise en évidence des activités enzymatiques

Un screening des activités protéolytiques, amylolytiques et cellulolytiques a été effectué sur les extraits protéiques de nos souches bactériennes. La présence de ces activités est détectée en utilisant les substrats à base de lait écrémé ; amidon ; D-Cellobiose.

Les extraits extracellulaires ont montré une activité enzymatique plus élevée (52%) que celles des extraits intracellulaires (0%). Parmi les extraits intracellulaires, les réactions protéolytiques ont été les plus fréquentes.

Pour les extraits protéiques intracellulaires des souches n'ont montré aucune activité enzymatique, tandis que pour les extraits protéiques extracellulaires les souches de *Bacillus* ont montré une activité protéolytique de 100% ,*staphylococcus* a 81%, *Enterobacter* 80% suivie des souches de *Klebsiella* 75% et *pseudomonas* à 60%. Pour l'activité amylolytique aucun des extraits des souches n'a montré une activité enzymatique (**figure 10**).

Les extraits protéiques extracellulaires ont montré une activité cellulolytique de chacune des souches : *Staphylococcus* à 50% ; *Enterobacter* à 40% ; *Klebsiella* à 25% ;*Pseudomonas* à 20% ; et *Bacillus* 0%(**figure 11**) (**Annexe 07**).

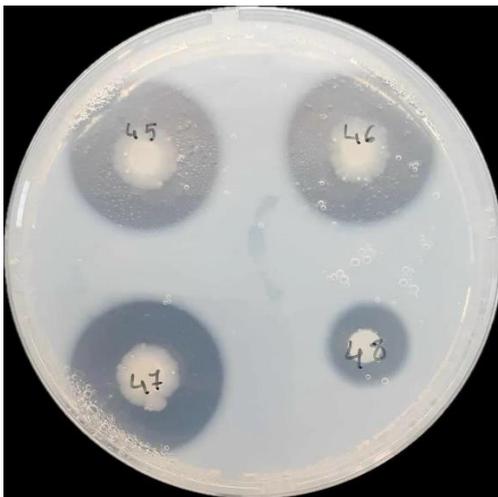


Figure 12: Résultat de l'activité protéolytique



Figure 13: Résultat de l'activité cellulolytique

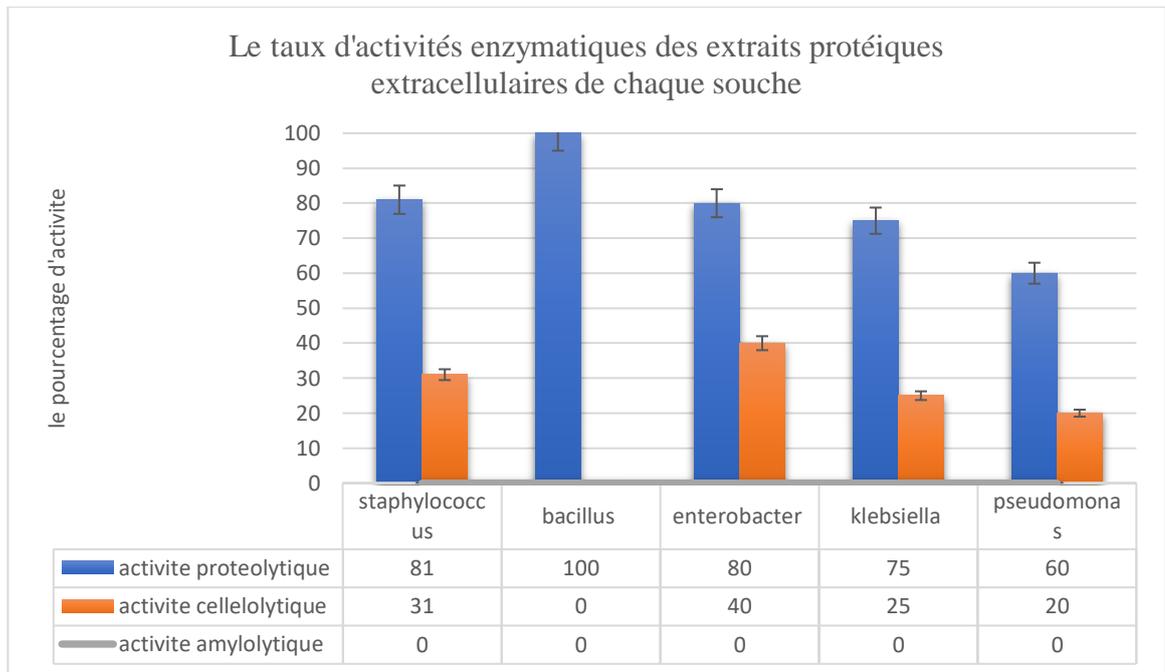


Figure 14: Le taux d'activités enzymatiques des extraits protéiques extracellulaires de chaque souche.

III.4 Résultats de l'activité antibactérienne :

Les extraits intracellulaires ont tous montré une activité (100%) contre *Staphylococcus aureus* et ont présenté des zones d'inhibition de différents diamètres autour des disques (>6 mm) (**Annexe 07**). Contrairement aux extraits extracellulaires qui n'ont présenté aucune activité (0%) sur la même souche (*Staphylococcus aureus*).

En revanche, aucun des extraits intracellulaires (0%) et extracellulaires (0%) n'a présenté une activité contre la souche *Escherichia coli* (**Annexe 07**).



Figure 15: Résultat de l'activité antibactérienne des extraits protéolytique contre *Staphylococcus aureus*.

DISCUSSION

L'élucidation du rôle des microbes au sein du phytobiome a conduit à une intensification des efforts visant à identifier et à caractériser les communautés microbiennes (microbiote) en fonction de divers paramètres, notamment l'espèce hôte, le stade de développement, la distribution spatiale et l'état physiologique[49].

Bien que de nombreuses recherches aient porté sur les graines de *P.halepensis*, aucune étude n'a encore été menée sur la caractérisation de la microflore qu'elles abritent. Notre étude contribue à combler cette lacune en s'imposant à explorer et analyser la composition microbiologique des graines de *P.halepensis*, ouvrant ainsi de nouvelles perspectives dans ce domaine de recherche. En raison de leur nature exceptionnelle en tant qu'organe végétal, les graines constituent une source inestimable d'informations sur l'origine et la composition du microbiote végétal. L'étude de la microflore endophyte des graines permet d'approfondir notre compréhension de cette dynamique complexe. Cette connaissance approfondie du microbiote des graines peut ensuite servir de catalyseur au développement de produits biotechnologiques et industriels innovants.

Différentes graines peuvent varier dans la composition de leur microbiote, ce qui a un impact sur la santé et la productivité de la plante, qui peut être déterminée par les génotypes des graines ainsi que par les conditions environnementales dans lesquelles les graines se développent[50].

Nos résultats ont révélé une diversité microbienne significative au sein de chaque échantillon étudié. Nous pensons avoir pu isoler des bactéries à Gram négatif des genres courants tels que les *Enterobacter*, *Klebsiella*, *pseudomonas*, et d'autres à Gram positifs des genres *staphylococcus* et *Bacillus* .

Sur la base de nos résultats, nous avons relevé la présence de microbiote endophyte dans les graines. Avec *Staphylococcus* comme espèce prédominante. Nos résultats concordent avec les résultats d'études antérieures portant sur la présence de *Staphylococcus* dans les graines de différentes plantes parmi eux :Truyens et al, 2013 [51] ont identifié des souches de *Staphylococcus* dans les graines d'*Arabidopsis thaliana*. Midha et al, 2016 [52] ont également signalé la présence de *Staphylococcus* ainsi que le phylum des *Gamma-Proteobacteria*, auquel appartiennent *Klebsiella* dans les graines de riz[52]. *Pseudomonas*, *Entrobacter* et *Bacillus* ont également été isolés à partir des graines de riz [53] ainsi qu'à partir d'autres graines végétales [49][50].

La variabilité des activités enzymatiques entre les différentes souches isolées suggère que la capacité enzymatique des souches est une caractéristique variable qui dépend de la souche.

Dans notre étude, les souches appartenant probablement aux genres *Bacillus*, et *Staphylococcus*, *Enterobacter* démontre une activité protéolytique ce qui concorde avec les résultats rapporté par Rao M et al, 1998 [54] ,en outre, Prasad M et ses collègues en 2010 ont rapporté que les protéases sont naturellement excrétées dans le milieu, ce qui facilite leur purification [32]. Par ailleurs, l'étude réalisée par Nicodeme et al, 2005 [55] a également démontré que *Pseudomonas* est une souche productrice de protéase. Nos propres constatations sont en accord avec ces résultats. Les résultats correspondent à ceux trouvés dans l'étude menée par Savvateeva L en 2004 affirme que *Klebsiella* possède une activité protéolytique [56].

Nos résultats montrent que 20 % de nos souches productrices de cellulase appartenant aux genres *Enterobacter*, *Pseudomonas*, *Staphylococcus* et *Klebsiella*. Ces résultats correspondent à ceux trouvés dans la littérature [57], [58], [59], [60] qui justifie que les souches bactériennes appartenant au genre *Enterobacter*, *Pseudomonas*, *Staphylococcus* et *Klebsiella* produise l'enzyme cellulase.

Concernant l'activité antibactérienne, nos résultats ont montré que tous les extraits de nos souches isolées ont une activité contre *staphylococcus aureus* ce qui confirme sa sensibilité contrairement à *E.coli* ce qui peut être comparable à l'étude effectuée par Fekih et ses collègues sur le fait que l'huile essentielle de *P. halepensis* a montré une forte activité antibactérienne contre des bactéries telles que *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella pneumoniae*, *Salmonella enterica Spp*, *Arizonae* et d'autres or qu'elle n'était pas active contre *Escherichia coli* et *Pseudomonas aeruginosa* [13].

CONCLUSION ET PERSPECTIVES

Les plantes offrent une multitude de services à l'environnement, parmi lesquels la contribution des micro-organismes endogènes présents dans leurs graines. Ces micro-organismes, objets de recherches croissantes, présentent un potentiel biologique et biotechnologique considérable. Dans le cadre de cette étude, nous avons exploré la microflore bactérienne des graines de *P.halepensis*, une espèce d'arbre méditerranéen largement répandue.

L'analyse de la diversité microbienne des graines de *P.halepensis* réalisée par des techniques d'isolement et d'identification microbiologique. Les résultats obtenus ont révélé une richesse microbienne remarquable, avec la présence d'une large variété de souches bactériennes. Cette diversité microbienne souligne le potentiel biologique élevé de ces graines en tant que source de micro-organismes bénéfiques.

L'évaluation des activités enzymatiques de la microflore bactérienne des graines de *P.halepensis* a mis en évidence la présence d'enzymes clés, telles que les enzymes protéolytiques et cellulolytiques qui pourraient conduire à leur production à grande échelle pour des applications industrielles. Ces enzymes pourraient être utilisées dans divers secteurs, notamment la production alimentaire, la dégradation des déchets organiques, la fabrication de biocarburants et la synthèse de produits pharmaceutiques.

L'exploration des micro-organismes et des enzymes des graines de *P.halepensis* ouvre un champ de recherche vaste et prometteur avec un potentiel d'application considérable dans divers domaines. En poursuivant des recherches approfondies et en développant des stratégies d'exploitation efficaces, nous pouvons tirer parti de ces ressources naturelles pour promouvoir une bioéconomie durable et contribuer à la résolution de défis environnementaux et sociétaux majeurs.

REFERENCES
BIBLIOGRAPHIQUE

- [1] Anne-Sophie Masson and Marie Simonin, “Le microbiote des plantes, de son rôle dans la survie végétale à son ingénierie pour une agriculture durable,” <https://planet-vie.ens.fr/>.
- [2] I. NAHAL, “Le pin d’Alep (*Pinus halepensis* Mill). Etude taxonomique, phytogéographique, écologique et sylvicole,” *Annales de l’Ecole nationale des eaux et forêts et de la Station de recherches et expériences*, vol. 19, no. 4, pp. 475–686, 1962.
- [3] M. Ghanmi *et al.*, “Étude du rendement et de la composition de l’essence de térébenthine du Maroc: Cas du Pin maritime (*Pinus pinaster*) et du Pin d’Alep (*Pinus halepensis*),” *Acta Botanica Gallica*, vol. 152, no. 1, pp. 3–10, 2005, doi: 10.1080/12538078.2005.10515450.
- [4] Z. Djerrad, L. Kadik, and A. Djouahri, “Chemical variability and antioxidant activities among *Pinus halepensis* Mill. essential oils provenances, depending on geographic variation and environmental conditions,” *Ind Crops Prod*, vol. 74, pp. 440–449, Nov. 2015, doi: 10.1016/j.indcrop.2015.05.049.
- [5] M. S. Afridi *et al.*, “New opportunities in plant microbiome engineering for increasing agricultural sustainability under stressful conditions,” *Front Plant Sci*, vol. 13, Sep. 2022, doi: 10.3389/fpls.2022.899464.
- [6] R. Gupta, G. Anand, R. Gaur, and D. Yadav, “Plant–microbiome interactions for sustainable agriculture: a review,” *Physiology and Molecular Biology of Plants*, vol. 27, no. 1, pp. 165–179, Jan. 2021, doi: 10.1007/s12298-021-00927-1.
- [7] Z. Djerrad, L. Kadik, and A. Djouahri, “Chemical variability and antioxidant activities among *Pinus halepensis* Mill. essential oils provenances, depending on geographic variation and environmental conditions,” *Ind Crops Prod*, vol. 74, pp. 440–449, Nov. 2015, doi: 10.1016/j.indcrop.2015.05.049.
- [8] L. Wang and C. L. Weller, “Recent advances in extraction of nutraceuticals from plants,” *Trends in Food Science and Technology*, vol. 17, no. 6, pp. 300–312, Jun. 2006. doi: 10.1016/j.tifs.2005.12.004.

- [9] N. Kadri, B. Khetta, R. Yahiaoui-zaidi, V. Barragan-Montero, and J. L. Montero, "Analysis of polar lipid fraction of *Pinus halepensis* Mill. seeds from North Algeria," *Ind Crops Prod*, vol. 51, pp. 116–122, Nov. 2013, doi: 10.1016/j.indcrop.2013.08.071.
- [10] N. Kadri, B. Khetta, Y. Aid, S. Kherfellah, W. Sobhi, and V. Barragan-Montero, "Some physicochemical characteristics of pinus (*Pinus halepensis* Mill., *Pinus pinea* L., *Pinus pinaster* and *Pinus canariensis*) seeds from North Algeria, their lipid profiles and volatile contents," *Food Chem*, vol. 188, pp. 184–192, Apr. 2015, doi: 10.1016/j.foodchem.2015.04.138.
- [11] M. Abi-Ayad, F. Zahra Abi-Ayad, R. Sid Ahmed Abou Bakr Belkaid, and C. Ziani-Cherif Abou Bakr Belkaid, "Chemical composition and antifungal activity of Aleppo pine essential oil," 2011. [Online]. Available: <http://www.academicjournals.org/JMPR>
- [12] S. Khalil Tukan, K. Mohammad Al-Ismaïl, R. Ajo, and M. Al-Dabbas, "Seeds and seed oil compositions of Aleppo Pine [*Pinus halepensis* Mill.] grown in Jordan," 2016. [Online]. Available: <https://www.researchgate.net/publication/287351590>
- [13] N. Fekih *et al.*, "Chemical composition and antibacterial activity of *Pinus halepensis* Miller growing in West Northern of Algeria," *Asian Pac J Trop Dis*, vol. 4, no. 2, pp. 97–103, Apr. 2014, doi: 10.1016/S2222-1808(14)60323-6.
- [14] N. Kadri *et al.*, "Antiangiogenic activity of neutral lipids, glycolipids, and phospholipids fractions of *Pinus halepensis* Mill. seeds," *Ind Crops Prod*, vol. 54, pp. 6–12, Mar. 2014, doi: 10.1016/j.indcrop.2013.12.051.
- [15] M. Abi-Ayad, F. Z. Abi-Ayad, H. A. Lazzouni, and S. A. Rebiahi, "Antibacterial activity of *Pinus halepensis* essential oil from Algeria(Tlemcen)," 2011. [Online]. Available: <http://scholarsresearchlibrary.com/archive.html>
- [16] A. Abbou *et al.*, "Effect of precipitation solvent on some biological activities of polysaccharides from *Pinus halepensis* Mill. seeds," *Int J Biol Macromol*, vol. 141, pp. 663–670, Dec. 2019, doi: 10.1016/j.ijbiomac.2019.08.266.
- [17] H. Bouzenna *et al.*, "Protective effects of *Pinus halepensis* L. Essential oil on aspirin-induced acute liver and kidney damage in female wistar albino rats," *J Oleo Sci*, vol. 65, no. 8, pp. 701–712, 2016, doi: 10.5650/jos.ess15287.

- [18] P. A. Postu *et al.*, “Pinus halepensis essential oil attenuates the toxic Alzheimer’s amyloid beta (1-42)-induced memory impairment and oxidative stress in the rat hippocampus,” *Biomedicine and Pharmacotherapy*, vol. 112, Apr. 2019, doi: 10.1016/j.biopha.2019.108673.
- [19] K. Koutsaviti, A. Giatropoulos, D. Pitarokili, D. Papachristos, A. Michaelakis, and O. Tzakou, “Greek Pinus essential oils: larvicidal activity and repellency against *Aedes albopictus* (Diptera: Culicidae),” *Parasitol Res*, vol. 114, no. 2, pp. 583–592, Feb. 2015, doi: 10.1007/s00436-014-4220-2.
- [20] L. Hamrouni, M. Hanana, I. Amri, A. E. Romane, S. Gargouri, and B. Jamoussi, “Allelopathic effects of essential oils of pinus halepensis miller: Chemical composition and study of their antifungal and herbicidal activities,” *Archives of Phytopathology and Plant Protection*, vol. 48, no. 2, pp. 145–158, Jan. 2015, doi: 10.1080/03235408.2014.884667.
- [21] X. Wang, Y. Chi, and S. Song, “Important soil microbiota’s effects on plants and soils: a comprehensive 30-year systematic literature review,” *Frontiers in Microbiology*, vol. 15. Frontiers Media SA, 2024. doi: 10.3389/fmicb.2024.1347745.
- [22] B. Karimi *et al.*, “Biogeography of soil bacteria and archaea across France,” 2018. [Online]. Available: <http://advances.sciencemag.org/>
- [23] M. Rossmann *et al.*, “Embrapa Environment, Rod. SP-314 k 127,” *Jaguariuna SP*, vol. 5, no. 19, p. 2640, doi: 10.1093/femsec/fiaa032/5775476.
- [24] H. Kim and Y. H. Lee, “The rice microbiome: A model platform for crop holobiome,” *Phytobiomes Journal*, vol. 4, no. 1. American Phytopathological Society, pp. 5–18, Feb. 20, 2020. doi: 10.1094/PBIOMES-07-19-0035-RVW.
- [25] TAMSAOUETE Ouezna and OUCHENE Fairouz, “Etude de la flore microbologique des graines du Pinus halepensis.,” UNIVERSITE AKLI MOHAND OULHADJ , Algeria - BOUIRA, 2023.
- [26] Granner D, *Biochimie de HARPER.*, 3ème édition., vol. 47. Bruxelles, 2008.
- [27] Meunier N, “Evaluation du potentiel de production de protéases bactériennes à partir de boues d’épuration municipales,” Mémoire pour l’obtention du grade de Maitre ès Sciences, Université du Quebec., Canada , 1999.

- [28] Barredo J. L, “Microbial enzymes and biotransformations,” *Humana Press*, vol. 17, pp. 1–319, 2005.
- [29] Gassara F, “Production économique d’enzymes ligninolytiques par fermentation à l’état solide des déchets agroindustriels et leurs applications,” Université du Québec, Canada, 2012.
- [30] S. C. B. Gopinath *et al.*, “Biotechnological Aspects and Perspective of Microbial Keratinase Production,” *Biomed Res Int*, vol. 2015, pp. 1–10, 2015, doi: 10.1155/2015/140726.
- [31] J. Zhang, X. Yang, and Y. Li, “[Key active sites of proteases and protease inhibitors: a review].,” *Sheng Wu Gong Cheng Xue Bao*, vol. 37, no. 2, pp. 561–579, Feb. 2021, doi: 10.13345/j.cjb.200579.
- [32] P. M. P. Sangene Biotech, G. Das, and M. P. Prasad, “Isolation, purification and mass production of protease enzyme from *Bacillus subtilis* Isolation, purification & mass production of protease enzyme from *bacillus subtilis*,” 2010. [Online]. Available: <https://www.researchgate.net/publication/267303044>
- [33] Boudehane A and Mezioud R, “Caractérisation physico-chimique d’enzymes bactériennes d’intérêt industriels et thérapeutiques,” *Memoire de master*, Université Akli Mohand Oulhadj, Bouira, 2017.
- [34] M. J. García-Gómez, S. Huerta-Ochoa, O. Loera-Corral, and L. A. Prado-Barragán, “Advantages of a proteolytic extract by *Aspergillus oryzae* from fish flour over a commercial proteolytic preparation,” *Food Chem*, vol. 112, no. 3, pp. 604–608, Feb. 2009, doi: 10.1016/j.foodchem.2008.06.016.
- [35] N. Patel, D. Rai, Shivam, S. Shahane, and U. Mishra, “Lipases: Sources, Production, Purification, and Applications,” *Recent Pat Biotechnol*, vol. 13, no. 1, pp. 45–56, Feb. 2019, doi: 10.2174/1872208312666181029093333.
- [36] O. N. G.-R. Glokpai, C. A. Zebre, K. P. Eba, K. C. Kouassi, K. A. Kouassi, and I. Coulibaly, “Isolation and Phenotypic Identification of some Molds Isolated from Peanut Pastes Sold in some Public Markets in the City of Daloa, Central-West, Côte d’Ivoire,” *International Journal of Pathogen Research*, vol. 13, no. 2, pp. 46–53, Apr. 2024, doi: 10.9734/ijpr/2024/v13i2279.

- [37] L. R. Lynd, P. J. Weimer, W. H. van Zyl, and I. S. Pretorius, "Microbial Cellulose Utilization: Fundamentals and Biotechnology," *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, vol. 66, no. 3, pp. 506–577, Sep. 2002, doi: 10.1128/MMBR.66.3.506-577.2002.
- [38] P. Saranraj, D. Stella, and D. Reetha, "MICROBIAL CELLULASES AND ITS APPLICTIONS: A REVIEW," 2012.
- [39] M. Tuncer, A. S. Ball, A. Rob, and M. T. Wilson, "Optimization of extracellular lignocellulolytic enzyme production by a thermophilic actinomycete *Thermomonospora fusca* BD25," *Enzyme Microb Technol*, vol. 25, no. 1–2, pp. 38–47, Jul. 1999, doi: 10.1016/S0141-0229(99)00012-5.
- [40] Mokhtar Youcef Benkada, "Etude de l'inoculum séminicole de *Drechslera teres* (Sacc.) Shoem. Et caractérisation de souches par l'utilisation de profils protéiques et isoenzymatiques," Toulouse, INPT, 1994.
- [41] ALVAREZ E and McGee, "New Assays for Detection of *Pseudomonas syringae* pv . *glycinea* in Soybean Seed," 1995.
- [42] S. Bhaduri and P. H. Demchick, "NOTES Simple and Rapid Method for Disruption of Bacteria for Protein Studies," 1983.
- [43] M. S. Islam, A. Aryasomayajula, and P. R. Selvaganapathy, "A review on macroscale and microscale cell lysis methods," *Micromachines*, vol. 8, no. 3. MDPI AG, 2017. doi: 10.3390/mi8030083.
- [44] M. M. Bradford, "A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding," *Anal Biochem*, vol. 72, no. 1–2, pp. 248–254, May 1976, doi: 10.1016/0003-2697(76)90527-3.
- [45] N. J. Kruger, "The Bradford Method For Protein Quantitation," 2009, pp. 17–24. doi: 10.1007/978-1-59745-198-7_4.
- [46] W. J. Loesche, "The identification of bacteria associated with periodontal disease and dental caries by enzymatic methods," *Oral Microbiol Immunol*, vol. 1, no. 1, pp. 65–70, Feb. 1986, doi: 10.1111/j.1399-302X.1986.tb00322.x.

- [47] J. Kiernan, “Indigogenic substrates for detection and localization of enzymes,” *Biotechnic & Histochemistry*, vol. 82, no. 2, pp. 73–103, Jan. 2007, doi: 10.1080/10520290701375278.
- [48] C. Bekhechi, F. Atik-Bekkara, and D. E. Abdelouahid, “Composition et activité antibactérienne des huiles essentielles d’*Origanum glandulosum* d’Algérie,” *Phytothérapie*, vol. 6, no. 3, pp. 153–159, Jun. 2008, doi: 10.1007/s10298-008-0310-6.
- [49] H. G. Kong, G. C. Song, and C. M. Ryu, “Inheritance of seed and rhizosphere microbial communities through plant–soil feedback and soil memory,” *Environmental Microbiology Reports*, vol. 11, no. 4. Wiley-Blackwell, pp. 479–486, Aug. 01, 2019. doi: 10.1111/1758-2229.12760.
- [50] E. B. Nelson, P. Simoneau, M. Barret, B. Mitter, and S. Compant, “Editorial special issue: the soil, the seed, the microbes and the plant,” *Plant and Soil*, vol. 422, no. 1–2. Springer International Publishing, Jan. 01, 2018. doi: 10.1007/s11104-018-3576-y.
- [51] S. Truyens, N. Weyens, A. Cuypers, and J. Vangronsveld, “Changes in the population of seed bacteria of transgenerationally <scp> <scp>Cd</scp> </scp> -exposed <scp>A</scp> *rabidopsis thaliana*,” *Plant Biol*, vol. 15, no. 6, pp. 971–981, Nov. 2013, doi: 10.1111/j.1438-8677.2012.00711.x.
- [52] S. Midha *et al.*, “Genomic Resource of Rice Seed Associated Bacteria,” *Front Microbiol*, vol. 6, Jan. 2016, doi: 10.3389/fmicb.2015.01551.
- [53] D. Ruiza, B. Agaras, P. de Werrab, L. G. Wall, and C. Valverde, “Characterization and screening of plant probiotic traits of bacteria isolated from rice seeds cultivated in Argentina,” *Journal of Microbiology*, vol. 49, no. 6, pp. 902–912, 2011, doi: 10.1007/s12275-011-1073-6.
- [54] M. B. Rao, A. M. Tanksale, M. S. Ghatge, and V. V. Deshpande, “Molecular and Biotechnological Aspects of Microbial Proteases †,” 1998. [Online]. Available: <https://journals.asm.org/journal/membr>
- [55] M. Nicodeme, J.-P. Grill, G. Humbert, and J.-L. Gaillard, “Extracellular protease activity of different *Pseudomonas* strains: dependence of proteolytic activity on culture conditions,” *J Appl Microbiol*, vol. 99, no. 3, pp. 641–648, Sep. 2005, doi: 10.1111/j.1365-2672.2005.02634.x.

- [56] L. V Savvateeva, “[Protease activity of *Klebsiella pneumoniae* of different virulence],” 2004. [Online]. Available: <https://www.researchgate.net/publication/8234237>
- [57] W. P. Lokapirnasari, D. S. Nazar, T. Nurhajati, K. Supranianondo, and A. B. Yulianto, “Production and assay of cellulolytic enzyme activity of *Enterobacter cloacae* WPL 214 isolated from bovine rumen fluid waste of Surabaya abattoir, Indonesia,” *Vet World*, vol. 8, no. 3, pp. 367–371, Mar. 2015, doi: 10.14202/vetworld.2015.367-371.
- [58] N. R. Gilkes, D. G. Kilburn, R. C. Miller, and R. A. J. Warren, “Bacterial Cellulases,” 1991.
- [59] A. Thomas, M. Laxmi, and A. Benny, “Bioethanol Production of Cellulase Producing Bacteria from Soils of Agrowaste Field,” *Journal of Scientific Research*, vol. 13, no. 2, pp. 643–655, May 2021, doi: 10.3329/jsr.v13i2.50574.
- [60] K. L. Barbosa *et al.*, “Bacterial cellulase from the intestinal tract of the sugarcane borer,” *Int J Biol Macromol*, vol. 161, pp. 441–448, Oct. 2020, doi: 10.1016/j.ijbiomac.2020.06.042.

ANNEXES

ANNEXE**Annexe 01 : Solutions**

- **Préparation de l'eau de javel a 10%**

Prélever 10ml de l'eau de javel ensuite ajouter 90ml de l'eau distillé stérile pour avoir l'eau de javel à 10%.

- **Préparation de l'eau physiologique**

Chlorure de sodium.....58,44g
Eau distillée.....1000ml

Annexe 02

- **Préparation du milieu Mac Conkey, EMB, Chapeman, MRS, du bouillon nutritif et de l'eau peptonée tamponnée**

- La poudre déshydratée de chaque milieu est pesée grâce à une balance analytique.
- La poudre est suspendue dans de l'eau distillée.
- Le barreau magnétique est déposé dans le mélange.
- Le mélange est déposé sur une plaque chauffante agitatrice et est bouilli jusqu'à dissolution complète des ingrédients.
- Le milieu est ensuite stérilisé par autoclavage.

Annexe 03

- **Examen à l'état frais**

Déposer une goutte d'eau physiologique sur la lame.

Flamber l'anse de platine.

- 3- Prélever une colonie avec l'anse de platine.
- 4- Déposer la colonie bactérienne dans la goutte d'eau stérile et l'étaler légèrement.
- 5- Déposer la lamelle sur la lame au niveau de la goutte.
- 6- Observer au microscope optique au grossissement (Gx40).

Annexe 04

Coloration de Gram

- 1- Effectuer un frottis fixé : sur une lame, déposer une goutte d'eau stérile. Ajouter une colonie isolée. Étaler et fixer à la chaleur.
- 2- Coloration par le violet de gentiane. Laisser agir de 30 secondes à 1 minute, puis rincer à l'eau.
- 3- Mordançage au Lugol : Laisser agir de 30 secondes à 1 minute, puis rincer à l'eau déminéralisée.
- 4- Décoloration à l'alcool : Verser goutte à goutte l'alcool sur la lame inclinée obliquement, et surveiller la décoloration qui doit être rapide. Le filet doit être clair à la fin de la décoloration. Rincer abondamment avec de l'eau déminéralisée pour stopper la décoloration.
- 5- Recoloration à la fuchsine : Mettre de l'eau distillée sur la lame et quelques gouttes de fuchsine. Laisser agir de 30 secondes à 1 minute. Laver doucement à l'eau déminéralisée.
- 6- Séchez la lame à la chaleur.
- 7- Observer au microscope optique avec une goutte d'huile à immersion au grossissement (G×1000).

Annexe 05 : Milieux pour les tests enzymatiques

• Milieu gélosé à 5% de lait écrémé

- lait écrémé50ml
- agar10g
- eau distillée1000ml

• Milieu gélose à amidon 1%

- Gélose nutritive.....1000ml
- Amidon.....10g

• Milieu à 0,5% de D-Cellobiose

- D-Cellobiose5g
- Gélose nutritive.....1000ml

Annexe 06

Tableau des résultats d'identification des souches

| | MILIEU | MANNITOL / mobilité | CITRATE | TSI | | CATALASE | OXYDASE | Colonie sur chromagar | Forme | Bactérie suspecte |
|---------|------------|---------------------|---------|-----|---------|----------|---------|-----------------------|---------|-----------------------|
| | | | | GAZ | LAC/GLU | | | | | |
| EPE (1) | CHAPMAN | +/- | - | - | + | + | - | Jaune | Cocci | <i>Staphylococcus</i> |
| EPH (1) | CHAPMAN | +/- | - | - | + | + | - | Jaune | Cocci | <i>Staphylococcus</i> |
| | EMB | +/+ | + | - | + | + | + | Verte | Bacille | <i>Pseudomonas</i> |
| EPE (2) | EMB | +/+ | + | + | + | + | - | Bleu | Bacille | <i>Enterobacter</i> |
| EPH 2 | CHAPMAN | +/+ | - | - | + | + | - | / | Bacille | <i>Bacillus</i> |
| EPE 3 | CHAPMAN | +/- | - | - | + | + | - | Jaune | Cocci | <i>Staphylococcus</i> |
| | MRS | +/- | - | - | + | + | - | / | Cocci | <i>staphylococcus</i> |
| | EMB | +/+ | + | - | - | + | + | Verte | Bacille | <i>Pseudomonas</i> |
| EPE 4 | EMB | +/+ | + | - | - | + | + | Verte | Bacille | <i>Pseudomonas</i> |
| BN5 | EMB c1 | +/+ | + | + | + | + | - | Bleu | Bacille | <i>Enterobacter</i> |
| | EMB C2 | +/+ | + | + | + | + | - | Bleu | Bacille | <i>Enterobacter</i> |
| ED 5 | EMB C1 | +/- | - | - | + | + | - | Jaune | Cocci | <i>Staphylococcus</i> |
| | EMB C2 | +/- | + | + | + | + | - | Bleu Violet | Bacille | <i>Klebsiella</i> |
| | MRS | +/- | - | - | + | + | - | / | Cocci | <i>staphylococcus</i> |
| BN 6 | CHAPMAN c1 | +/- | - | - | + | + | - | Jaune | Cocci | <i>Staphylococcus</i> |
| | Chapman c2 | +/+ | - | - | + | + | - | / | Bacille | <i>Bacillus</i> |
| EPE 6 | CHAPMAN | +/+ | - | - | + | + | - | / | Bacille | <i>Bacillus</i> |
| ED 6 | CHAPMAN | +/- | - | - | + | + | - | Jaune | Cocci | <i>Staphylococcus</i> |
| | EMB | +/- | + | + | + | + | - | Bleu violet | Bacille | <i>Klebsiella</i> |

| | | | | | | | | | | |
|--------|---------------|-----|---|---|---|---|---|----------------|---------|-----------------------|
| BN 7 | CHAPMAN c1 | +/- | - | - | + | + | - | Jaune | Cocci | <i>Staphylococcus</i> |
| | Chapman c2 | +/- | - | - | + | + | - | Jaune | Cocci | <i>Staphylococcus</i> |
| | MRS | +/- | - | - | + | + | - | / | Cocci | <i>staphylococcus</i> |
| EPE 8 | CHAPMAN | +/+ | - | - | + | + | - | / | Bacille | <i>Bacillus</i> |
| | EMB | +/+ | + | - | - | + | + | Verte | Bacille | <i>Pseudomonas</i> |
| ED 8 | CHAPMAN | +/+ | - | - | + | + | - | / | Bacille | <i>Bacillus</i> |
| BN 9 | MRS | +/- | - | - | + | + | - | / | Cocci | <i>staphylococcus</i> |
| EPE 9 | CHAPMAN | +/+ | - | - | + | + | - | / | Bacille | <i>Bacillus</i> |
| | EMB | +/- | + | + | + | + | - | Bleu Violet | Bacille | <i>Klebsiella</i> |
| EPH 9 | CHAPMAN | +/- | - | - | + | + | - | Jaune | Cocci | <i>Staphylococcus</i> |
| ED 9 | EMB | +/+ | + | - | - | + | + | Verte | Bacille | <i>Pseudomonas</i> |
| BN 10 | CHAPMAN | +/- | - | - | + | + | - | Jaune | Cocci | <i>Staphylococcus</i> |
| | EMB | +/+ | + | + | + | + | - | Bleu | Bacille | <i>Enterobacter</i> |
| EPE 10 | CHAPMAN | +/- | - | - | + | + | - | Jaune | Cocci | <i>Staphylococcus</i> |
| EPH 10 | EMB | +/- | + | + | + | + | - | Bleu Violet | Bacille | <i>Klebsiella</i> |
| ED 10 | EMB | +/- | - | - | + | + | - | Jaune | Cocci | <i>Staphylococcus</i> |

Annexe 07

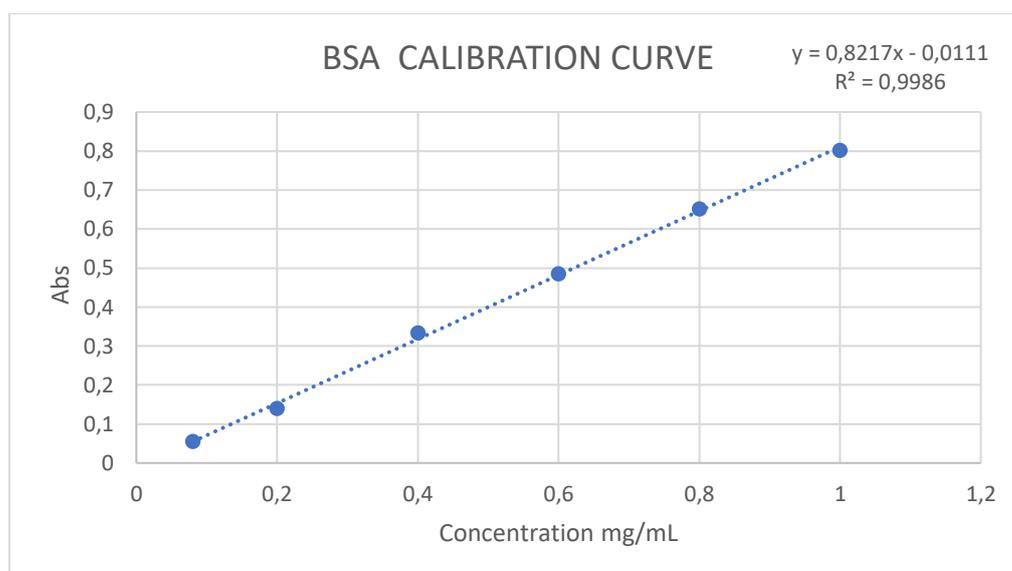
**Tableau des résultats des extraits aux différentes activités enzymatiques et
antibactérienne.**

| | Bactérie suspecte | Activité enzymatique | | | Activité antibactérienne | |
|-------------------------|-----------------------|----------------------|----------------|--------------|-----------------------------|-------------------------|
| | | Protéolytique | Cellulolytique | Amylolytique | <i>Staphylocoque aureus</i> | <i>Escherichia coli</i> |
| Extrait intracellulaire | <i>Staphylococcus</i> | - | - | - | 8 mm | - |
| | <i>Staphylococcus</i> | - | - | - | 9 mm | - |
| | <i>Pseudomonas</i> | - | - | - | 12mm | - |
| | <i>Staphylococcus</i> | - | - | - | 14mm | - |
| | <i>Pseudomonas</i> | - | - | - | 12mm | - |
| | <i>Staphylococcus</i> | - | - | - | 10mm | - |
| | <i>Enterobacter</i> | - | - | - | 9mm | - |
| | <i>Bacillus</i> | - | - | - | 9,5mm | - |
| | <i>Bacillus</i> | - | - | - | 10mm | - |
| | <i>Klebsiella</i> | - | - | - | 10mm | - |
| | <i>Staphylococcus</i> | - | - | - | 13mm | - |
| | <i>Bacillus</i> | - | - | - | 10mm | - |
| | <i>Staphylococcus</i> | - | - | - | 9mm | - |
| | <i>Staphylococcus</i> | - | - | - | 10mm | - |
| | <i>Pseudomonas</i> | - | - | - | 11mm | - |
| | <i>Staphylococcus</i> | - | - | - | 9mm | - |
| | <i>Staphylococcus</i> | - | - | - | 9mm | - |
| | <i>Staphylococcus</i> | - | - | - | 10mm | - |
| | <i>Staphylococcus</i> | - | - | - | 8mm | - |
| | <i>Pseudomonas</i> | - | - | - | 11mm | - |
| | <i>Bacillus</i> | - | - | - | 10mm | - |
| | <i>Klebsiella</i> | - | - | - | 10mm | - |
| | <i>Enterobacter</i> | - | - | - | 11mm | - |
| | <i>Staphylococcus</i> | - | - | - | 10mm | - |
| | <i>Bacillus</i> | - | - | - | 7mm | - |
| | <i>Enterobacter</i> | - | - | - | 9mm | - |
| | <i>Staphylococcus</i> | - | - | - | 7mm | - |
| | <i>Staphylococcus</i> | - | - | - | 11mm | - |
| | <i>Klebsiella</i> | - | - | - | 8mm | - |
| | <i>Staphylococcus</i> | - | - | - | 8mm | - |
| <i>Enterobacter</i> | - | - | - | 8mm | - | |
| <i>Pseudomonas</i> | - | - | - | 7mm | - | |
| <i>Staphylococcus</i> | - | - | - | 11mm | - | |
| <i>Enterobacter</i> | - | - | - | 7mm | - | |
| <i>Klebsiella</i> | - | - | - | 7mm | - | |
| Extrait extracellulaire | <i>Staphylococcus</i> | 19mm | + | -- | - | - |
| | <i>Staphylococcus</i> | 18mm | + | - | - | - |
| | <i>Staphylococcus</i> | 20mm | + | -- | - | - |
| | <i>Pseudomonas</i> | 0mm | - | - | - | - |
| | <i>Staphylococcus</i> | 21mm | - | - | - | - |
| | <i>Enterobacter</i> | 14mm | - | - | - | - |
| | <i>Staphylococcus</i> | 0mm | + | - | - | - |

| | | | | | |
|-----------------------|------|---|---|---|----|
| <i>Bacillus</i> | 20mm | - | - | - | - |
| <i>Bacillus</i> | 26mm | - | - | - | - |
| <i>Pseudomonas</i> | 25mm | + | - | - | - |
| <i>Pseudomonas</i> | 14mm | - | - | - | - |
| <i>Staphylococcus</i> | 0mm | - | - | - | - |
| <i>Staphylococcus</i> | 10mm | - | - | - | - |
| <i>Bacillus</i> | 30mm | - | - | - | - |
| <i>Enterobacter</i> | 21mm | - | - | - | - |
| <i>Staphylococcus</i> | 11mm | - | - | - | - |
| <i>Klebsiella</i> | 12mm | - | - | - | - |
| <i>Klebsiella</i> | 25mm | - | - | - | - |
| <i>Enterobacter</i> | 0mm | - | - | - | - |
| <i>Bacillus</i> | 22mm | - | - | - | - |
| <i>Pseudomonas</i> | 28mm | - | - | - | - |
| <i>Staphylococcus</i> | 28mm | - | - | - | - |
| <i>Klebsiella</i> | 0mm | - | - | - | - |
| <i>Staphylococcus</i> | 19mm | - | - | - | -- |
| <i>Klebsiella</i> | 27mm | + | - | - | - |
| <i>Enterobacter</i> | 26mm | + | - | - | - |
| <i>staphylococcus</i> | 22mm | - | - | - | - |
| <i>Staphylococcus</i> | 0mm | - | - | - | - |
| <i>Bacillus</i> | 27mm | - | - | - | - |
| <i>Staphylococcus</i> | 28mm | - | - | - | - |
| <i>Staphylococcus</i> | 16mm | - | - | - | - |
| <i>Pseudomonas</i> | 13mm | - | - | - | - |
| <i>Staphylococcus</i> | 25mm | - | - | - | - |
| <i>Staphylococcus</i> | 22mm | - | - | - | - |
| <i>Enterobacter</i> | 8mm | + | - | - | - |

Annexe 08

Courbe d'étalon du dosage des protéines



Annexe 09

Caractéristiques générales des souches bactériennes testées

| <i>Nom de la souche</i> | <i>Reference</i> | <i>Gram</i> | <i>Famille</i> |
|------------------------------|------------------|-------------|--------------------|
| <i>Escherichia coli</i> | ATCC 25922 | Négatif | Enterobacteriaceae |
| <i>Staphylococcus aureus</i> | ATCC 6538 | Positif | Staphylococcaceae |

Résumé :

Les plantes hébergent une variété d'espèces endophytes, y compris les bactéries endophytes des graines. Malgré de multiples recherches sur la caractérisation microbiologique des graines de plantes, on dispose de très peu d'informations sur les endophytes microbiens présents dans les graines de *Pinus halepensis*. La présente étude avait pour objectif de déterminer la microflore bactérienne des graines de *Pinus halepensis* et de cribler les protéines fonctionnelles produites par cette microflore. Nos résultats ont révélé la présence de souches bactériennes dans ces graines, telles que *Staphylococcus* 44%, *Bacillus* 17%, *Pseudomonas* 14% *Klebsiella* et *Enterobacter* ainsi que dans notre étude en vitro, nous avons constaté que toutes les souches bactériennes présentent au moins une activité enzymatique (protéolytique et cellulolytique). Ce travail a mis en lumière la présence d'une microflore endophyte dans les graines de *Pinus halepensis*, qui fait office de source potentielle d'enzymes d'un grand intérêt pour des applications industrielles.

Mots clés : Graines, *Pinus halepensis*, flore bactérienne, activité enzymatique, activité antibactérienne.

Abstracts:

Plants host a variety of endophytic species, including endophytic seed bacteria. Despite extensive research about microbiological characterization of plant seeds, very little information is available on the microbial endophytes present in *Pinus halepensis* seeds. The aim of the present study is to determine the bacterial microflora of *Pinus halepensis* seeds and to screen the functional proteins produced by this microflora. Our results revealed the presence of bacterial strains in these seeds, such as *Staphylococcus* 44%, *Bacillus* 17%, *Pseudomonas* 14% *Klebsiella* and *Enterobacter*. In our investigation in vitro, we found that all bacterial strains display at least one enzymatic activity (proteolytic and cellulolytic). This work has highlighted the presence of an endophytic microflora in *Pinus halepensis* seeds, which acts as a potential source of enzymes of great interest for industrial applications.

Keywords: Seeds, *Pinus halepensis*, bacterial flora, enzymatic activity, antibacterial activity.

ملخص:

تستضيف النباتات مجموعة متنوعة من الأنواع المستوطنة بما في ذلك البكتيريا الداخلية للبذور. وعلى الرغم من الأبحاث المكثفة التي أجريت على التوصيف الميكروبيولوجي لبذور النباتات، إلا أن المعلومات المتوفرة عن البكتيريا الداخلية الميكروبية الموجودة في بذور الصنوبر الحلبي *Pinus halepensis* قليلة جداً. الهدف من هذه الدراسة هو تحديد البكتيريا الميكروبية في بذور الصنوبر *Pinus halepensis* وفحص البروتينات الوظيفية التي تنتجها هذه البكتيريا. وقد كشفت نتائجنا عن وجود سلالات بكتيرية في هذه البذور، مثل *Staphylococcus* 44%، *Bacillus* 17%، *Pseudomonas* 14% *Klebsiella*، *Enterobacter* في دراستنا المختبرية، وجدنا أن جميع السلالات البكتيرية أظهرت نشاطاً إنزيمياً واحداً على الأقل (محللة للبروتين ومحللة للسليول). سلط هذا العمل الضوء على وجود نباتات مجهرية داخلية في بذور الصنوبر الحلبي التي تعمل بمثابة مصدر محتمل للإنزيمات ذات أهمية كبيرة للتطبيقات الصناعية.

