

**REPUBLIQUE ALGERIENNE DEMOCRATIQUE ET POPULAIRE**

**Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique  
Université Mouloud Mammeri de Tizi-Ouzou**

**Faculté des Sciences Biologiques et des Sciences Agronomiques**

**Département de Biochimie et de Microbiologie**



**Mémoire de fin d'étude**

**En vue de l'obtention du diplôme de Master en Sciences biologiques**

**Option : Biotechnologie Microbienne**

***Thème***

***Les bactéries rhizosphériques comme agents de  
biocontrôle***

**Réalisé par :**

**M<sup>elle</sup> MOULA Manel**

**M<sup>elle</sup> SEFIANE Rabab**

**Soutenu le : 04/07/2023 à 12h00**

**Devant le jury composé de :**

**M<sup>me</sup> BRAHMI F.**

**MCB**

**Présidente**

**M<sup>me</sup> MEDJKOUH-REZZAK L.**

**MCB**

**Examinatrice**

**M<sup>me</sup> TABLI N.**

**MCB**

**Promotrice**

**Année universitaire : 2022/2023**



# Remerciements



*Avant tout, Nous tenons à remercier Allah le tout puissant, de nous  
avoir donné la force et la patience ;*

*Nos sincères remerciements s'adressent ensuite à notre promotrice  
Mme TABLI N : Maitre de Conférences Classe B à l'UMMTO, de nous  
avoir encadré, conseillé et encouragé et permis de travailler dans un cadre  
très agréable.*

*Mme BRAHMI F : Maitre de Conférences Classe B à l'UMMTO,  
d'avoir accepté de présider le jury.*

*Mme MEDJKOUH L : Maitre de Conférences Classe B à l'UMMTO,  
pour avoir accepté d'examiner ce travail et d'être parmi le jury.*

*Nous tenons également à exprimer nos profondes reconnaissances à  
Melle DERMECHE S, pour son soutien, son enthousiasme et ses conseils  
avisés tout au long de ce travail.*

*Nous remercions Mme OUHOCINE DJ., ingénieure au laboratoire  
pédagogique de microbiologie, pour sa gentillesse, sa serviabilité, sa  
disponibilité et l'intérêt qu'elle apporte à notre travail.*

*Enfin, nos remerciements s'adressent à toutes les personnes ayant  
contribué de près ou de loin à la réalisation de ce travail.*



# Dédicaces

*A mes chers parents Nassima et Mourad*

*Aucun mot, aucune dédicace ne saurait exprimer mon respect, ma considération et mon amour pour vous deux. Vos sacrifices étaient toujours la source de ma force, c'est votre soutien qui m'a permis d'arriver à ce jour, ce que je suis aujourd'hui et tous ce que je fais est un remerciement pour votre patience, votre générosité et vos efforts pour mon bien être.*

*A mon cher frère Sidali, je ne te remercie jamais assez pour ton soutien. Merci d'être toujours à mes côtés.*

*Ma merveilleuse sœur Ourida à qui je souhaite le succès dans sa vie.*

*À mes chères amies, Kamelia, Maria, Kenza et mon binôme Manel, je vous dédie ce travail en hommage à tous les moments agréables, inoubliables que nous avons vécus ensemble. Je vous remercie pour votre présence.*

*Rabab*



# Dédicaces

*A mes chers parents,*

*A mes frères ,*

*A mes grands-parents,*

*A mes amis et mes camarades*

*Manel*

<b>CMC</b>	<b>CarboxyMethyl Cellulose</b>
<b>GN</b>	<b>Gélose Nutritive</b>
<b>HCN</b>	<b>Cyanhydrique d'Hydrogène</b>
<b>ISR</b>	<b>Induced Systemic Resistance</b>
<b>PCA</b>	<b>Plat Count Agar</b>
<b>PDA</b>	<b>Potato Dextrose Agar</b>
<b>PGI</b>	<b>Percentage Growth Inhibition</b>
<b>PGP</b>	<b>Plant Growth Promotion</b>
<b>PGPR</b>	<b>Plant Growth Promoting Rhizobacteria</b>
<b>PGPB</b>	<b>Plant Growth Promoting Bacteria</b>
<b>PSB</b>	<b>Phosphate Solubilizing Bacteria</b>
<b>SAR</b>	<b>Systemic Acquired Resistance</b>
<b>TSA</b>	<b>Trypticase Soja Agar</b>

---

<b>Figure n° 01</b> : La zone rhizosphérique .....	<b>03</b>
<b>Figure n° 02</b> : L'aspect microscopique d' <i>Aspergillus niger</i> sous microscope optique .....	<b>07</b>
<b>Figure n° 03</b> : Symptômes de l'aspergillose sur l'ail et l'oignon .....	<b>08</b>
<b>Figure n° 04</b> : L'aspect microscopique du genre <i>Alternaria sp</i> sous microscope optique .....	<b>08</b>
<b>Figure n° 05</b> : L'aspect microscopique du genre <i>Penicillium sp</i> sous microscope optique .....	<b>09</b>
<b>Figure n° 06</b> : Aspects d'espèces fongiques sur gélose nutritive.....	<b>26</b>
<b>Figure n° 07</b> : Recherche de l'activité protéasique .....	<b>28</b>
<b>Figure n° 08</b> : Recherche de la production de l'amylase .....	<b>29</b>
<b>Figure n° 09</b> : Recherche de la production de la cellulase .....	<b>29</b>
<b>Figure n° 10</b> : Recherche de la production de la chitinase .....	<b>30</b>
<b>Figure n° 11</b> : Mise en évidence des deux activités estérasique et lipasique .....	<b>30</b>
<b>Figure n° 12</b> : Recherche de l'activité uréasique .....	<b>31</b>
<b>Figure n° 13</b> : Pourcentage d'inhibition de la croissance des champignons phytopathogènes par les isolats testés. ....	<b>34</b>
<b>Figure n° 14</b> : Résultats du test d'antagonisme exercé par les 6 isolats sur les 3 champignons phytopathogènes en présence de témoins.....	<b>35</b>
<b>Figure n° 15</b> : Résultats de production de cyanure d'hydrogène (HCN) par les 6 isolats .....	<b>37</b>
<b>Figure n° 16</b> : Résultats du test de production d'ammoniac (NH <sub>3</sub> ) comparés au témoin négatif.....	<b>38</b>
<b>Figure n° 17</b> : Aspect de quelques résultats d'activités enzymatiques testées sur boites .....	<b>40</b>
<b>Figure n° 18</b> : Colorations de Gram des isolats bactériens .....	<b>44</b>

<b>Tableau I</b> : Principaux avantages et inconvénients de la lutte biologique .....	<b>20</b>
<b>Tableau II</b> : Quelques agents de biocontrôle utilisés dans la lutte contre des phytopathogènes. .....	<b>22</b>
<b>Tableau III</b> : Taux d'inhibition des champignons phytopathogènes .....	<b>33</b>
<b>Tableau IV</b> : Résultats de production de cyanure d'hydrogène par les isolats .....	<b>37</b>
<b>Tableau V</b> : Résultats de la capacité des différents isolats à produire l'ammoniac .....	<b>38</b>
<b>Tableau VI</b> : Résultats des différents tests d'activités enzymatiques réalisés pour les isolats .	<b>40</b>
<b>Tableau VII</b> : Résultats de la coloration de Gram des isolats bactériens .....	<b>44</b>

# Sommaire

---

Liste des abréviations

Listes des figures

Liste des tableaux

**Introduction ..... 01**

## Partie bibliographique

### Chapitre I : La rhizosphère

1. Concept de la rhizosphère ..... 03

2. Les exsudats racinaires ..... 03

3. La flore de la rhizosphère ..... 04

3.1. Les rhizobactéries ..... 04

3.2. Les champignons ..... 05

3.2.1. Les mycorhizes ..... 05

3.2.1.1. Les ectomycorhizes ..... 06

3.2.1.2. Les endomycorhizes ..... 06

3.2.1.3. Les ectendomycorhizes ..... 06

4. Champignons phytopathogènes ..... 06

4.1. *Aspergillus niger* ..... 07

4.2. *Alternaria sp.* ..... 08

4.3. *Penicillium sp.* ..... 09

5. Facteurs déterminant l'activité rhizosphérique ..... 10

6. Les interactions entre les microorganismes de la rhizosphère ..... 10

6.1. Le commensalisme ..... 10

6.2. Le mutualisme ..... 10

## Sommaire

---

6.3. L'antagonisme .....	11
6.3.1. La compétition.....	11
6.3.2. L'hyperparasitisme.....	11
7. Rôle de la rhizosphère .....	11
8. Rhizobactéries promotrices de la croissance des plantes (Plant Growth Promoting Rhizobacteria (PGPR).....	12
9. Mécanismes impliqués dans la croissance des plantes.....	13
9.1. Mécanismes directs .....	13
9.1.1. Solubilisation du phosphate .....	13
9.1.2. Fixation d'azote.....	13
9.1.3. Production des phytohormones (production d'hormones de croissance).....	14
9.2. Mécanismes indirects .....	14
9.2.1. Compétition pour l'espace et les nutriments .....	14
9.2.2. Production des sidérophores.....	15
9.2.3. Résistance systémique acquise (SAR) .....	15
9.2.4. Résistance systémique induite (ISR).....	16
9.2.5. Enzymes lytiques.....	16

## Chapitre II : Le biocontrôle

1. Les moyens de lutte.....	18
1.1. Lutte physique .....	18
1.2. Lutte chimique.....	18
1.2.1. Les fongicides .....	18

## Sommaire

---

1.2.2. Pesticides .....	19
1.3. Lutte biologique .....	20
1.3.1. Avantages et inconvénients de la lutte biologique .....	20
1.4. Lutte culturale .....	21
2. Microorganismes les plus utilisés dans la lutte biologique .....	21
3. Les mécanismes de biocontrôle.....	22
3.1. Compétition pour les nutriments et l'espace .....	23
3.2. Parasitisme .....	23
3.3. Antibiose .....	23
3.4. Stimulation de la défense des plantes.....	24

## Partie expérimentale

### Chapitre I : Matériel et méthodes

1. Matériel .....	25
1.1. Matériel biologique .....	25
1.2. Matériel non biologique .....	25
2. Méthodes .....	25
2.1. Echantillonnage .....	25
2.2. Isolement et purification des bactéries .....	25
2.3. Mise en évidence de l'activité antifongique.....	26
2.3.1. Etude de l'action antagoniste des isolats bactériens à l'égard des trois champignons par confrontation directe sur boîte.....	26

## Sommaire

---

2.4. Recherche de métabolites spécifiques à activité antifongique .....	27
2.4.1. Production de cyanure d'hydrogène (HCN).....	27
2.4.2. Production d'ammoniac (NH <sub>3</sub> ).....	27
2.5. Caractérisation métabolique et fonctionnelle .....	27
2.5.1. Activités enzymatiques .....	27
2.5.1.1. Activité protéasique.....	28
2.5.1.2. Activité amylasique.....	28
2.5.1.3. Activité cellulasique .....	29
2.5.1.4. Activité chitinasique.....	30
2.5.1.5. Activité lipasique et estérasique .....	30
2.5.1.6. Activité uréasique.....	31
2.5.2. Coloration de Gram des isolats .....	31

## Chapitre II : Résultats et discussion

1. Prélèvement d'échantillons de sol et isolement de bactéries .....	33
2. Inhibition de la croissance mycélienne par confrontation directe .....	33
3. Résultats de la recherche de métabolites spécifiques à activité antifongique .....	36
3.1. Production de métabolites volatiles.....	36
3.1.1. Production de Cyanure d'hydrogène (HCN).....	36
3.1.2. Production d'ammoniac (NH <sub>3</sub> ).....	38
4. Caractérisation métabolique et fonctionnelle .....	39
4.1. Activités enzymatiques .....	39

# Sommaire

---

4.1.1. Activité protéasique.....	41
4.1.2. Activité lipasique et estérasique .....	41
4.1.3. Activité amylasique.....	42
4.1.4. Activité chitinasique.....	42
4.1.5. Activité cellulastique.....	43
4.1.6. Activité uréasique.....	43
4.2. Coloration de Gram des isolats .....	44
<b>Conclusion et perspectives.....</b>	<b>45</b>

## Références bibliographiques

## Annexes

## Résumé

## Abstract

## ملخص

# **Introduction**

Les organismes phytopathogènes, notamment les bactéries, les champignons, les insectes, les nématodes, les virus et les protozoaires représentent l'un des problèmes majeurs en agriculture. D'après les estimations de la production agricole mondiale, 50 % de cultures végétales sont perdues avant ou après la récolte (Choudhary et *al.*, 2009). Les champignons phytopathogènes sont responsables d'une grande partie de cette perte, ils imposent une menace majeure pour la santé des plantes et la production agricole.

Pendant les trois dernières décennies, les agriculteurs sont devenus dépendants des produits chimiques comme moyens relativement fiables de protection des cultures, en raison de leurs performances et leur facilité d'application (Jan et *al.*, 2011). Cependant, l'utilisation non contrôlée de ces produits, entraîne des risques sur la santé publique et environnementale, et peut provoquer une stimulation des systèmes de résistance des agents pathogènes à ces produits (Nasraoui, 2006). Ils peuvent également être à l'origine d'un déséquilibre dans l'écosystème naturel par leur effet négatif sur la microflore rhizosphérique (Singh et *al.*, 2019).

En raison de l'aggravation des problèmes en matière de contrôle des maladies fongiques, une recherche sérieuse est nécessaire pour identifier des méthodes alternatives pour la protection des végétaux, qui sont moins dépendantes des produits chimiques et sont plus respectueuses de l'environnement. La lutte biologique est l'une des méthodes prometteuses, elle consiste en l'utilisation de microorganismes qui ont soit un potentiel inhibiteur de l'agent causal, soit l'habilité d'accroître le mécanisme de défense de la plante. Parmi ces microorganismes, les bactéries/rhizobactéries dites promotrices de la croissance des plantes (PGPB/R) sont les meilleurs candidats à appliquer sous forme de cellules vivantes. Ils sont connus pour leur production de métabolites bioactifs. Leur capacité à coloniser la rhizosphère et les racines des plantes, à contrôler les microorganismes phytopathogènes et à former des spores adaptées pour la formulation de produits stables, sont des caractères importants pour la réussite du biocontrôle.

Nous avons fixé comme objectif dans ce travail l'étude des bactéries rhizosphériques comme agents de biocontrôle isolées à partir d'un sol rhizosphérique de la Wilaya de Béjaïa, à l'égard de trois champignons phytopathogènes, à savoir : *Aspergillus niger*, *Alternaria sp* et *penicillium sp*, pour la mise en évidence des caractères de production de molécules antifongiques et stimulatrices de la croissance des plantes.

Pour ce faire, nous avons opté pour la division de ce travail en trois grandes parties : La première partie est consacrée à la synthèse bibliographique relative au sujet, la deuxième

partie est réservée à la présentation de l'ensemble des tests effectués *in vitro* et la troisième partie représente les résultats obtenus et leur discussion.

# Partie bibliographique



# **Chapitre I**

## **La rhizosphère**

## 1. Concept de la rhizosphère

Le terme rhizosphère a été adopté en 1904 par Lorenz Hiltner (Hinsinger et *al.*, 2005). 'Rhizo' vient du grec « Rhiza » signifiant racine, 'Sphère' vient du latin signifiant globe. La sphère définit le champ d'influence du système racinaire des légumineuses.

La rhizosphère désigne la mince couche du sol qui entoure les racines et dont la composition est profondément modifiée par le métabolisme de la racine (Schröder et Hartmann, 2003). La rhizosphère définit aujourd'hui le lieu d'interaction entre le sol, la plante et les microorganismes.



**Figure n° 01** : La zone rhizosphérique (Bazot, 2005).

## 2. Les exsudats racinaires

L'exsudation est définie comme la libération de composés solubles de faible poids moléculaire (Lesuffleur et *al.*, 2007). Au niveau de la rhizosphère, les racines libèrent beaucoup de matières organiques sous forme de mucilage, plus de 40% des produits de photosynthèse passent dans le système racinaire (Betencourt, 2012).

Les exsudats, en particulier dans la région apicale, constituent la plus grande partie des substances chimiques libérées par les racines. C'est aussi ceux que les microorganismes décomposent le plus rapidement. Ils sont souvent composés de sucres, d'acides aminés, des facteurs de croissance et d'acides à base d'ammoniac, vitamines, enzymes et acides gras organiques. Ils servent de fournisseurs de nutriments pour la microflore rhizosphérique, agissant soit pour stimuler, soit pour inhiber certaines espèces (Boudiaf Nait Kaci, 2014).

Les microorganismes stimulés peuvent agir directement sur la plante en mettant à sa disposition des phytohormones (Lebuhn et *al.*, 1997), des vitamines ou des molécules organiques absorbables par les racines ou bien indirectement en améliorant sa nutrition minérale par solubilisation ou minéralisation de certains éléments (Bais et *al.*, 2006).

### 3. La flore de la rhizosphère

Le terme «flore» désigne toutes les espèces végétales ou microbiennes présentes dans une zone géographique ou une écorégion spécifique.

La majorité de la microflore de la zone rhizosphérique est très hétérogène. En fait, de nombreuses études ont montré une haute densité et un niveau d'activité microbiologique proche des racines des plantes ; cette microflore est composée principalement de bactéries et de champignons.

La rhizosphère est la zone du sol qui entoure étroitement les racines et est activement influencée par la plante. Les racines des plantes libèrent continuellement un mélange complexe d'interactions chimiques qui altèrent l'environnement local du sol (la disponibilité d'éléments denses en nutriments : sucres, acides aminés, la teneur en oxygène, la pression de l'eau et le pH en favorisant la croissance des microorganismes, qu'ils soient nocifs ou bénéfiques. Les jeunes plantes libèrent jusqu'à 40% du carbone qu'elles stockent dans la rhizosphère, tandis que les plantes mûres en libèrent jusqu'à 20% de ce carbone, créant une nouvelle niche écologique pour la vie microbienne. La nature et l'activité de la flore microbienne entourant les racines de la plante la distinguent significativement du sol environnant (Danjon et *al.*, 2007).

Les bactéries et les champignons qui ont été isolés dans la rhizosphère peuvent stimuler la croissance des végétaux, freiner le développement des maladies transmises par le sol, mais aussi causer eux-mêmes des maladies (Danjon et *al.*, 2007).

#### 3.1. Les rhizobactéries

Ce sont des bactéries associées aux racines de plantes. Celles-ci sont généralement des souches très compétitives capables de coloniser le système racinaire riche en éléments nutritifs, tout au long du cycle de développement de la plante (Dorjey et *al.*, 2017). Leur nature hétérotrophique typique nécessite l'utilisation de composés organiques comme source d'énergie. Leurs besoins sont entièrement satisfaits à l'intérieur, même dans la rhizosphère.

Certains de ces microorganismes influencent de manière bénéfique la plante en stimulant sa croissance et/ou en la protégeant contre des infections par des agents phytopathogènes. Ces bactéries de la rhizosphère sont alors reprises sous le terme PGPR (Plant Growth-Promoting Rhizobacteria). La plupart des souches bactériennes exploitées comme biopesticides appartiennent aux genres *Agrobacterium*, *Bacillus* et *Pseudomonas* (Adam, 2008). Beaucoup de recherches se sont concentrées sur ces deux derniers genres de bactéries parce qu'ils sont des habitants communs de la rhizosphère et possèdent une grande activité dans le contrôle biologique de maladies liées au sol. Ils ont la capacité de produire de nombreux antibiotiques, et ils sont faciles à cultiver *in vitro* ou à manipuler en laboratoire. De plus, les bacilles offrent un avantage par rapport aux autres bactéries en raison de leur capacité à former des endospores résistantes au changement des conditions du milieu (Cavaglieri *et al.*, 2005 ; Raaijmakers *et al.*, 2002).

### 3.2. Les champignons

Les champignons sont des organismes eucaryotes, aérobies souvent multicellulaires et parfois unicellulaires, qui sont plus résistants aux conditions environnementales difficiles que les bactéries. Ils sont dotés d'une paroi chitineuse. Ils représentent entre 50 et 60 % de la biomasse vivante en dehors des rivières. Selon leurs habitudes alimentaires, ils sont divisés en quatre groupes : décomposant (matériaux organiques frais), prédateurs, pathogènes et parasites (qui peuvent nuire aux cultures) et symbiotes. Les champignons jouent des rôles très importants dans les cycles des nutriments du sol (Egidi *et al.*, 2019), ainsi que dans le recyclage des déchets, des sécrétions chimiques et excréments des racines des plantes, des animaux et des microorganismes (Egidi *et al.*, 2019).

#### 3.1.1. Les mycorhizes

Le terme mycorhize (du gréco-latin 'mukes', qui signifie champignon, et 'rhiza' qui signifie racine) a été utilisé pour la première fois par le botaniste allemand FRANK en 1885 pour décrire les organes mixtes racines-champignons (Strullu, 1991). L'organe appelé mycorhize résulte d'une union durable entre les racines de la majorité des végétaux et certains champignons symbiotiques du sol, basés sur des échanges réciproques de métabolites (Drenou *et al.*, 2006).

Les mycorhizes sont très répandues dans la nature, elles intéressent 95% des végétaux. L'union favorise la croissance des deux partenaires. Le végétal fournit au champignon des

sucres. En retour, le champignon alimente la plante en éléments minéraux notamment en phosphore (Châtaigner et Duponnois, 2017).

La symbiose mycorhizienne peut prendre différentes formes appelées ectomycorhizes, endomycorhizes ou ectendomycorhizes, basées sur leur morphologie (Durrieu, 1993).

#### **3.1.1.1. Les ectomycorhizes**

Du grec 'ektos', à l'extérieur chez lesquels les champignons se développent essentiellement autour de la racine, en formant un manteau fongique (Hopkins, 2003) ; de ce manteau part un réseau d'hyphes qui se développe entre les cellules corticales de la racine (réseau de Hartig) sans jamais entrer à l'intérieur de ces dernières (Hopkins, 2003 ; Wang et *al.*, 2006). Ce réseau constitue le siège des échanges nutritifs bidirectionnels entre le champignon et la plante. Ils colonisent seulement 3% des espèces végétales et tout particulièrement les plantes ligneuses, arbres ou arbustes (Fortin et *al.*, 2008)

#### **3.1.1.2. Les endomycorhizes**

Ce sont des champignons ne formant pas de manchon fongique mais dont les hyphes pénètrent dans les cellules du cortex racinaire. On distingue les endomycorhizes éricoïdes et les endomycorhizes d'orchidées, qui forment des pelotons d'hyphes intracellulaires, et les endomycorhizes à arbuscules qui colonisent l'intérieur des cellules sous forme d'arbuscules (Dominique, 2007).

#### **3.1.1.3. Les ectendomycorhizes**

Les ectendomycorhizes sont des formes intermédiaires qui possèdent à la fois les caractéristiques des ectomycorhizes, c'est-à-dire, un réseau de Hartig bien développé et un manteau fongique plus ou moins épais, ou absent dans quelques cas, et les caractéristiques des endomycorhizes soit la pénétration à l'intérieur des cellules corticales par les hyphes (Garbaye, 2013 ; Yu et *al.*, 2001).

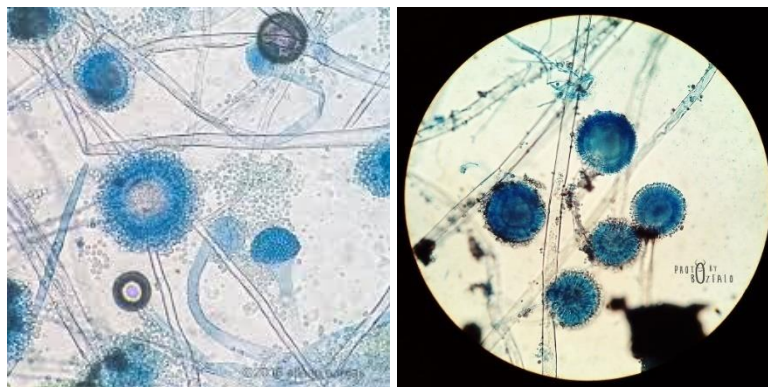
### **4. Champignons phytopathogènes**

Les champignons phytopathogènes ou dits telluriques constituent un groupe d'organismes microscopiques hétérotrophes ubiquistes, qui présentent des structures et des caractéristiques biologiques extrêmement diversifiées (Kirk et *al.*, 2001). Ils établissent des interactions antagonistes avec les plantes (Vander, 2003). Plusieurs genres de champignons telluriques sont capables d'infecter les racines de plantes ainsi que les autres parties et même le fruit

(Abdelkader, 2012). Dans cette catégorie de champignons, on peut trouver les *Aspergillus*, les *Penicillium*, les *Fusarium*, *Alternaria*, *Pythium* ...etc. L'ensemble de ces microorganismes provoquent des maladies sur diverses cultures maraîchères, céréales, plantes (Agrios, 2005).

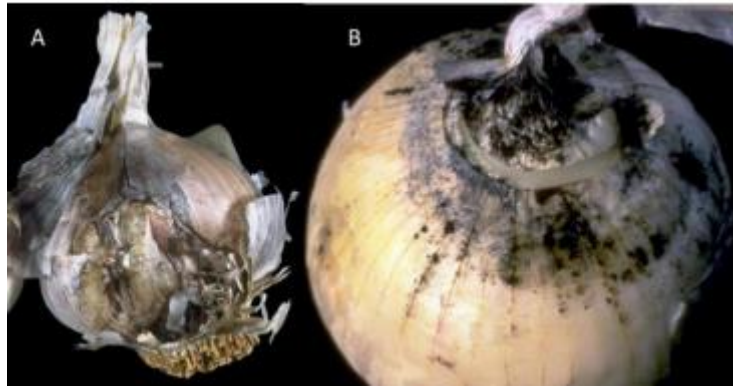
#### 4.1. *Aspergillus niger*

*Aspergillus niger* est un champignon cosmopolite. Il peut être isolé de tous les continents et donc capable de se développer dans une grande variété de biotopes avec de très différentes conditions environnementales. Il croît à des températures allant de 6°C à 47°C et des pH entre 1,5 et 9,8 (Pitt et Hocking, 2009). Ce champignon est abondant dans le sol et les environnements artificiels. Par exemple, il se trouve dans des poussières de tapis et de matelas. Il est aussi utilisé comme usine cellulaire pour la production d'enzymes comme les pectinases et les protéases qui étaient les premières à être exploitées et ont été initialement produites en culture de surface (Schuster et *al.*, 2002).



**Figure n° 02:** L'aspect microscopique d'*Aspergillus niger* sous microscope optique (G×400)

*Aspergillus niger* est un champignon phytopathogène responsable de la «pourriture noire» chez les fruits et les légumes. C'est le contaminant le plus courant des aliments stockés, il est responsable de la pourriture des fruits frais et des céréales (Lima et *al.*, 2019). *Aspergillus niger* est également responsable de la moisissure des bulbes d'oignon, il touche fréquemment : les oignons entreposés, les bulbes d'échalote, l'ail, les céréales, les graines de cacao et du café. Ce champignon est caractérisé par la production abondante de conidiospores, ces derniers une fois propagés dans l'air, assurent l'apparition d'*A. niger* dans les régions chaudes et humides (Lima et *al.*, 2019), mais également dans les sols secs et chauds (Dedi et Diomande, 2017). *A. niger* est capable de produire des acides organiques et des mycotoxines tels que l'ochratoxine A (El khoury et *al.*, 2006).



**Figure n° 03 :** Symptômes de l'aspergillose sur l'ail (A) (Anonyme 1, 2021) et l'oignon (B) (Anonyme 2, 2021)

#### 4.2. *Alternaria sp*

Les *Alternaria* sont des champignons microscopiques pigmentés très fréquents dans notre environnement. Ils appartiennent aux moisissures atmosphériques. Ce sont des champignons filamenteux qui se développent sur des matières organiques dont ils utilisent le carbone. En effet, comme la plupart des champignons, ils sont hétérotrophes, pouvant vivre comme des saprophytes ou parasites. Ils intéressent la mycologie médicale à des degrés différents en raison de trois caractéristiques de leur rôle pathogène ; rôle infectieux, allergisant et toxigène (Linac et *al.*, 1999).



**Figure n° 04 :** L'aspect microscopique du genre *Alternaria* sous microscope optique (Gx40)

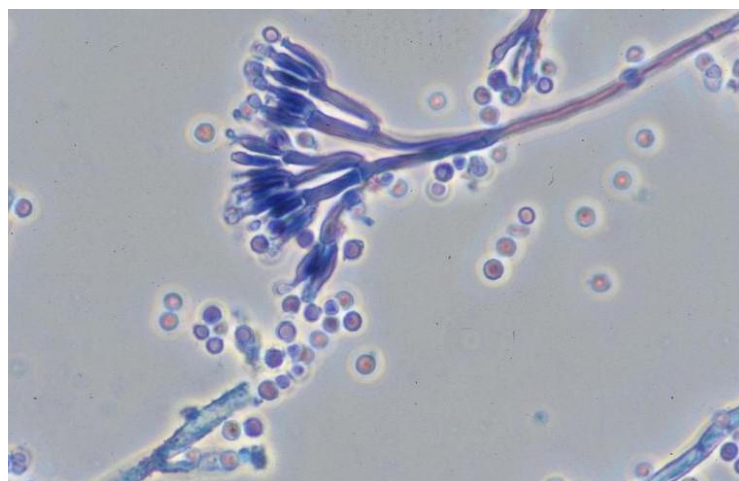
### 4.3. *Penicillium sp*

Les *Penicillium* sont un genre de champignons très diversifié et répandu à travers le monde dans divers habitats, tels que le sol, la végétation, l'air, les environnements intérieurs et les produits alimentaires. On reconnaît plus de 200 espèces différentes appartenant à ce genre (Reboux et *al.*, 2010).

Ces champignons sont des mycètes mésophiles pouvant croître entre 5°C et 37 °C (température optimale de 20°C à 30 °C) à un pH de 3 à 5. Ils jouent un rôle important en tant que décomposants de matières organiques. Ils sont souvent responsables de pourritures destructrices dans l'industrie alimentaire (Visagie et *al.*, 2014). Les *Penicillium* sont également connus pour être des usines d'enzymes. Ils sont utilisés dans diverses industries pour produire des enzymes utiles dans la production alimentaire et l'industrie pharmaceutique (Susca et Perrone, 2017).

De plus, ces champignons peuvent être des irritants courants de l'air intérieur. Leurs spores peuvent se détacher et se propager dans l'air et causer des réactions allergiques chez certaines personnes sensibles (Les personnes atteintes de problèmes respiratoires préexistants ou d'un système immunitaire affaibli).

Le plus grand mérite de ce genre est d'avoir produit la pénicilline, qui a marqué la renommée et révolutionné les approches médicales pour traiter les maladies bactériennes (Susca et Perrone, 2017).



**Figure n° 05 :** L'aspect microscopique du genre *Penicillium* sous microscope optique (G×100)

## 5. Facteurs déterminant l'activité rhizosphérique

D'une façon générale, l'activité rhizosphérique dépend de plusieurs facteurs de l'environnement édaphique, notamment la teneur du sol en eau et en oxygène, sa température, sa teneur en éléments assimilables, la présence de composés phytotoxiques, la présence des molécules signal libérés au cours des échanges entre les racines des plantes et les microorganismes qui leur sont associés (champignons, bactéries, cyanobactéries...). Les signaux rhizosphériques influent sur l'expression génétique « épigénétique ». Ils sont souvent « phytobénéfiques » en améliorant par exemple l'architecture, la croissance et le fonctionnement du système racinaire (Gobat et *al.*, 2003).

## 6. Les interactions entre les microorganismes de la rhizosphère

Au niveau de la rhizosphère, qui est une région abondante en communautés microbiennes et riche en matières organiques, de nombreuses interactions intenses entre les microorganismes se produisent; ces interactions sont catalysées par les exsudats racinaires qui favorisent certains groupes de microorganismes au dépend d'autres au sein de la communauté microbienne (Curl et Truelove, 1986). Les interactions sont les suivantes :

### 6.1. Le commensalisme

Le commensalisme est une sorte de lien biologique naturel entre deux êtres vivants dans lequel l'hôte donne une partie de sa propre nourriture au visiteur sans recevoir d'effets négatifs évidents de ce dernier. L'existence du commensalisme dans la rhizosphère comprend les changements environnementaux (humidité, pH, etc.) faits par un microorganisme qui crée un environnement favorable à la croissance d'un autre.

Aussi, certains organismes dégradent ou neutralisent des substances toxiques favorisant ainsi la croissance des autres (Curl et Truelove, 1986).

### 6.2. Le mutualisme

D'une manière générale, la symbiose est une relation permanente entre deux organismes d'espèces différentes et qui se traduit par des effets bénéfiques aussi bien pour l'un que pour l'autre. Il y a deux phénomènes qui peuvent être distingués : le mutualisme (symbiose) et le synergisme (proto-coopération), dans lequel un microorganisme est stimulé par la présence de l'autre. Dans le mutualisme, la présence de chaque microorganisme est essentielle à la survie de l'autre, tandis que dans la proto-coopération, la survivance de la population n'est pas

dépendante d'une interaction, mais la présence des deux microorganismes ensemble conduit à un meilleur développement (Nehem, 2008).

### **6.3. L'antagonisme**

En écologie, le terme d'antagonisme fait référence à une inhibition ou une action défavorable d'un organisme vis-à-vis d'un autre à l'intérieur d'une population microbienne mixte. En général, l'antagonisme se manifeste soit par une compétition, un hyperparasitisme, une production de sidérophores ou par une antibiose (Djellout et *al.*, 2019).

#### **6.3.1. La compétition**

La compétition entre deux ou plusieurs microorganismes concerne soit les éléments nutritifs, l'espace ou les autres facteurs environnementaux qui deviennent limitatifs pour la croissance. L'effet sélectif des exsudats racinaires sur la microflore serait le résultat de la compétition qui oppose des souches à croissance lente et des souches à croissance rapide, ces dernières sont particulièrement favorisées dans la rhizosphère (Nehem, 2008).

#### **6.3.2. L'hyperparasitisme**

L'hyperparasitisme est l'attaque directe d'un microorganisme par un autre dans un but nutritionnel (Benhacene et *al.*, 2016). La rhizosphère, qui héberge une large variété de populations microbiennes, constitue un milieu favorable pour l'apparition du parasitisme.

## **7. Rôle de la rhizosphère**

En effet, il existe une double relation fonctionnelle qui est établie dans la rhizosphère, concernant l'effet des racines sur le milieu environnant, ainsi que la réponse de la microflore à l'activité racinaire. Le rôle de la rhizosphère peut être résumé ainsi :

\*La rhizosphère joue un rôle essentiel dans les processus de phytoremédiation ;

\*Elle est le siège des processus physiques et chimiques spécifiques liés à l'alimentation hydrique et minérale des plantes (Gobat et *al.*, 2003) ;

\*C'est le lieu privilégié des échanges de matière et d'énergie : la libération de composés organiques, l'absorption d'eau et d'ions, la synthèse des métabolites microbiens divers et variés ;

\*La rhizosphère est une région du sol riche en gaz carbonique et pauvre en oxygène dissous, la rhizosphère est de ce fait un site réducteur, où se développe une activité dénitrifiante, réduisant l'ion nitrate en oxyde d'azote, voir en ammoniacque (Gobat *et al.*, 2003) ;

\*Elle contribue à modifier les propriétés des sols : propriétés biologiques, biodiversités et activités microbiennes, fertilité et qualité du sol (Gobat *et al.*, 2003) ;

\*Dans la rhizosphère, la synthèse de phosphatase mène à une augmentation de la disponibilité du phosphore, et en contrepartie son assimilation par les plantes (Hinsinger *et al.*, 2005) ;

\* La rhizosphère joue un rôle dans la régulation de la santé et de la nutrition des plantes, en lien avec la nature des exsudats racinaires (Hinsinger *et al.*, 2005).

## **8. Rhizobactéries promotrices de la croissance des plantes (Plant Growth Promoting Rhizobacteria (PGPR))**

Les rhizobactéries sont fortement stimulées par l'effet rhizosphérique. Elles activent la croissance des plantes, influencent de manière bénéfique la plante en la protégeant contre des infections par des agents phytopathogènes (Ramjegathesh, 2013). Au cours des dernières années, le nombre des PGPR identifiées a connu une grande augmentation (2 à 5% des rhizobactéries) ; elles comprennent de nombreuses espèces bactériennes. (Ahmed *et al.*, 2008 ; Whipps, 2001). Les PGPR colonisent la rhizosphère en utilisant les exsudats racinaires comme substrats nutritifs, mais à la différence des autres bactéries rhizosphériques elles ont, en retour, un effet bénéfique sur la plante via divers mécanismes (Jørgensen *et al.*, 2000 ; Kang *et al.*, 2013). Cet effet bénéfique peut être direct, lorsque la bactérie stimule la croissance racinaire (symbiose associative entre la bactérie PGPR et sa plante-hôte) ou indirect, lorsqu'elle contrôle des organismes phytoparasites (antagonisme) (Dobbelaere *et al.*, 2003). Les modes d'action des PGPR sont : la production de phytohormones, la production de sidérophore, la solubilisation du phosphate (Lamizadeh *et al.*, 2016), l'inhibition des microorganismes pathogènes et la détoxification du milieu (Beauchamp, 1993).

## 9. Mécanismes impliqués dans la croissance des plantes

Selon leurs activités, elles sont classées comme : biofertilisants (augmentant la disponibilité des éléments nutritifs pour les plantes), phytostimulateurs (améliorant la croissance des plantes, habituellement par la production de phytohormones), et comme agents de biocontrôle (luttant contre les maladies, principalement par la production d'antibiotiques et de molécules antifongiques) (Pérez-Montano et *al.*, 2013). Elles agissent selon deux mécanismes ; direct et indirect (Gupta et *al.*, 2015).

### 9.1. Mécanismes directs

#### 9.1.1. Solubilisation du phosphate

La fertilisation du sol est l'une des méthodes les plus communes pour accentuer la production agricole. Le phosphore est un macronutriment indispensable à la croissance et au développement des plantes mais aussi un important élément nutritif limitant cette croissance. Malgré son abondance dans le sol, il n'est assimilable par les plantes qu'une fois solubilisé. Le phosphore insoluble peut être sous une forme organique ou inorganique (Chaiarn et Lumyong, 2009). Les bactéries rhizosphériques solubilisant le phosphate (PSB) sont exploitées pour leurs caractéristiques de solubilisation et de minéralisation du phosphore et sont introduites et employées constamment dans la rhizosphère (Ahemad, 2015). Parmi les microorganismes bactériens nous pouvons citer les genres : *Bacillus*, *Pseudomonas*, *Rhizobium*, *Burkholderia*, *Micrococcus*, *Aerobacter*, et *Erwinia*. (Khabbaz et *al.*, 2019).

De plus, ces bactéries protègent les plantes des pathogènes par la production d'antibiotiques, d'HCN et de métabolites antifongiques. Elles favorisent également la croissance des plantes par la fixation d'azote (N<sub>2</sub>), la production de sidérophores et la sécrétion de phytohormones (Ahemad, 2015).

#### 9.1.2. Fixation d'azote

La fixation biologique de l'azote atmosphérique est un élément crucial des activités microbiennes dans l'environnement. La majeure partie de cet élément se trouve sous forme d'azote gazeux (N<sub>2</sub>) inaccessible aux animaux et aux plantes. L'azote atmosphérique est converti par de nombreux genres bactériens reconnus comme fixateurs d'azote, qui peuvent être libres (*Azobacter spp* ; *Klebsiella pneumoniae*) ou symbiotiques (*Rhizobium meliloti* ;

*Rhizobium leguminosarum*) (Roger et al., 1996) en des formes assimilables à l'aide d'un système enzymatique complexe connu sous le nom de nitrogénase (Glick, 1995).

Ces bactéries facilitent la croissance des plantes en fournissant les nutriments souvent présents uniquement en quantités limitées dans plusieurs sols (Glick, 2012). Les plantes peuvent acquérir l'azote sous deux formes minérales, soit le nitrate ( $\text{NO}_3^-$ ) ou l'ammonium ( $\text{NH}_4^+$ ) (Mantelin et Touraine, 2004).

### **9.1.3. Production des phytohormones (production d'hormones de croissance)**

La production des phytohormones par les PGPR est un mécanisme essentiel, auquel plusieurs rhizobactéries approuvent la croissance des plantes (Spaepen et al., 2008). Les hormones végétales (les auxines, les gibbérellines, l'éthylène et les cytokinines) sont des messages chimiques qui aident la plante à se défendre dans son environnement. Ce sont de petites molécules de signal produites en très faible concentration influençant les processus biochimiques, physiologiques et morphologiques dans les plantes (Baca et al., 2007; Han et al., 2005 ; Kloepper et al., 2007 ; Martinez-Viveros et al., 2010). De manière générale, elles jouent un rôle important dans la réponse de la plante aux stress biotiques et abiotiques (Gupta et al., 2015), ainsi que dans l'amélioration de la croissance des plantes (Glick, 2012).

## **9.2. Mécanismes indirects**

Les PGPR stimulent indirectement la croissance des plantes par élimination de phytopathogènes par divers mécanismes :

### **9.2.1. Compétition pour l'espace et les nutriments**

Que ce soit pour l'espace ou les ressources nutritives, l'agent de biocontrôle peut entrer en compétition avec le microorganisme pathogène et empêcher son développement (Haas et Defago, 2005). La compétition pour les éléments nutritifs entre en jeu lorsqu'il y a 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 (Jijakli, 2003). L'implication de la compétition pour les nutriments dans le biocontrôle a été montrée dans plusieurs tests *in vitro* (Meena et al., 2014).

Les PGPR colonisent rapidement les surfaces des plantes et utilisent la plupart des nutriments disponibles, ce qui rend difficile la croissance des champignons (Glick et *al.*, 2012).

Plusieurs souches bactériennes et fongiques réduisent ou inhibent la germination des conidies de *Botrytis cinerea*, via la compétition pour des éléments nutritifs comme l'azote, le carbone, ou des macro ou microéléments présents dans le milieu, ce qui réduit la gravité des symptômes de la pourriture sur des feuilles détachées de tomate et d'haricot. La bactérie *Pseudomonas sp* peut, par exemple, utiliser les acides aminés plus vite que les conidies de *B. cinerea*, empêchant ces dernières de germer (Ajouz, 2009).

### 9.2.2. Production des sidérophores

Le fer est un macronutriment capital pour les bactéries, les champignons et les plantes. Dans les sols, le fer est souvent disponible sous forme insoluble (ion ferrique  $Fe^{3+}$ ) (Gupta et *al.*, 2015). La faible biodisponibilité du fer dans la rhizosphère entraîne une compétition accrue, où la plante, les bactéries et les champignons concurrencent pour cet élément (Glick, 2012 ; Meena, 2014). Les microorganismes ont développé des mécanismes pour l'assimilation du fer, mais aussi la synthèse des sidérophores, avec une grande affinité pour  $Fe^{3+}$ , le complexe Fe-sidérophores est capté par des récepteurs membranaires facilitant la prise du fer par les microorganismes (Glick, 2012 ; Meena, 2014), qui sera ensuite transformé en sa forme soluble qui est le fer ferreux ( $Fe^{2+}$ ) (Gupta et *al.*, 2015). Bien que divers sidérophores bactériens diffèrent dans leur capacité de séquestrer le fer en général, ils privent les champignons pathogènes de cet élément car les sidérophores fongiques ont une affinité plus faible (Sivasakthi et *al.*, 2014). Cela provoque une perturbation des champignons pathogènes, affectant leur croissance ultérieure et l'infection des plantes (Khabbaz et *al.*, 2019).

### 9.2.3. Résistance systémique acquise (SAR)

Elle se développe lorsque les plantes activent avec succès leurs propres mécanismes de défense en réponse à une primo-infection par un agent pathogène (Khabbaz et *al.*, 2019), qui confère une protection durable contre un large spectre de microorganismes. Elles acquièrent une sorte de mémoire de la première infection afin de se protéger plus rapidement une fois en contact avec une seconde (Adam, 2008).

La résistance systémique acquise est provoquée par des agents pathogènes ; généralement des pathogènes nécrotiques, et/ou par des inducteurs abiotiques (molécules chimiques).

#### 9.2.4. Résistance systémique induite (ISR)

Les PGPR induisent une résistance des plantes contre les maladies fongiques, bactériennes et virales, les insectes et les nématodes, à travers l'expression de mécanismes de défense inductibles chez la plante. La résistance systémique induite est phénotypiquement similaire à la résistance systémique acquise (Annapurna et *al.*, 2013 ; Ramamoorthy et *al.*, 2001). L'induction de la résistance systémique induite (ISR) dans la plante est une autre façon dont les bactéries peuvent protéger les plantes. Une différence majeure entre ces deux voies induites est l'implication de l'acide salicylique, d'acide jasmonique et d'éthylène respectivement (Khabbaz et *al.*, 2019).

Il existe plusieurs déterminants bactériens impliqués dans l'induction de la résistance systémique par les PGPR, les plus importants étant les lipopolysaccharides présents dans la membrane externe des cellules bactériennes, les sidérophores et la production d'acide salicylique (Van Loon et *al.*, 1998).

#### 9.2.5. Enzymes lytiques

La production d'enzymes hydrolytiques comme la chitinase, la glucanase et la protéase est un mécanisme de lutte biologique qui joue un rôle important dans la gestion des phytopathogènes (Sheeba et *al.*, 2017).

La majorité des champignons phytopathogènes contiennent de la chitine et des  $\beta$  (1,3) glucane dans leurs parois cellulaires, la dégradation de ces polymères structuraux a des effets néfastes sur la croissance des champignons (Lorito, 1994), certaines souches bactériennes de lutte biologique inhibent la croissance et le développement des champignons et à la fois produisent des enzymes lytiques tels que la cellulase,  $\beta$ (1,3),  $\beta$ (1,4),  $\beta$ (1,6) glucanases, enzymes chitinolytiques protéases et lipases qui peuvent lyser une partie des parois cellulaires de nombreux phytopathogènes fongiques (Glick, 2012 ; Tsegaye, 2017 et Whipps, 2001) ces enzymes sont de puissants inhibiteurs, en particulier lorsqu'elles sont utilisées en combinaison pour le contrôle des champignons pathogènes (Lorito, 1994). Les bactéries impliquées dans le biocontrôle jouent un rôle important dans l'augmentation du rendement et l'amélioration de la croissance et la qualité des fruits et légumes et offrent un moyen pour remplacer les fertilisateurs et les fongicides chimiques (El-Gamal et *al.*, 2016)

Le genre *pseudomonas* est l'un des agents de lutte biologique jouant un rôle majeur dans la croissance des plantes et la protection des cultures (Fernaldo et *al.*, 2005 ; Sheeba et *al.*, 2017).

# **Chapitre II**

## **Le biocontrôle**

Les plantes subissent souvent des dégâts causés par des « bioagresseurs ». Leur contrôle a souvent constitué une des préoccupations majeures des agriculteurs. Les plantes peuvent être aussi attaquées par des maladies du fait du développement de bactéries, de champignons, de virus. Les ravageurs et les maladies constituent les ennemis des cultures. Pour lutter contre ces ennemis, l'homme a développé un ensemble de pratiques et de produits.

## **1. Les moyens de lutte**

La lutte contre les maladies des plantes est basée sur différentes méthodes. La plupart de ces méthodes est orientée pour protéger les plantes saines des maladies plutôt que de guérir les plantes malades. Seules quelques infections peuvent être contrôlées d'une façon satisfaisante après que les plantes deviennent malades. Les méthodes de lutte appliquées en agriculture varient considérablement d'une maladie à une autre en fonction du pathogène, de la plante hôte et de leur interaction chacun avec l'autre et avec l'environnement. Le but final de toutes les méthodes utilisées est de combattre les maladies des plantes et alors d'accroître la quantité et d'améliorer la qualité de la production agricole (Nasraoui, 2006).

### **1.1. Lutte physique**

Plusieurs agents physiques peuvent être utilisés pour lutter contre les maladies des plantes. Ces agents sont la température (haute ou basse), l'air sec, la lumière à longueurs d'onde défavorables, la radiation... (Nasraoui, 2008).

### **1.2. Lutte chimique**

En raison de l'avancée de la chimie synthétique, l'utilisation des produits phytopharmaceutiques a augmenté rapidement depuis les années 1950 (Ajouz, 2009).

La lutte chimique implique l'utilisation de traitements à base de produits chimiques pour protéger les plantes contre les ennemis. Il est également défini par l'utilisation de fongicides pour détruire, affaiblir, ou réprimer le champignon (Ajouz, 2009). Il est actuellement le moyen le plus utilisé pour la défense des végétaux.

L'utilisation des composés chimiques, qui sont toxiques aux pathogènes, est le moyen le plus commun du contrôle des maladies des plantes. Ils inhibent la germination, la croissance et/ou la multiplication des pathogènes ou ils les tuent complètement.

### 1.2.1. Les fongicides

Les fongicides représentent l'ensemble des substances chimiques qui tuent ou inhibent la croissance des champignons pathogènes susceptibles de provoquer des dégâts sur les plantes cultivées et les récoltes (Rocher, 2004). Ils sont appelés aussi mycocides ou produits antifongiques, qui peuvent être de nature abiotique (produits chimiques) ou biotique (bactérie, champignon). En effet, la plupart des fongicides affectent directement des fonctions essentielles, comme ceux qui réduisent la production d'énergie cellulaire, suite généralement à un effet sur les processus respiratoires. D'autres agissent sur la synthèse des constituants du champignon ; il en existe ceux qui affectent la biosynthèse de composants majeurs, comme des glucides (exemple : chitine), des lipides (exemple : phospholipides, stérols), des mélanines, des acides aminés (exemple : méthionine), des protéines ou des acides nucléiques. D'autres substances ont encore pour but la désorganisation des cellules et leurs divisions au sein des tissus fongiques (Leroux, 2003).

Aujourd'hui, les traitements fongicides offrent aux utilisateurs une gamme variée de produits ainsi que de nouvelles substances actives qui présentent une protection prolongée, un large spectre d'activité et un contrôle systémique des maladies (Calvel et *al.*, 2005). Un fongicide peut ne pas être efficace si des précautions ne sont pas prises (Davet, 1996).

### 1.2.2. Pesticides

Depuis la Deuxième Guerre mondiale, l'utilisation de pesticides synthétiques est devenue plus répandue et intense. Ces pesticides ont été synthétisés à moindre coût et étaient faciles à utiliser. Leur utilisation a été fulgurante pendant plusieurs années (Elmhirst, 2006).

Un pesticide est défini de la façon suivante par l'EFSA (European Food Safety Authority) : « Substance utilisée pour éliminer ou lutter contre des organismes nuisibles, notamment des organismes porteurs de maladies, des insectes, des animaux et des plantes indésirables ».

Les engrais chimiques, les pesticides, les herbicides et les fongicides ont été l'outil prédominant pour améliorer la croissance des plantes et contrôler la propagation des agents pathogènes au cours des dernières décennies. Cependant, une telle approche a entraîné la dégradation du sol. En fait, ce type de traitement peut entraîner des risques pour les humains et d'autres organismes non ciblés, ainsi que l'émergence de populations résistantes de phytopathogènes (Leroux, 2003 ; Pal et Gardener, 2006).

Les phénomènes de résistance constituent un problème dans la lutte contre les phytopathogènes, justifiant ainsi l'intérêt actuel pour l'étude de méthodes alternatives à la lutte chimique (Ajouz, 2009).

### 1.3. Lutte biologique

La lutte biologique (ou "biocontrôle") est l'une des méthodes de lutte alternative qui visent à trouver un agent de lutte d'origine naturelle, non offensif et efficace contre un large spectre de maladies bactériennes, fongiques et parasitaires des plantes sans avoir recours aux pesticides. Elle consiste à utiliser des parasitoïdes, prédateurs, pathogènes, antagonistes ou concurrents en vue d'arrêter ou inhiber le développement d'une population de ravageurs et la rendant moins dommageable.

Plusieurs êtres vivants ont fait l'objet d'étude où ont été utilisés dans des applications de lutte biologique sous le nom de 'Biopesticides' « organismes vivants ou produits issus de ces organismes ayant la particularité de supprimer ou limiter les ennemis des cultures » (Deravel et al., 2013). Ils peuvent être classés en trois grandes catégories, selon leur nature : les biopesticides microbiens, les biopesticides végétaux et les biopesticides animaux (Chandler et al., 2011).

#### 1.3.1. Avantages et inconvénients de la lutte biologique

D'un point de vue sanitaire, environnemental et économique, la lutte biologique présente de nombreux avantages (Lefort, 2010), mais aussi des contraintes (Tableau I).

**Tableau I** : Principaux avantages et inconvénients de la lutte biologique (Lefort, 2010).

Avantages	Inconvénients
<ul style="list-style-type: none"> <li>• Haute spécificité contre l'agent pathogène ;</li> <li>• Efficace ;</li> <li>• Développement à moindre coût</li> <li>• Moins nuisible que les pesticides chimiques ;</li> <li>• Dégradation rapide des biopesticides, diminuant les risques de pollution ;</li> <li>• Très sécuritaire pour la santé humaine et l'environnement suite à l'utilisation d'auxiliaire.</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Efficacité modulée par les conditions climatiques ;</li> <li>• Nécessité d'une connaissance approfondie des ravageurs et des auxiliaires ;</li> <li>• Une élimination totale d'un ravageur n'est pas faisable ;</li> <li>• Le traitement est souvent délicat ;</li> <li>• Efficacité pas toujours constante d'une production à l'autre.</li> </ul>

## 1.4. Lutte culturale

La lutte culturale est l'une des méthodes les plus anciennes utilisées pour gérer les ravageurs et les maladies des plantes. Elle repose sur la modification des conditions édaphiques et climatiques (pH, température, humidité du sol...) afin de réduire l'impact des bioagresseurs sur les cultures (Chabrier et *al.*, 2005). Les pratiques de lutte culturale visent à maintenir des conditions favorables à la croissance des plantes, telles que la fertilisation, l'irrigation, l'assainissement du sol, ce qui renforce leur résistance aux maladies et à la population des ravageurs.

## 2. Microorganismes les plus utilisés dans la lutte biologique

Plusieurs microorganismes ont été utilisés dans le contrôle des maladies causées par les phytopathogènes (Errakhi, 2008) (Tableau II). Les espèces bactériennes telles que *Bacillus*, *Pseudomonas*, *Serratia* ont démontré leur efficacité dans le contrôle des maladies fongiques, tandis que les bactéries de la rhizosphère sont d'excellents agents de biocontrôles pour les agents pathogènes des plantes transmis par le sol (Ashwini et Srividya, 2014). Un certain nombre de maladies fongiques, bactériennes et parasitaires peuvent être considérablement contrôlées par des bactéries Gram-négatives, en particulier les souches de *Pseudomonas* (Ganeshan et Kumar, 2005). Ils colonisent de manière compétitive les racines des plantes et stimulent la croissance de ces dernières, et réduisent également l'incidence des maladies causées par les phytopathogènes.

Parmi les champignons les plus utilisés en biocontrôle, nous pouvons citer *Trichoderma spp.* L'antagonisme par *Trichoderma* (champignon du sol) a prouvé son efficacité en tant qu'agent de lutte biologique contre un large spectre de pathogènes. Ils agissent par la production d'enzymes lytiques, la production d'antibiotiques, la compétition spatiale et nutritionnelle (Elad et *al.*, 1999), l'induction des systèmes de résistance des plantes (Brimmer et Boland, 2003) et l'inactivation des enzymes de l'agent pathogènes (Elad et *al.*, 1999).

D'autres microorganismes, tels que les actinobactéries, sont apparus comme des candidats prometteurs pour le contrôle biologique en raison de leur capacité à inhiber une variété de phytopathogènes bactériens et fongiques, ainsi qu'à produire divers composés bioactifs toxiques pour les agents pathogènes des plantes (Chitraselvi, 2018 ; Djebaili et *al.*, 2020). Plusieurs études ont démontré la capacité des *Streptomyces* à produire une grande

variété d'agents antibactériens efficaces contre certains phytopathogènes (Smaoui et *al.*, 2018).

**Tableau II :** Quelques agents de biocontrôle utilisés dans la lutte contre les phytopathogènes (Errakhi, 2008).

<b>Agents de biocontrôle</b>	<b>Agents phytopathogènes cibles</b>	<b>Mécanisme(s) d'action</b>
<i>Trichoderma harzianum</i>	<i>Roselliniana</i> spp.	Parasitisme
<i>Trichoderma koningii</i>	<i>Sclerotium rolfsii</i>	Parasitisme
<i>Streptomyces</i> sp. 93	<i>Pythium</i> , <i>Aphanomyces</i> , <i>Phytophthora</i> , <i>Rhizoctonia</i> et <i>Fusarium</i> spp.	Antibiose
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	<i>Aspergillus flavus</i> , <i>A. niger</i> , <i>Rhizoctonia bataticola</i> , <i>Rhizoctonia solani</i> , <i>Sclerotium rolfsii</i> et <i>Puccinia</i> <i>arachidis</i>	Antibiose Compétition
<i>Pseudomonas</i> spp	<i>Gaeumannomyces graminis</i> var. <i>tritici</i> , <i>Pseudomonas</i> <i>tolaasii</i> , <i>Fusarium oxysporum</i> f. sp. <i>liniet</i> <i>Erwinia amylovora</i>	Antibiose Compétition
<i>Trichoderma</i> spp	Plusieurs champignons phytopathogènes	Parasitisme Antibiose Compétition
<i>Bacillus subtilis</i>	<i>Fusarium</i> spp.	Antibiose

### 3. Les mécanismes de biocontrôle

La protection conférée par un microorganisme de lutte biologique s'appuie sur un ou plusieurs mécanismes d'action tels que la compétition pour les nutriments essentiels, l'activité antagoniste *vis-à-vis* de la croissance des pathogènes *via* la production d'antibiotiques

(antibiose) ou d'enzymes, le parasitisme et /ou sur leur capacité à stimuler des systèmes de défense chez l'hôte végétal (Perez-Montano et al., 2013).

### 3.1. Compétition pour les nutriments et l'espace

Les interactions microbiennes sont conditionnées par la nature et l'intensité de la compétition entre microorganismes. Cette compétition peut s'instaurer pour l'espace et pour les nutriments. Elle est considérée comme un mécanisme d'action potentiel dans les systèmes de contrôle biologique. Les champignons en particulier, utilisent la capacité saprophytique compétitive (CSA), qui était à l'origine utilisée pour décrire la capacité du champignon à coloniser les substrats organiques (Lehlali et al., 2022).

Lorsque deux ou plusieurs organismes sont présents simultanément, ils peuvent entrer en compétition nutritionnelle si ont besoin du même nutriment essentiel, ce qui entraîne une diminution de la croissance et de l'activité des organismes en interaction. Des agents de biocontrôle (BCAs) peuvent entrer en compétition avec l'agent pathogènes pour acquérir des nutriments dans et autour de la plante hôte (Pellon, 2020), tel que la compétition pour le fer; afin d'acquérir cet élément indispensable mais peu soluble, les microorganismes ont développé une stratégie qui repose sur la synthèse de sidérophores.

Des sidérophores produites par certaines souches de *Pseudomonas fluorescens* sont appelées pyoverdines et forment avec le fer ( $Fe^{3+}$ ) un complexe, le fer chélaté par les pyoverdines ne peut pas être utilisé par certains champignons (Lemanceau, 1992).

### 3.2. Parasitisme

Ce mécanisme de lutte consiste en une interaction directe entre deux microorganismes où les tissus vivants de l'un constituent une base nutritive pour l'autre (Helluy et al., 2005). Il implique généralement la synthèse de divers métabolites ou enzymes conduisant à la dégradation des structures fongiques. Il existe plusieurs parasites connus capables d'agir en attaquant les champignons pathogènes (par exemple *Coniothyrium minitans* est capable d'attaquer les sclérotés) (Pellan, 2020).

### 3.3. Antibiose

C'est le mécanisme de biocontrôle le plus étudié, utilisé par certains microorganismes pour inhiber la croissance de l'agent pathogène par la synthèse des molécules qui ont une activité antimicrobienne (Benazouz-Kesbia, 2021), comme les antibiotiques produits par des bactéries isolées du sol contribuant à la suppression ou à l'inhibition de la croissance des

phytopathogènes (Petatán-Sagahón et *al.*, 2011), ainsi que des enzymes lytiques qui hydrolysent une grande variété de composés notamment ; la chitine, les protéines et l'ADN.

### **3.4. Stimulation de la défense des plantes**

Les agents de biocontrôle peuvent être à l'origine de la production de stimulateurs de défense qui concernent toutes substances ou tous microorganismes vivant non pathogènes qui une fois appliqués sur une plante sont capables de promouvoir un état de résistance significativement plus élevé par rapport à une plante non traitée (Dubernard, 2017).

L'induction des mécanismes de résistance chez la plante a été démontrée pour la première fois par Kempe et Sequira (1983), qui ont remarqué qu'un pré-traitement de la pomme de terre par des bactéries a protégé leur tubercule.

# Partie expérimentale



# **Chapitre I**

## **Matériel et Méthodes**

Notre travail a été réalisé au laboratoire pédagogique de microbiologie de la faculté des sciences biologiques et des sciences agronomiques à l'université de MOULOUD MAMMARI de TIZI OUZOU, durant la période du mois de Mai jusqu'au mois de juin de l'année 2022/2023.

## **1. Matériel**

### **1.1. Matériel biologique**

Les souches fongiques utilisées dans cette étude, appartenant à trois genres de moisissures *Aspergillus niger*, *Alternaria sp* et *Penicillium sp*, ont été fournies par le laboratoire de maîtrise des Énergies renouvelables équipé 'Biomasse et Environnement' et le laboratoire de mycologie de l'université Abderrahmane Mira de Béjaïa.

### **1.2. Matériel non biologique**

Les milieux de culture, solutions et réactifs ainsi que l'appareillage utilisés dans cette étude sont cités en annexes I, II et III respectivement.

## **2. Méthodes**

### **2.1. Echantillonnage**

Les échantillons de sol sont prélevés à partir de la zone rhizosphérique des tomates à Seddouk Ouedda, Béjaïa (latitude : 36.51864, longitude : 4.70308). Ensuite, les échantillons ont été transportés au laboratoire dans des flacons stériles.

### **2.2. Isolement et purification des bactéries**

Une série de dilutions décimales allant jusqu'à  $10^{-8}$  est préparée à partir d'une solution mère contenant 1g du sol et 9 ml d'une solution tampon phosphate salin (PSB). Cette opération est suivie par un ensemencement sur milieu Plate Count Agar (PCA) par inondation. Les boîtes sont ensuite incubées à 30°C pendant 48h à 72h.

Après 48h d'incubation, les colonies différentes phénotypiquement (taille, couleur, forme, pigment produit,...) sont ensemencées sur gélose PCA, par la suite des repiquages successifs sont effectués sur le même milieu d'isolement jusqu'à l'obtention des colonies pures.

### 2.3. Mise en évidence de l'activité antifongique

#### ➤ Repiquage des souches fongiques

A l'aide d'un écouvillon stérile, ôter, une quantité vierge de spores du champignon et l'ensemencer en stries serrées sur milieu GN. L'incubation des cultures est effectuée à 28°C pendant 6 jours.

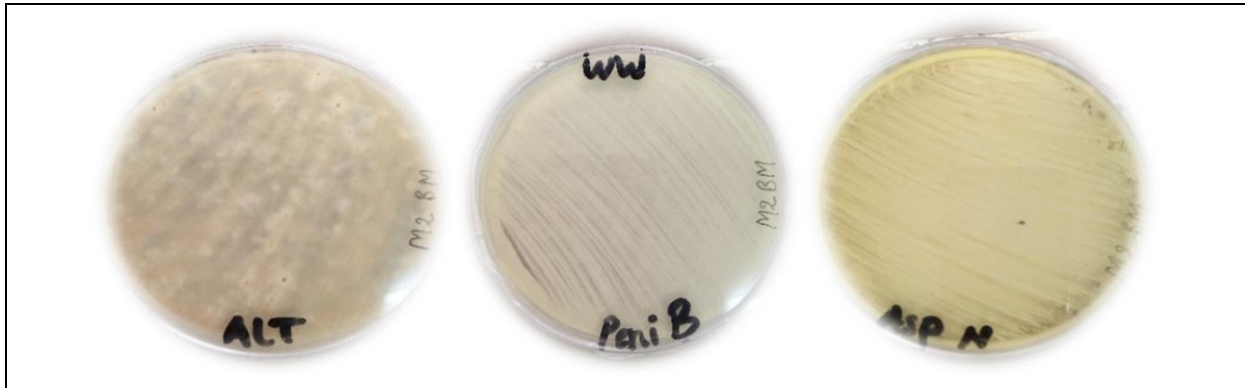


Figure n° 06 : Aspects d'espèces fongiques sur gélose nutritive

#### ➤ Repiquage des isolats bactériens

A l'aide d'un écouvillon stérile, ôter, une quantité vierge de colonies bactériennes et l'ensemencer en stries serrées sur gélose nutritive. L'incubation est effectuée à 30°C pendant 24h à 48h afin d'obtenir des cultures jeunes.

**Remarque : Le repiquage est effectué la veille de la réalisation des tests antifongiques.**

#### 2.3.1 Etude de l'action antagoniste des isolats bactériens à l'égard des trois champignons par confrontation directe sur boîte

Les 6 isolats bactériens ont fait l'objet du test d'antagonisme sur gélose TSA à l'égard des trois souches fongiques : *Aspergillus niger*, *Alternaria sp* et *Penicillium sp* en présence de boîtes témoins.

Cette technique consiste alors à placer, dans la même boîte de Pétri contenant un milieu TSA, un disque fongique provenant d'une culture jeune. Trois disques bactériens différents sont déposés à une distance d'environ 1 cm de la périphérie, chaque test est réalisé en duplicata.

Des témoins négatifs pour chaque champignon ont été préparés en parallèle en déposant un disque de chaque antagoniste au centre des boîtes dépourvues de bactéries.

L'incubation est réalisée à 28°C, les boîtes sont observées pendant 7 jours avec une

vérification quotidienne de l'apparition ou non d'une zone d'inhibition.

La capacité de chaque isolat bactérien à inhiber la croissance mycélienne est déterminée en calculant le pourcentage d'inhibition de la croissance (PGI%) selon la formule suivante :

$$\text{PGI}\% = \frac{dT-dS}{dT} \times 100$$

Où :

**dT**: Distance en cm entre le centre du disque du champignon dans le témoin et la périphérie.

**dS** : Distance en cm entre le centre du disque du champignon phytopathogène et la marge de la colonie contenue dans la boîte de Pétri traitée.

## **2.1. Recherche de métabolites spécifiques à activité antifongique**

### **2.1.1. Production de Cyanure d'hydrogène (HCN)**

Suivant la méthode décrite par Lorck (1948), la recherche de la production d'HCN est effectuée par ensemencement en stries des isolats bactériens sur milieu Gélose nutritive (GN) additionné de glycine (4.4 g/l). Un disque de papier Wattman imprégné d'une solution de picrate de sodium (5% d'acide picrique et 2% de carbonate de sodium anhydre) est déposé au fond du couvercle des boîtes. Ces dernières sont scellées avec du parafilm. La lecture du test s'effectue après incubation à 30°C pendant 96h. Le test positif se traduit par une variation de la couleur du papier Wattman du jaune vers une couleur orange à marron rougeâtre.

### **2.1.2. Production d'ammoniac (NH<sub>3</sub>)**

Les isolats bactériens sont testés pour leur capacité à produire de l'ammoniac dans l'eau peptonée. Des colonies d'une culture bactérienne jeune sont inoculées dans 10 ml d'eau peptonée, puis incubées à 30°C pendant 4 jours. La lecture du test se fait par l'ajout de 0,1 ml du réactif de Nessler dans chaque tube, le développement d'une couleur jaune, orange ou brune indique une production de l'ammoniac (Cappuccino et Sherman, 1992).

## **2.2. Caractérisation métabolique et fonctionnelle**

### **2.2.1. Activités enzymatiques**

Afin de déterminer l'utilité des isolats dans la fertilisation des sols et la lutte contre les champignons phytopathogènes, différentes enzymes ont été recherchées. Les activités

enzymatiques sont mises en évidence sur milieux gélosés par la méthode des disques en introduisant le substrat recherché comme seule source de carbone.

### 2.2.1.1. Détermination de l'activité protéasique

Le milieu de culture contient (en g/l) : caséine pancréatique (5) ; Extrait de levure (2,5) ; Glucose (1), et Agar (15). Le milieu est ajusté à pH 7 et autoclavé 20 minutes à 120°C. Parallèlement, 100 ml d'une solution de lait écrémé à 10% autoclavée (120°C/10 min) est préparée et ajoutée au milieu. Ce dernier est ensuite ensemencé par la méthode des disques. L'incubation est maintenue à 30°C pendant 48h. Les bactéries ayant une activité protéasique montrent un halo transparent autour des disques (Bach et Munch, 2000).

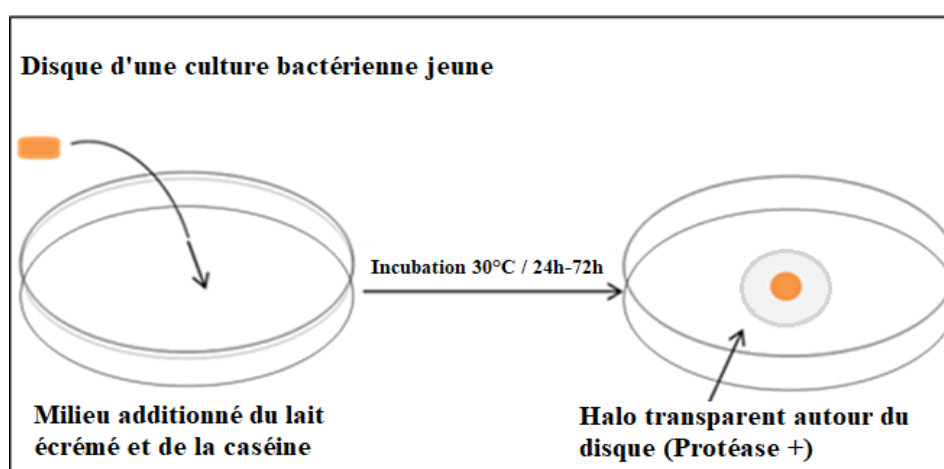


Figure n° 07 : Recherche de l'activité protéasique

### 2.2.1.2. Détermination de l'activité amylasique

L'ensemble des souches isolées ont été testées pour la production d'une amylase extracellulaire. Et ce, par l'ensemencement d'un disque de chaque souche sur une gélose nutritive à base d'amidon qui contient en (g/l) :  $\text{KNO}_3$  (0,5),  $\text{K}_2\text{HPO}_4$  (1,0),  $\text{MgSO}_4$  (0,2),  $\text{CaCl}_2$  (0,1),  $\text{FeCl}_3$  (0,001), amidon soluble (10,0), agar (15,0), eau distillée 1000 ml. Le pH est ajusté à 7,2 puis autoclavé à 121°C/30 min. 1% d'amidon soluble est ensuite additionné. Le tout est mélangé et laissé au repos puis filtré (0,22 $\mu\text{m}$ ). La révélation de la production d'une amylase se fait par l'ajout du Lugol, suivi d'un rinçage avec de l'eau distillée. La lecture des résultats a été effectuée après 72h d'incubation à 30°C, et ce, par l'apparition d'une zone claire autour des disques (Vinoth et *al.*, 2009).

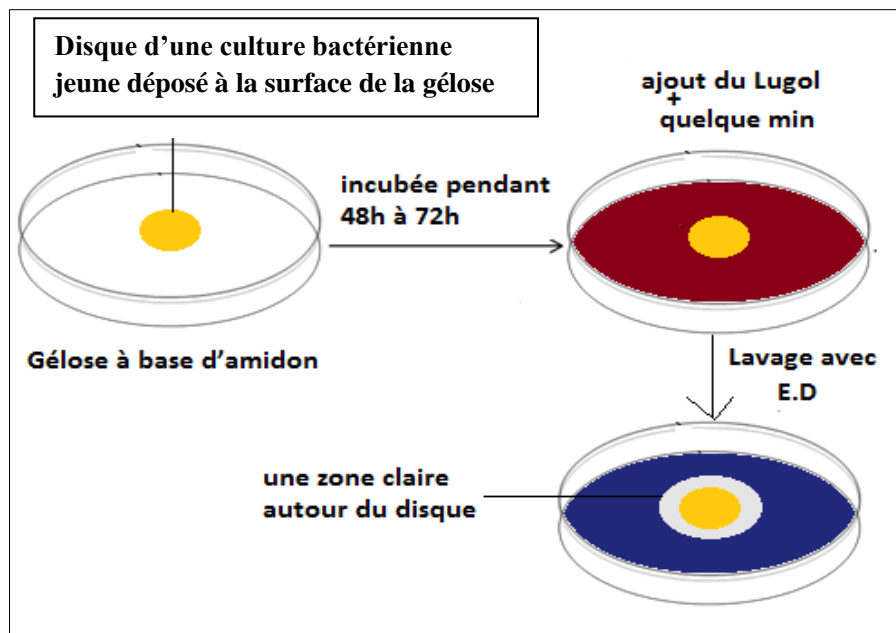


Figure n° 08 : Recherche de la production de l'amylase

### 2.2.1.3. Détermination de l'activité cellulasique

Selon Carder (1986) , la mise en évidence de l'activité cellulasique est effectuée sur un milieu de culture contenant (en g/l) : (6)  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ , (3)  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , (1)  $\text{NH}_4\text{Cl}$ , (3) Extrait de levure, (5) CMC, (15) Agar. Les boîtes sont incubées à  $30^\circ\text{C}$  pendant 7 jours.

Afin de révéler la présence d'une cellulase, les boîtes sont inondées par une solution de Rouge Congo (1%) et incubées pendant 20 min, puis une solution de NaCl à 1M est ajoutée. Après une nuit (Jaradat *et al.*, 2008), l'activité cellulasique se manifeste par l'apparition d'un halo clair autour des disques.

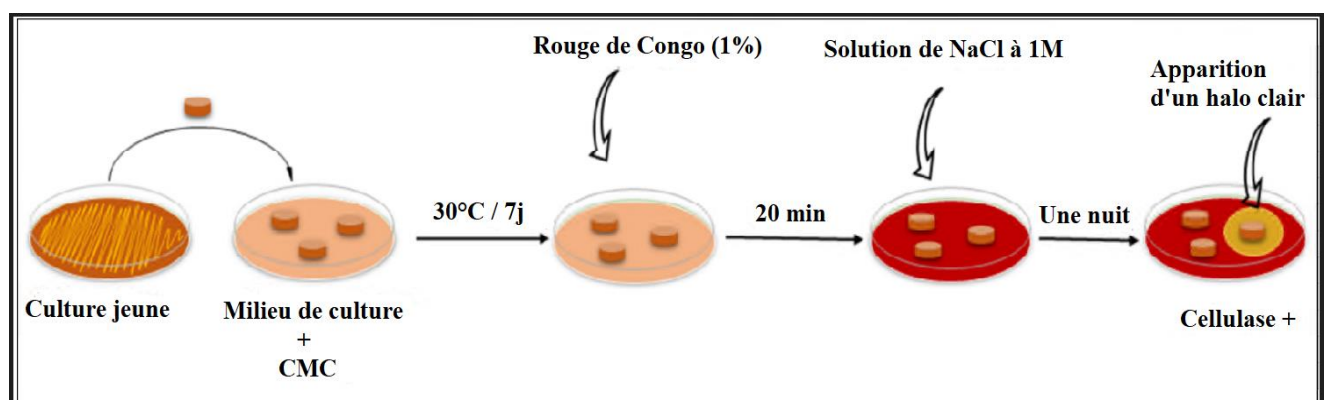


Figure n° 09 : Recherche de la production de la cellulase.

### 2.2.1.4. Détermination de l'activité chitinasique

Le milieu de culture utilisé est composé de la manière suivante (en g/l) : La chitine colloïdale (0.6 à 0.8),  $K_2HPO_4$  (2.7),  $KH_2PO_4$  (0.3),  $MgSO_4 \cdot 7H_2O$  (0.7), NaCl (0.5), KCl (0.5), Extrait de levure (0.13), Agar (15). Le milieu estensemencé par la méthode des disques puis incubé pendant 7 jours à 30°C. L'activité chitinasique se manifeste par un halo transparent autour de ces disques (Kopečný et al., 1996).

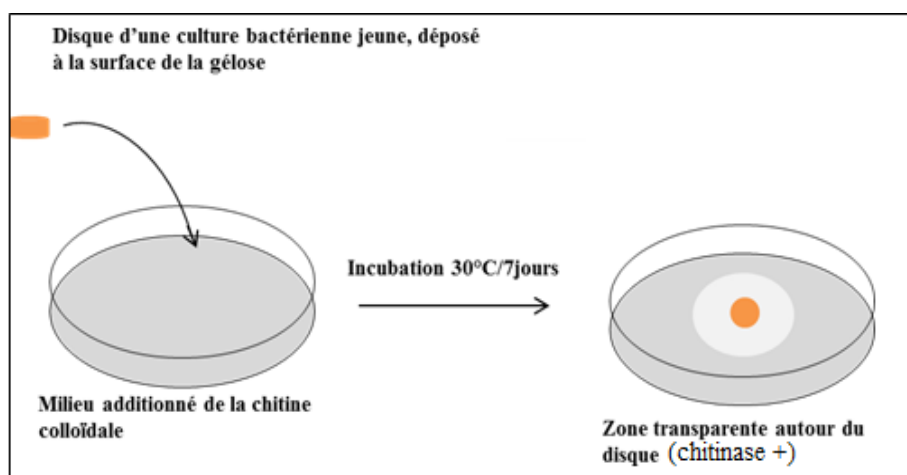


Figure n° 10 : Recherche de la production de la chitinase

#### ➤ Préparation de la chitine colloïdale :

1g de chitine est suspendu dans 9 ml d'HCl concentré. La solution est laissée sous agitation pendant 2 heures jusqu'à dissolution (apparition d'une couleur brune). Par la suite, elle sera transférée dans une fiole de 250 ml et le volume est complété avec de l'eau distillée. Après un temps de repos (une nuit), le surnageant est décanté et enlevé et le culot est resuspendu dans de l'eau distillée. La procédure de lavage et de décantation est répétée trois fois avec de l'eau de robinet et trois fois avec l'eau distillée. Enfin, le surnageant est éliminé et la chitine décantée est filtrée à l'aide d'un tamis métallique de 0,5 mm. L'effluent est stocké dans une bouteille opaque à 4°C.

### 2.5.1.5. Détermination de l'activité estérasique et lipasique

Selon (Carrim et al., 2006) , ces deux activités sont recherchées sur le milieu de culture décrit par Sierra (1957) qui contient (en g/l) : peptone (10) ; NaCl (5) ;  $CaCl_2 \cdot 2H_2O$  (0.1) ; Agar (18) ; le tween 80 (1%, v/v) est ajouté pour révéler l'activité estérasique, alors que le tween 20 est utilisé pour mettre en évidence l'activité lipolytique. Le pH est ajusté à 7,4. Après ensemencement, les boîtes sont incubées pendant 48h à 30°C.

Un résultat positif est traduit par l'apparition d'une zone opaque autour des disques.

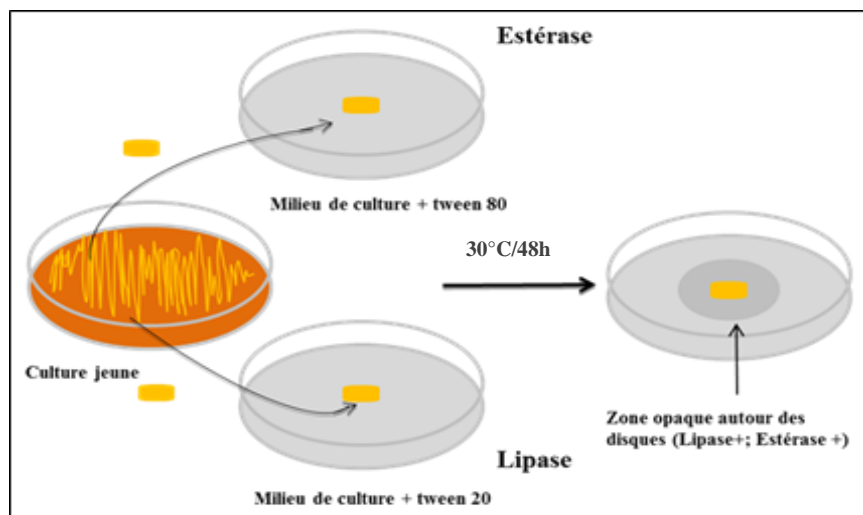


Figure n° 11 : Mise en évidence des deux activités estérasiqque et lipasique

### 2.5.1.6. Détermination de l'activité uréasique

Pour préparer le milieu, à 950 ml d'eau distillée : (1g) Peptone, (1g) Glucose, (5g) NaCl, (1,2g)  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ , (0,8g)  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , (0,012g) rouge de phénol et (15g) d'agar sont ajoutés. Le pH du milieu est ajusté à 6,8 puis autoclavé 20 minutes à  $120^\circ\text{C}$ , 50 ml d'une solution d'urée à 40% préalablement filtrée ( $0,22\mu\text{m}$ ) sont ajoutés. Enfin le milieu est coulé en boites de Pétri (Christensen, 1946).

L'activité uréasique est traduite par la présence d'un halo rose autour des disques.

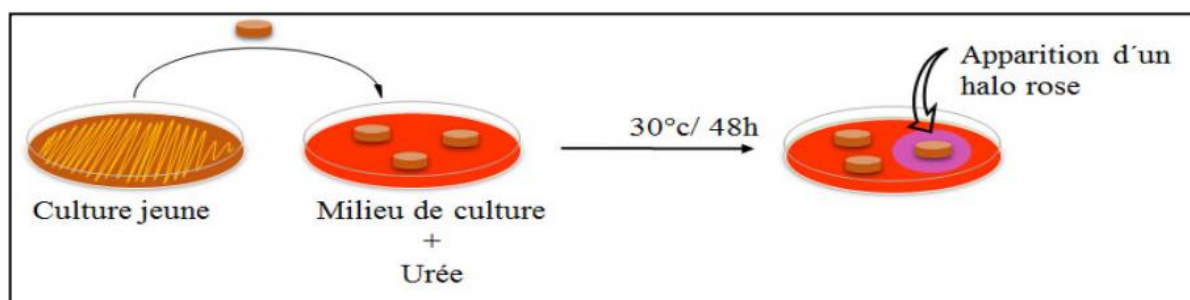


Figure n° 12 : Recherche de l'activité uréasique

### 2.5.2. Coloration de Gram des isolats

Les isolats sélectionnés suite aux résultats des tests *in vitro* ont fait l'objet d'une observation microscopique. À partir de chaque isolat pur, un frottis bactérien est préparé pour la réalisation de la coloration de Gram, (toutes les étapes de la coloration sont indiquées en annexe IV).

# **Chapitre II**

## **Résultats et discussion**

## 1. Prélèvement d'échantillons de sol et isolement de bactéries

À partir des échantillons prélevés du sol rhizosphérique des tomates situé à Seddouk Ouedda Béjaïa-Algérie, 6 isolats bactériens ont été purifiés et ont fait l'objet d'un test d'antagonisme par confrontation directe à l'égard de trois champignons phytopathogènes à savoir : *Aspergillus niger*, *Alternaria sp* et *Penicillium sp*.

## 2. Inhibition de la croissance mycélienne par confrontation directe

Les 6 isolats ont fait l'objet du test d'antagonisme sur gélose TSA à l'égard des trois souches fongiques : *Aspergillus niger*, *Alternaria sp* et *Penicillium sp*. Après incubation en présence de boîtes témoins, la mesure des diamètres des zones d'inhibitions a permis de calculer les PGI% (pourcentage d'inhibition de la croissance mycélienne) pour les trois champignons cibles qui varient selon les isolats bactériens. Les résultats selon le PGI% obtenu sont représentés dans le tableau III et les figures n°13 et n°14.

**Tableau III** : Taux d'inhibition des champignons phytopathogènes (*Aspergillus niger*, *Alternaria sp* et *Penicillium sp*).

Isolats Champignons	PGI %		
	<i>Aspergillus niger</i>	<i>Alternaria sp</i>	<i>Penicillium sp</i>
<b>A</b>	66,66%	57,89%	61,11%
<b>B</b>	64,1%	52,63%	22,22%
<b>C</b>	56,41%	42,1%	44,44%
<b>D</b>	69,23%	57,89%	50%
<b>E</b>	61,53%	47,36%	55,56%
<b>F</b>	69,23%	63,15%	66,66%

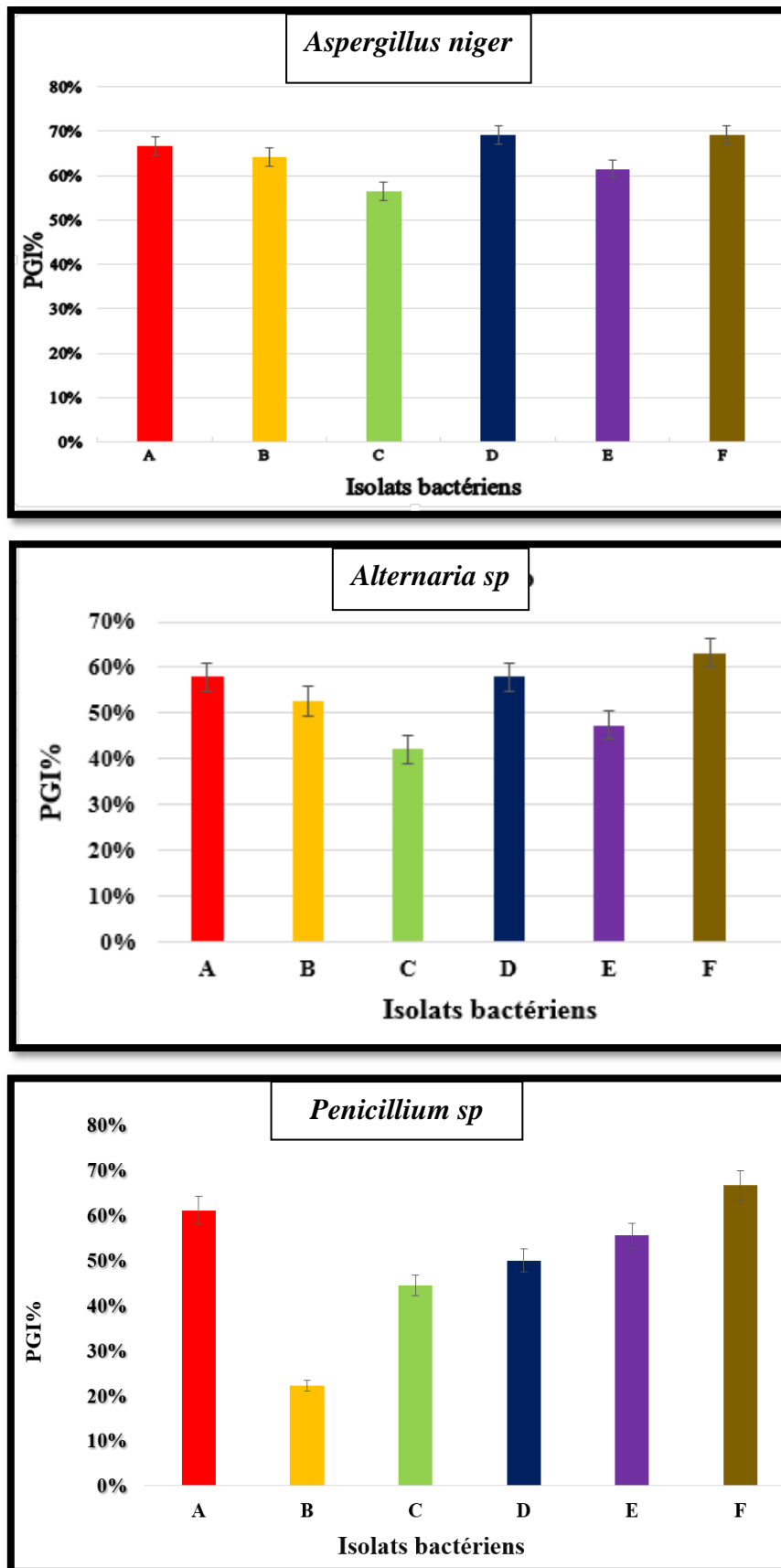
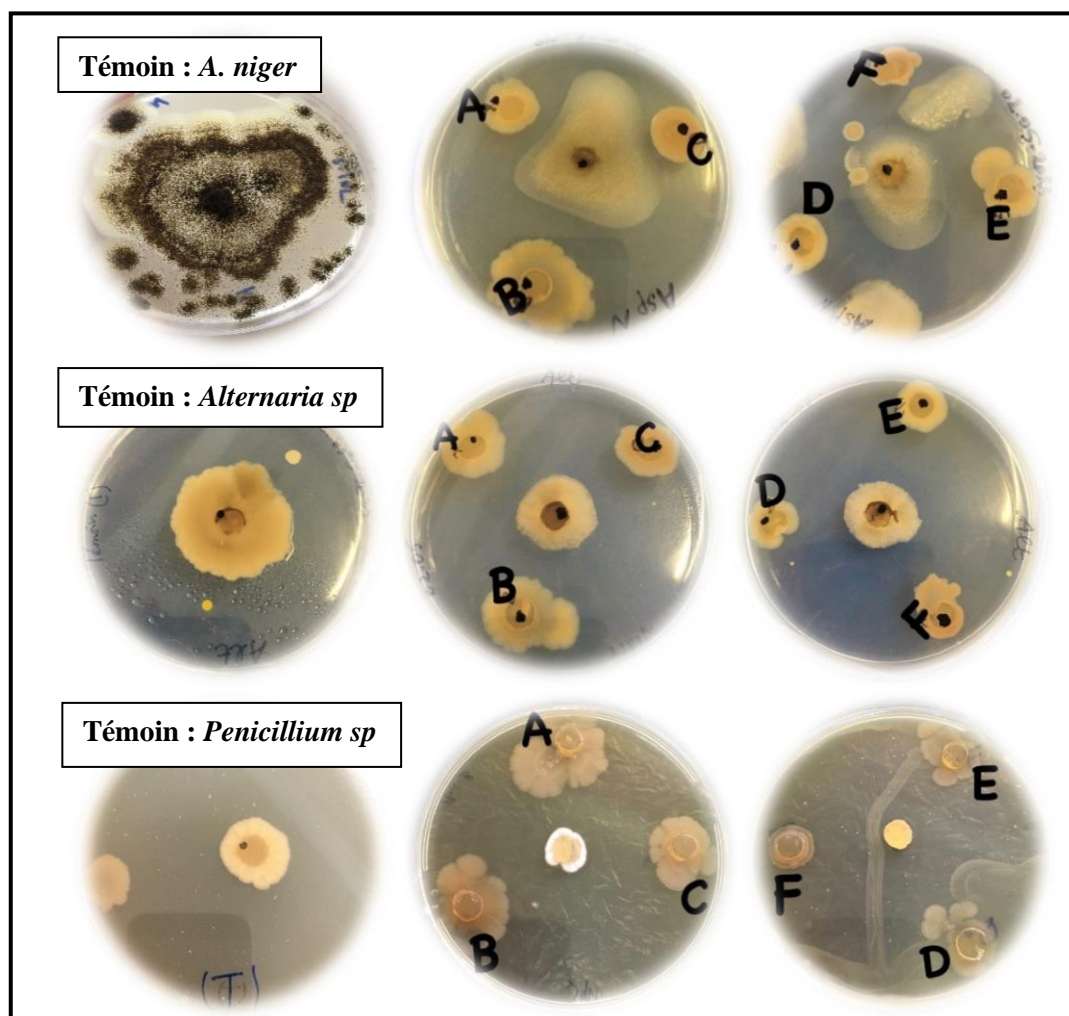


Figure n° 13: Pourcentage d'inhibition de la croissance des champignons phytopathogènes par les isolats testés.



**Figure n° 14 :** Résultats du test d'antagonisme exercé par les 6 isolats sur les 3 champignons phytopathogènes en présence de témoins.

Les isolats D et F ont enregistré le même pourcentage de PGI% le plus important (69,23%) à l'égard d'*Aspergillus niger* tandis que l'isolat C présente le plus faible pourcentage d'inhibition (56,41%) à l'égard du même champignon. Pour *Alternaria sp*, le meilleur taux d'inhibition a été enregistré par l'isolat F qui a atteint 63,15%, suivi par A et D avec un même pourcentage (57,89%), alors que le pourcentage le plus faible (42,1%) est enregistré chez l'isolat C. Enfin, pour *Penicillium sp*, le PGI% le plus important est enregistré chez l'isolat F (66,66%), tandis que l'isolat D a montré une activité inhibitrice moyenne (50%). Un pourcentage faible (22,22%) est marqué par l'isolat B.

Pour *Aspergillus niger*, les isolats A, D et F ont présenté des taux d'inhibition importants avec des PGI variant de 66% à 70%. Ces résultats se rapprochent de ceux obtenus par Bensidhoum et al. (2016) ayant trouvé un pourcentage d'inhibition dépassant les 50%. Des travaux établis par Jemni et al. (2009); Rai et al. (2016) et Tabli. (2018), ont montré une

activité antifongique à l'égard du même pathogène avec des pourcentages d'inhibition de 66%, 70% et 90% respectivement, qui semblent supérieurs à nos résultats obtenus.

Pour *Penicillium sp.*, l'isolat F a marqué le pourcentage le plus important, qui est égal à 66,66%, tandis que l'isolat D a montré une activité inhibitrice moyenne (50%). Un pourcentage faible 22,22% est marqué par l'isolat B. En comparaison avec les résultats obtenus par Jemni et *al.* (2010), qui varient entre 50% et 70%, nous constatons que ceux-ci sont supérieurs aux résultats de la présente étude. Cette différence est peut être due aux métabolites secondaires libérés par les bactéries antagonistes dans le milieu de culture.

Enfin, pour *Alternaria sp.*, nos résultats sont proches de ceux trouvés par Milet. (2017), ayant montré un taux d'inhibition de 62,5% par l'isolat à G+ et 65% par l'isolat à G-.

Par ailleurs, selon (Williams et Asher, 1996), la différence entre les pourcentages d'inhibition des souches fongiques testées suggère que le mode d'action et/ou le type des métabolites produits par les bactéries peut varier, mais aussi que ces bactéries sont taxonomiquement différentes.

### **3. Résultats de la recherche de métabolites spécifiques à activité antifongique**

Une série de tests a été effectuée durant cette investigation, afin de rechercher et de déterminer les mécanismes d'activités probables de nos isolats contre les champignons phytopathogènes.

#### **3.1. Production de métabolites volatiles**

##### **3.1.1. Production de Cyanure d'hydrogène (HCN)**

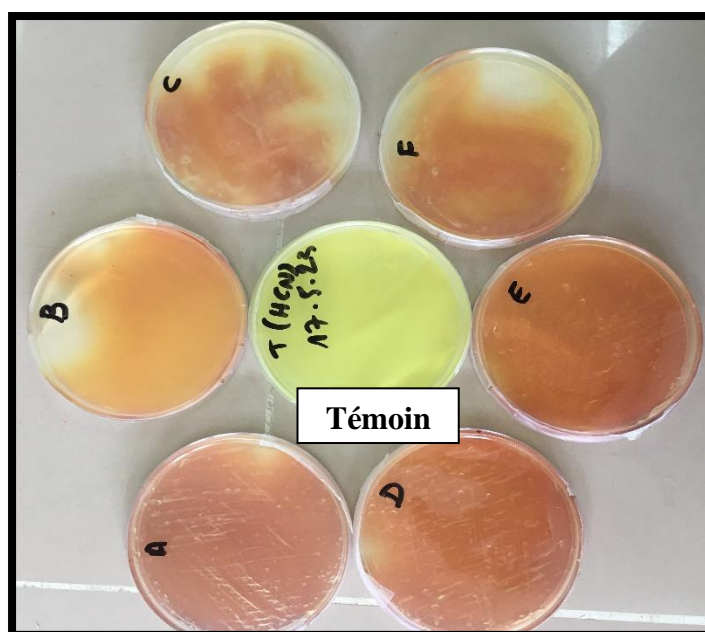
L'ensemble des résultats sont enregistrés dans le tableau IV. Après incubation à 30°C /4 jours, un virage de la couleur du papier Wattman imprégné dans la solution de picrate de sodium a été constaté chez les 6 isolats, (A, B, C, D, E, F). L'intensité de la couleur varie entre orange, brun rougeâtre et rouge, selon la quantité produite.

**Tableau IV** : Résultats de production de cyanure d'hydrogène par les 6 isolats.

Isolats	Résultats
A, D	+
B, C, E, F	++

(+++): Rouge    (++) : Orange    (+) : Brun rougeâtre    (-) : Jaune

La figure ci-dessous présente l'aspect de tous les résultats enregistrés en présence de témoin

**Figure n° 15** : Résultats de production de cyanure d'hydrogène (HCN) par les 6 isolats.

La capacité des rhizobactéries à produire des composés bénéfiques pour la croissance et la santé des plantes est bien connue. En raison de sa toxicité, l'HCN est l'un des composés jouant un rôle dans la protection des cultures. La synthèse d'HCN est une activité commune parmi les espèces bactériennes appartenant aux genres *Pseudomonas* et *Bacillus*. (Kachhap et al., 2015). L'HCN est décrit comme un composé métabolique de biocontrôle qui aide à protéger de nombreuses plantes des maladies causées par les champignons phytopathogènes (Ramette et al., 2003 ; Jousset et al., 2006). D'autres auteurs ont rapporté que l'HCN pourrait également augmenter la disponibilité des nutriments dans le sol en séquestrant des minéraux tels que le phosphate (Rijavec et al., 2016).

La production de l'HCN est constatée chez tous les isolats (100%), ce qui semble supérieur aux résultats obtenus par Saharan et Nehra, 2011, estimés à 75 %. Ce même résultat a été rencontré dans le travail d'Avinash et Rai (2014).

Plusieurs espèces bactériennes, dont *Pseudomonas aeruginosa*, *Pseudomonas fluorescens*, ont été découvertes pour produire de l'HCN, selon Knowles et Bunch (1986). La production de cet antibiotique par *Pseudomonas fluorescens* est en partie responsable de sa capacité de biocontrôle, comme la suppression de la poussière noire du tabac causée par *Thielaviopsis basicola* (Haichour et al., 2015).

### 3.1.2. Production d'ammoniac (NH<sub>3</sub>)

Après 4 jours d'incubation et l'ajout du réactif de Nessler, il y'a eu révélation d'une différence par rapport au témoin non inoculé. Le virage immédiat à la couleur brune a été observé dans un seul isolat (F) et jaune pour le reste des isolats (A, B, C, D, E) ce qui confirme la production d'ammoniac. Les figures suivantes résument les résultats.

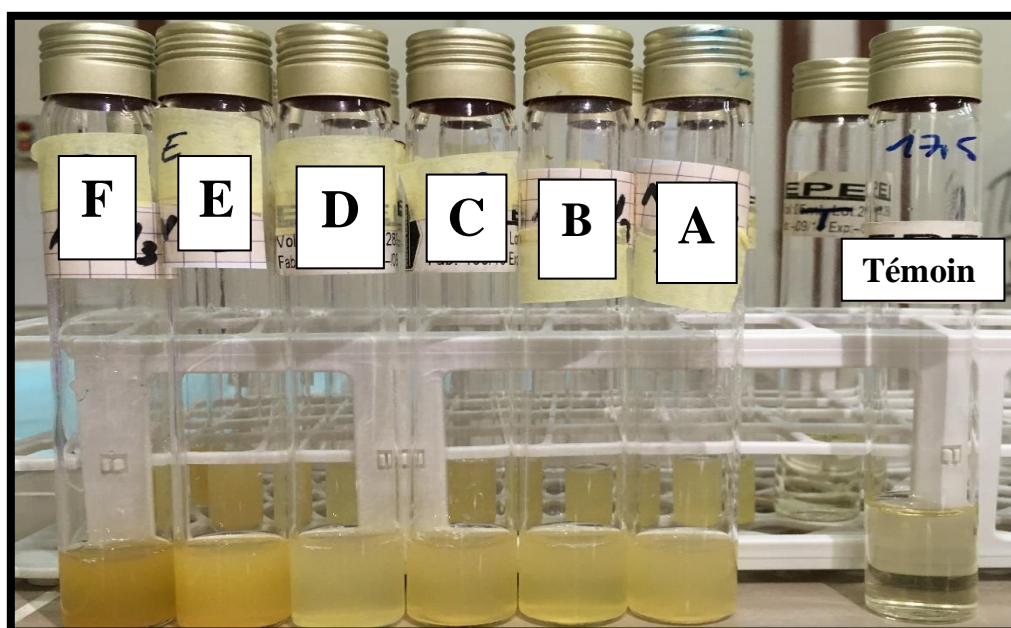
**Tableau V** : Résultats de la capacité des différents isolats à produire l'ammoniac.

Isolats	Résultats
A, B, C, D, E	++
F	+++

(-): négatif

(++) : Jaune

(+++): Brun



**Figure n° 16** : Résultats du test de production d'ammoniac (NH<sub>3</sub>) comparés au témoin négatif

Selon Kavitha *et al.* (2013), la production d'ammoniac est l'une des moyens utilisés par les bactéries pour lutter contre les champignons pathogènes. Elle est également considérée comme une caractéristique clé des rhizobactéries qui améliorent indirectement la croissance des plantes (Joseph *et al.*, 2007). En effet, elle assure un rôle dans la signalisation lors de l'interaction plantes-rhizobactéries (Becker *et al.*, 2002). Dans notre étude, l'ammoniac est produit par tous les isolats, résultat similaire à celui d'Ahmad *et al.* (2008) et Gontia-Mishra *et al.* (2016). Conformément aux nôtres, Tabli. (2018) a aussi démontré que tous ses isolats étaient producteurs d'ammoniac.

Les composés volatils tels que l'ammoniac et le cyanure d'hydrogène sont produits par un grand nombre de rhizobactéries et jouent un grand rôle dans le biocontrôle (Brimecombe *et al.*, 2000). Alabouvette *et al.* (2018) ont démontré que l'efficacité d'un agent de contrôle biologique n'était pas due à un seul mécanisme mais à une combinaison de différents modes d'action.

#### **4. Caractérisation métabolique et fonctionnelle**

La production d'enzymes lytiques extracellulaires peut inhiber la croissance des champignons. Ainsi, l'exposition des phytopathogènes à des enzymes lytiques peut provoquer la dégradation des composés complexes tels que la chitine, les protéines, la cellulose, qui sont par conséquent des constituants importants des parois cellulaires de l'agent pathogène, mais aussi des sources de nutrition (Islam et Hossain, 2013).

##### **4.1. Activités enzymatiques**

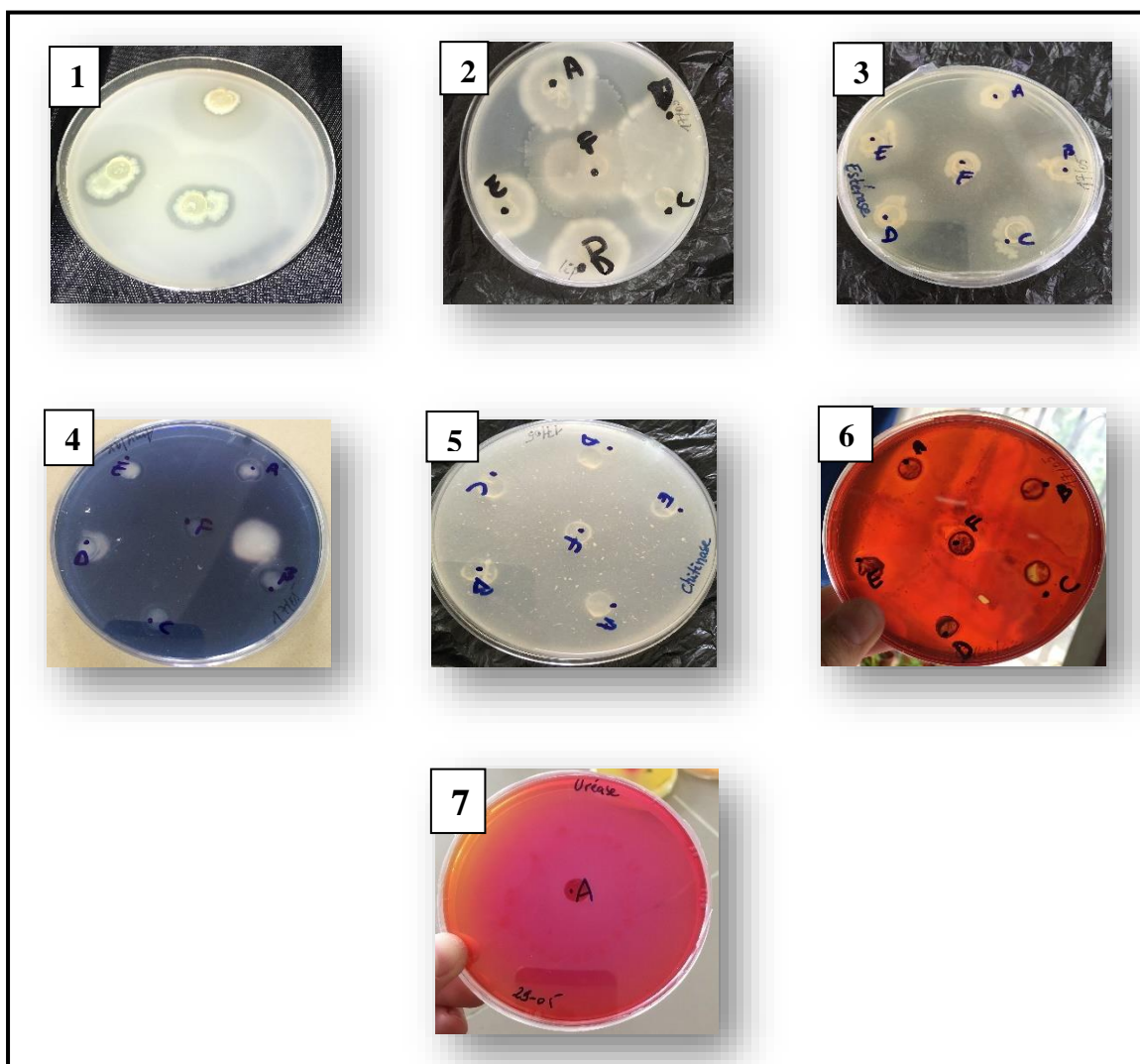
Différentes activités enzymatiques sont recherchées sur boîtes, les activités testées sont : les protéases, les lipases, les estérases, les cellulases, les chitinases, les amylases et les uréases. Pour les activités positives, les résultats varient entre faibles, moyens et bons d'un isolat à un autre.

Les résultats obtenus sont présentés dans le tableau VI et l'aspect des boîtes après incubation est représenté sur la figure n° 17.

**Tableau VI** : Résultats des différents tests d'activités enzymatiques réalisés pour les 6 isolats

Isolats	Protéase	Lipase	Estérase	Amylase	Chitinase	Cellulase	Uréase
<b>A</b>	+++	+++	++	-	-	-	+++
<b>B</b>	+++	++	++	+	-	-	++
<b>C</b>	+++	+++	+	-	-	-	-
<b>D</b>	+++	++	++	-	-	-	+++
<b>E</b>	+++	++	+++	-	-	-	+++
<b>F</b>	+++	+++	+	-	-	-	+

(+++): activité élevée ; (++) : activité moyenne ; (+) : activité faible ; (-) : pas d'activité

**Figure n° 17** : Aspect de quelques résultats d'activités enzymatiques testées sur boîtes

Protéase (1) ; Lipase (2) ; Estérase (3) ; Amylase (4) ; Chitinase (5) ; Cellulase (6) ; Uréase (7)

#### 4.1. Activité protéasique

L'activité protéasique est observée chez 100% des isolats examinés. Il est bien établi que la synthèse des enzymes lytiques telles que les protéases est l'un des mécanismes d'action indirects utilisés par les PGPR dans l'éradication des microorganismes nocifs (Twisha et Desai, 2014). Les protéases sont un ensemble important d'enzymes qui jouent un rôle clé dans la dégradation de la matière organique et la régulation nutritionnelle. Elles sont généralement utilisées dans l'industrie alimentaire, la production de détergents, le cuir, le processus de fabrication du fromage et plusieurs traitements médicaux et pharmaceutiques (Muthulakshmi et al., 2011).

Les résultats obtenus par Tabli. (2018) sont similaires aux nôtres. D'après les études réalisées par Ahmad et al. (2013) et Dinesh et al. (2015), 75% des isolats ont montré un résultat positif. Alors que dans d'autres études telles que Gontia-Mishra et al. (2016), 25% des isolats produisent des protéases. Avinash et Rai (2014) ont trouvé que 50% des isolats producteurs de ces enzymes.

L'absence d'autres enzymes telles que la chitinase et la lipase a démontré l'importance de la protéase dans le biocontrôle. Cela signifie qu'une bactérie produisant suffisamment de protéase peut contrôler la croissance des phytopathogènes sans produire plus d'enzymes (Athman et al., 2006 ; Ayantola et al., 2020).

##### 4.1.2. Activité lipasique et estérasique

Dans ce travail, tous les isolats (100%) se sont révélés producteurs d'enzymes estérasique et lipasique. Dans l'étude réalisée par Tabli et al. (2013), 100% des souches ont montré une activité estérasique positive, ce qui coïncide avec nos résultats obtenus. Concernant l'activité lipasique, seulement 50% des isolats obtenus étaient lipase +, ce qui semble inférieur à nos résultats. Par ailleurs, dans les études publiées par Carrim et al. (2006), seulement 40% des isolats ont présenté une activité estérasique et lipasique positive.

Les résultats obtenus par Bensidhoum et al. (2016) ont enregistré 51% et 69,38% pour l'activité estérasique et lipasique respectivement.

La synthèse des lipases et des estérases par les bactéries peut contribuer au recyclage de la matière organique en fournissant des éléments nécessaires aux plantes. Selon Senthilkumar R et Selvkumar G (2008), la production de lipase par le microorganisme dépend largement de l'espèce, des souches et des conditions de culture qui sont responsables de l'hydrolyse des lipides.

### 4.1.3. Activité amylasique

L'isolat B est le seul isolat à avoir montré un résultat positif pour cette activité. L'amidon est une réserve majeure d'hydrate de carbone de toutes les plantes supérieures. Les amylases peuvent avoir plusieurs sources, végétales, animales et microbiennes. Ces dernières sont les plus demandées en industrie (Sharma et *al.*, 2010). La synthèse des enzymes amylasiques par les bactéries du sol permet une dégradation de la matière organique dans la nature et ainsi fournir des éléments minéraux que les plantes vont utiliser pour leur croissance. Quand l'amidon est dégradé, les produits finaux solubles tels que (le glucose ou le maltose) sont absorbés par les cellules (Ekunsaumi, 2002).

Nos résultats sont différents de ceux trouvés par Dinesh et *al.* (2015), Lafkir et Mahbous (2018) ayant enregistré que 25% et 27% des souches ayant une activité amylasique respectivement. Tabli et *al.* (2013), Nabti et *al.* (2014) ont constaté que 100% des souches avaient montré une activité positive pour ce test. Ces différences peuvent être dues à la différence du site de prélèvement ainsi qu'à la variabilité et la diversité génétique des isolats bactériens.

### 4.1.4. Activité chitinasique

Les chitinases jouent un rôle protecteur contre les champignons phytopathogènes (Gadelhaki et *al.*, 2005). Selon Cohen-Kupiec et Chet, (1998) ; Patil et *al.* (1999), les chitinases sont présentes chez plusieurs microorganismes eux-mêmes dépourvus de chitine, mais pour lesquels la chitine constitue une source de nutriments. La chitine représente le composant majeur de la plupart des parois des cellules fongiques, l'implication alors de la lyse enzymatique de ces parois par l'intermédiaire des chitinases extracellulaires par des microorganismes producteurs de chitinase, ont été signalés comme agents de lutte biologique, par conséquent de biocontrôle, pour différents types de maladies fongiques.

Pour cette activité, aucun de nos isolats n'a montré un résultat positif. Dans les études réalisées par Ahmad et *al.* (2013), Tabli et *al.* (2013), Nabti et *al.* (2014), 100%, 75% et 50% des isolats ont montré une activité chitinasique positive respectivement. Ces résultats ne corroborent pas avec les nôtres. Avinash et Rai (2014) ont trouvé 4 souches sur 11 qui produisent la chitinase. Ces différences peuvent être dues au potentiel enzymatique des isolats et aux différences des lieux de prélèvement.

#### 4.1.5. Activité cellulasique

D'après les résultats du tableau, on constate qu'aucun de nos isolats n'a manifesté des résultats positifs pour ce test.

Les cellulases produites par les microorganismes du sol ont suscité beaucoup d'attention en raison de leur utilisation dans plusieurs domaines en biotechnologie comme dans les industries alimentaires, l'industrie du textile (Kuhad et *al.*, 2011), la bioconversion des déchets cellulosesiques, l'industrie du papier, dans l'alimentation animale, des aides digestives dans le domaine thérapeutique et plus récemment pour la production de biocarburant (Sukumaran et *al.*, 2005).

Nos résultats sont différents de ceux trouvés par Tabli et *al.* (2013), Ahmad et *al.* (2013), Dinesh et *al.* (2015), où 25% des isolats obtenus étaient cellulase +. Avinash et Rai, (2014), Bensidhoum et *al.* (2016), Gontia-Mishra et *al.* (2016) et Lafkir et Mahbous (2018), ont constaté quant à eux que 50% des isolats montrent une activité cellulosique. Cette différence peut-être due au type du Gram de nos isolats. Schwarz (2001) affirme que 80% des bactéries qui produisent la cellulase sont des Gram +.

Par conséquent, la cellulase peut être considérée comme un moyen potentiel dans le biocontrôle pour la stimulation et la favorisation de la croissance des plantes grâce à l'accélération de la décomposition de la matière organique et de l'augmentation de la fertilisation du sol (Ramamoorthy et *al.*, 2001).

#### 4.1.6. Activité uréasique

Une quantité énorme d'urée est constamment libérée dans l'environnement par les activités biologiques. L'uréase est une enzyme extracellulaire représentant 63% de l'activité totale du sol, son rôle réside dans l'hydrolyse de l'urée pour former deux molécules d'ammoniac ( $\text{NH}_3$ ) et une molécule de dioxyde de carbone ( $\text{CO}_2$ ). Elle est utilisée comme indicateur du sol, car sa concentration est intrinsèquement liée au taux de la matière organique (Martinez-Salgado et *al.*, 2010).

Pour ce test, 83% de nos résultats sont positifs avec une production d'uréase en quantités variables. La production de cette enzyme peut être considérée comme un mécanisme indirect de la stimulation de la croissance des plantes, et ainsi peut être incluse dans le biocontrôle. Une activité uréasique a été signalée chez plus de 200 espèces de bactéries et ceux-ci incluent les organismes Gram-positifs tels que *Staphylococcus sp.* et les organismes Gram-négatifs. Nos résultats sont proches de ceux trouvés par Tabli et *al.* (2013) et Nabti et *al.* (2014) où

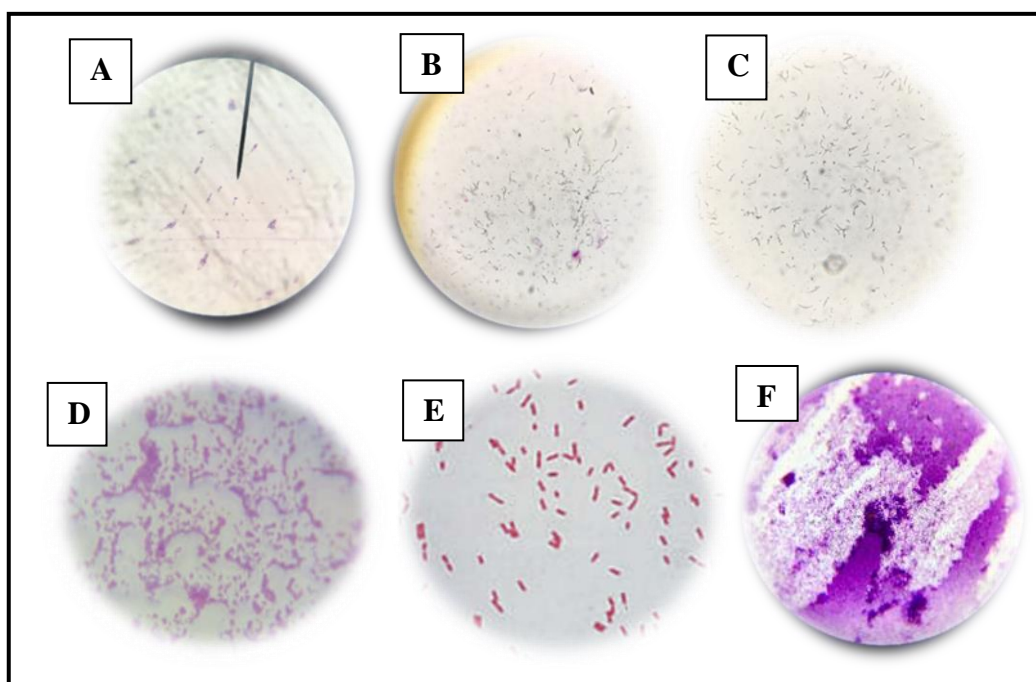
100% et 75% de leurs isolats étaient uréase+ respectivement. Hasan et *al.* (2014) et Bensidhoum et *al.* (2016) ont trouvé que 50% de leurs isolats ont montré une activité uréasique positive.

#### 4.2. Coloration de Gram des isolats

Après avoir effectué la coloration de Gram, les frottis colorés sont observés à l'immersion (G×1000). Cette technique a révélé cinq isolats Gram négatif et un isolat Gram positif, la plupart sont des bacilles. Les résultats obtenus sont résumés dans le tableau ci-dessous (Tableau VII).

**Tableau VII :** Résultats de la coloration de Gram des isolats bactériens

Isolats	Coloration de Gram		
	Forme	Gram	Agencement
A	Bacille	G +	Isolé
B	Cocci	G -	Isolé
C	Bacille	G -	Isolé
D	Coccobacille	G -	Isolé
E	Diplobacille	G -	Isolé
F	Bacille	G -	Isolé



**Figure n° 18 :** Coloration de Gram des isolats bactériens.

# **Conclusion et perspectives**

L'utilisation des PGPR comme biostimulants constitue une alternative biologique prometteuse pouvant influencer d'une manière positive le rendement et la santé des plantes. La connaissance des méthodes de protection et d'amélioration de la croissance des plantes permet d'augmenter les rendements des cultures et par conséquent répondre aux demandes sans cesse en augmentation.

Dans cette présente étude, des échantillons de sol sont prélevés de la zone rhizosphérique des tomates, à la Wilaya de Béjaïa (Seddouk Ouedda). Ces échantillons ont fait l'objet d'un isolement de bactéries d'intérêt agricole (PGPR). Six isolats ont été sélectionnés et purifiés sur la base des différences d'aspects macroscopiques des colonies. Ces isolats ont fait l'objet d'un test d'antagonisme contre les champignons phytopathogènes ; *Aspergillus niger*, *Alternaria sp* et *Penicillium sp*. Les résultats de la confrontation directe ont montré des pourcentages d'inhibition variant de 50% à 70% pour *A. niger*, 20% à 70% pour *Penicillium sp* et 40% à 65% pour *Alternaria sp*. A cet effet, les isolats choisis exhibent certains critères de PGPR, qui peuvent stimuler la croissance des plantes directement et/ou indirectement. En plus de leur aptitude à lutter contre les champignons phytopathogènes, ces isolats produisent plusieurs enzymes lytiques telles que les protéases, lipases, estérases, amylases, et uréases qui sont d'intérêt agricole remarquable à cause de leur implication dans la fertilisation des sols par la dégradation des polymères organiques, ainsi que la production des substances volatiles contre les trois phytopathogènes cela a été confirmé par leur production de deux substances de nature volatile à savoir : l'HCN et l'ammoniac.

Notre travail reste préliminaire et mérite d'être complété par :

- Tester l'activité de nos isolats sur d'autres champignons (genres et espèces) ;
- Rechercher d'autres activités à savoir la résistance aux métaux lourds et l'activité insecticides des isolats bactériens ;
- Identification phylogénétiques des isolats ;
- Réalisation des tests d'inoculation *in vivo* (sur plantes), au laboratoire ou sur champs pour voir leurs caractères de promotion de la croissance des plantes;
- Purification, identification et caractérisation biochimique des molécules antifongiques.

**Références**

**Bibliographiques**

- Abdelkader, F. (2012). Etude comparative de l'infection des sols par quelques champignons pathogènes en conditions de semis direct et de travail conventionnel. Diplôme de Magister, Université FERHAT ABBAS, Sétif, Algérie.
- Adam, A. (2008). *Elicitation de la résistance systémique induite chez la tomate et le concombre et activation de la voie de la lipoxygénase par des rhizobactéries non-pathogènes*, Thèse de l'université de Liège, Belgique.
- Agrios, G.N. (2005). *Plant Pathology*. 5<sup>th</sup> ed. Elsevier Academic Press, USA.
- Ahemad, M. (2005). Phosphate-Solubilizing bacteria-assisted phytoremediation of metalliferous soil. *3 Biotech* **5**, 111-121.
- Ahmad, F., Ahmad, L., Khan, M.S. 2008. *Screening of free-living rhizospheric bacteria for their multiple plant growth promoting activities*. *Microbiological Research*. **163**(2), 173-181.
- Ajouz, S. (2009). *Estimation du potentiel de résistance de Botrytis Cinerea à des biofongicides*. Thèse de Doctorat de l'Université d'Avignon et des pays de Vaucluse, France.
- Alabouvette, C., Cordier, C. 2018. Fertilité biologique des sols : des microorganismes utiles à la croissance des plantes innovation, Agronomiques, INRAE, 69.
- Annapurna, K., Kumar, A., Kumar, L.V., Govindasamy, V., Bose, P., Ramadoss, D. 2013. PGPR-Induced Systemic Resistance (ISR) in Plant Disease Management. *In: Maheshwari, D. (eds) Bacteria in Agrobiological Disease Management*. Springer, Berlin, Heidelberg. 405–425.
- Anonyme 2: <https://www.invasive.org/browse/detail.cfm?imgnum=5367343> (consulté le 17/08/2021)
- Ashwini, N., Srividya, S. (2014). Potentiality of *Bacillus subtilis* as biocontrol agent for management of anthracnose disease of chilli caused by *Colletotrichum gloeosporioides* OGC1. *3 Biotech* **4**, 127–136.

- Athman, Y.S. (2006). Host-endophyte-pest interactions of endophytic *Fusarium oxysporum* antagonistic to *Radopholus similis* in banana (*Musa* spp). Thèse de l'université de Pretoria, 1-183.
- Avinash, T.S., Rai, R.V. (2014). Antifungal Activity of Plant Growth Promoting Rhizobacteria against *Fusarium oxysporum* and *Phoma* sp. of Cucurbitaceae. In: Kharwar, R., Upadhyay, R., Dubey, N., Raghuwanshi, (eds) *Microbial Diversity and Biotechnology in Food Security*. Springer, New Delhi, 257–264.
- Ayantola, K.J., Fagbohun, E.D. 2020. Enzymatic Activity of *Rhizobacillus* Isolated from Tomato Rhizosphere. *Asian Journal of Biochemistry, Genetics and Molecular Biology*, **4**(3), 11-19.
- Baca, B.E., Elmerich, C. 2007. Microbial production of hormones. In Elmerich, C., Newton, W.E. *Associative and Endophytic Nitrogen-fixing Bacteria and cyanobacteria associations*, Springer, Netherlands. 113-143.
- Bach, H.J., Munch, J.C. 2000. Identification of bacterial sources of soil peptidases. *Biol Fertil Soils*, **31**, 219-224.
- Bais, H. P., Weir, T. L., Perry, L. G., Gilroy, S., Vivanco, J. M. 2006. The rôle of root exudates in rhizosphère interactions with plants and other organisms. *Ann. Rev. Plant Biol*, **57**, 233-266.
- Bazot, S. (2005). Contribution à l'étude de l'allocation des photoassimilats récent dans la plante et la rhizosphère chez une graminée pérenne, Unité Mixte de Recherche INRA-INPL Agronomie Environnement Nancy Colmar, **176**, 25-26.
- Beauchamp, C.J. (1993). Mode d'action des rhizobactéries favorisant la croissance des plantes et potentiel de leur utilisation comme agent de lutte biologique. *Phytoprotection*, **74**, 19-27
- Becker, D., Stanke, R., Fendrik, I., Frommer, W.B., Vanderleyden, J., Kaiser, W.M., Hedrich, R. 2002. Expression of the  $\text{NH}_4^+$  -transporter gene *LEAMT 1;2* is induced in tomato roots upon association with  $\text{N}_2$  -fixing bacteria. *Planta*, **215**: 424-429
- Benazouz-Kesbia, K. (2021). Cours de biotechnologie fongique et bactérienne. Faculté des Sciences Biologiques et des Sciences Agronomiques UMMTO, 1-4.

- Benhacene, Z., Messiad, I., Slimane, B. L. 2016. *Évaluation et taxonomie numérique des bactéries promotrices des plantes isolées de rhizosphère du Capsicum annuum* (Master dissertation, Université 8 Mai 1945 de Guelma).
- Bensidhoum, L., Rai, A., Tabli, N., Kahouadji, N., Khaber, M., Nabti, E. (2015). Biological Control of *Botrytis cinerea* by *Bacillus* sp. Strain S7LiBe Under Abiotic Stress, **1**(6): 07-14.
- Betencourt, E. (2012). *Interactions entre céréale et légumineuse en association et acquisition de phosphore du sol : processus rhizosphériques sous-jacents*. Thèse de l'université de Montpellier SupAgro, Ecole doctoral SIBAGH, 8-95.
- Betencourt, E., Duputel, M., Colomb, B., Desclaux, D., Hinsinger, P. 2012. Intercropping promotes the ability of durum wheat and chickpea to increase rhizosphere phosphorus availability in a low P soil. *Soil Biol Biochem*, **46**, 183-184.
- Boudiaf Nait-Kaci, M., Hedde, M., Mouas Bourbia, S., Derridj, A. 2014. Hierarchization of factors driving soil macrofauna in North Algeria groves. *Biotechnol. Agron. Soc. Environ*, **18**(1), 11-18.
- Brimecombe, M.J., Eliej, D., Lynch, J. M. 2000. The effect of root exudates on rhizosphere microbial populations. In: Pinton, R., Varini, Z., Nannipieri, P. Ed. *The rhizosphere: Biochemistry and Organic Substance at the Soil-Plant Interface*. Marcel Dekker, New York.
- Brimmer, T.A., Boland, G.J. 2003. A review of the non-target effects of fungi used to biologically control of plant diseases. *Agriculture, Ecosystems et Environment*, **100**(1), 3-16.
- Cappucino, J.C., Sherman, N. 1992. Negative staining. *Microbiology: A laboratory Manual*, **3**, 125-179.
- Carrim, A. J. I., Barbosa, E.C., Gonçalves Vieira J.D. 2006. Enzymatic Activity of Endophytic Bacterial Isolates of *Jacaranda decurrens* Cham. (Carobinhado- campo). *Braz. Arch. Biolog. Technol*, **49**(3), 353-359.
- Cavaglieri, L., Orlando J., Rodriguez, M.I., Chulze, S., Etcheverry, M. 2005. Biocontrol of *Bacillus subtilis* against *Fusarium verticillioides* in vitro and at the maize root level. *Research in microbiology*, **156**(5-6), 748-754.

- Chabrier, C., Mbolidi-Baron, H., Wicker., E. 2005. Techniques de lutte alternatives, 43p.
- Chaiharn, M., Lumyong, S. 2009. Phosphate solubilization potential and stress tolerance of rhizobacteria from rice soil in Northern Thailand. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, **25**(2), 305-314.
- Chandler, D., Bailey, A.S., Tatchell, G.M., Davidson, G., Greaves, J., Grant, W.P. 2011. The development, regulation and use of biopesticides for integrated pest management. *Phil. Trans. R. Soc. B*, **366**(1573), 1987-1998.
- Châtaigner, J.M., Duponnois, R. 2017. Les microorganismes du sol : des outils biologiques pour satisfaire les objectifs du développement durable (ODD). F.F.E. Annales des Mines - *Réalités industrielles*, 1, 94-98.
- Chitraselvi, R. P. E. 2018. Actinomycetes : dependable tool for sustainable agriculture. *Curr. Investig. Agric. Curr. Res*, **1**, 128-130.
- Choudhary, D.K., Johri, B.N. 2009. Interactions of *Bacillus* sp. and plants- With special reference to induced systemic resistance (ISR). *Microbiology Research*, **164**(5-6), 493- 513.
- Christensen, W.B. (1946). Urea Decomposition as a Means of Differentiating *Proteus* and *Paracolon* Cultures from Each Other and from *Salmonella* and *Shigella* Types. *Journal of Bacteriology*, **52**, 461-466.
- Cohen-Kupiec, R., Chet, I. 1998. The molecular biology of chitin digestion. *Current Opinion in Biotechnology*, **9**(3), 270-277.
- Curl, E, A et B. Truelove. 1986. *The Rhizosphere. Advanced Series in Agriculture Sciences*. Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg. *Environmental Conservation*, **15**(3), 284-288.
- Danjon, F., Drénou, C., Dupuy, L., Lebourgeois, F. 2007. « Le rôle du sol et de l'ancrage racinaire ». Landmann G., Birot Y. (Eds.). In: *Forêt, Vent et Risque : des connaissances enrichies pour une meilleure gestion forestière*. Editions *QUAE-ECOFOR*, Versaille : pp 22
- Davet, P. (1996). *Vie microbienne du sol et production végétale*, 383p.
- Dedi, JKÉ., Diomande, B.Y. 2017. Caractérisation de la mycoflore de grains de maïs (Zeamays) destinés à la préparation d'aliments composés pour la

volaille. *International Journal of Biological and Chemical Sciences*, **11**,2594-2603.

- Deravel, J., Krier, F., Jacques P. 2013. Les biopesticides, compléments et alternatives aux produits phytosanitaires chimiques (synthèse bibliographique). *Biotechnol. Agron. Soc. Environ.* 2014, **18**(2), 220-232.
- Dinesh, R., Anandaraja, M., Kumarb, A., Binia, Y.K., Subilaa, K.P., Aravind, R., 2015. Isolation, characterization, and evaluation of multi-trait plant growth promoting rhizobacteria for their growth promoting and disease suppressing effects on ginger. *Microbiological Research*, **173**, 34-43.
- Djebaili, R., Pellegrini, M., Smati, M., Del Gallo, M., Kitouni, M. 2020. Actinomycete strains isolated from saline soils: Plant-growth-promoting traits and inoculation effects on *Solanum lycopersicum*. *Sustainability*, **12**(11), 4617.
- Djellout, H., Mekheldi, D., Belkacem, K.K., Raio, A., Krimi, Z. 2019. Evaluation de potentiel de souche antagoniste de *Bacillus* spp. et de *Pseudomonas* spp. dans le contrôle d'*agrobacterium* spp. Pathogène impliqué dans la maladie de galle de collet. *Revue Agrobiologia*, **9**(1): 1267-1283.
- Dobbelaere, S.J., Vanderleyden, J., Okon, Y. 2003. Plant growth promoting effects of diazotrophs in the rhizosphere. *Critical Reviews in Plant Sciences*, **22**(2), 107-149.
- Dominique, S. (2007). Les bases de la production végétale.la plantes et son amélioration .Ed. Collection science et technique agricoles, 97p.
- Dorjey, S., Dolkar, D., Sharma, R. 2017. Plant Growth Promoting Rhizobacteria *Pseudomonas*: A Review. *Int. J. Curr. Microbiol. App. Sci*, **6**(7), 1335-1344.
- Drenou, C., Bonneau, M., Charnet, F., Cruiziat, P., Frochot, H., Garbaye, J., Girard, S., Larrieu, L., Levy, G., Marcais Moore, W., Rossignol, J.P. 2006. *Les Racines. Face cachée des arbres*. Institut Pour le développement forestier CNPPF, 335
- Durrieu, G. 1993. Ecologie des champignons. *Collection d'écologie*. Ed. Masson, **23**, 207p.

- Egidi, E., Delgado-Baquerizo, M., Jonathan, M., Plett., Juntao., Wang., Eldridge, D., Bardgett, R.D., Maestre, F.T., Singh, K.B. 2019. A few *Ascomycota* taxa dominate soil fungal communities worldwide. *Nature communication*, **10**, 2369.
- Ekunsaumi, T.(2002). Laboratory Production and Assay of Amylase by Fungi and Bacteria. (accessed 15.05.2016).
- El Khoury, A., Rizk, T., Lteif, R., Azouri, H., Delia, M.L., Lebrihi, A., 2006. Occurrence of ochratoxin A-and aflatoxin B1-producing fungi in lebanese grapes and ochratoxin A content in Musts and Finished Wines during 2004. *Journal of agricultural and food chemistry*, **54**(23), 8977-8982.
- Elad, Y., Kapat, A. 1999. The role of *Trichoderma harzianum* protease in the biocontrol of *Botrytis cinerea*. *European Journal of Plant Pathology*, **105**, 177-189.
- El-Gamal N. G., Shehata A. N., Hamed E.R. and Shehata H. S. (2016). Improvement of Lytic Enzymes Producing *Pseudomonas fluorescens* and *Bacillus subtilis* Isolates for Enhancing their Biocontrol Potential against Root Rot Disease in Tomato Plants. *Research Journal. Pharma Biolog Chemic. Sci*, **7**, 1p.
- Elmhirst, J. (2006). Profil de la culture des tomates de serre au Canada. Edition : agriculture et agroalimentaire, Canada, 50 p.
- Errakhi, R. (2008). *Contribution d'actinomycètes (Actinobactéries) à la lutte biologique contre Sclerotiumrolfsii et rôle de l'acide oxalique dans l'induction des mécanismes de défense*. Thèse de Doctorat. Université Cadi Ayyad, Marrakech Maroc.
- Fernando, W.G.D., Nakkeeran, S., Zhang, Y. 2005. Biosynthesis of Antibiotics by PGPR and its Relation in Biocontrol of Plant Diseases. In Z. A. Siddiqui (eds.), *PGPR: Biocontrol and Biofertilization*, 67-109.
- Fortin, J.A., Plenchette, C., Piché, Y. 2008. Les mycorhizes : la nouvelle révolution verte. Québec, Éditions *Multi Mondes*, 131 p.
- Gadelhaki, G. G., EL-Tarabily, A.K., AL-Kaabi, F.K. 2005. Insect Control Using Chitinolytic Soil Actinomycetes as Biocontrol Agents. *International Journal of Agriculture and Biology*, **4**,627-633.

- Ganeshan, G., Manoj Kumar, A. 2005. *Pseudomonas fluorescens*, a potential bacterial antagonist to control plant diseases, *Journal of Plant Interactions*, **1**(3): 123-134.
- Garbaye, J. (2013). La symbiose mycorhizienne : Une association entre les plantes et les champignons. Paris, Editions Quae, 280 p.
- Glick, B. R. (1995). The enhancement of plant growth by free-living bacteria. *Canadian Journal of Microbiology*, **41**(2),109-117.
- Glick, B. R. (2012). Plant Growth-Promoting Bacteria: Mechanisms and Applications. Hindawi Publishing Corporation, *Scientifica*, **2012**, 15p.
- Gobat, J.M., Aragno, M., Matthey, W. 2003. Le sol vivant : bases de pédologie biologique des sols. Presses Polytechniques et Universitaires, Lausan, 5-6p.
- Gonita-Mishra, I., Sapre, S., Sharam, A., Tiwari, S. 2016. Alleviation of Mercury Toxicity in Wheat by the Interaction of Mercury-Tolerant Plant Growth Promoting Rhizobacteria. *Journal of Plant Growth Regulation*. **35**, 1000-1012.
- Gupta, G., Singh Parihar, S., Kumar Ahirwar, N., Kumar Snehi, S. Singh, V. 2015. Plant Growth Promoting Rhizobacteria (PGPR) : Current and Future Prospects for Development of Sustainable Agriculture. *Journal of Microbial Biochemical Technology*, **7**(2), 96-102.
- Haas, D., Defago, G. 2005. Biological control of soil-borne pathogens by *fluorescent pseudomonads*. *Nature Reviews Microbiology*, **3**, 307-319.
- Haichour, N., Mezaache Aichour, S., Boukhalifa, A., Madaci, I., Ghechi, A., Zerroug, M. M. 2015. Metabolites involved in promoting plants growth and their protection. Conférence Internationale sur les Méthodes Alternatives de Protection des Plantes, (11-13), 309-315.
- Han, J., Sun, L., Dong, X., Cai, Z., Sun, X., Yang, H., Wang, Y., Song, W. 2005. Characterization of a novel plant growth-promoting bacteria strain *Delftiatsuruhatensis* HR4 both diazotrophand a potential biocontrol agent against various plant pathogens. *Systematic and Applied Microbiology* **28**(1), 66-76.

- Helluy, S., Holmes, J. C. 2005. Parasitic manipulation: further considerations. *Behavioural Processes*, **68**(3), 205-210.
- Hinsinger, P., Gobran, G.R., Gregory, P.J., Wenzel, W. 2005. Rhizosphere geometry and heterogeneity arising from root-mediated physical and chemical processes. *New phytologist* **168**(2), 293-303.
- Hopkins, W.G. (2003). *Physiologie végétale*. Bruxelles, De Boeck Supérieur, 532p.
- Jaradat, Z., Dawagreh, A., Ababneh, Q., Saadoun, I. 2008. Influence of culture conditions on cellulose production by *Streptomyces* sp. (strain j2). *Jordan journal of biological sciences*, **1**(4), 141-146.
- Jemni, M., Maaroufi, A., Mejri, S. 2009. Caractérisation et optimisation des conditions de croissance d'un biopesticide bactérien. *Revue des Régions Arides*. Jerba, Tunisie, 1367-1370.
- Jijakli, M.H. (2003). La lutte biologique en phytopathologie, In : Lepoivre, P.(eds), *Phytopathology*. De Boeck, Bruxelles, 289-317.
- Jørgensen, K., Puustinen, J., Suortti, A.-M. 2000. Bioremediation of petroleum hydrocarbon-contaminated soil by composting in biopiles. *Environmental Pollution*, **107**(2), 245-254.
- Joseph, B., Patra, R.R., Lawrence, R. 2007. Characterization of plant growth promoting rhizobacteria associated with chickpea (*Cicer arietinum* L.). *International Journal of Plant Production*, **2**, 141-152.
- Kang, Y., Shen, M., Wang, H., Zhao, Q. 2013. « A possible mechanism of action of plant growth promoting rhizobacteria (PGPR) strain *Bacillus pumilus* WP8 via regulation of soil bacterial community structure ». *The Journal of general and applied microbiology*, **59**(4), 267-277.
- Kavitha T., Nelson, R., Jesi, S.J. 2013. Screening of rhizobacteria for plant growth promoting traits and antifungal activity against charcoal rot pathogen *Macrophomina phaseolina*, *International Journal of Pharma and Bio Sciences*, **4**, 177-186.
- Kempe, J., Sequeira. L. 1983. Biological control of bacterial wilt of potatoes : Attempts to induce resistance by treating tubers with bacteria. *Plant Diseases*, **67**, 499-503.

- Khabbaz, S.E., Ladhalakshmi, D., Babu, M., Kandan, A., Ramamoorthy, V., Saravanakumar, D., Al-Mughrabi, T., Kandasamy, S. 2019. Plant Growth Promoting Bacteria (PGPB). A Versatile Tool for Plant Health Management. *Can. J. Pestic. Pest Manag*, **1**(1), 1-25.
- Kloepper, J.W., Gutierrez-Estrada, A., McInroy, J.A. 2007. Photoperiod regulates elicitation of growth promotion but not induced resistance by plant growth-promoting rhizobacteria. *Canadian Journal of Microbiology*, **53**(2), 159-167.
- Knowles, C. J., Bunch, A. W. 1986. Microbial cyanide metabolism. *Advances in Microbial Physiology*. **27**, 73-111.
- Kopečný, J., Hodrová, B., Stewart, C.S. 1996. The isolation and characterization of a rumen chitinolytic bacterium. *Letters in Applied Microbiology*, **23**(3), 195-198.
- Lafkir, S., Mahbous, A. 2018 : Activités enzymatiques des bactéries rhizosphériques de deux plantes médicinales (*Matricaria chamomilla* et *Rosmarinus officinalis*), 22-45.
- Lamizadeh, E., Enayatizamir, N. 2016. Isolation and identification of plant growth-promoting rhizobacteria (PGPR) from the rhizosphere of sugarcane in saline and non-saline soil. *Int J Curr Microbiol App Sci*, **5**(10),1072-1083.
- Lebuhn, M., Heulin, T., Hartmann, A. 1997. Production of auxine and other indolic and phenolic compounds by *Paenibacillus polymyxa* strains isolated from different proximity to plant roots. *FEMS Microbiology Ecology*, **22**(4), 325-334.
- Lefort, F. (2010). Lutte biologique et lutte microbiologique: des concepts anciens pour des méthodes de lutte modernes. Haute école du paysage d'ingénierie et d'architecture (Hepia) de Genève-Suisse Occidentale, 57p.
- Lehlali, R., Ezrari, D., Nabil, R., Kenfaoui, J., Esmaeel, Q., ElHamss, H., Belabess, Z., Ait Barka, E. 2022. Biological Control of Plant Pathogens : A Global Perspective. *Microorganisms*, **10**(3), 596.
- Lemanceau, P. (1992). Effets bénéfiques de rhizobactéries sur les plantes: exemple des *Pseudomonas* spp. *fluorescents*. Institut National de la Recherche Agronomique d'Algérie. **12**(6), 413-437.

- Leroux, P. (2003). Mode d'Action des Produits Phytosanitaires sur les Organismes Pathogènes des plantes. *Biologie et Pathologie Végétale C. R. Biologies*, **326**(1), 9-21.
- Lesuffleur, F. (2007). *Rhizodéposition à court terme de l'azote et exsudation racinaire des acides aminés par le trèfle blanc (Trifolium repens L.)*. Thèse de doctorat. Institut de biologie fondamentale et appliquée (IBFA). Université de CAEN, France.
- Lima, MAS, Oliveira MDCFD, Pimenta AT, Uchôa PK, 2019. *Aspergillus niger* : a hundred years of contribution to the natural products chemistry. *Journal of the Brazilian Chemical Society*. **30**(10), 2029-2059.
- Linas, M.D., Morassin, B., Recco, P. 1999. Actualités sur *Alternaria* : écologie. *Revue Française d'allergologie*, **38**(4), 349-355p.
- Loper, J.E., Henkels, M.D. 1999. Utilization of heterologous siderophore senchances levels of iron available to *Pseudomonas putida* in the rhizosphere. *Applied and Environmental Microbiology*, **65**(12), 5357-5363.
- Lorck, H. (1948). Production of hydrocyanic acid by bacteria. *Physiologia Plantarum*, **1**(2), 142-146.
- Lorito, M., Peterbauer, C., Hayes, C.K., Harman, E.G. 1994. Synergistic interaction between fungal cell wall degrading enzymes and different antifungal compounds enhances inhibition of spore germination. *Microbiology*, **140**(3), 623-629.
- Mantelin, S., Touraine, B. 2004. Plant Growth-Promoting Bacteria and Nitrate Availability: Impacts on Root Development and Nitrate Uptake. *Journal of Experimental Botany*, **55**(394), 27-34.
- Martinez-Salgado, M.M., Gutiérrez-Romero, V., Janssens, M., Ortega-Blu R. 2010. Biological soil quality indicators : a review. In : Mendez-Vilas A. (Ed), *Current Research, Technology and Education Topics in Applied Microbiology and Microbial Biotechnology*. Formatex, Spain, 319-328.
- Martinez-V, O., Jorquera, M.A., Crowley, D.E., Gajardo, G., Mora, M.L. 2010. Mechanisms and piratical consideration involved in plant growth promotion by rhizobacteria. *Journal of Soil Science and Plant Nutrition*, **10**(3), 293-319.

- Meena, B. (2014). Biological Control of Pest and Diseases Using *Fluorescent Pseudomonads*. In K. Sahayaraj (eds.), *Basic and Applied Aspects of Biopesticides*, 17-29.
- Milet, A. (2017). *Isolement de microorganismes à partir du sol des régions arides et sélection d'isolats à effet antagoniste sur l'agent de l'Alternariose*. (Thèse Doctorat de l'Université Constantine 1).
- Muthulakshmi, C., Gomathi, D., Kumar, D.G., Ravikumar, G., Kalaiselvi, M., Uma, C. 2011. Purification and Characterization of Protease by *Aspergillus flavus* under Solid State Fermentation. *Journal of Biological Sciences Production*, **4**(3), 137-148.
- Nabti, E. H., Bensidhoum, L., Tabli, N., Dahel, D., Weiss, A., Rothballer, M., Schmid M., Hartmann, A. 2014: Growth stimulation of barley and biocontrol effect on plant pathogenic fungi by a *Cellulosimicrobium* sp. Strain isolated from salt-affected rhizosphere soil in north western Algeria. *European Journal of Soil Biology*, **61**, 20-26.
- Nasraoui, B. (2006). Les champignons parasites des plantes cultivées, biologie, systématique, pathologie, maladies. Centre de publication universitaire. Tunisie, 456p.
- Nasraoui, B. (2008). Principales maladies fongiques des céréales et des légumineuses en Tunisie. *Main Fungal diseases of cereals in Tunisia*. Centre de publication universitaire.
- Nehem, N. 2008. *Etude des interactions entre Saccharomyces cerevisiae et Oenococcusoeni : impact sur la réalisation de la fermentation malolactique en cultures séquentielles et mixtes*. Thèse de Doctorat de l'Institut National Polytechnique de Toulouse, 43-44.
- Pal, K.K., Gardener, Mc.S.B. 2006. Biological Control of Plant Pathogens. *The Plant Health Instructor*, 25p.
- Patil, R.S., Ghormade, V., Deshpande, M.V. 1999. Chitinolytic enzymes: an exploration. *Enzyme and Microbial Technology*, **26**(7), 473-483.
- Pellan, L. (2020). *Décryptage des mécanismes impliqués dans le biocontrôle des champignons mycotoxinogènes des céréales*. Thèse de doctorat en Biotechnologie et Microbiologie. 225.

- Pérez-Montano, F., Alias-Villegas, C., Bellogin, R. A., Cerro, P.A., Espuny, M.R., Jiménez-Guerrero, I., Lopez-Baena, F.J., Cubo, T. 2013. Plant growth promotion in cereal and leguminous agricultural important plants: From microorganism capacities to crop production. *Microbiological Research*. **169**(5-6), 325-336.
- Perrone, G., Susca, S. 2017. *Penicillium* Species and Their Associated Mycotoxins. In: Moretti, A., Susca, Methods in Molecular Biology, (eds) *Journal of Mycotoxigenic Fungi*, **1542** 107-119.
- Petatàn-Sagahón, I., Anducho-Reyes, M. A., Silva-Rojas, H. V., Arana-Cuensa, A., TellezJurado, A., Cárdenas -Álvarez, I. O., Mercado-Flores, Y. 2011. Isolation of bacteria with antifungal activity against the phytopathogenic fungi *stenocarpella maydis* and *Stenocarpella macrospora*. *International Journal of Molecular Sciences*, **12**(9), 5522- 5537.
- Pezet, R., Viret, O., and Gindro, K. (2004) . Plant-microbe interaction: The *Botrytis greymould* of grapes-biology, biochemistry, epidemiology and control management. In: *Advances in Plant Physiology* (Hemantaranjan A., ed), Scientific publishers, Jodhpur, India, 7, 71-116.
- Raaijmakers, J.M., Vlami, M., Souza, J.T. (2002). Antibiotic production by bacterial biocontrol agents. *Antonie van Leeuwenhoek*. **81**(1-4), 537-547.
- Rai A., Bensidhoum, L., Tabli, N., Bouaoud, Y., Naili, F., Cruz, C., Nabti, E. 2016. A *Pseudomonas Protegens* with High Antifungal Activity Protects Apple Fruits Against *Botrytis cinerea* Gray Mold. *International Journal of Scientific Research in Science and Technology*, **2**(6): 227-237.
- Ramamoorthy, V., Viswanathan, R., Raguchander, T., Prakasam, V., Samiyappan, R. 2001. Induction of systemic resistance by plant growth promoting rhizobacteria in crop plant against pests and diseases. Article en ligne sur Science direct. *Crop Protection*, **20**(1), 1-11.
- Ramette, A., Frapolli, M., Défago, G., Moëgne-Loccoz, Y., 2003. Phylogeny of HCN Synthase-Encoding hcnBC Genes in Biocontrol *Fluorescens Pseudomonas* and Its Relationship with Host Plant Species and HCN Synthesis Ability, *Molecular Plant-Microbe Interactions*, **16**(6), 525-535.
- Ramjegathesh, R., Samiyappan, R., Raguchander, T., Prabakar, K., Saravanakumar, D. (2013). Plant-PGPR interaction for pest and

diseaseresistance in sustainable agriculture. In bacteria in Agrobiologie : *Disease Management*, Springer, Berlin, Heidelberg, j293-320.

- Reboux, G., Bellanger, A., Roussel, S., Grenouillet, F., Millon, L. 2010. Pollution atmosphérique, Moisissures et habitat : risques pour la santé et espèces impliquées, *Revue française d'allergologie*, **72**(4), 352-362.
- Rocher, F. (2004). *Lutte chimique contre les champignons pathogènes des plantes : évaluation de la systémie-phloémienne de nouvelles molécules à effet fongicide et d'activateurs de réaction de défense*. Thèse de Doctorat de L'université de Poitiers, 163p.
- Roger, P., Dommergues, Y., Balandreau, J., Dreyfus, B., Sougoufara, B. 1996. La fixation biologique de l'azote : quelles potentialités pour le développement : conférence-débat de l'ORSTOM.
- Saharan, B.S., Nehra, V. 2011. Plant Growth Promoting Rhizobacteria. A Critical Review. *Life Sciences and Medicine Research*, **2011**, LSMR-21.
- Schröder, P., Hartmann, A. 2003. Global Soils: New Developments in Rhizosphere Research, *Germany. Journal of Soils and Sediments*, **3**(4), 227.
- Schuster, E., Dunn-Coleman, N., Frisvad, J. C., Van Dijck, P.W. 2002. On the safety of *Aspergillus niger* -a review. *Appl microbiol biotechnol*, **59**(4-5), 426-435.
- Senthilkumar, R., Selvakumar, G. 2008. Isolation and Characterization of an Extracellular Lipase Producing *Bacillus* sp. SS-1 from Slaughter House Soil. *Advanced Biotech*, 24-25.
- Sharma, S., Gul Khan, F., Nabi Qazi, G. 2010. Molecular cloning and characterization of amylase from soil metagenomic library derived from Northwestern Himalayas. *Appl Microbiol Biotechnol*, **86**,1821-1828.
- Sheeba J., Dhamotharan R. and Baskar K. 2017. Isolation, Screening and Characterization of Plant Growth Promoting Bacteria and their Antifungal Effect on *Rhizoctonia Solani* (J.G. Kühn 1858). *Adv. Plants. Agric. Res.* **7**(5): 369-375.
- Sierra, G.A. (1957). A simple method for the detection of lipolytic activity of microorganisms and some observations on the influence of the contact between cells and fatty substrates, *Antonie Van Leeuwenhoek*. **23**, 15-22

- Singh, M., Singh, D., Gupta, A., Pandey, K.D., Singh, P.K., Kumar, A., 2019. Plant growth promoting rhizobacteria: application in biofertilizers and biocontrol of phytopathogens. In PGPR amelioration in sustainable agriculture .Woodhead Publishing, 41-66. Smith SE, Read DJ, (2008). *Mycorrhizal Symbiosis*. 3rd Edition. Academic Press, London.
- Sivasakthi, S., Usharani, G., Saranraj, P. 2014. Biocontrol potentiality of plant growth promoting bacteria (PGPR)- *Pseudomonas fluorescens* and *Bacillus subtilis* : A review. *African journal of agricultural research*, **9**(16) : 1265-1277.
- Smaoui, S., Ennouri, K., Chakchouk-Mtibaa, A., Sellem, I., Bouchaala, K., Karray-Rebai, I., Mellouli, L. 2018. Modeling-based optimization approaches for the development of Anti-*Agrobacterium tumefaciens* activity using *Streptomyces* sp TN71. *Microbial Pathogenesis*, **119**, 19-27.
- Spaepen, S., Dobbelaere, S., Croonenborghs, A., Vanderleyden, J. 2008. Effects of *Azospirillum brasilense* indole-3-acetic acid production on inoculated wheat plants. *Plant Soil*, **312**, 15-23.
- Strullu, D.G. (1991). Les mycorhizes des arbres et des plantes cultivées. *Technique et documentation Lavoisier*. Paris, 242p.
- Sukumaran, R. K., Singhanian, R. R., Pandey, A., 2005. Microbial cellulases production, application, and challenges. *Journal of Scientific and industrial Research*, **64**(11), 832-844.
- Tabli, N. (2018). *Isolement de bactéries à partir des milieux aquatiques productrices des substances antifongiques*. Thèse de doctorat. microbiologie appliquée. Bejaia-Algérie.
- Tabli, N., Nabti, E.H., Dahel, D., Mokrane, N., Manyani, H., Dary, M., Megias, M.G. 2013. Impact of diazotrophic bacteria on germination and growth of tomato, with biocontrol effect, isolated from Algerian soil. *J. Eco. Heal. Env*, **2**(1), 1-7.
- Tabli, N., Raia, A., Bensidhoum, L., Palmieri, G., Gogliettino, M., Cocca, E., Consiglio, C., Cillo, F., Bubici, G., Nabti, E.H. 2018 : Plant growth promoting and inducible antifungal activities of irrigation well water-bacteria. *Biological Control*, **117**, 78-86.

- Taniwaki, M.H., Hocking, A.D., Pitt, J.I., Fleet, G.H. 2009. Growth and mycotoxin production by food spoilage fungi under high carbon dioxide and low oxygen atmospheres. *International Journal of Food and Microbiology*, **132**(2-3), 100-108.
- Tsegaye, Z., Assefa, F., Beyene, D. 2017. Properties and Application of Plant Growth Promoting Rhizobacteria. *Int. J. Curr. Trend. Pharmacobiol. Med. Sci.* **2**(1), 30-43.
- Twisha, P., Desai, P.B. 2014. Study on Rhizospheric microflora of Wild and Transgenic varieties of *Gossypium species* in Monsoon. *Res. J. Recent. Sci*, **3**, 42-51.
- Van Loon. L.C., Bakker, P.A.H.M., Pieterse, C.M.J. 1998. SYSTEMIC RESISTANCE INDUCED BY RHIZOSPHERE BACTERIA. *Annu. Rev. Phytopathol.* **36**, 453–83.
- Vander Pulten, W.H. (2003). Plant defense belowground and spatiotemporal processes in natural vegetation: *Ecology*, **84**(9), 2269-2280.
- Vinoth, R.S., Kanikkai, R.A., Babu, V.A., Manoj, G.T., Naman, H.S., Johnson, A.J., Infant, S.B. Sathiyaseelan, K. 2009. Study of starch degrading bacteria from kitchen waste soil in the production of amylase by using paddy straw. *Recent Research in Science and Technology*, **1**(1), 8-13.
- Visagie, C. M., Houbraeken, J., Frisvad, J. C., Hong, S. B., Klaassen, C. H W., Perrone, G., Seifert, K. A., Varga, J., Yaguchi, T., Samson, R.A. 2014. Identification and nomenclature of the genus *Penicillium*. *Studies in Mycology*, **87**(1), 343-371.
- Wang, B., Qiu, Y-L. 2006. Phylogenetic distribution and evolution of mycorrhizas in land plants. *Mycorrhiza*, **16**, 299-363.
- Weller, D.M., Raaijmakers J.M, McSpadden Gardener B. B, Thomashaw L. S. 2002. Microbial populations responsible for specific soil suppressiveness plant pathogens. *Ann. Rev. Phytopathol*, **40**, 309-348.
- Whipps, J.M. (2001). Microbial interactions and biocontrol in the rhizosphere. *Journal of Experimental Botany*, **52**(1), 487-511.
- Williams G.F., Asher M.J.C. (1996). Selection of rhizobacteria for the control of *Pythium ultimum* and *Aphanomyces cochlioides* on sugar-beet seedlings. *Crop Protection*, **15**(5), 479-486.

- Yu, T.E., J.C., Egger, K. N., Petterson, R.L. 2001. a. Ectoendomycorrhizal associations characteristics and functions. *Mycorrhizas*, 11, 167-177.

# **Annexes**

**Annexe I : Milieux de culture utilisés et leur composition (pour un litre de milieu)**

Milieux de culture	Abréviations	Utilisation
Gélose trypticase soja agar	TSA	Test antifongique
Gélose nutritive	GN	Isolement de la flore bactérienne et repiquage
Potato dextrose agar	PDA	Culture des champignons

➤ **Gélose Trypticase Soja Agar (TSA)**

Composition	Quantité
Agar	15 (g)
Peptone de caséine	15 (g)
Peptone de soja	5 (g)
NaCl	5 (g)
Eau distillée	1L
pH	7

➤ **Gélose Nutritive (GN)**

Composition	Quantité
Peptone	5 (g)
Extrait de viande	1 (g)
Extrait de levure	2 (g)
NaCl	5 (g)
Agar	7.5 (g)
pH	7.2±0.2

➤ **Potato Dextrose Agar (PDA)**

<b>Composition</b>	<b>Quantité</b>
Pomme de terre	200 (g)
Glucose	20 (g)
Agar bactériologique	15 (g)
pH	6.7

**Annexe II : Produits chimiques utilisés (solutions et réactifs...)**

- Alcool
- Chlorure de sodium
- Eau distillée
- Eau physiologique
- Eau Peptonée Exempte d'Indole
- Fuchsine
- Huile à immersion
- Picrate de sodium
- Réactif de Nessler
- Rouge Congo
- Solution de Lugol
- Tween 80
- Tween 20
- Violet de Gentiane

**Annexe III : Appareillage**

<b>Appareillage</b>	<b>Source</b>
Autoclave	WEBEKO. Allemagne
Etuve	BINDER. Allemagne
Réfrigérateur	ENIEM. Algérie
pH-mètre	HANNA. Portugal
Balance	KERN 770. Allemagne
Plaque chauffante	GERHARDT. Allemagne
Bain marie	MEMMERT. Allemagne

#### Annexe IV : Coloration de Gram

➤ Préparation du frottis bactérien

\*Déposer au centre d'une lame de microscope préalablement nettoyée à l'alcool une goutte d'eau physiologique ;

\*Racler stérilement, à l'aide d'une pipette Pasteur, quelques colonies bactériennes bien isolées et l'étaler en un film mince ;

\*Passer 3 fois la lame dans la flame du bec Bunsen pour fixer l'échantillon puis laisser refroidir ;

\*Placer la lame sur un bac de coloration.

➤ Réalisation de la coloration

\*Déposer une goutte de violet de Gentiane sur le frottis fixé. Laisser agir pendant 1 minute puis rincer légèrement à l'eau distillée ;

\*Fixer le frottis au Lugol et laisser reposer 45 secondes puis rincer rapidement à l'eau de robinet ;

\*Décolorer rapidement à l'alcool pendant 30 secondes et arrêter la décoloration quand ça devient clair ;

\*Recolorer à la Fuchsine (rose). Laisser agir pendant 1 minute puis rincer très brièvement à l'eau de robinet ;

\*Sécher la lame au bec Bunsen ;

\*Examiner la lame au microscope et observer en immersion ( $\times 1000$ ).

## Résumé

En vue des risques augmentés des maladies des plantes causées par les champignons phytopathogènes, l'atténuation de la gravité par les agents de biocontrôle est l'outil promoteur utilisé. Pour cela, la sélection de bactéries rhizosphériques pour des essais préliminaires d'antagonisme *in vitro* ont été mis en évidence dans ce travail. Six isolats prélevés à partir du sol rhizosphérique des tomates à Seddouk Ouedda, Béjaia ont été purifiés sur la base d'une différence de l'aspect phénotypique sur boîtes, puis testés pour leur capacité à inhiber la croissance des trois champignons phytopathogènes *Aspergillus niger*, *Alternaria sp* et *Penicillium sp*. Les isolats sélectionnés sont également testés pour leur production de métabolites antifongiques d'intérêt agricole ; production d'HCN et NH<sub>3</sub>, production d'enzymes lytiques (protéase, amylase, lipase, estérase, cellulase, chitinase et uréase). Les résultats obtenus ont montré que les souches bactériennes ont exercé un pouvoir inhibiteur appréciable sur la croissance mycélienne des trois champignons dans le test de confrontation directe sur boîtes, avec des PGI% qui varient entre 20 à 70%. L'isolat F était efficace à l'égard des trois champignons testés. La plupart des isolats étudiés produisent la majorité des enzymes recherchées, à l'exception de la cellulase et la chitinase.

**Mots clés :** Sol rhizosphérique, bactéries rhizosphériques, isolats, champignons phytopathogènes, agents de biocontrôle

## Abstract

In view of the increased risks of plant diseases caused by phytopathogenic fungi, mitigation of severity by biocontrol agents is the promoting tool used. To this end, the selection of rhizospheric bacteria for preliminary *in vitro* antagonism trials was highlighted in this work. Six isolates taken from the rhizosphere soil of tomatoes at Seddouk Ouedda, Béjaia were purified on the basis of a difference in phenotypic appearance on boxes, then tested for their ability to inhibit the growth of the three phytopathogenic fungi *Aspergillus niger*, *Alternaria sp* and *Penicillium sp*. The selected isolates were also tested for their production of antifungal metabolites of agricultural interest: production of HCN and NH<sub>3</sub>, production of lytic enzymes (protease, amylase, lipase, esterase, cellulase, chitinase and urease). The results obtained showed that the bacterial strains exerted an appreciable inhibitory power on the mycelial growth of the three fungi in the direct box test, with PGI% varying between 20% and 70%. Isolate F was effective against all the three fungi tested. All of the isolates studied produced most of the enzymes tested, with the exception of cellulase and chitinase.

**Key words:** Rhizospheric soil, rhizospheric bacteria, isolates, phytopathogenic fungi, biocontrol agents.

## ملخص

في ضوء المخاطر المتزايدة للأمراض النباتية التي تسببها الفطريات الممرضة للنبات، فإن تخفيف حدة عوامل المكافحة الحيوية هو أداة لاختبارات الضد الأولية في المختبر في هذا العمل الجذرية الترويج المستخدمة. لهذا الغرض، تم تسليط الضوء على اختيار بكتيريا تم تنقية ستة عزلات مأخوذة من تربة جذور الطماطم في منطقة صدوق واده بجاية على أساس اختلاف المظهر المطهري على علب *Aspergillus niger* و *Alternaria sp* و *Penicillium sp*. ثم اختبار قدرتها على تثبيط نمو ثلاثة فطريات ممرضة للنبات و إنتاج NH<sub>3</sub> و HCN يتم أيضاً اختبار العزلات المختارة من أجل إنتاج المستقلبات المضادة للفطريات ذات الأهمية الزراعية؛ إنتاج الإنزيمات اللايتية (البروتياز، الأميلاز، الليباز، الإستيراز، السليولاز، الكيتيناز واليورياز). أظهرت النتائج التي تم الحصول عليها أن السلالات البكتيرية تمارس قوة مثبطة ملحوظة على النمو الفطري للفطريات الثلاثة في اختبار المواجهة المباشرة على علب بيترى، بنسبة فعال ضد الفطريات الثلاثة التي تم اختبارها. تنتج معظم العزلات المدروسة F والتي تتراوح بين 20 إلى 70٪. كان عزل PGI٪ غالبية الإنزيمات المطلوبة، باستثناء السليولاز والكيتيناز.

الحيوية المكافحة عوامل، النباتية للأمراض المسببة الفطريات، العزلات، الجذرية البكتيريا، الجذرية التربة: المفاتيحية الكلمات.