

**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**

**DEPARTEMENT DE BIOCHIMIE ET DE MICROBIOLOGIE**

**Mémoire de fin d'étude**

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

**Option : Microbiologie Appliquée**

***Thème***

**Isolement et sélection de bactéries aquatiques  
productrices de molécules d'intérêt agricole**

**Réalisé par:**

**Soutenu le: 11 juillet 2022**

- **BELLALI Djouher**
- **CHABANE Malha**
- **DEKANI Mélissa**

**Devant le jury composé de :**

<b>Mr HOUALI K</b>	<b>Professeur</b>	<b>UMMTO</b>	<b>Président</b>
<b>Mr TITOUCHE Y</b>	<b>MCA</b>	<b>UMMTO</b>	<b>Examineur</b>
<b>Mme TABLI N</b>	<b>MCB</b>	<b>UMMTO</b>	<b>Promotrice</b>
<b>Mlle DERMECHE S</b>	<b>MCA</b>	<b>UMMTO</b>	<b>Co-promotrice</b>

**Année Universitaire : 2021/2022**



# Remerciements

*Nous tenons à remercier en premier lieu le bon Dieu de nous avoir donnés la santé, la volonté, la foi et le courage pour réaliser ce travail.*

*Nous tenons à remercier très profondément **M<sup>me</sup> TABLI N**, de nous avoir encadrées, conseillées et encouragées et permis de travailler dans un cadre très agréable.*

*On tient à exprimer nos profondes reconnaissances à **M<sup>lle</sup> DERMECHE S**, notre Co-promotrice, pour son encadrement et suivi attentif, son soutien, son enthousiasme et ses conseils avisés tout au long de ce travail.*

*Nous adressons notre reconnaissance à **M<sup>r</sup> Houali K**, d'avoir accepté présider le jury de ce mémoire.*

*Nous remercions également **M<sup>r</sup> Titouche Y**, qui nous a fait l'honneur d'être l'examineur de ce mémoire et pour sa disponibilité et son aide les plus précieux.*

*Enfin toute notre sympathie et nos remerciements vont également à tous ceux et celles, qui de près ou de loin, ont contribué à la réalisation de ce mémoire.*

# Dédicaces



*Nous dédions ce modeste travail*

*À nos parents, que ce travail soit le témoignage sincère et affectueux de nos profondes reconnaissances pour tout ce que vous avez fait.*

*À nos frères et sœurs, qui nous ont soutenus et encouragés.*

*À nos chères familles*

*À tous nos ami(e)s*

*Mélissa et Djouher.*

# Dédicaces



*« Le meilleur moyen de réussir, c'est toujours d'essayer encore une fois » Thomas Edison*

*Ce modeste travail je le dédie à mes chers parents qui m'ont toujours été là pour moi me poussé et motivé dans mes études, sans eux je n'aurais certainement pas fait d'étude supérieure. Ce mémoire de fin d'étude représente donc l'aboutissement du soutien et des encouragements qu'ils m'ont prodigués tout au long de mes études qu'ils en soient remerciés par cette trop modeste dédicace.*

*A mes chers frères et sœurs*

*A mes belles sœurs*

*A mes nièces, et neveux*

*A mon meilleur ami Dr Adel .E qui n'a jamais cessé de m'encourager et d'avancer.*

*Enfin, à tous les gens qui m'ont aidé dans ma vie*

**Malha**

<b>Tableau 01</b> : Quelques maladies des plantes et les agents causals.....	<b>8</b>
<b>Tableau 02</b> : Quelques agents de biocontrôle utilisés dans la lutte contre des phytopathogènes.....	<b>15</b>
<b>Tableau 03</b> : Milieux de cultures utilisés.....	<b>24</b>
<b>Tableau 04</b> : Appareils utilisés.....	<b>25</b>
<b>Tableau 05</b> : Résultats des différents tests d'activités enzymatiques testés pour les 15 isolats.....	<b>42</b>
<b>Tableau 06</b> : Caractères microscopiques des isolats.....	<b>48</b>

<b>Figure 01:</b> Représentation schématique du mode d'action des bactéries stimulatrices de la croissance des plantes et dans le biocontrôle.....	<b>23</b>
<b>Figure 02 :</b> Aspects des espèces fongiques sur milieu à extrait de malt.....	<b>24</b>
<b>Figure 03 :</b> Site de prélèvement des échantillons d'eau de puits.....	<b>26</b>
<b>Figure 04 :</b> Étapes de la sélection des isolats bactériens.....	<b>27</b>
<b>Figure 05 :</b> Mise en évidence de l'inhibition de la croissance mycélienne par les isolats bactériens.....	<b>28</b>
<b>Figure 06:</b> Recherche de la production de l'amylase.....	<b>30</b>
<b>Figure 07:</b> Recherche de la production de la cellulase.....	<b>31</b>
<b>Figure 08 :</b> Recherche de la production de la chitinase.....	<b>31</b>
<b>Figure 09 :</b> Mise en évidence des deux activités estérasique et lipasique.....	<b>32</b>
<b>Figure 10 :</b> Recherche de la production des protéases.....	<b>33</b>
<b>Figure 11 :</b> Recherche de l'activité uréasique.....	<b>33</b>
<b>Figure 12 :</b> Recherche de la production d'Acide Indole Acétique (AIA).....	<b>34</b>
<b>Figure 13 :</b> Aspects de quelques isolats bactériens obtenus sur boîtes.....	<b>36</b>
<b>Figure 14:</b> Pourcentage d'inhibition de la croissance des champignons phytopathogènes par les isolats testés (histogrammes A, B, C, D et E).....	<b>38</b>
<b>Figure 15:</b> Inhibition exercée par quelques isolats sur les cinq champignons phytopathogènes.....	<b>39</b>
<b>Figure 16:</b> Inhibition de la sporulation d' <i>Aspergillus niger</i> par l'isolat I10 sur boîtes.....	<b>39</b>
<b>Figure 17 :</b> Aspect des résultats d'activités enzymatiques testées sur boîtes.....	<b>43</b>
<b>Figure 18 :</b> Quantités d'Acide indole acétique produites par les différents isolas.....	<b>47</b>
<b>Figure 19 :</b> Colorations du Gram de quelques isolats bactériens.....	<b>48</b>

<b>ACC</b>	<b>1-Amino Cyclopropane-1-Carboxylate</b>
<b>AIA</b>	<b>Acide Indole Acétique</b>
<b>BHIB</b>	<b>Bouillon d'Infusion Cœur Cervele « Brain Heart Infusion Broth »</b>
<b>CMC</b>	<b>Carboxy Methyl Cellulose</b>
<b>GN</b>	<b>Gélose Nutritive</b>
<b>GEM</b>	<b>Gélose Extraite de Malt</b>
<b>HCN</b>	<b>Cyanhydrique d'Hydrogène</b>
<b>PDA</b>	<b>Gélose dextrosée à la pomme de terre « Potato Dextrose Agar »</b>
<b>PGI</b>	<b>Pourcentage d'inhibition de la croissance « Percentage Growth Inhibition »</b>
<b>PGP</b>	<b>Stimulation de la Croissance de la Plante « Plant Growth Promotion »</b>
<b>PGPR</b>	<b>Rhizobactéries Stimulatrices de la Croissance des Plantes « Plant Growth Promoting Rhizobacteria »</b>
<b>PGPB</b>	<b>Bactéries Stimulatrices de la Croissance des Plantes « Plant Growth Promoting Bacteria »</b>
<b>PR</b>	<b>Protéine Liée à la Pathogénicité « Pathogenesis-related protein »</b>
<b>PSB</b>	<b>Bactérie Solubilisant le Phosphate « Phosphate Solubilizing Bacteria »</b>
<b>LB</b>	<b>Luria Bertani</b>
<b>AS</b>	<b>Acide Salicylique</b>
<b>SAR</b>	<b>Résistance Systémique Acquise « Systemic Acquired Resistance »</b>
<b>ISR</b>	<b>Résistance Systémique Induite « Induced Systemic Resistance »</b>
<b>Mm</b>	<b>Millimètre</b>
<b>µg</b>	<b>Micros gramme.</b>
<b>C°</b>	<b>Degré Celsius.</b>
<b>Cm</b>	<b>Centimètre.</b>
<b>T</b>	<b>Temps.</b>
<b>pH</b>	<b>Potentiel d'hydrogène</b>

# Sommaire

Liste des tableaux	
Listes des figures	
Liste des abréviations	
<b>Introduction</b> .....	1

## Partie bibliographique

### Chapitre I : Les champignons phytopathogènes

1- Introduction .....	3
2- Principaux genres de champignons phytopathogènes .....	3
2-1 <i>Aspergillus</i> sp.....	3
2-2 <i>Penicillium</i> sp .....	4
2-3 <i>Fusarium</i> sp .....	5
2-4 <i>Botrytis</i> sp .....	6
3- Maladies des plantes .....	6
3-1 Définition .....	6
3-2 Symptômes.....	7

### Chapitre II : Les moyens de lutte

1 Moyens de lutte.....	9
1-1 Lutte physique .....	9
1-2 Lutte culturale .....	9
1-3 Lutte intégrée .....	10
1-4 Lutte chimique .....	10
1-4-1 Fongicides .....	10
1-4-2 Pesticides.....	11
1-5 Lutte biologique.....	11
1-5-1 Intérêt de la lutte biologique dans le contrôle des maladies phytopathogènes.....	12
1-5-2 Microorganismes les plus utilisés dans la lutte biologiques .....	13

## **Chapitre III : Les PGPB comme agents stimulateurs de la croissance et biocontrôle**

1-Généralités .....	16
2- Mécanismes d'actions des bactéries stimulatrices de la croissance des plantes.....	16
2-1 Mécanismes directs .....	17
2-1-1 Biofertilisation.....	17
2-1-2 Production de phytohormones.....	18
2-2 Mécanismes indirectes .....	19
2-2-1 Compétition.....	19
2-2-2 Synthèse d'antibiotiques.....	20
2-2-3 Résistance systémique.....	21
2-2-4 Enzymes lytiques.....	22

## **Partie expérimentale**

### **Chapitre I : Matériel et Méthodes**

1 Matériels.....	24
1-1 Les souches fongiques .....	24
1-2 Les isolats bactériens .....	24
1-3 Milieux de culture.....	24
1-4 Produits chimiques utilisés (réactifs, alcool) .....	25
1-5 Appareillage.....	25
2 Méthodes .....	26
2-1 Prélèvement des échantillons d'eau de puits .....	26
2-2 Evaluation de quelques caractères physico-chimiques des échantillons d'eau .....	26
2-2-1 Analyse du potentiel d'hydrogène de l'eau.....	26
2-2-2 Conductivité de l'eau.....	27
2-3 Criblage d'isolats bactériens producteurs de molécules antifongiques.....	27
2-4 Caractérisation métabolique et fonctionnelle (quelques traits PGP impliqués dans le biocontrôle).....	29
2-4-1 Activités enzymatiques.....	29

2-4-2 Production d'Acide indole acétique .....	33
2-4-3 Coloration de Gram des isolats sélectionnés.....	34

## **Chapitre II : Résultats et discussion**

1- Caractères physico-chimiques de l'eau du puits utilisées .....	35
1-1 Potentiel hydrogène de l'eau.....	35
1-2 Conductivité de l'eau .....	35
2-Criblage d'isolats bactériens producteurs de molécules antifongiques .....	36
2-1 Isolement et purification des bactéries.....	36
3- Résultats de l'étude de l'action antagoniste des isolats bactériens a l'égard des cinq champignons.....	36
4- Caractérisation métaboliques et fonctionnelles (quelques traits PGP impliqués dans le biocontrôle).....	41
4-1 Activités enzymatiques.....	42
4-2 Production de l'acide indole acétique .....	46
4-3 Coloration de Gram des isolats sélectionnés.....	47
Conclusion.....	49
Références bibliographiques	
Annexes	
Résumé	

# Introduction

Depuis plusieurs décennies, les maladies des plantes sont connues pour leur effet dévastateur sur les récoltes à petite et à grande échelle (Agrios, 2005). Les agents phytopathogènes, notamment les bactéries, les champignons, les insectes, les nématodes, les virus et les protozoaires, sont les principales causes des maladies des plantes (Borriss, 2011 ; Corbez, 1990). L'inquiétude envers les maladies phytopathogènes devient de plus en plus grave du fait de l'extension des cultures intensives (Seitz et *al.*, 1982; Alderman *et al.*, 1996). On estime qu'environ un tiers des ressources alimentaires sont détruites chaque année en raison de l'attaque par les agents pathogènes (Borriss, 2011).

La majorité des maladies des plantes sont causées par les champignons phytopathogènes qui réduisent de façon importante la productivité des cultures dans le monde entier. Pour lutter contre ces maladies, l'utilisation croissante et inconsciente de substances chimiques dans les sols peut entraîner plusieurs effets négatifs. En outre, l'efficacité des fongicides chimiques est souvent compromise par l'émergence de pathogènes résistants, l'accumulation de résidus chimiques nocifs dans l'environnement, et leurs effets néfastes sur les organismes non ciblés (Gerhardson, 2002 ; Nagórska et *al.*, 2007 ; Belhadi et *al.*, 2016).

Les inconvénients de la lutte chimique rendent nécessaire et urgent de rechercher une méthode de lutte alternative écologique et durable, et donc d'une méthode de lutte biologique. Un certain nombre de travaux (Nabti et *al.*, 2014 ; Bensidhoum et *al.*, 2015 ; Bensidhoum et *al.*, 2016 ; Tabli et *al.*, 2018 ) ont démontré l'impact de certains microorganismes bénéfiques tels que les bactéries/rhizobactéries dites promotrices de la croissance des plantes (PGPB/R) pouvant constituer une solution alternative prometteuse afin de réduire l'application des produits chimiques et d'améliorer la santé des plantes.

C'est dans cette optique que ce travail est dirigé, il s'agit d'un isolement de bactéries à partir d'un puits d'irrigation d'intérêt agricole du village de Djebira (Wilaya de Béjaia), pour la mise en évidence des caractères de production de molécules antifongiques et stimulatrices de la croissance des plantes.

Le présent manuscrit est scindé en deux parties :

- **la première partie est consacrée pour** une synthèse bibliographique qui comprenant un ensemble de données sur les champignons phytopathogènes, les moyens de lutte et sur les bactéries promotrices de la croissance des plantes (PGPB) ;
- **la seconde partie** est réservée aux matériel et méthodes utilisés dans cette investigation ainsi qu'à la présentation et discussion des résultats obtenus lors de ce travail.

Enfin, le présent travail fini par une conclusion retraçant l'ensemble des résultats obtenus.

**Partie**

**bibliographique**

# Chapitre I

## Les champignons phytopathogènes

**1- Introduction**

Les champignons sont des organismes vivants eucaryotes, uni ou pluricellulaires (Dufresne, 2021). Ils sont réunis au sein du règne des Fungi, la majorité appartiennent aux basidiomycètes, ascomycètes, chytridiomycète et zygomycètes (Gonzalez-Fernandez et *al.*, 2010). Ils sont caractérisés par l'absence de chlorophylle (Botton et *al.*, 1990) et un mycélium formé de filaments nommés hyphes (Corbez, 1990). Etant thallophytes, leur appareil végétatif est dépourvu de racines, tiges et feuilles (Botton et *al.*, 1990).

Organismes hétérotrophes, les champignons se nourrissent par absorption en tirant leur énergie de la matière organique en décomposition, sont majoritairement des saprophytes (Boucht, 2005) ayant une paroi cellulaire composée de chitine et de glucanes (Dufresne, 2021).

La plupart des champignons possèdent deux modes de reproduction qui se fait grâce aux spores de façon sexuée ; se reproduisant souvent en fin de cycle, ou asexuée ; assurant la propagation, elle permet de produire un grand nombre de spores assurant l'extension secondaire des maladies lors du développement explosif des épidémies dans les cultures en végétation active (Schiffers, 2011 ; Corbez, 2021).

Les champignons phytopathogènes sont la cause principale de 70% des pathologies végétales (Deacon, 2005). Ils utilisent divers stratégies, certains tuent leurs hôtes et s'en nourrissent, tandis que d'autres colonisent les tissus vivants (Doehlemann et *al.*, 2007). De plus, durant leur cycle d'infection, ils produisent plusieurs composants essentiels comme les enzymes, toxines... qui sont appelés « facteurs de pathogénicités » (Fernaldez, 2007).

**2- Principaux genres de champignons phytopathogènes****2-1- *Aspergillus* sp**

Le genre *aspergillus* est classé dans la division des deutéromycètes, cependant certaines formes sexuées appartiennent à la division des ascomycètes. Il comprend près de 180 espèces. Il représente l'un des genres de microchampignons les plus importants d'un point de vue économique (Geiser et *al.*, 2007). Ces champignons, sont polyphages (Botton et *al.*, 1990), parfois pathogènes pour l'homme, les animaux et les végétaux, et susceptibles de produire des métabolites toxiques. (Botton et *al.*, 1990 ; Gauthier, 2016).

Les espèces d'*Aspergillus* sont des moisissures saprophytes ; omniprésentes dans le monde. Elles ont pour caractéristiques ; des filaments hyalins (clairs), cloisonnés et sont haploïdes. Elles sont thermophiles et peuvent, pour certaines espèces, tolérer des températures de 70°C (Desoubeaux et *al.*, 2010).

Ci-dessous sont décrites deux espèces pathogènes d'*aspergillus* qui causent des maladies cryptogamiques :

### **2-1-1- *Aspergillus niger***

*Aspergillus niger* est une espèce fongique d'une grande importance industrielle, il est économiquement important en tant qu'organisme de fermentation utilisé pour la production de l'acide citrique (Baker, 2006) et dans la production de plusieurs enzymes telles que les amylases, les pectinases et les protéases (Niermanet *al.*, 2002).

Ce champignon est l'une des espèces les plus communes dans le sol, plantes, aliments et fréquemment retrouvé comme contaminant des cultures (Desoubeaux et *al.*, 2010). Il pousse rapidement (2 à 3 jours) à une température optimale qui varie généralement entre 25 et 30 °C. En revanche il peut se développer jusqu'à 42°C (Tabuc, 2007).

Les colonies sont plates, souvent sillonnées radialement granuleuses, initialement blanches à jaune, devenant noires à revers crème ou jaune pâle (Gugnani, 2003). *Aspergillus niger* est responsable de la pourriture post-récolte des fruits frais, y compris les raisins ; dans lesquels il constitue un agent principal de la pourriture des grappes à *aspergillus*, les pommes, poires, pêches, agrumes, figues, fraises, mangues et melons et pourriture noire des oignons (Hocking, 2006).

### **2-1-2- *Aspergillus flavipes***

Cette souche fongique se caractérise par une certaine nuance de jaune avec une couleur souvent confinée à la couche externe, elle a une tête en forme de tonneau à la colonnaire lorsqu'elle est bien développée, blanche ou devenant lentement de nuance de vineux. (Charles et *al.*, 1945). C'est un champignon cosmopolite, se retrouvant dans les sols, et les végétaux en décomposition, qu'il peut, dégrader en raison de son activité cellulolytique (Botton et *al.*, 1990).

### 2-2- *Penicillium* sp

*Penicillium* est l'un des champignons les plus courants, ubiquitaire et cosmopolite (Visagie et *al.*, 2014). Il est majoritairement saprophyte, filamenteux, polyphage. Sa croissance est optimale à des températures modérées et est capable de croître à des activités de l'eau inférieure à 0,9 (Pitt, 2002). Il est responsable de la décomposition des matières organiques, où il provoque des pourritures en tant qu'agent pathogène (Visagie et *al.*, 2014).

Il est estimé qu'il regroupe actuellement 483 espèces, un nombre en constante augmentation au fur et à mesure de la révision de sa taxonomie (Houbraken et *al.*, 2020).

Les colonies matures de *Penicillium* sont caractérisées par la production d'un grand nombre de conidiospores sèches, qui sont généralement gris-vert à bleu-vert, mais aussi pour certaines espèces : jaune, orange, chamois, rose et rouge (Moss, 1987 ; Tabuc, 2007).

Diverses espèces sont cultivées au niveau industriel pour la fabrication de fromages, la production de métabolites tels que l'acide gluconique, les pénicillines ou la griséofulvine. Ils peuvent en outre produire de dangereuses mycotoxines (Botton et *al.*, 1990).

### 2-3- *Fusarium* sp

Le genre *Fusarium* a été décrit pour la première fois en 1809 par Link. Le nom « *Fusarium* » fait référence à leurs spores en forme de fuseau, de canoë ou de banane (Heit, 2015). Le mycélium aérien est parfois cotonneux, les colonies présentent souvent des couleurs vives, au recto et au verso de la gélose, avec parfois des pigments diffusibles (Summerell et *al.*, 2003). En ce qui concerne le thalle, il a une croissance généralement rapide et présente une couleur blanche à crème, jaune, brunâtre, rose, rouge, violette ou lilas (Botton et *al.*, 1990).

*Fusarium* est un genre ubiquitaire et cosmopolite de champignons, se sont des ascomycètes filamenteux, présents au sein de tous les types de matrices. Ils peuvent être retrouvés dans les sols, à la surface des végétaux ou de leurs débris et dans la poussière de l'air (Dignani et Anaissie, 2004 ; Palmero et *al.*, 2011). Le genre comprend près de 40 espèces, souvent largement répandues, nombreux sont des phytopathogènes (Botton et *al.*, 1990).

Le genre *Fusarium* a une température de croissance optimale comprise entre 25 et 30°C, cependant il peut résister à un spectre plus large allant de 5 à 37°C (Heit, 2015). Bien connu pour son rôle important en phytopathologie (Messiaen et Cassini, 1968), il est ainsi responsable d'importants dommages sur les cultures céréalières aboutissant à la destruction de

nombreuses récoltes (Nelson et *al.*, 1994), avec possibilité de produire de dangereuses toxines (Botton et *al.*, 1990).

#### **2-4- *Botrytis* sp**

Ce champignon est un ascomycète hétérothallique. Les espèces de *Botrytis* sont parmi les pathogènes végétaux et les saprophytes les plus omniprésents (Lepoivre, 2003 ; Nasraoui, 2008). Le genre *Botrytis* comprend 22 espèces dont la plupart ont un spectre d'hôte restreint (Jarvis, 1977).

Il est formé d'un mycélium septé qui a une forme de grappe (Lepoivre, 2003 ; Nasraoui, 2008) avec un thalle à croissance très rapide, d'abord blanc puis gris à brin-noir (Botton et *al.*, 1990). Parmi les conditions favorables au développement de ce champignon, sont retrouvées une humidité dite relativement importante ou idéale d'au moins 90%, et une température optimale de 18 à 20°C (Blancard et *al.*, 2021).

À la frontière du saprophytisme et du parasitisme, le champignon phytopathogène, ubiquiste, *Botrytis cinerea* est responsable de la pourriture grise, pouvant entraîner la destruction partielle ou totale de la plante hôte, est un microorganisme polyphage, qui cause d'énormes dégâts en agriculture. La maladie causée par celui-ci est économiquement redoutable et importante car il touche plus de 230 espèces de végétaux (Ajouz, 2009).

### **3- Maladies des plantes**

#### **3-1-Définition**

Une maladie se définit comme étant une anomalie dans la structure ou la fonction d'une plante causée par un facteur irritant continu (agent causal ou agent pathogène) (Bruno Schiffers, 2011), mais aussi comme un déséquilibre phénologique accompagné par l'apparition de symptômes spécifiques (Rouag, 2022).

Ces maladies sont causées par des micro-organismes qui vivent comme des parasites sur les plantes, provoquant sur celles-ci des nécroses, pourritures sèches ou humides, transformation d'organes et plus, entraînant souvent la mort de l'organe attaqué et même la plante toute entière.

Parmi ces parasites végétaux, on peut citer :

- **Les cryptogames** (champignons, algues, lichens) qui sont responsables des maladies cryptogamiques.

- **Bactéries** : responsables des maladies bactériennes.

On rattache également à ces groupes, les affections causées par les virus (maladies à virus ou viroses des plantes), les dégâts causés par les parasites ou semi parasites, les dégâts

causés par les plantes spontanées qui vivent en concurrence avec des plantes cultivées et enfin, les maladies alimentaires (maladies de carences) (Bouhot *et al.*, 1965).

Les maladies peuvent être divisées en deux principaux types de stress qui peuvent affecter les plantes ; le stress due aux facteurs abiotiques (non infectieux) et le stress due aux facteurs biotiques (infectieux).

➤ **Stress abiotique**

Le stress abiotique résulte de l'action des facteurs environnementaux défavorables, nutritionnels, mécaniques ou autres (ex : tassement du sol, pollution de l'air, arrière effet d'herbicide, fumure inadaptée, carences nutritionnelles, excès d'engrais, irrigations inadaptées –ex : pourriture apicale sur les tomates, coups de soleil fréquent sur les melons par exemple) et ne peuvent être transmises à des plantes saines (Schiffers *et al.*, 2011).

➤ **Stress biotique**

Le stress biotique englobe les attaques d'organismes vivants phytopathogènes comme les insectes, les champignons, les bactéries, les virus, les mycoplasmes et les rickettsies qui sont transmis par divers vecteurs (vent, eau, contacts entre végétaux, nématodes, etc.) à d'autres plantes saines, ou être présents dans le sol, provoquant ainsi la maladie chez les nouveaux hôtes sensibles (Schiffers *et al.*, 2011).










Pour qu'une maladie d'une plante se développe, trois composantes sont nécessaires: la plante et le pathogène doivent se mettre en contact et interagir, les conditions de l'environnement doivent être favorables. La plante peut être plus ou moins résistante, sensible, jeune, âgée. Le pathogène peut être plus ou moins virulent, actif, dormant. Les conditions de l'environnement peuvent affecter plus ou moins la croissance, la sensibilité et la résistance de la plante hôte, la multiplication, le degré de virulence et la dispersion du pathogène. L'interaction plante, pathogène et environnement est généralement considérée comme formant un triangle appelé «le triangle de la maladie» dont chaque côté représente l'une des trois composantes (Nesraoui, 2008).

**3-2-Symptômes**

Un symptôme est la présence visuelle de la maladie sur la plante causé par un agent pathogène (Knudsen, 2013).

Le tableau ci-dessous présente quelques maladies causées et les agents responsables correspondants :

Tableau 01 : Quelques maladies des plantes et les agents causals

Agent pathogène	Plante	Maladie	Références	Figures
<i>Botrytis cinerea</i>	Raisin, vigne, plantes cultivées, arbres fruitiers, plantes maraichères.	Pourriture grise	Bulit et Lafon, (1970)	
<i>Sclerotinia libertinia</i>	Salade	Maladie du collet	Soursac, (1922)	
<i>Phytophthora infestans</i>	Pomme de terre	Mildiou	Henfling, (1978)	
<i>Fusarium oxysarum</i>	Palmier à l'huile	Fusariose vasculaire	Renard, (1989)	
<i>Septoria arpicola</i>	Céleri	septeriose	Rochat et al., (2020)	
<i>Aspergillus niger</i>	Mais, oignon	Moisissure noire	Pal et al., (2014)	
- <i>Ustilago segetum</i> var <i>tritici</i> - <i>Ustilago segetum</i> var <i>avenae</i> - <i>Ustilago segetum</i> var <i>nuda</i>	- Blé - Avoine - Orge	Charbonnu des cereals	Nesraoui, (2008)	
<i>Pythium ultimum</i>	Betterave	Fonte des semis	Khan et al., (1997)	
<i>Phytophthora fragariae</i> var <i>rubi</i>	Framboise	pourridié	Valois et al., (1996)	

# Chapitre II

Les moyens de

lutte

**1- Moyens de lutte**

Différentes approches sont disponibles afin d'exclure ou réduire les pathogènes des plantes. Les méthodes utilisées pour maîtriser les maladies des plantes varient en fonction de la plante hôte, du type de pathogène, de l'interaction entre les deux, ainsi qu'une gamme d'autres facteurs, y compris les conditions environnementales. Le but final est de combattre les phytopathologies et alors d'accroître et améliorer la quantité de la production agricole. La plupart des méthodes visent à protéger les plantes contre les pathogènes plutôt que de les guérir une fois qu'elles ont été infectées (Nasraoui, 2006). Parmi ces méthodes nous pouvons citer ; la lutte physique, la lutte culturale, la lutte intégrée, la lutte chimique et la lutte biologique.

**1-1-Lutte physique**

Les méthodes de lutte physique incluent toutes les techniques dont le mode d'action primaire ne fait intervenir aucun processus biologique, biochimique et toxicologique (Vincent et *al.*, 2001). C'est une technique simple qui vise à détruire les organismes vivants nuisibles (ravageurs, champignons, bactéries, virus, ...) à l'aide certains processus comme : les désinfections des sols à la vapeur, l'élévation de la température du sol grâce à l'énergie solaire (Charbier et *al.*, 2007) et l'utilisation des différents types de pièges pour capturer les mouches et les larves (Gagnon, 2000).

**1-2-Lutte culturale**

La lutte culturale est certainement la méthode la plus ancienne visant à gérer la population des ravageurs (Dr Stuart, 1989). Elle est généralement caractérisée par les modifications des conditions édaphiques et climatiques comme le pH, la température, l'humidité du sol...etc. Les pratiques de lutte culturales pouvant réduire les maladies des plantes comprennent la fertilisation, l'irrigation, l'assainissement, le travail du sol et l'amélioration des conditions de croissance des cultures afin de maintenir les conditions favorables pour la croissance de la plante pour la rendre mieux résistante aux bio-agresseurs (Chabrier et *al.*, 2007 ; Niwas, 2021).

Le contrôle cultural implique fréquemment des variations de pratiques horticoles, sylvicoles ou d'élevages standards. Sa simple planification et le faible coût sont les principaux avantages des stratégies de cette méthode (Meyer, 2003). Parmi ses inconvénients, elle nécessite une planification à long terme pour mieux connaître les ravageurs visés (Gagnon et *al.*, 2000). Cependant, avec le développement des pesticides synthétiques, ces contrôles ont été abandonnés et dévalorisés car ils sont préventifs et non pas curatifs ( Dr Stuart, 1989).

**1-3- Lutte intégrée**

La lutte intégrée est une stratégie basée sur l'expérimentation et l'observation qui permet de contrôler les cultures en harmonie avec leur environnement. Elle prend en considération toutes les méthodes de protection des plantes disponibles (mécaniques, chimiques et biologiques) (Adli, 2017). Elle se caractérise par une action de lutte contre les organismes ravageurs (oiseaux, rongeurs, acariens, insectes, champignons, bactéries, virus,...) en utilisant tous les moyens possibles et compatibles entre eux afin de les maintenir sous un seuil économique acceptable (Firlej et Vanoosthuyse, 2001), elle permet de réduire au maximum les risques pour la santé humaine et l'environnement (Guyader, 2020), et assurant la rentabilité et la viabilité à long terme de l'agriculture commerciale (Meyer, 2003).

**1-4- Lutte chimique**

La lutte chimique consiste à effectuer des traitements à base de produits chimiques pour défendre les végétaux contre leurs ennemis, en outre elle se définit par l'utilisation de fongicides, pour détruire, affaiblir, ou réprimer le champignon (Ajouz, 2009 ; Lachuer, 2010).

La lutte chimique contre les champignons phytopathogènes est largement utilisée et s'est révélée depuis toujours une méthode de lutte efficace et indispensable (Leroux, 2003; Pezet et *al.*, 2004). Elle concerne essentiellement les champignons responsables des maladies fongiques des plantes.

**1-4-1- Fongicides**

Plusieurs stratégies chimiques permettent de lutter contre l'invasion d'une plante par un champignon, de façon directe ou indirecte. 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).

**1-4-2-Pesticides**

Depuis la deuxième guerre mondiale, l'utilisation des pesticides de synthèse est généralisée et intensifiée. Synthétisés à faible coût, ces pesticides étaient facilement disponibles et utilisables. Leur utilisation a été pour plusieurs années fulgurantes (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 ».

Au cours des dernières décennies, l'application d'engrais chimiques, pesticides, herbicides et fongicides était l'outil dominant pour améliorer la croissance des plantes et contrôler la propagation des agents pathogènes. Cependant, une telle approche a conduit à la dégradation des sols. En effet, ce type de traitement peut entraîner, d'une part, des risques pour l'homme et les organismes non ciblés, d'autres part, une émergence de résistance des populations de phytopathogènes (Leroux, 2003 ; Pal et Gardener, 2006).

Toutes ces conséquences néfastes et leur médiatisations ont entraîné une prise de conscience et craintes, ainsi la recherche de méthodes non chimiques de contrôle des maladies continue de gagner en importance (Smeesters et *al.*, 2000 ; Whipps et *al.*, 2009). 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).

**1-5- Lutte biologique**

En agriculture biologique, les produits agricoles doivent être obtenus sans utilisation de produits chimiques de synthèse. Ainsi, en ce qui concerne la défense des végétaux, seuls les moyens biologiques, les moyens culturaux et les pesticides à base de substances naturelles sont autorisés (Lachuer, 2010).

La lutte biologique est faite pour l'encouragement des ennemis naturels dans le but de réduire l'utilisation des pesticides, et vers une exploitation agricole intégrée et respectueuse de l'environnement (Smeesters et *al.*, 2000).

Elle est largement définie comme étant : "Toute action mettant en jeu des organismes modifiant l'hôte, y compris les méthodes culturales, qui permettent de diminuer, par voie directe ou indirecte, les dommages causés par un parasite" (Corbaz, 1990).

Plusieurs définitions sont données, mais on citera ici la définition officielle par l'OILB (Organisation Internationale de la Lutte Biologique) qui stipule que la protection biologique

est « *l'utilisation d'organismes vivants pour prévenir ou réduire les dégâts causés par des ravageurs* ».

Le principe de la lutte biologique est basé sur l'exploitation par l'homme et à son profit d'une relation naturelle entre deux êtres vivants:

- la **cible** (de la protection) qui est un organisme indésirable, pathogène ou ravageur d'une plante cultivée, mauvaise herbe, etc.

- l'**agent** de protection (ou auxiliaire dans le cas des ravageurs) est un organisme différent, le plus souvent un parasite (ou parasitoïde) qui est un prédateur ou un agent pathogène du premier, qui le tue à plus ou moins brève échéance, éventuellement en s'en nourrissant, ou tout au moins qui limite son développement (Ajouz, 2009).

La lutte biologique connaît ces dernières années un regain de popularité dû en partie à un certain échec de la lutte chimique. Les traitements chimiques tels que les fongicides donnent de bons résultats à court terme mais à long terme, leur accumulation ou l'accumulation de leurs résidus dans l'environnement représente un danger qu'on ne peut plus négliger. Par contre, la lutte biologique a une efficacité relative et demande plus de connaissances et d'observations, mais à long terme, elle est beaucoup plus intéressante sur le plan environnemental et économique (Corbaz, 1990; Toussaint, 1996).

### **1-5-1- Intérêt de la lutte biologique dans le contrôle des maladies**

#### **phytopathogènes**

En plus de son rôle dans la restauration de la biodiversité dans les écosystèmes, la lutte biologique présente un rôle important dans le contrôle des maladies phytopathogènes. Les stratégies de cette lutte contre ces maladies reposent sur la résistance génétique, la gestion de la plante et son environnement et les pesticides de synthèse (Emmert, 1999), en utilisant les micro-organismes comme moyens pour diminuer la pollution (Lehlali et *al.*, 2022), cela contribue à réduire l'utilisation des pesticides chimiques au strict minimum pour minimiser les conséquences néfastes sur la santé humaine et sur l'environnement (Emmert, 1999 ; Singh, 2002).

Le secret de la lutte biologique est de connaître les interactions écologiques qui se déroulent dans l'environnement du sol et les racines pour prédire les conditions nécessaires pour que cette lutte soit réalisée, sachant qu'il y a une certaine spécificité entre ces interactions plante-sol-microbe pour la suppression de la maladie (Whipps, 2001).

### 1-5-2- Microorganismes les plus utilisés dans la lutte biologiques

Plusieurs microorganismes ont été utilisés dans le contrôle des maladies phytopathogènes (Errakhi, 2008) (Tableau 02). Des genres bactériens tels que *Bacillus*, *Pseudomonas*, *Serratia* et *Arthobacteron* font leurs preuves dans le contrôle des maladies fongiques, les bactéries de la rhizosphère sont d'excellents agents pour contrôler les agents pathogènes des plantes transmis par le sol (Ashwini et Srividya, 2014). Les bactéries à Gram négatif, en particulier les souches de *Pseudomonas* sont capables de contrôler de façon significative un certain nombre de maladies fongiques, bactériennes et nématodes (Ganeshan et Manoj 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.

Les *Pseudomonas* agissent par différents mécanismes ; comme la production d'antibiotiques, de sidérophores, du cyanure d'hydrogène (HCN) et par inactivation des enzymes de l'agent pathogène (Ganeshan et Manoj Kumar, 2005 ; Ashwini et Srividya, 2014). De nombreuses publications ont fait écho à des essais réalisés en serre ou au champ, montrent l'intérêt potentiel des *Pseudomonas fluorescents* non pathogènes en tant qu'agents de lutte biologique contre les pathogènes responsables des maladies de plantes (Whipps, 2001 ; Weller et al., 2002 ; Tabli et al., 2018), cependant, les rhizobactéries du groupe *Pseudomonas* spp. fluorescents ont été amplement utilisées dans le bio-contrôle des pathologies végétales d'origine tellurique vis-à-vis de *Fusarium oxysporum* (Benchabane et al., 2011).

De leur côté, les espèces de *Bacillus* ont prouvé leurs efficacités comme étant l'un des principaux groupes de PGPR. *Bacillus* est le genre bactérien clé ayant montré le plus grand potentiel pour le contrôle de la maladie botrytique causée par *Botrytis* sp, et cela via la sécrétion d'enzymes lytiques, de sidérophores, d'antibiotiques, compétition pour l'espace et les nutriments, stimulation des défenses des plantes et combinaison de plusieurs mécanismes (Bensidhoum et al., 2015). Selon Srividya et Ashwini, une étude préliminaire en 2012, a révélé qu'une certaine souche de *Bacillus subtilis* isolée de la rhizosphère du piment, a montré un antagonisme à large spectre contre de puissants phytopathogènes bactériens et fongiques, et ceci grâce à la production de trois enzymes mycolitiques (la chitinase, la glucanase et la cellulase) à des niveaux appréciables. Une multitude d'essais et d'expériences de l'utilisation de ces trois enzymes pendant cet itinéraire, afin d'aboutir et de déterminer le rôle concerté de celles-ci dans l'antagonisme de *B. subtilis* contre l'espèce fongique *Colletotrichum gloeosporioides* (Srividya et Ashwini 2014).

Parmi les champignons les plus utilisés, nous pouvons citer *Trichoderma* spp. L'antagonisme de *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 (Brimmeret Boland, 2003) et l'inactivation des enzymes de l'agent pathogènes (Elad et *al.*, 1999).

D'autres micro-organismes tels que les actinobactéries sont devenues candidats prometteurs dans le contrôle biologique, grâce à leur capacité d'inhiber divers phytopathogènes bactériens et fongiques, en raison de leur aptitude à produire différents 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 02 :** Quelques agents de biocontrôle utilisés dans la lutte contre des phytopathogènes (Errakhi, 2008).

Agents de bio-contrôle	Agents phytopathogènes cibles	Mécanisme(s) d'action
<i>Trichoderma harzianum</i>	<i>Roselliniana</i> spp.	Parasitisme
<i>Trichoderma koningii</i>	<i>Sclerotium rolfsii</i>	Parasitisme
<i>Pseudomonas</i> spp. DF-41 et PA-2	<i>Sclerotinia sclerotiorum</i>	Antibiose
<i>Streptomyces</i> sp.Di-944	<i>Rhizoctonia solani</i>	Antibiose
<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>Streptomyces diastatochromogenes</i> PonSSII	<i>Streptomyces scabies</i>	Antibiose Compétition
<i>Pseudomonas</i> spp	<i>Gaeumannomyces graminis</i> <i>var. tritici</i> , <i>Pseudomonas</i> <i>tolaasii</i> , <i>Fusarium oxysporum</i> f. sp. <i>lini</i> et <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

# Chapitre III

## Les PGPB comme agents stimulateurs de croissance et de biocontrôle

### 1- Généralités

L'application de bactéries stimulatrices de la croissance des plantes (PGPB) et ayant un rôle de biocontrôle en tant qu'inoculant des plantes cultivées contre les champignons phytopathogènes, offre une alternative biologique à l'utilisation de produits agrochimiques (Bensidhoum et *al.*, 2016).

Les PGPB peuvent favoriser et faciliter la croissance et le développement des plantes dans des conditions de stress biotique ou abiotique par des moyens directs ou indirects. Elles englobent toutes les bactéries non pathogènes d'origine naturelle qui améliorent la croissance des plantes. Ce sont des micro-organismes de plus en plus utilisés en agriculture, afin d'accroître le rendement des cultures en augmentant la disponibilité des nutriments, en améliorant la croissance des plantes et en les protégeant contre les maladies et les ravageurs (Grobelač et *al.*, 2014).

Les PGPB comprennent principalement les genres suivants : *Pseudomonas* , *Azospirillum* , *Azotobacter* , *Klebsiella* , *Enterobacter* , *Alcaligenes* , *Arthrobacter* , *Burkholderia* , *Bacillus*, *Serratia*, *Agrobacterium radiobacter*, *Acinetobacter* spp., *Arthrobacter* spp et *Azospirillum brasilense* (Khabbaz et *al.*, 2019).

Le groupe de PGPB le plus étudié englobe les rhizobactéries, communément appelées Rhizobactéries favorisant la croissance des plantes (PGPR) en raison de leur capacité à coloniser les racines et les plantes (Khabbaz et *al.*, 2019). Ce sont des bactéries du sol vivants aux alentours ou à la surface des racines, qui sont directement impliquées dans la stimulation de la croissance et le développement des plantes à travers la production et la sécrétion de divers régulateurs chimiques aux alentours de la rhizosphère, c'est la première définition donnée par Kloepper, 1994.

### 2- Mécanismes d'actions des bactéries stimulatrices de 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).

### 2-1-Mécanismes directs

#### 2-1-1- Bio-fertilisation

Les PGPR peuvent être considérées comme des bio-fertilisateurs, car elles présentent des mécanismes qui facilitent l'assimilation et l'augmentation de la disponibilité des nutriments ainsi que la stimulation de la croissance des plantes. Certaines PGPR fixent l'azote atmosphérique, solubilisent les minéraux et minéralisent les composés organiques (Martinez-Viveros et al., 2010).

##### 2-1-1-1 Solubilisation du phosphate

La fertilisation du sol est l'une des méthodes les plus communes pour accentuer la production agricole. Après l'azote, le phosphate est le nutriment le plus limitant pour les plantes. Malgré la disponibilité du phosphore (P) dans le sol, la quantité majoritaire de cet élément se trouve sous forme insoluble, donc non disponible pour être impliquée dans la croissance des plantes. Le phosphore insoluble peut être sous une forme organique ou inorganique (Chaiharn and Lumyong, 2009). Les bactéries 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 ; *Pseudomonas*, *Bacillus*, *Rhizobium*, *Burkholderia*, *Achromobacter*, *Micrococcus*, *Aerobacter*, *Flavobacterium*, *Chryseobacterium*, et *Erwinia*. (Khabbaz et al., 2019).

De plus, les bactéries solubilisant protègent les plantes des pathogènes par la production d'antibiotiques, d'HCN, de phénazines et de métabolites antifongiques, mais non seulement, mais favorisent également la croissance des plantes par la fixation d'azote (N<sub>2</sub>), la production de sidérophores, la sécrétion de phytohormones et la baisse des niveaux d'éthylène (Ahemad, 2015).

##### 2-1-1-2 Fixation d'azote

L'azote moléculaire est utilisé par de nombreux genres bactériens reconnus comme fixateurs d'azote, qui peuvent être libres (*Azobacter* spp ; *Klebsiella pneumoniae* ; *Clostridium pasteurianum*) ou symbiotiques (*Rhizobium meliloti* ; *Rhizobium leguminosarum*) (Roger et al., 1996).

---

Ces bactéries facilitent la croissance des plantes en fournissant les nutriments souvent présents uniquement en quantités limitantes 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).

### **2-1-2- Production des phytohormones (production d'hormones de croissance)**

Les hormones végétales 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 (Han et *al.*, 2005 ; Baca et Elmerich, 2007 ; Kloepper et *al.*, 2007 ; Martinez-Viveros et *al.*, 2010). De manière générale, elles jouent un rôle aussi bien important dans la réponse de la plante aux stress biotiques et abiotiques (Gupta et *al.*, 2015), que dans le développement et la croissance optimale des plantes (Glick, 2012), parmi les phytohormones:

#### **2-1-2-1 L'éthylène**

L'éthylène est un composé volatile, faisant partie des hormones végétales (Lurol et *al.*, 2016), jouant un rôle important depuis l'antiquité comme régulateur et de stimulateur de la croissance des parties des plantes tels que les racines, les tiges et les pétioles (Glick, 2005 ; Tsegaye et *al.*, 2017). L'éthylène a également été établi comme une hormone de stress si son niveau est supérieur au niveau optimale ce qui affecte négativement la croissance globale de la plante (Hassen et *al.*, 2014 ; Tsegaye, 2017). L'activité enzymatique de l'ACC désaminase dégrade l'ACC (le précurseur d'éthylène dans toutes les plantes supérieures), empêche l'augmentations excessives de la synthèse d'éthylène dans des diverses conditions de stress, permettant a la plante d'être plus résistante (Khabbaz et *al.*, 2019 ; Orozco-Mosqueda et *al.*, 2020). Les souches bactériennes présentant une activité d'ACC désaminase ont été identifiées dans un large éventail du genres tels que : *Achromobacter*, *Azospirillum*, *Bacillus*, *Enterobacter*, *Pseudomonas* et des espèces de *Rhizobium* (Khabbaz et *al.*, 2019).

#### **2-1-2-2 Cytokinines et gibbérellines**

Les cytokinines et gibbérellines font partie de la classe des phytohormones, impliquées dans plusieurs processus de développement de la plante ; améliorent la division et l'élargissement des cellules, la modification de la morphologie des plantes par l'expansion du tissu végétal.

La production de ces phytohormones a été détectée chez quelques souches de PGPR/B tels qu'*Azospirillum*, *Pseudomonas* et *Bacillus* (Tsegaye, 2017).

### 2-1-2-3 Acide indole acétique

L'acide indole acétique (AIA) est synthétisé par les PGPB, est la phytohormone la plus importante du groupe des auxines (Gupta et al., 2015 ; Khabbaz et al., 2019). Elle est produite à partir du tryptophane qui est considéré comme précurseur vu que son adjonction est nécessaire à sa production (Khabbaz et al., 2019).

Les bactéries productrices d'AIA comme *Bacillus* sp et *Pseudomonas* sp ont un effet positif sur la croissance et l'élongation racinaire, la division, l'extension et la différenciation des cellules végétales, et la stimulation de la germination des graines,... (Maleki et al., 2010 ; Glick, 2012 ; Khabbaz et al., 2019).

Cette phytohormone contrôle également la croissance végétative, la photosynthèse, la formation des pigments et la biosynthèse de divers métabolites, assurant la stimulation de la croissance des plantes et la résistance aux conditions stressantes (Glick, 2012).

Ponmurugan et Gopi (2006) ont mis en évidence le rôle des *Pseudomonas* producteurs d'AIA dans le développement des racines des petits pois et, par conséquent, d'autres paramètres de croissance des plantes.

### 2-2- Mécanismes indirectes

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

#### 2-2-1- Compétition

##### 2-2-1-1 Compétition pour l'espace et les nutriments

Que ce soit pour l'espace ou les ressources nutritives, l'agent de bio-contrôle 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 PGPB 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).

### 2-2-1-2 Compétition pour le fer et production des sidérophores

Le fer est un macronutriment essentiel pour la majorité des organismes de la biosphère. Dans les sols, le fer est disponible souvent sous forme insoluble (ion ferrique  $Fe_3^+$ ) (Gupta et al., 2015). Les plantes et les microorganismes demandent des quantités élevées en fer disponible pour l'assimilation, ce qui pose problème, dans la rhizosphère où la plante, les bactéries, et 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). Visiblement, l'affinité des sidérophores pour la séquestration du fer de l'environnement est plus forte chez les PGPB que les champignons pathogènes, conduisant finalement à une pénurie de fer. Cela provoque une perturbation des champignons pathogènes, affectant leur croissance ultérieure et l'infection des plantes (Khabbaz et al., 2019).

### 2-2-2 Synthèse d'antibiotiques (Antibiose)

La production d'antibiotiques est considérée comme l'un des mécanismes de lutte les plus puissants contre les phytopathogènes les plus étudiés chez les plantes (Gupta et al., 2015).

L'antibiose consiste en la production et la sécrétion des molécules qui tuent ou réduisent la croissance de microorganismes pathogènes cibles (Weyens et al., 2010). La sécrétion de substances antibiotiques par les microorganismes est un phénomène fréquent. Certains métabolites sont capables d'interférer avec la germination, la croissance mycélienne et/ ou la sporulation des champignons phytopathogènes. D'autres engendrent la distorsion des hyphes fongiques en modifiant l'aspect des colonies ou entraînent le relargage de composés cellulaires en réponse à la perturbation de la perméabilité cellulaires (Jijakly, 2003).

---

Certaines souches sont capables de produire un antibiotique de nature volatile connu sous le nom de cyanure d'hydrogène (HCN) ainsi que des enzymes telles que les chitinases, les glucanases, les protéases, et les lipases pour protéger les plantes du stress biotique par suppression des pathogènes (Gupta et al., 2015).

Le cyanure d'hydrogène (HCN) est un composé antimicrobien à large spectre impliqué dans le contrôle biologique des maladies dû aux phytopathogènes (Ramette et al., 2003). Le rôle de l'HCN dans la suppression des agents pathogènes des plantes a été rapporté par plusieurs chercheurs dans plusieurs cultures. Ils ont comparé la production d'HCN de multiples souches de *P. fluorescens* et leur efficacité dans le contrôle de la pourriture des racines de l'arachide causée par l'espèce fongique *Macrophomina phaseolina*. Il a été suggéré que l'HCN peut tuer l'agent pathogène en inhibant le transport des électrons et en interrompant l'apport d'énergie aux cellules (Khabbaz et al., 2019).

### **2-2-3 Résistance systémique**

La Résistance Systémique Acquise (SAR) et la Résistance Systémique Induite (ISR) sont les deux types de résistance systémique mises en place par la plante à la suite d'un stress. En effet, SAR est définie comme la résistance systémique mise en place par la plante suite à une attaque par un agent pathogène, et que l'ISR est mise en place par la plante en réponse à la présence de micro-organismes bénéfiques (PGPR) (Bakker et al., 2007).

#### **2-2-3-1 Résistance systémique acquise**

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 micro-organismes (Durrant et Dong, 2004). 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) ; l'acide salicylique (SA) (Ryals et al., 1996), un composé qui est souvent produit suite à l'infection par le pathogène et typiquement mène à l'expression des protéines reliées à la pathogénicité (PR) mais aussi l'éthylène, l'acide dichloro-isonicotinique et le benzothiadiazole (Gorlach et al., 1996; Sticher et al., 1997 ; Pal et al., 2006).

---

**2-2-3-2 Résistance systémique induite**

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 (Ramamoorthy et *al.*, 2001 ;Annapurna et *al.*, 2013). 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 (Khabbaz et *al.*, 2019).

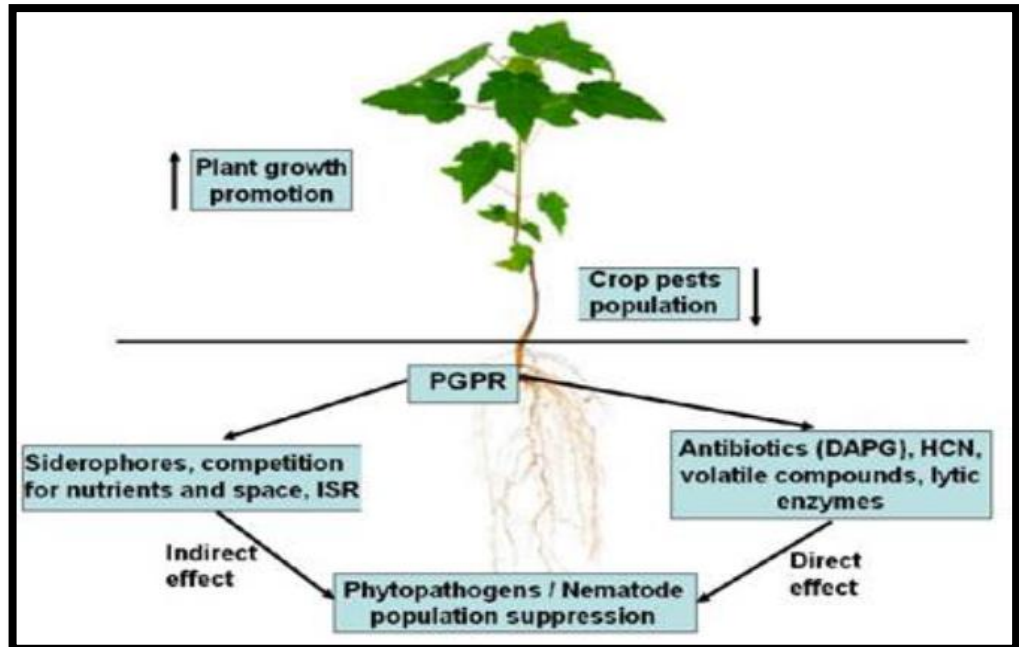
Il existe plusieurs déterminants bactériens impliqués dans l'induction de la résistance systémique par les PGPR, les plus importants étant les lipopolysaccharides présents dans la membrane externe des cellules bactériennes, les sidérophores et la production d'acide salicylique (Van Loon et *al.*, 1998).

**2-2-4 Enzymes lytiques**

La production d'enzymes hydrolytiques comme la chitinase, glucanase, 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(Whipps, 2001 ; Glick, 2012 et Tsegaye, 2017), 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).



**Figure 01** : Représentation schématique du mode d'action des bactéries stimulateurs de la croissance des plantes et dans le biocontrôle.

# Partie

# expérimentale

# Chapitre I

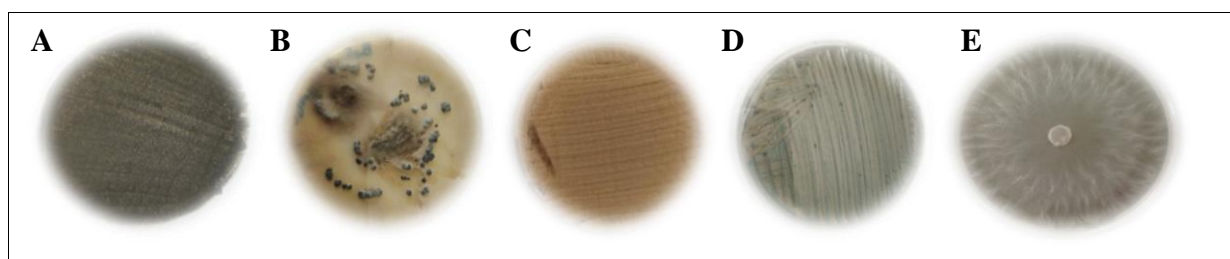
## Matériel et Méthodes

Ce travail a été réalisé, durant la période du mois de Mars jusqu'au mois de Juin 2022, au niveau du laboratoire de recherche de Biochimie Analytique et Biotechnologies de la faculté de science Biologique et des Sciences Agronomiques de l'université Mouloud Mammeri de Tizi-Ouzou en collaboration avec le laboratoire de Maitrise des Energies Renouvelables équipe biomasse et Environnement de l'Université A. Mira de Bejaïa.

## 1- Matériel

### 1-1- Les souches fongiques

Les souches fongiques utilisées dans cette étude appartiennent à quatre genres de moisissures ; *Penecillium* sp, *Fusarium* sp, *Botrytis* sp et *Aspergillus* sp dont deux espèces *Aspergillus niger* et *Aspergillus flavipes*. Elles nous ont été fournies par le laboratoire de biomasse et environnement et le laboratoire de Mycologie de l'université A. MIRA, Bejaïa.



**Figure 02 :** Aspect des espèces fongiques sur milieu à extrait de malt.

**A:** *Aspergillus niger* ; **B:** *Botrytis* sp; **C:** *Aspergillus flavipes* ; **D:** *Penicillium* sp ;  
**E:** *Fusarium* sp.

### 1-2 Les isolats bactériens

Les isolats bactériens ont été isolés et purifiés à partir de trois échantillons d'eau, prélevés, en Mars 2022, d'un puits à usage agricole situé dans la wilaya de Bejaïa.

### 1-3 Milieux de culture

**Tableau 3 :** Milieux de cultures utilisés (composition annexe I).

Milieux de cultures	Abréviations	Utilisation
Brain Heart Infusion Broth	BHIB	Culture des microorganismes
Gélose nutritive	GN	Isolement de la flore bactérienne
Gélose à extrait de malt	EM	Test d'activité d'antagoniste
Patato dextrose agar	PDA	Culture des champignons

**1-4 Produits chimiques utilisés (réactifs, alcool,...)**

Lors des expérimentations, les produits chimiques suivants ont été utilisés ;

- Violet de Gentiane
- Solution de Lugol
- Alcool
- Fuchsine
- Huile à immersion
- Rouge Congo
- Réactif de salkowsky

**1-5 Appareillage**

**Tableau 04:** Appareils utilisés.

<b>Appareillages</b>	<b>source</b>
Autoclave	PBINTERNATIONAL
Bain Marie	MEMMERT
Réfrigérateur	ENIEM.
Spectrophotomètre	SHIMADZU.
Etuve (28°C)	BINDER.
Balance de précision	KERN 770.
pH-mètre	HANNA instruments HI2210.
Conductimètre	HANNA Instruments HI98129
Centrifugeuse	ORTO ALRESA
Agitateur (orbital incubator)	STUART
Hotte	FLOW FAST V

## 2 Méthodes

### 2-1 Prélèvement des échantillons d'eau de puits

Dans le but de rechercher des bactéries à caractères PGP (Plant Growth Promotion) et productrices de molécules antifongique contre les champignons phytopathogènes, des prélèvements sont réalisés en toute asepsie à partir des eaux douces (puits) du village Djebira (36°41'59.2 « N 5°04'28.8 »E) en mois de Mars 2022. Le puits est à usage agricole situé à la base d'une montagne recevant ainsi les flux des eaux de ruissellement en période d'hiver, et n'a pas été nettoyé pendant plusieurs années. Les échantillons sont prélevés à l'aide d'un récipient désinfecté à l'eau de javel et sont récupérés dans des flacons stériles en verre puis transportés au moyen d'une glacière (4°C) le jour même au laboratoire. Les figures suivantes illustrent l'endroit de prélèvement et sa position géographique.



**Figure 03** : Site de prélèvement des échantillons d'eau de puits.

### 2-2 Evaluation de quelques caractères physico-chimiques des échantillons d'eau

#### 2-2-1- Analyse potentiel d'hydrogène de l'eau

Les valeurs du pH sont obtenues grâce à l'utilisation d'un pH-mètre étalonné, en plongeant la sonde directement dans la solution, et en enregistrant la valeur affichée. L'expérience est réalisée en triplicata (Mathieu et Pieltain, 2003).

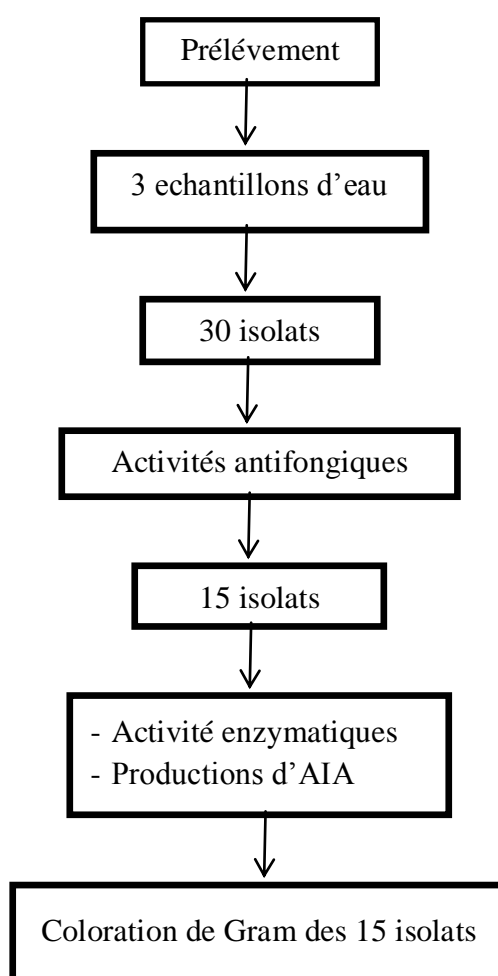
### 2-2-2- Conductivité de l'eau :

La conductivité électrique est déterminée selon le protocole de Hardie and Doyle, (2012). Elle est mesurée à l'aide d'un conductimètre (Hanna Instruments-HI98129), préalablement étalonné. La cellule du conductimètre est trempée dans la solution en la déplaçant vers le haut et vers le bas légèrement. La lecture est faite à l'arrêt de la cellule lorsque le système se stabilise.

## 2-3- Criblage d'isolats bactériens à caractères PGP et producteurs de molécules antifongiques

### 2-3-1- Isolement et purification des bactéries

Un volume de 1ml de chaque échantillon d'eau prélevé est ensemencé par inondation sur la surface du milieu GN, les boîtes sont incubées à 30°C pendant 24 à 72h. Après incubation, chaque colonie apparaissant différente à l'œil nu est repiquée stérilement dans une autre boîte de milieu GN, incubée puis conservée pour les tests ultérieurs.



**Figure 04:** Étapes de la sélection des isolats bactériens.

### 2-3-2- Détermination de l'activité antifongique

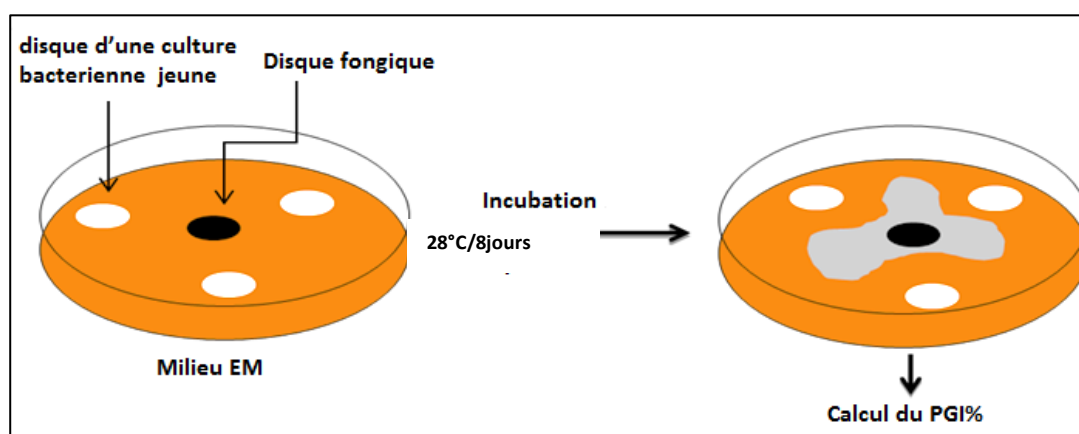
#### 2-3-2-1 Repiquage des souches fongiques

A l'aide d'un écouvillon stérile, ôter, une quantité vierge de spores est prélevée à partir du champignon et l'ensemencer en stries serrées sur milieu PDA. L'incubation des cultures est effectuée à 28°C pendant 48h.

#### 2-3-2-2- Etude de l'action antagoniste des isolats bactériens à l'égard des cinq champignons

Le premier test permet de faire une sélection préliminaire des différents isolats bactériens (figure 05). Celui-ci est basé sur l'effet antagoniste à l'égard des cinq champignons phytopathogènes : *Aspergillus niger*, *Aspergillus flavipes*, *Penicillium sp*, *Fusarium sp* et *Botrytis sp*. Par la méthode en double culture.

Le test de confrontation directe est réalisé dans des boîtes de pétri contenant le milieu gélosé à d'extrait de malt. Un disque de jeune culture mycélienne de 5mm de diamètre est déposé au centre de la boîte de pétri entouré par trois disques d'une culture jeune d'isolat différents. La distance entre les disques est de 2,5cm, ainsi trois répétitions ont été effectuées pour chaque bactérie/champignon. L'incubation est réalisée à 28°C, les boîtes sont observées quotidiennement pendant 8 jours avec une vérification quotidienne de l'apparition ou non d'une zone d'inhibition. Les témoins négatifs sont des monocultures réalisées pour chaque champignon, ensemencé dans un milieu gélosé a extrait de malt pur (Bezert et al., 1996) (figure 05).



**Figure 05:** Mise en évidence de l'inhibition de la croissance mycélienne par les isolats bactériens

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 :

$$\text{PGI}\% = \frac{\text{KR}-\text{R1}}{\text{KR}} \times 100$$

**KR:** La distance en mm entre le point d'inoculation du champignon et la marge de la colonie contenue dans le témoin.

**R1:** La distance en mm entre le point d'inoculation du champignon phytopathogène et la marge de la colonie contenue dans la boîte de Pétri traitée.

Les résultats de l'activité antifongique par méthode de confrontation sur gélose ont permis de sélectionner 15 meilleurs isolats bactériens. Ces derniers ont été soumis au test de caractérisation métabolique et fonctionnelle (quelques traits PGP impliqués dans le biocontrôle).

## **2-4-Caractérisation métabolique et fonctionnelle (quelques traits PGP impliqués dans le biocontrôle)**

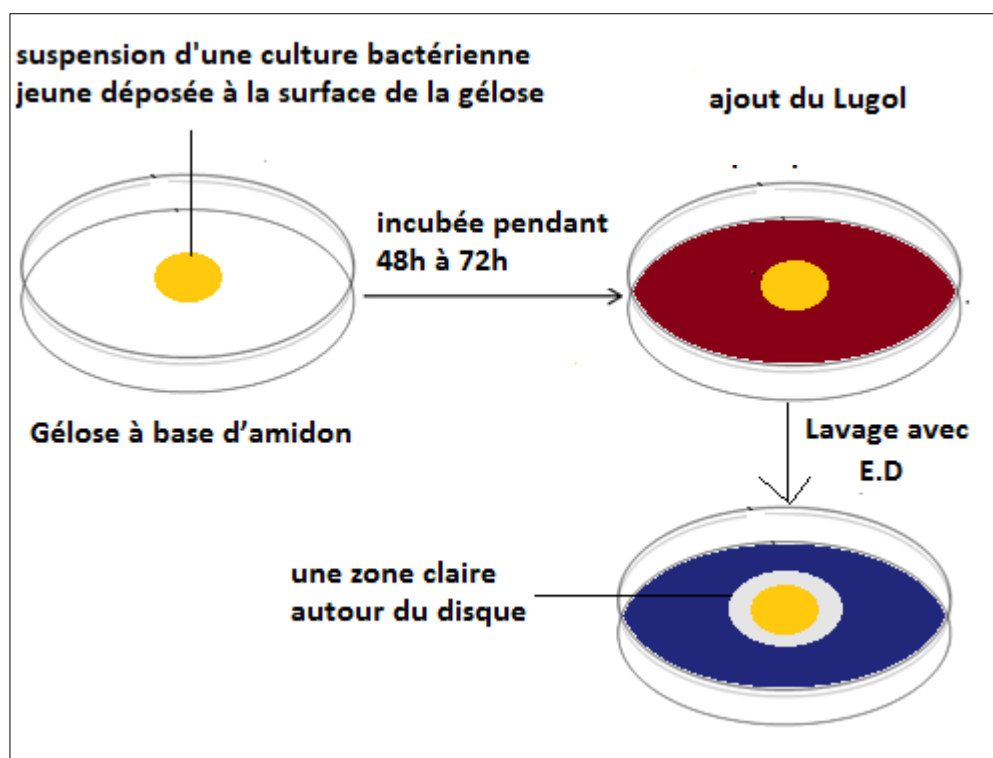
### **2-4-1- Activités enzymatiques**

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 en introduisant le substrat recherché comme seule source de carbone. Pour toutes les activités, 10 $\mu$ l de chaque suspension bactérienne (âgée de 24h) est déposé à la surface du milieu convenable puis incubé à 28°C.

#### **2-4-1-1 Activité amylasique**

Afin de mettre en évidence la capacité des souches à dégrader l'amidon soluble, un test d'activité amylasique est réalisé sur gélose à base d'amidon. Le milieu contient en (g/l) : KNO<sub>3</sub>(0,5), K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> (1,0), MgSO<sub>4</sub> (0,2), CaCl<sub>2</sub> (0,1), FeCl<sub>3</sub> (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/30mn. Une solution de lugol (révélateur) est préparée comme suit : 1g d'iode cristallin, 2g de KI, 300ml d'eau distillée. Le tout est mélangé est laissé au repos puis filtré. Les boîtesensemencées sont incubées pendant 48-72h, puis la solution de Lugol préalablement préparée est éparpillée sur toute la surface du milieu, après quelques minutes de contact, l'excès est éliminé et les boîtes sont lavées à l'eau distillée et la lecture est effectuée de la manière suivante:

La présence de l'amidon dans le milieu apparaît sous forme d'une couleur bleue noirâtre, ce qui signifie l'absence de l'activité amylasique. En revanche, si l'amidon est hydrolysé, une zone claire apparaît autour de l'inoculum, ce qui traduit la présence d'une activité amylasique extracellulaire chez les souches (Vinoth Raj *et al.*, 2009)(figure 06).



**Figure 06:** Recherche de la production de l'amylase

#### 2-4-1-2 Activité cellulasique

L'activité cellulasique est recherchée sur milieu de Carder (1986) contenant en g/l:  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  (6) ;  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  (3);  $\text{NaCl}$  (0,5);  $\text{NH}_4\text{Cl}$  (1); extraits de levure (3) ; CMC (carboxyméthyl-cellulose) (5) ; Agar (15). Les boitesensemencées sont incubées pendant 7 jours.

Après incubation, une solution de rouge Congo (1%) est ajoutée à la surface des colonies, (Nermeen *et al.*,2010) et 15min plus tard, la surface est inondée avec une solution de  $\text{NaCl}$  à 1M puis laissée au repos une nuit (Jaradat *et al.*,2008).L'activité cellulasique se manifeste par l'apparition d'un halo clair autour des inoculums (figure 07).

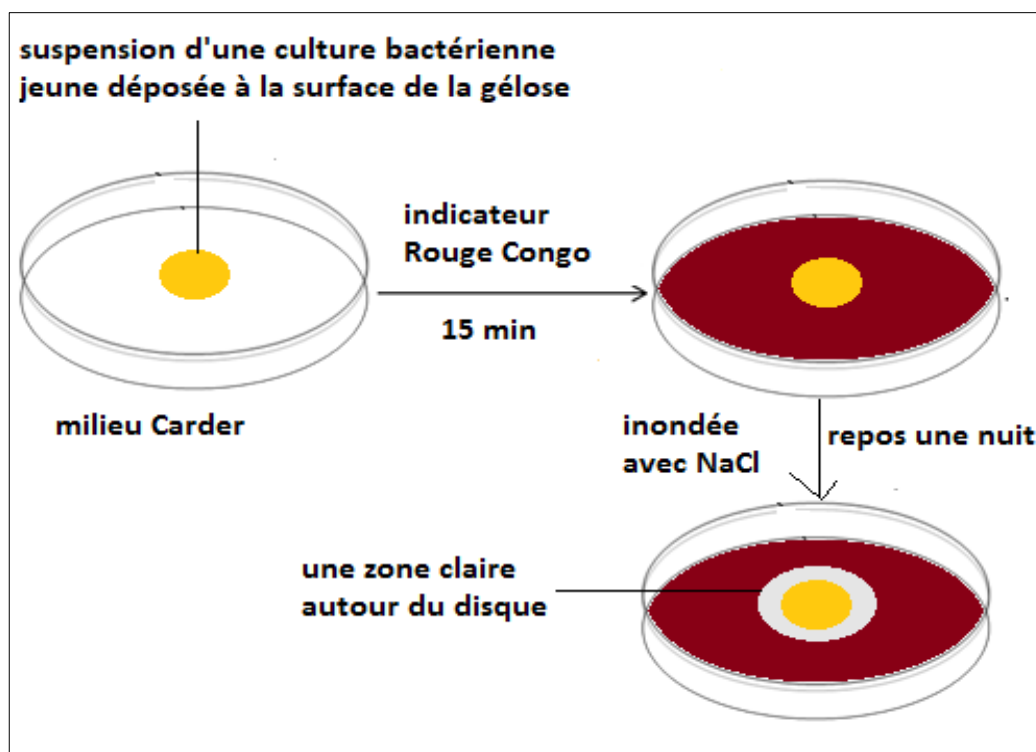


Figure 07: Recherche de la production de la cellulase.

#### 2-4-2-3 Activité chitinasique

Le milieu de culture est composé de la manière suivante en g/l :

La chitine colloïdale : 0.8 à 0.6,  $K_2HPO_4$  : 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. L'incubation dure 7 jours.

La présence de chitinase est révélée par l'apparition d'un halo transparent autour des colonies bactériennes (figure 08).

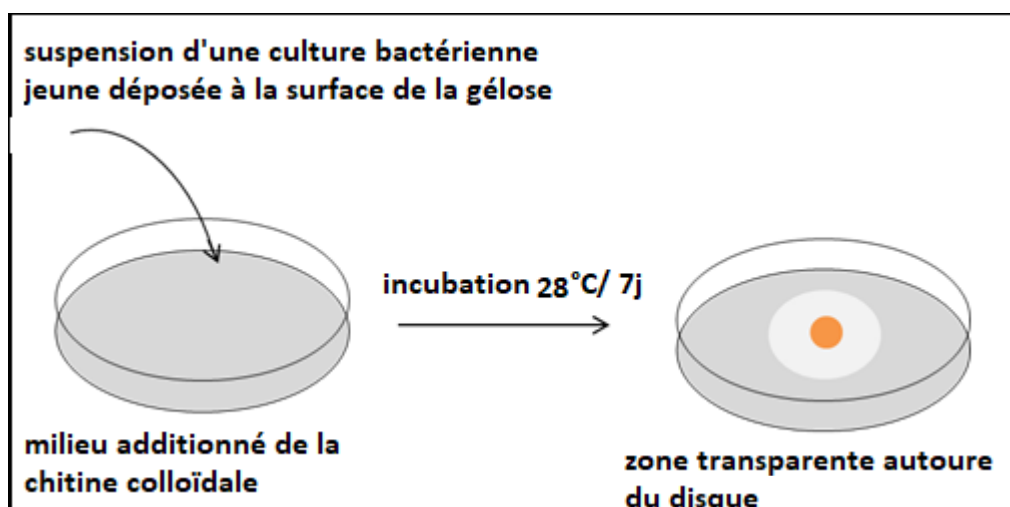
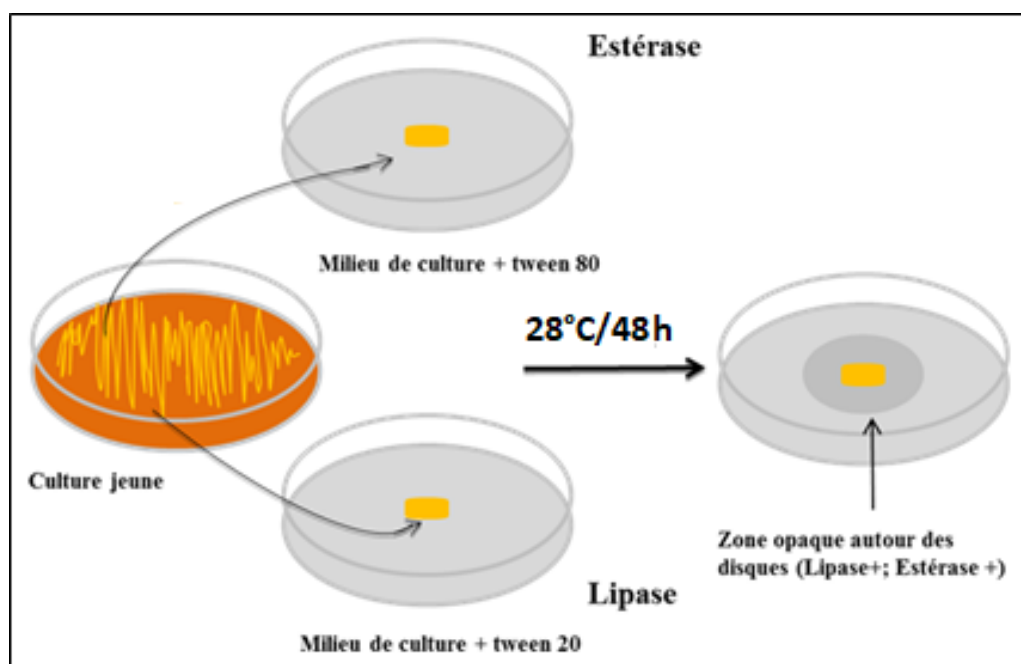


Figure 08 : Recherche de la production de la chitinase.

#### 2-4-2-4 Activité estérasiqque et lipasiqque

Ces activités sont recherchées sur le milieu de culture décrit par Sierra (1957) qui contient en g/L : peptone (10) ; NaCl(5) ; CaCl 2H<sub>2</sub>O (0.1) ; Agar(18) ; le tween 80 (1%, v/v) est ajouté pour révéler l'activité estérasiqque, alors que le tween 20 est utilisé pour mettre en évidence l'activité lipolytiqque. Le pH est ajusté à 7,4. Après ensemencement, les boîtes sont incubées pendant 48h (Carrim et *al.*, 2006).

La présence d'une activité est traduite par l'apparition d'une zone opaque autour des colonies (figure 09).



**Figure 09 :** Mise en évidence des deux activités estérasiqque et lipasiqque

#### 2-4-2-5 Activité protéasiqque

L'activité protéasiqque est réalisée sur un milieu de culture contenant en g/l : caséine pancréatique (5) ; Extrait de levures (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 du 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 (Bach et Munch, 2000).

Les bactéries ayant une activité protéasiqque positive montrent un halo transparent (figure 10).

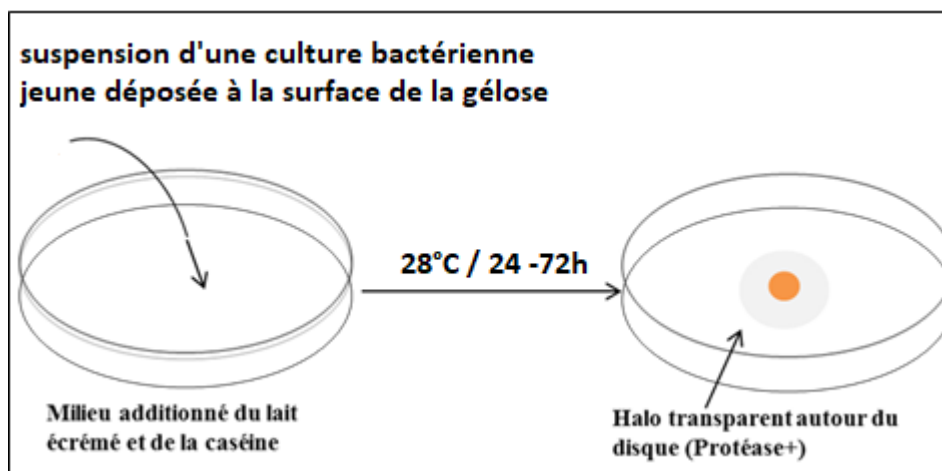


Figure 10 : Recherche de la production des protéases

#### 2-4-2-6 Activité uréasique

Pour préparer le milieu, à 950ml d'H<sub>2</sub>O (CSP): (1g) Peptone, (1g) Glucose, (5g) NaCl, (1.2g) Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, (0,8g) KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, (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 ° C, 50 ml d'une solution d'urée à 40% préalablement filtrée (0.22µm) sont ajoutés. Enfin le milieu est coulé en boîtes de Pétri (Christensen ; 1946).

L'activité uréasique est traduite par la présence d'un halo rose autour des colonies (figure 11).

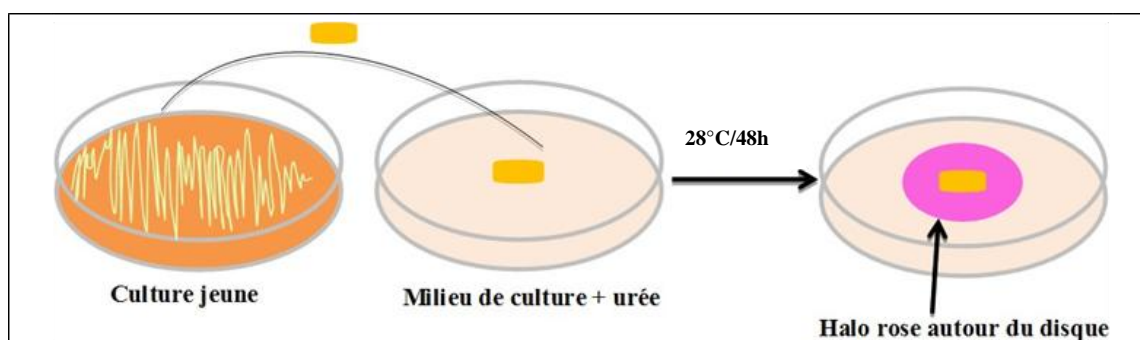


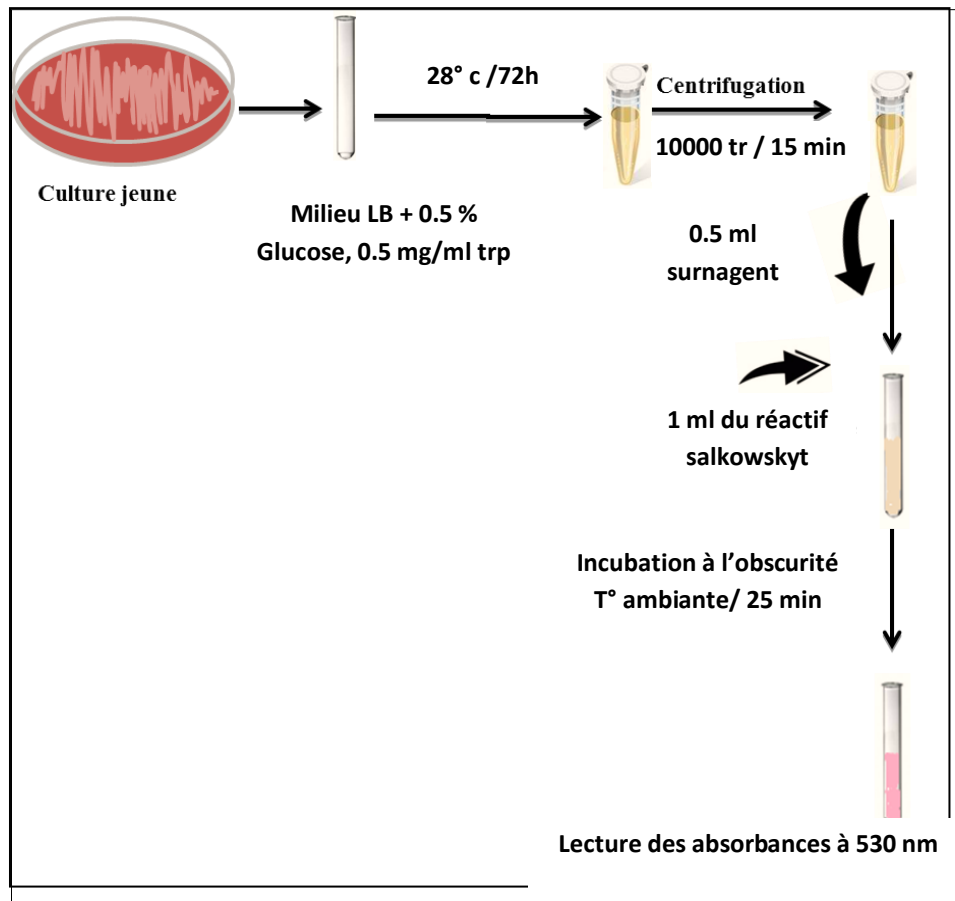
Figure 11 : Recherche de l'activité uréasique

#### 2-4-2- Production d'acide indole acétique (AIA)

La production d'AIA (auxines) par les bactéries sélectionnées est déterminée selon la méthode de Bric *et al.*, (1991) illustrée par la figure 12.

Les bactéries sont ensemencées sur milieu Luria Bertani (LB) supplémenté de 0,5% de glucose et de 0,5 mg/ml de tryptophane. Ce dernier est préalablement filtré à travers une membrane millipore (0,22 µm) et ajouté au milieu après autoclavage. Après une incubation à 28°C/ 72h sous agitation, les cultures sont centrifugées à 10000 tr /15min. après

centrifugation, 0,5 ml du filtrat est récupéré et additionné de 1ml du réactif de Salkowsky (150 ml H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 98% +250ml H<sub>2</sub>O + 7,5 ml FeCl<sub>3</sub> 0,5M). Le mélange est ensuite incubé à l'obscurité pendant 20min. l'absorbance de la coloration rose apparue est mesurée par spectrophotomètre à 530nm. Les valeurs d'AIA produit par chaque souche sont calculées par extrapolation sur une courbe d'étalonnage préparée de la même façon avec l'AIA pure.



**Figure 12** : Recherche de la production d'Acide Indole Acétique (AIA).

#### 4-2-3- Coloration de Gram des isolats sélectionnés

La coloration de Gram est déterminée selon la méthode de Hans Christian Gram (1884). (Annexe III).

# Chapitre II

## Résultats et discussion

Dans le but de rechercher des bactéries à effet PGP et biocontrôle, des prélèvements ont été effectués à partir d'un puits à usage agricole, d'une profondeur de 17 mètre du village Djebira Bejaia-Algérie, 15 isolats bactériens ont été sélectionnés sur la base des tests d'antagonisme en double culture à l'égard de cinq champignons phytopathogènes à savoir *A. niger*, *A. flavipes*, *Penicillium sp.*, *Fusarium sp.* et *B. cinerea* sur milieu gélosé à extrait de malt.

## **1- Evaluation de quelques aractères physico-chimiques de l'eau de puits utilisées**

### **1-1 Potentiel d'hydrogène de l'eau**

Les 3 échantillons d'eau ont subi une mesure du pH. La valeur moyenne de ces 3 échantillons enregistrée par le pH-mètre est de 7,5. Cette valeur est peu différente de celle enregistrée par Bensidhoum et *al.*, (2016) et Tabli (2018) avec un pH qui varie entre 7,04 et 7,06 respectivement, sur des échantillons prélevés de la même région. Cette différence est due aux changements climatiques et aux conditions environnementales. Selon Brunton et Ourimbah, (2011) ; le pH de la plupart des eaux naturelles est compris entre 5 et 8.

Le pH généralement acceptée pour l'eau d'irrigation se situe entre 5,5 et 7,5. Le pH d'eau de puits à partir duquel est effectué notre prélèvement se situe dans cette gamme, ce qui suggère qu'elle est adéquate pour l'irrigation.

### **1-2 Conductivité de l'eau**

La conductivité de l'eau est directement proportionnelle à la quantité de solides (sels minéraux) dissous dans l'eau. Ainsi plus la concentration en solide dissouts sera importante, plus la conductivité sera élevée. D'après Auber (1976) et Rai (2017), la conductivité électrique est considérée comme un indicateur de la salinité, plus un échantillon est salé plus il est inductible. Un échantillon salin est caractérisé par une valeur de conductivité électrique dépassant  $4\text{dSm}^{-1}$

Les résultats de la conductivité électrique enregistrée pour l'eau de puits est de  $6,61\text{dSm}^{-1}$ . Cette valeur est supérieure à la valeur maximale tolérée pour une eau d'irrigation, cette dissemblance peut être due à la variabilité en teneurs en minéraux avec le temps ou sous l'effet de la pluviométrie (Geurgazi et *al.*, 2014).

## 2- Criblage d'isolats bactériens producteurs de molécules antifongiques

### 2-1 Isolement et purification des bactéries

Les isolats bactériens sont sélectionnés sur la base de leurs critères phénotypiques sur gélose nutritive, à savoir, la forme, la taille, la couleur et la texture des colonies obtenues après incubation à 30°C / 24 à 48h. 30 isolats sont apparus différents à l'œil nu, ces derniers sont repiqués et purifiés sur milieu ordinaire neuf, et conservés pour les tests ultérieurs. La figure suivante montre l'aspect de quelques isolats obtenus après purification.



**Figure 13** : Aspects de quelques isolats bactériens obtenus sur boîte.

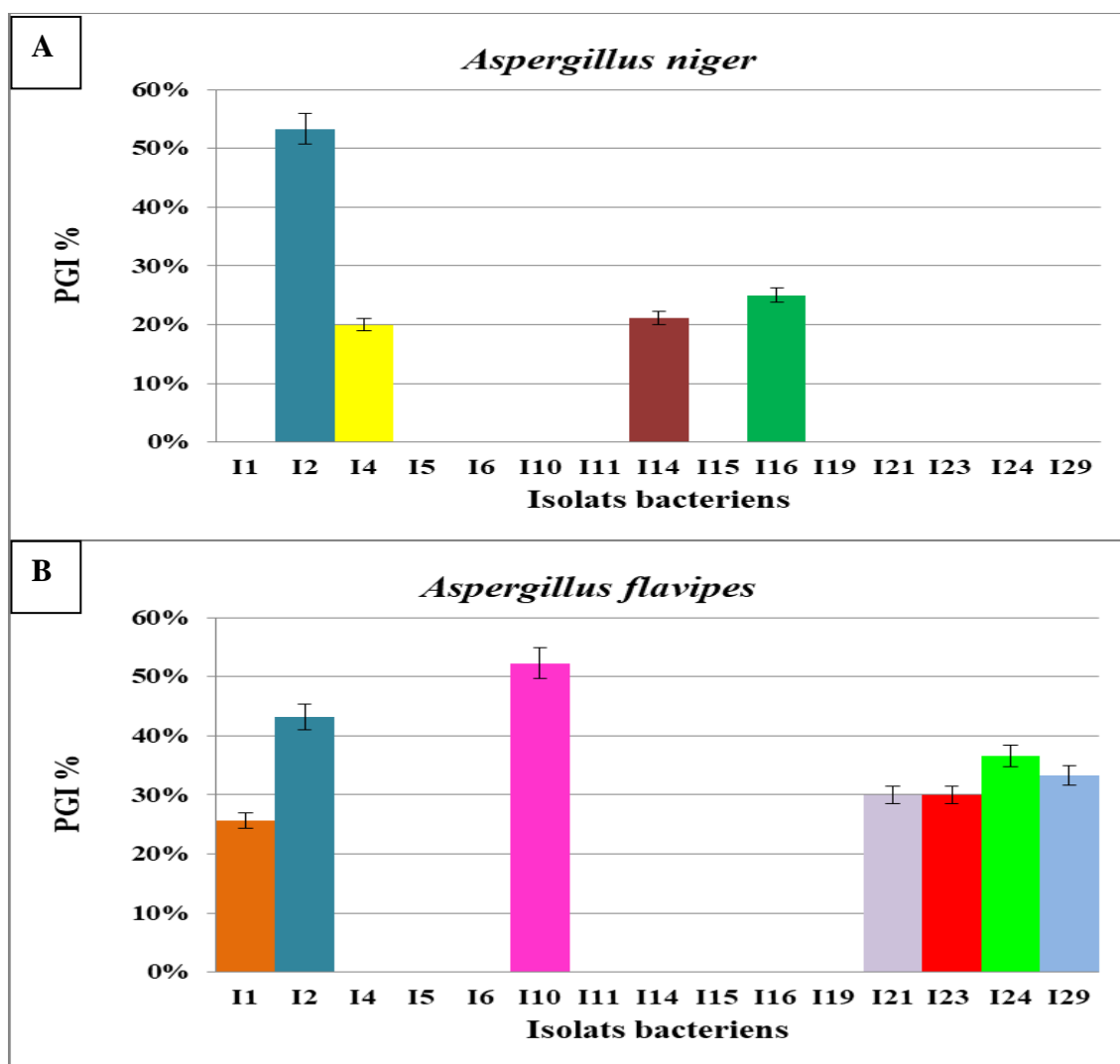
## 3- Résultats de l'étude de l'action antagoniste des isolats bactériens à l'égard des cinq champignons

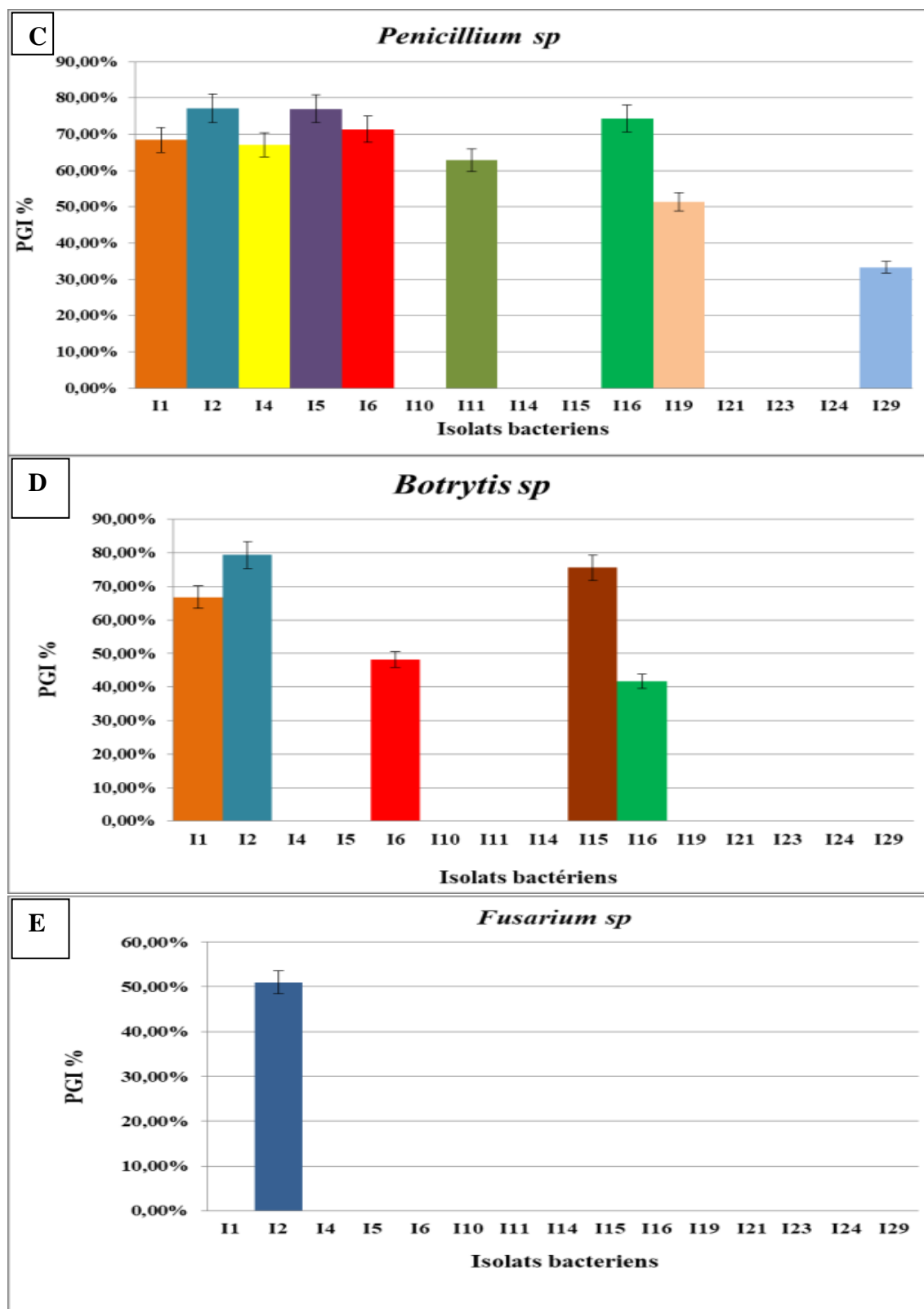
L'application de fongicides chimiques en agriculture provoque de graves problèmes de pollution pour l'environnement et des soucis à court et à long terme sur la santé humaine. En outre, leurs efficacités diminuent continuellement en raison de l'émergence de souches pathogènes résistantes (Handelsman et Stabb, 1996 ; Zhu et *al.*, 2007). Selon Haggag et Mohamed (2007), l'utilisation de microorganismes antagonistes ou de leurs métabolites actifs comme une alternative écologiquement durable aux produits chimiques constitue une approche non négligeable. En effet, Islam et Hossain, (2013), stipulent que la compétition entre les bactéries et les phytopathogènes a longtemps été considérée comme étant un moyen important pour éliminer les maladies des plantes.

Les 30 isolats ont été confrontés à l'égard des cinq souches fongiques ; *Aspergillus niger*, *Aspergillus flavipes*, *Fusarium* sp, *Botrytis* sp et *Penicillium* sp, en présence de boîtes témoins. Après 8 jours d'incubation, l'activité antifongique *in vitro* a révélé la présence d'une action inhibitrice envers les champignons testés. Les résultats de ce test ont montré que

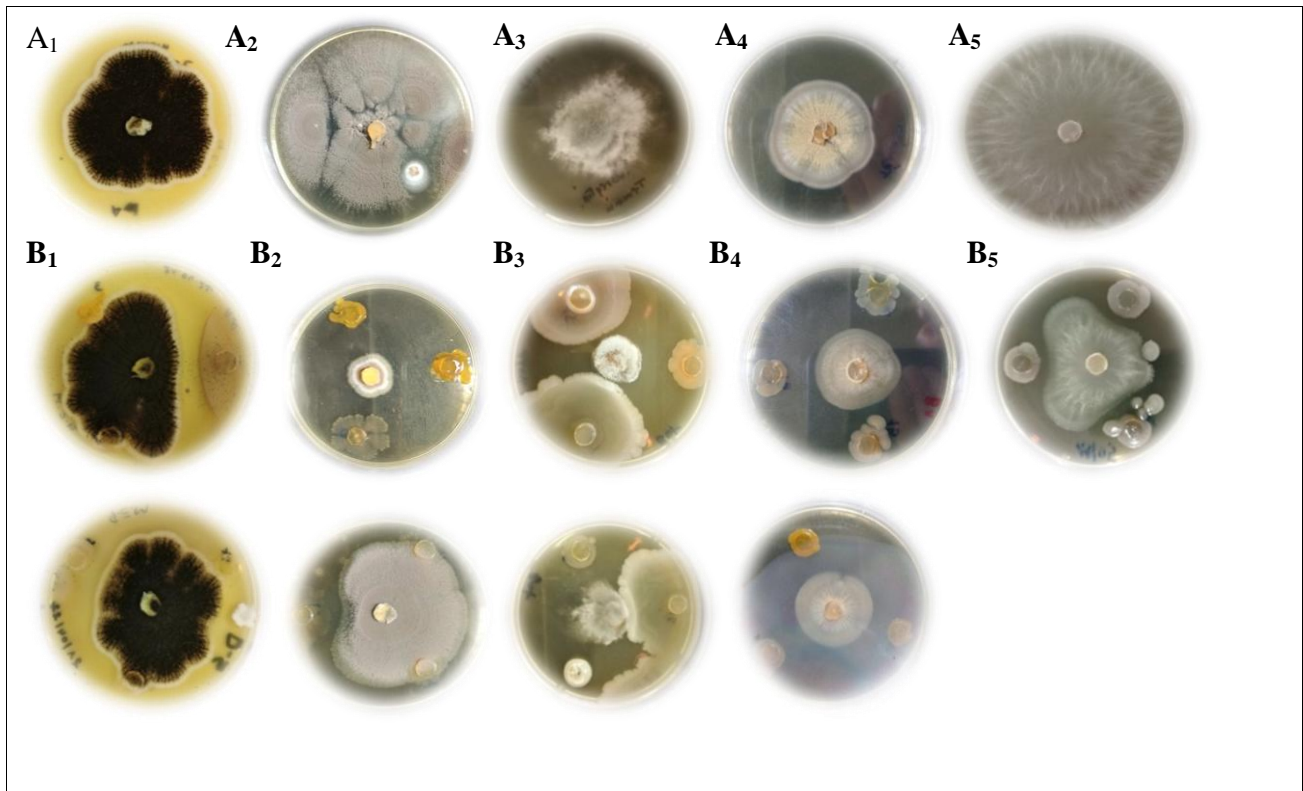
la croissance mycélienne enregistrée chez les témoins négatifs est supérieure à celle des interactions isolats/ champignons. Cependant, 15 isolats ont prouvé des résultats meilleurs par rapport à l'inhibition du développement mycélien où de claires zones d'inhibition ont été obtenus. La mesure des diamètres de ces dernières a permis de calculer les PGI% (pourcentage d'inhibition de la croissance mycélienne) pour les cinq champignons cibles qui varient selon les isolats bactériens.

Les résultats obtenus sont présentés dans les graphes et les figures suivants :





**Figure 14:** Pourcentage d’inhibition de la croissance des champignons phytopathogènes par les isolats testés (histogrammes A, B, C, D et E)



**Figure 15:** Inhibition exercée sur boîtes par quelques isolats sur les 5 champignons phytopathogènes en présence de témoins.

A : témoins ( A<sub>1</sub> : *A. niger* ; A<sub>2</sub> : *Penicillium* sp ; A<sub>3</sub> : *Botrytis* sp ; A<sub>4</sub> : *A. flavipes* ; A<sub>5</sub> : *Fusarium* sp ), B: inhibition en présence des isolats bactériens (B<sub>1</sub> : *A. niger* ; B<sub>2</sub> : *Penicillium* sp ; B<sub>3</sub> : *Botrytis* sp ; B<sub>4</sub> : *A. flavipes* ; B<sub>5</sub> : *Fusarium* sp ).



**Figure 16 :** Inhibition de la sporulation D'*Aspergillus niger* par l'isolat I10 sur boîtes.

Les antagonistes bactériens ont reçu beaucoup d'intérêts en raison de leurs capacités à contrôler les différentes classes d'agents phytopathogènes à travers plusieurs modes d'action (Vitullo et al., 2012). Dans ce présent travail, 50% (15/30) des isolats présentent un effet antagoniste à l'égard d'au moins un des cinq champignons testés.

Parmi les 15 isolats, 9 ont présenté le spectre d'action le plus important à l'égard de *Penicillium* sp avec des PGI% atteignant les 77%. Par ailleurs, trois isolats ont présenté un taux de réduction important dépassant les 66,66% à l'égard de *Botrytis* sp. En revanche, certains des isolats ont montré un spectre d'action modéré vis-à-vis d'*Aspergillus niger*, *Aspergillus flavipes*, *Fusarium* sp, avec des taux d'inhibitions de 53,33%, 52,23% et 51% respectivement.

Pour *Penicillium* sp, c'est l'espèce fongique qui semble être la plus inhibée par les isolats, où 60% de ces derniers ont présenté plus de 50% d'inhibition. L'isolat I2 a marqué le pourcentage d'inhibition le plus important, qui égale à 77,14%, tandis que l'isolat I19 a montré une activité inhibitrice moyenne (51,42%). Ces résultats sont satisfaisants comparés à ceux obtenus par Jemni et al., (2010), ayant obtenus des pourcentages d'inhibition variant entre 50 à 70%. Etebarian et al., (2005) ont présenté un taux de réduction de 78,5% à l'égard du même champignon. Ces résultats sont similaires à ceux de la présente étude.

Les isolats I1, I2 et I15, ont présenté les taux d'inhibition les plus importants contre *Botrytis* sp avec des PGI% atteignant les 79,41%. Nos résultats sont proches de ceux obtenus par Bensidhoum et al., (2015) et Bensidhoum et al., (2016), où le pourcentage d'inhibition de croissance varie entre 70 à 85%. Dans les travaux similaires comme ceux de Jemni et al., (2009) ; Tabli, (2018) ; Rai et al., (2016) et Tour et al., (2004), ou leurs isolats ont exhibé une activité inhibitrice avec un pourcentage de 50, 60, 66 et 70% respectivement, qui sont inférieurs à nos résultats. La valeur de PGI% la plus faible (41,17%) est enregistrée avec l'isolat I16.

Pour *Aspergillus niger*, les 4 isolats (I2, I4, I14 et I16) ont présenté des taux d'inhibition importants avec des PGI% variant de 20% à 53,33%. Ces résultats corroborent avec ceux obtenus par Bensidhoum et al., (2016) ayant trouvé un pourcentage d'inhibition dépassant les 50%. A la différence de Rai et al., (2016) ; Jemni et al., (2009) et Tabli, 2018, qui ont noté une activité antifongique à l'égard du même pathogène avec des pourcentages d'inhibition de 66, 70 et 90% respectivement, qui semble supérieur à nos résultats obtenus. Le faible pourcentage d'inhibition à l'égard d'*Aspergillus niger*, est obtenu avec l'isolat I4 (20%).

Il a été observé que l'isolat I10, montre une inhibition de la sporulation d'*Aspergillus niger* (figure 16). Le mécanisme exact par lequel cet antagoniste inhibe cette sporulation des n'est pas encore clair, vu que les mécanismes diffèrent d'un champignon à l'autre.

Dans le cas d'*Aspergillus flavipes*, les valeurs de PGI% minimales et maximales obtenues sont de 26% pour I1 et de 52,23% pour l'Isolat I10. Cependant, une diminution de la charge mycélienne et un ralentissement de sa croissance sont observées autour des disques d'isolats ayant une activité positive à l'égard du pathogène ciblé.

Dans le cas de *Fusarium* sp, seul l'isolat (I2) a montré une activité inhibitrice avec un pourcentage d'inhibition de 51%. Par ailleurs, des chiffres presque similaires sont obtenues par Bensidhoum et al., (2016) , qui quand à eux ont obtenus un pourcentage aux alentours de 60%. A la différence de Ajilogba et al., (2013) et Farhan et al., (2010) qui ont montré un pouvoir d'inhibition de 95% qui sont supérieurs comparés à nos résultats obtenus.

Tous les isolats sélectionnés ont présenté de différents pourcentages d'inhibition à l'égard de deux ou de trois champignons, l'isolat antagoniste le plus performant, I2, a pu inhiber la croissance des cinq champignons ciblés; la zone d'inhibition est tellement claire qu'il n'y a pas eu de contacte physique avec le pathogène, concluant que la bactérie produit des métabolites antifongiques (Montealegre et al., 2003).

Les résultats des tests d'antagonisme ont révélé une importante activité antifongique des isolats contre les champignons testés et certains ont réduit considérablement la croissance des champignons. D'après Essghaier et al., (2012), cette inhibition de la croissance des pathogènes *in vitro* et la formation de zones d'inhibition semblent être dues aux métabolites secondaires libérés par les bactéries antagonistes dans le milieu de culture. Par ailleurs, 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 (Williams et Asher, 1996).

#### **4-Caractérisation métabolique et fonctionnelle (quelques traits PGP impliqués dans le bio-contrôle)**

Plusieurs auteurs (Tabli et al., 2017 ; Bensidhoum et al., 2016 ; Nabti et al., 2014 et Tabli et al., 2013) ont décrit les mécanismes d'amélioration de la croissance des plantes par les PGPB.

La production d'enzymes lytiques extracellulaire 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).

Les cinq souches fongiques fournies au laboratoire et les isolats sélectionnés sont testés pour rechercher divers caractères promoteurs de la croissance végétale : activités enzymatiques et production d'AIA.

#### 4-1- Activités enzymatiques

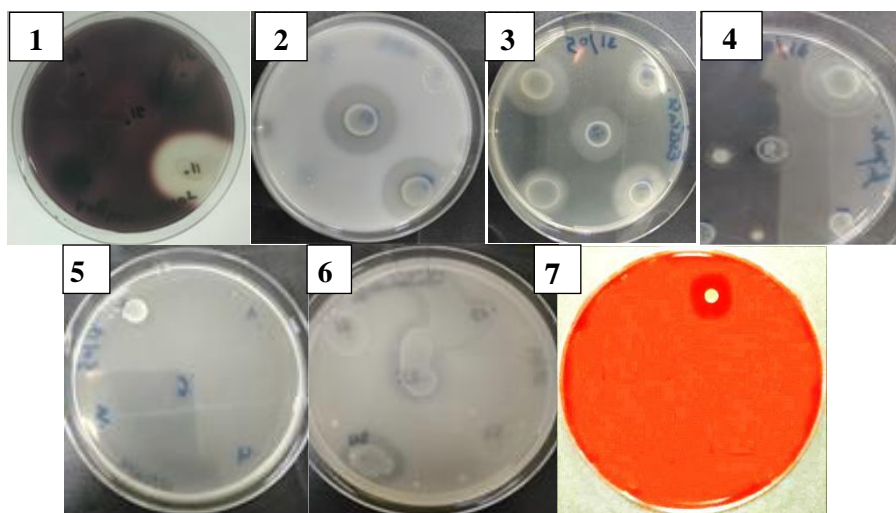
Le teste préliminaire des activités antifongiques sur les 30 isolats a permis la sélection des 15 suivants : I1, I2, I4, I5, I6, I10, I11, I14, I15, I16, I19, I21, I23, I24 et I29 qui ont fait l'objet des tests ultérieurs. Différentes activités enzymatiques sont recherchées sur boîtes, les activités testées concernant : les protéases, les lipases, les cellulases, les chitinases, les estérases, les amylases et les uréases. Pour les activités positives, les résultats varient entre faibles, moyens et bons d'un isolat à l'autre, à l'exception de l'activité uréasique où aucun isolat n'a produit l'uréase.

Les résultats des activités enzymatiques recherchées dans ce travail sont résumés dans le tableau 05 et l'aspect des boîtes après incubation est représenté sur la figure 14.

**Tableau 05:** Résultats des différents tests d'activités enzymatiques réalisés pour les 15 isolats

Isolats	Cellulase	Lipase	Estérase	Protéase	Chitinase	Amylase	Uréase
<b>I1</b>	++	+++	-	+++	-	+++	-
<b>I2</b>	++	+++	+	+++	-	-	-
<b>I4</b>	++	+++	-	+++	-	+++	-
<b>I5</b>	++	-	-	-	-	+++	-
<b>I6</b>	-	+++	++	-	+	-	-
<b>I10</b>	-	+	++	+++	-	-	-
<b>I11</b>	-	+	-	++	-	+++	-
<b>I14</b>	-	-	+	+++	-	-	-
<b>I15</b>	-	-	+	++	-	-	-
<b>I16</b>	-	+++	++	+++	-	-	-
<b>I19</b>	-	+++	+++	+++	-	-	-
<b>I21</b>	-	+++	++	-	-	-	-
<b>I23</b>	-	+++	++	-	-	-	-
<b>I24</b>	-	+++	+++	-	+++	-	-
<b>I29</b>	-	+++	+++	+++	+++	-	-

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



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

**1:** Amylase ; **2:**Protéase; **3:**Estérase ;**4:**Lipase ; **5:**Uréase ;**6:**Chitinase; **7:**Cellulase

#### 4-1-1 Activité cellulasique

D'après les résultats du tableau, on constate que quatre isolats (I1, I2, I4, I5) ont manifesté des résultats positifs pour ce test.

Les cellulases sont des enzymes synthétisées par un grand nombre de microorganismes comprenant aussi bien les champignons (*Trichoderma*, *Aspergillus* et *Thermomonospora*) que les bactéries (*Clostridium*) (Kuhad et al., 2011). Les résultats obtenus montrent que l'activité cellulasique est observée chez 26,60 % des isolats (Tableau 05). La dégradation de la cellulose joue un rôle clé dans le cycle de carbone (Lee et al., 2007), elle est principalement convertie par les microorganismes en dioxyde de carbone et en méthane (Eriksson, 1985). Plusieurs bactéries rhizosphériques de genre *Pseudomonas* et *Bacillus*, ont la capacité de produire l'enzyme cellulase. Cette dernière exerce un mécanisme important d'inhibition fongique, et ceci, par la dégradation de la paroi cellulaire du champignon (Reetha et al., 2014). 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).

#### 4-1-2 Activité lipasique et estérasique

Dans ce travail, 73% et 80% des isolats se sont révélés producteurs d'enzymes estérasique et lipasique respectivement. Les lipases sont largement répandues chez les bactéries, les levures et les champignons filamenteux. Elles sont aussi bien produites chez les bactéries Gram + telle que *Bacillus*, que les bactéries Gram – telle que *Pseudomonas* (Frickers et al., 2008). Dans l'étude réalisée par Tabli et al. (2013), concernant l'activité lipasique et uréasique, 50% des souches ont montré une activité lipasique positive, ce qui est inférieur à nos résultats obtenus. Par conséquent, l'activité estérasique est présente chez tous les isolats (100%), ce qui semble supérieur à nos résultats (73%). Par ailleurs, dans les études réalisées par Carrim et al., (2006), seulement 40% des isolats ont présenté des activités estérasique et lipasique positives.

La production de lipases est influencée par le type et la disponibilité de la source du carbone et d'azote. Les lipases sont produites durant la croissance bactérienne, où cette période de production peut varier de quelques heures à plusieurs jours selon les bactéries et les conditions environnementales (De Guzmán et al., 2008). Ces peptides antifongiques inhibent la croissance d'un grand nombre de champignons y compris les genres *Aspergillus*, *Penicillium*, et *Fusarium*, les bactéries et les oomycètes (Munimbazi et Bullerman, 1998).

La synthèse des lipases et des estérases par les bactéries testées pourrait participer au recyclage de la matière organique en fournissant les éléments nécessaires aux plantes (Ajar Nath Yadav et al., 2020).

#### 4-1-3 Activité protéasique

10 isolats sur les 15 testés ont montré un résultat positif pour cette activité. Les protéases constituent un groupe important d'enzymes jouant un rôle dans la nutrition et dans la dégradation de la matière organique. En plus, ce sont les enzymes les plus importantes dans le domaine industriel. Elles sont utilisées dans l'industrie alimentaire, l'industrie fromagère, les détergents, domaine de la pharmacologie et la production de médicaments etc (Muthulakshmi et al., 2011). Il est bien établi que la production des protéases est l'un des mécanismes d'action indirecte appliquée par les PGPR dans l'élimination des microorganismes nuisibles (Ajar Nath Yadav et al., 2020). D'après Dunne et al., (1997) l'inhibition du champignon phytopathogène *Phytophthora ultimum* dans les rhizosphère de la canne à sucre est due au développement de la protéase extracellulaire par les souches de *Stenotrophomonas maltophilia* W81.

#### 4-1-4 Activité chitinasique

Pour cette activité, seuls les isolats I6, I24 et I29 ont montré un résultat positif. La chitinase est une enzyme hydrolytique. Comme la cellulose, la chitine est un polymère de chaînes droites de sucre (N-acétyl-glucosamine) (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 (Cohen- Kupiec et Chet, 1998 ; Patil et al., 1999). Chez les bactéries, les chitinases jouent un rôle dans la nutrition et le parasitisme, tandis que chez les champignons, les protozoaires et les invertébrés, elles sont également impliquées dans la morphogénèse (Patil et al., 1999). Certes, 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 bio-contrôle, pour différents types de maladies fongiques. Certaines études ont révélé une relation entre les chitinases de *Bacillus* sp et sa capacité à inhiber la croissance mycélienne de *Fusarium oxysporum* et *Fusarium solani* (Bensidhoum et al., 2015), et donc les chitinases sont impliquées dans le mécanisme de défense des plantes (Patil et al., 1999). Dans les études réalisées par Tabli et al., (2013), Ahmad et al., (2013), Nabti et al., (2014), , 100%, 75%, 50% des isolats montrent une activité chitinasique, respectivement. Cependant, ces résultats ne coïncident pas avec les nôtres, puisque 20% de nos isolats seulement ont cette activité enzymatique. Ces différences peuvent être dues aux différents potentiels enzymatiques des isolats et aux différences des lieux de prélèvement.

#### 4-1-5 Activité amyliasique

Seuls les isolats I1, I4, I5 et I11 ont manifesté des résultats positifs pour ce test. Les amylases sont des enzymes qui décomposent l'amidon ou le glycogène. Elles peuvent être produites par plusieurs sources ; microbiennes, animales et même végétales, mais la plus demandée en industrie est l'amylase microbienne grâce à sa disponibilité et à sa production volumineuse (Vidylakshmi, 2009 ; Mathew et al., 2016).

Les bactéries assurent directement la croissance des plantes en leur solubilisant les nutriments dans le milieu. Nos résultats (26.6% d'isolats présentent une activité amyliasique) sont semblables à ceux observés par Dinesh et al., 2015, ayant trouvé que 25% des souches ont une activité amyliasique. Tandis que Tabli et al., 2013 et Nabti et al., 2014 ont constaté que 100% des souches avaient une activité positive pour ce test. Cette différence

peut être due à la différence du site de prélèvement ainsi qu'à la variabilité et la diversité génétique des isolats

#### 4-1-6 Activité uréasique

Aucun de nos isolats n'a montré une activité uréasique. L'uréase est une enzyme qui catalyse l'hydrolyse de l'urée pour former deux molécules d'ammoniac ( $\text{NH}_3$ ) et une molécule de dioxyde de carbone (Sirko et Brodzik, 2000). L'uréase est synthétisée chez de nombreux microorganismes : les algues, les champignons, les bactéries, les plantes et les invertébrés (Krajewska, 2009). Une activité uréasique a été signalée chez plus de 200 espèces de bactéries et ceux-ci incluent les organismes Gram-positifs tels que *Srrophylococcus* sp. et le groupe *Corynebacterium* et les organismes Gram-négatifs, y compris *Proteus mirabilis*. 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 bio-contrôle. Nos résultats sont différents 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), ont trouvé que 50% de leurs isolats ont montré une activité uréasique.

#### 4-2- Production de l'acide indole acétique

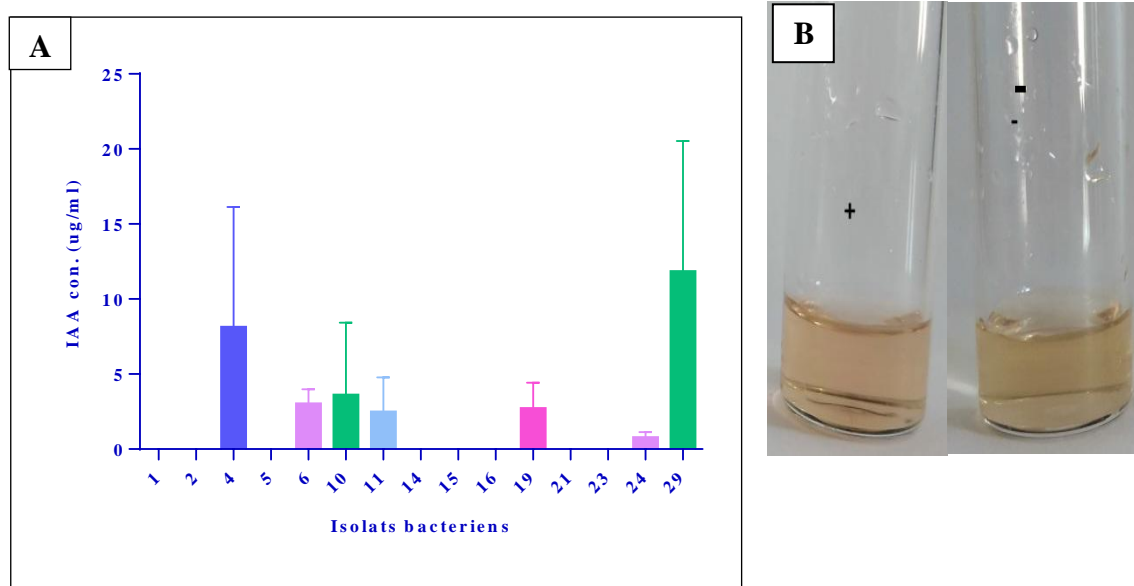
La production d'auxine (AIA) est considérée comme le mécanisme direct, le plus important, utilisé par les PGPB pour stimuler et augmenter remarquablement la croissance des plantes et le rendement des récoltes. Cette phytohormone coordonne différents processus de développement chez celles-ci (Khalid et al., 2004 ; Baca et Elmerich, 2007 ; Ali et al., 2009). Selon Zakharova et al., (1999), environ 80% des bactéries rhizosphériques sont capables de produire l'AIA.

Pour ce test, 46,66% de nos résultats sont positifs avec une production d'AIA en quantités variables (figure 18). Les isolats I4 et I29 ont produit les quantités respectives les plus élevées en  $\mu\text{g/ml}$  de : 8 et 13,2. Comparées à ces isolats, le taux de production d'AIA par : I6, I10, I11 et I19, sont moyens ( $2,3 \mu\text{g/ml} < \text{AIA} < 3,9 \mu\text{g/ml}$ ). Quant à l'isolat I24 a montré le taux de production le plus faible ( $\text{AIA} < 2,3 \mu\text{g/ml}$ ). Ali et al., (2008) ont établi un rapport positif sur la production *in vitro* des auxines par les bactéries du sol et leur capacité à favoriser la croissance des plantes dans différentes circonstances.

Un taux de production élevé d'AIA n'est pas toujours à l'intérêt de la plante. En effet, des concentrations élevées en AIA peuvent causer l'effet inverse (inhibition) sur la croissance des plantes, ce qui a été remarqué par Malik et Sindhu, (2011). Selon Beneduzi et

Passaglia, (2011), une quantité faible d'AIA stimule la croissance des plantes, alors qu'une forte concentration peut inhiber le développement des racines.

Une amélioration de 52% de la croissance racinaire est observée par Egamberdieva, (2009), après inoculation du blé par trois souches de *Pseudomonas* productrices de l'AIA (5, 5.7 et 7.4  $\mu\text{g/ml}$ ), ces taux sont proches de ceux élaborés par les isolats I6, I10, I11, I19 et I24 qui ont produits un taux d'AIA  $< 3,9\mu\text{g/ml}$ , ce qui approuve son utilisation comme inocula à des semences afin d'améliorer la croissance et le rendement des plantes.



**Figure18** : Quantités d'AIA produites par les différents isolas.

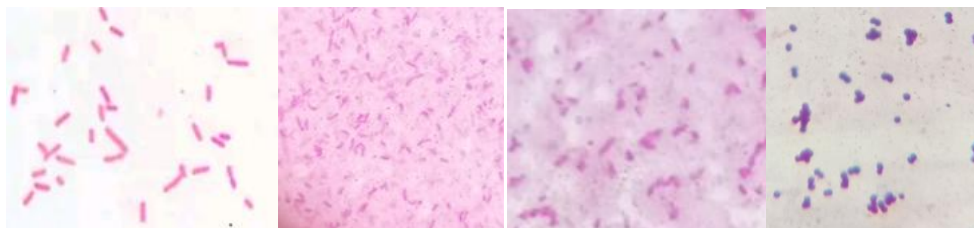
A : concentration produite en  $\mu\text{g}$  par ml ; B : aspect des résultats positifs et négatifs.

#### 4-3- Coloration de Gram des isolats sélectionnés

Les caractères morphologiques (coloration de Gram) des 15 isolats montrent les résultats suivants.

**Tableau 06** : Les caractères microscopiques des 15 isolats.

Isolats	Coloration de Gram		
	Forme	Gram	Agencement
I1	Bacille	G -	Isolé
I2	Gros bâtonnet	G -	Isolé
I4	Gros bacille	G -	Isolé
I5	Bacille long	G -	Isolé
I6	Bacille long	G -	Isolé
I10	Coccobacille	G -	Isolé
I11	Cocci	G +	Chainette, grappe diplômas
I14	Bacille long	G -	Isolé
I15	Petits, gros coccobacilles	G -	Isolé
I16	Bacille	G -	Isolé
I19	Bacille	G -	Isolé
I21	Bacille long	G -	Isolé
I23	Colibacille gros	G -	Isolé
I24	Coccobacille	G -	Isolé
I29	Coccobacille	G -	Isolé

**Figure 19**: Colorations de Gram de quelques isolats bactériens.

A l'exception de l'isolat I11 qui a montré une coloration de Gram +, tous les autres isolats sont des Gram -.

# Conclusion

L'utilisation des technologies microbiennes dans l'agriculture s'étend très rapidement par l'identification de nouvelles souches bactériennes efficaces dans l'amélioration de la croissance des plantes. L'application des PGPB comme agents de biocôntrole en tant qu'inoculant des plantes cultivées contre les ravageurs (champignons phytopathogènes) offre une alternative biologique à l'utilisation excessive et incontrôlable de produits agrochimiques.

Dans cette présente étude, trois échantillons d'eau sont prélevés d'un puits d'intérêt agricole, dans le village Djebira (Wilaya de Bejaïa). Ces échantillons ont fait l'objet d'un isolement de bactéries d'intérêt agricole (PGPB). Trente isolats ont été sélectionnés et purifiés sur la base des différences d'aspects macroscopiques des colonies. Ces isolats ont fait l'objet d'une sélection successive afin de choisir les meilleurs antagonistes contre les champignons phytopathogènes ; *Aspergillus niger*, *Aspergillus flavipes*, *Penicillium* sp., *Fusarium* sp. et *Botrytis* sp. Il en est ressorti 15 isolats soit (50%) ayant une bonne activité antagoniste, et qui produisent des molécules antifongiques et d'intérêt agricole, en particulier, l'isolat I2 qui a inhibé la croissance des cinq champignons par confrontation directe, avec des PGI% allant de 53,3% à 77,14%. Nos isolats, en plus de leur rôle dans le biocontrôle (enzymes lytiques), peuvent stimuler et améliorer la croissance des plantes en jouant le rôle de biostimulateurs (production d'AIA) et biofertilisateurs (production des enzymes impliquées dans la fertilisation du sol par la dégradation des substrats comme l'amidon et cellulose).

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

- Des tests de l'activité de nos isolats sur d'autres champignons (genre et espèces) ;
- La recherche d'autres activités à savoir la résistance aux métaux lourds et l'activité insecticides des isolats bactériens.
- L'identification phylogénétiques des isolats ;
- La 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;
- La purification, identification et caractérisation biochimique des molécules antifongiques.

**Références**

**Bibliographiques**

- Adam A. (2008). Elicitation de la résistance systémique induite chez la tomate et le concombre et activation de la voie de la lipoxgénase par des rhizobactéries non pathogènes. Thèse de doctorat en Science. Université de Liège, Centre Wallon de Biologie Industrielle, Belgique. 165p.
- Adli. M. (2017). La lutte intégrée, une méthode à considérer, journal gestion et technologie agricole (GTA).
- Ahemad, 2015. Phosphate-Solubilizing bacteria-assisted phytoremediation of metaliferous soils. 3 Biotech.5, 111-121
- Ajar Nath Yadav et Ali Asghar Rastegari, Neelam Yadav et Divjot Kour. (2020). Advances in Plant Microbiome and Sustainable Agriculture Diversity and Biotechnological Applications. Chapter 10: Biofertilizers and Biopesticides: Microbes for Sustainable Agriculture. (19): 260-262.
- Ajilogba C E; Babalola O O and Ahmed F. (2013). Antagonistic effects of *Bacillus* species in biocontrol of tomato *Fusarium* wilt. Ethno Med, 7(3): 205-216
- Ajouz S. (2009). Estimation du potentiel de résistance de *Botrytis Cinerea* à des biofongicides. Thèse de Doctorat. Sciences. Université d'Avignon et des pays de Vaucluse. France
- Alderman S.C., Coats D.D et Crowe F.J. (1996). Impact of Ergot on Kentucky Bluegrass Grown for Seed in Northeastern Oregon. Plant Disease. 80: 853-855.
- Ali, B., Sabri, A.N., Ljung, K., Hasnain, S. (2009). Auxin production by plant associated bacteria: impact on endogenous IAA content and growth of *Triticum aestivum* L. Lett. Appl. Microbiol. 48: 542–547.
- Annapurna. K, Amod Kumar, L. Vithal Kumar, V. Govindasamy, Pranita Bose, and D. Ramadoss. (2013). PGPR-Induced Systemic Resistance (ISR) in Plant Disease Management. Chapter 15. Division of Microbiology, Indian Agricultural Research Institute. India.
- 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.
- Aubert G., (1976). Les sols sodiques en Afrique du nord. de l'institut Nat. Agro. D'Alger. 1 : 185-195.

- Baca B.E et 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. and Munch J.C. ( 2000). Identification of bacterial sources of soil peptidases. *Biol. Fertil. Soils*. 31: 219-224.
- Baker Scott . (2006). Génomique d'*Aspergillus*: passé, présent et future. *Medical mycology*, 44 : 17-21.
- Bakker Peter A. H. M , Corné M. J. Pieterse, and L. C. van Loon. (2007). Induced Systemic Resistance by Fluorescent *Pseudomonas* spp. *Phytopathology*. 97: 239-243.
- Belhadi A., Mehenni M., Reguieg L. and Yakhlef H. (2016). Pratiques Phytosanitaires des *serristes maraichers* de trois localités de l'est des Ziban et leur impact potentiel sur la santé humaine et l'environnement. *Revue. Agric*, 1 09-16.
- Benchabane, M . Toua, D . Bensaid, F . (2011). Action Des Pseudomonas Spp. Fluorescents Dans La Modulation De La Réceptivité Du Sol A *Fusarium Oxysporum*. *AGROBIOLOGIA*. 1(2): 34-36.
- Bensidhoum L. (2016). Effet des extraits d'algues marines et d'une souche de *Pseudomonas protegens* S5LiBe résistante aux métaux lourds sur la croissance de l'orge et le biocontrôle d'agents phytopathogènes. Thèse de doctorat. Université A. Mira-Bejaia. 227p.
- Bensidhoum L., Nabti El-H., Tabli N., Kupfers chmied P., Weiss A., Rothballer M., Schmid M., Keel C. et Hartmann A. 2016. Heavy metal tolerant *Pseudomonas protegens* isolates from agricultural well water in northeastern Algeria with plant growth promoting, insecticidal and antifungal activities. *Eur. J. Soil. Biol.* 75: 38–46.
- Bensidhoum, L., Rai. A., Tabli. N., Kahouadji .N., Khaber. M., and Nabti .E. (2015). Biological Control of *Botrytis cinerea* by *Bacillus* sp. Strain S7LiBe Under Abiotic Stress. 1(6): 07-14.
- Bezert G., Chappe P., Mourey A et Loubinoux B. (1996). Action de *Bacillus* et d'Actinomycètes sur les champignons de bleuissement du bois. *Bulletin des Académie et Société Lorraines des Sciences*. 35 (3): 177-190.
- Blancard, D., Sorel, M., Fermaud, M. (2021). *Biologie, Epidémiologie*. INRAE.

- Borriss, R. (2011). Use of plant-Associated Bacillus strains as Biofertilizers and Biocontrol agents in agriculture. In: D. K. Maheshwari (Ed) bacteria in Agro biology: plant Growth responses. Springer- Verlag, Berlin Heidelberg. 41-76.
- Botton B ; Breton A ; Fevre M ; Guy P.H ; Larpeni J et Veau P. (1990). Moisissures utiles et nuisibles importance industrielles, 2<sup>ème</sup> Edition, Masson, Paris.
- Bouchet P, Guignard J-L, Pouchus Y-V. (2005). Les champignons, mycologie fondamentale et appliqué, 2<sup>ème</sup> édition, Masson, Paris.
- Bric, J. M., Bostock, R. M. et Silverstone, S. E. (1991). Rapid in Situ Assay for Indole Acetic Acid Production by Bacteria Immobilized on a Nitrocellulose Membrane. *Appl. Environ. Microbiol.* 57 (2): 535-538.
- Brimmer T A. and Boland G.J. (2003). A review of the non-target effects of fungi used to biologically control of plant diseases. *Arg. Ecosyst. Environ.* 100 : 3-16.
- Brunton V. and Ourimbah. 2011. Irrigation Water quality, Agriculture NSW-Field Vegetables, Primefact 1164 1st edition, 1-3.
- Built.J et Lafon.R. (1970). Quelques aspects de la biologie du *Botrytis cinerea*. Agent de la pourriture grise. Station de pathologie végétale. Centre de recherche de Bordeaux- I.N.R.A. pont- de- la- Maye. France.
- Carrim, A. J. I., Barbosa E.C. and Gonçalves Vieira J.D. (2006). Enzymatic Activity of Endophytic Bacterial Isolates of *Jacaranda decurrens* Cham. (Carobinhado-campo). *Braz. Arch. Biolog. Technol.* 49: 353-359.
- Chabrier. C, Mbolidi-Baron. H, Wicker. (2007). Techniques de lutte alternatives.
- Chaiarn and Lumyong, 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.
- Charles. T and Kenneth B.R. . (1945). A Manuel of Aspergilli. Etat unis.
- Chitraselvi, R. P. E. (2018). Actinomycetes : dependable tool for sustainable agriculture. *Curr. Investig. Agric. Curr. Res.* 1: 128-130.
- Christensen W.B. (1946). Urea Decomposition as a Means of Differentiating Proteus and Paracolon Cultures from Each Other and from *Salmonella* and *Shigella* Types. *J.Bacteriolog.* 52:461-466.
- Cohen-Kupiec R et Chet I. (1998). The molecular biology of chitin digestion. *Curr Opinion Biotech* (9): 270-277.

- Corbaz R. (1990) .Principes de phytopathologie et de lutte contre les maladies des plantes. Presses polytechniques et universitaire romandes (1<sup>ère</sup> édition). Lausanne. Suisse. 286p.
- Deacon J. (2005). Chapter 14: Fungi as plant pathogens. Issue. <http://archive.bio.ed.ac.uk/jdeacon/FungalBiology/chap14.htm>.
- Deravel, J., Krier, F., Jacques, P., (2013). Les biopesticides, compléments et alternatives aux produits phytosanitaires chimiques (synthèse bibliographique). Biotechnol. Agron. Soc. Environ. 18(2) : 220-232
- Desoubeaux. G et Chandener.J. (2010). Biological diagnosis of an *Aspergillus* infection. Feuillet de Biologie . VOL LI N° 293.
- Dignani. M. C., and Anaissie. E.( 2004). “Human fusariosis,” Clin. Microbiol. Infect. 10 : 67–75.
- Dinesh R., Anandaraja M., Kumaran A., Binia Y. K., Subila K.P and Aravind R. (2005). Isolation, characterization and evolution of multi-trait plant growth promoting rhizobacteria for their growth promoting and disease suppressing effects. 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.
- Doehlemann Gunther , Bilal Okmen, Wenjun Zhu, Amir Sharon. (2017). Plant Pathogenic Fungi. ASM journals. Microbiology Spectrum. 5 (1).
- Dr Stuart. B. H. (1989). Cultural methods of pest, primarily insect, control. Ecological agriculture projects. College Mac Donalde de l’université Mc Gill. Ste- Anne de Bellevue, QC, Canada H9X 3VP.
- Dufresne Philippe. (2021). Identification des champignons d’importance médicale. Laboratoire de santé publique du Québec.
- Dunne C., J.J. Crowley Y. moenne- loccoz D.N. dowling F.J. De Bruijun et F. O’Gara. (1997). Biological control of *phytium ultimum* by *stenotrophomonas maltophilia* W81 is mediated by an extracellular proteolytic activity. Microbiology. 143: 3921- 3931.

- Durrant W. E and Dong X. (2019). Developmental, Cell, and Molecular Biology Group, Department of Biology, Duke University, Durham, North Carolina 27708; doi: 10.1146/annurev.phyto.42.040803.140421.
- Egamberdieva, D. (2009). Alleviation of Salt Stress by Plant Growth Regulators and IAA Producing Bacteria in Wheat. *Acta Physiologiae Plantarum*. 31: 861-864.
- Elad Y. and Kapat A. (1999). The role of *Trichoderma harzianum* protease in the biocontrol of *Botrytis cinerea*. *Eur. J. Plant Pathol.* 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 J. Pharma Biolog Chemic. Sci.* 7: 1.
- Elmhirst J. (2006). Profil de la culture des tomates de serre au Canada. Edition : agriculture et agroalimentaire Canada. Canada.50 p.
- Emmert .E. A. B. and Handelsman J. (1999). Biocontrol of plant disease: a ( Gram -) positive perspective. *FEMS Microbiol. Lett.* 171: 1-9.
- Errakhi R. (2008). Contribution d'actinomycètes (Actinobactéries) à la lutte biologique contre *Sclerotium rolfsii* et rôle de l'acide oxalique dans l'induction des mécanismes de défense. Thèse de Doctorat. Université Cadi Ayyad, Marrakech Maroc.
- Essghaier B., Hedi1 A., HajlaouiM. R., Boudabous A. and Sadfi-Zouaoui. N. (2012). In vivo and in vitro evaluation of antifungal activities from a halotolerant *Bacillus subtilis* strain J9. *Afr. J. Microbiolog. Res.*6 (19): 4073-4083.
- Etebarian H.R., Sholberg P.L., Eastwell K.C et Sayler R.J. (2005). Biological control of apple blue mold with *Pseudomonas fluorescens*. *Canadian Journal of Microbiology*. 51: 591-598.
- Farhan H.N., Abdullah B.H. et Hameed A.T. (2010). The biological activity of bacterial vaccine of *Pseudomonas putida* 2 and *Pseudomonas fluorescens* 3 isolates to protect sesame crop (*Sesamum indicum*) from *Fusarium* fungi under field conditions. *Agriculture and Biology Journal of North America*. 1(5): 803-811.
- Fernaldez-Acero F.J., Carbu M., Garrido C., Vallejo. I. and M.J Cantoral. (2007). Proteomic Advances in Phytopathogenic Fungi. *Current Proteomics*, 4 (2): 79-88.

- Fernando W.G.D., Nakkeeran S. and 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.
- Firlej.A et Vanoosthuysse. (2001). La lutte intégrée et l'exemple de la punaise translucide : un auxiliaire promoteur pour la pomiculture au Québec. *Vertigo- la revue électronique des sciences de l'environnement*. 2(2).
- Gagnon. S, Chouinard. G et Semeesters. E. (2000). Méthodes alternatives à la lutte chimique en pomiculture : principales techniques applicables au Québec. Saint-Laurent.
- Ganeshan, G & Manoj Kumar,A. (2005). *Pseudomonas fluorescens*, a potential bacterial antagonist to control plant diseases, *Journal of Plant Interactions*, 1(3): 123-134.
- GAUTHIER Alban . (2016). Les mycotoxines dans l'alimentation et leur incidence sur la santé. Thèse de doctorat. Science pharmaceutique. Université de Bordeaux. France.
- Geiser.D.M, Klich.M.K , Frisvad.J.C, Peterson. S.W, Varga. J and Samson. R.A. (2007). The current status of species recognition and identification in *Aspergillus*. *Studies in microbiology*, 59: 1-10.
- Gerhardson B. (2002). Biological substitutes for pesticides. *Trends in Biotechnology*.20. (8): 338-343.
- Glick B R. (2005). Modulation of plant ethylene levels by the bacterial enzyme ACC deaminase. *FEMS microbial let.* 1; 251 (1): 1-7.
- Glick.B. R. (2012). Plant Growth-Promoting Bacteria: Mechanisms and Applications. *Hindawi Publishing Corporation Scientifica*.
- Gorlach.J, Volrath. S, Knauf-Beiter. G, Hengy. G, Beckhove. U, Kogel. K.H , Oostendorp.M, Staub. T, Ward. E, Kessmann. H, and Ryals. J. (1996). Benzothiadiazole, a Novel Class of Inducers of Systemic Acquired Resistance, Activates Gene Expression and Disease Resistance in Wheat. *The Plant Cell*, Vol. 8, 629-643.

- Grobelak Anna, Anna Napora & Małgorzata Kacprzak. 2014. The impact of plant growth promoting bacteria (PGPB) on the development of phytopathogenic fungi. Institute of Environmental Engineering, Poland. *Folia Biologica et Oecologica* 10: 107–112
- Guergazi S, Yahiaoui K, Amimeur D et Achour S. (2014). Impact du procédé de la chloration sur la qualité des eaux de surface algériennes. *Mater. Environ. Sci.* 5, 2028-2508.
- Gugnani Harish C. (2003). Ecology and taxonomy of pathogenic *Aspergilli* *Frontier in bioscience*; 8: 346-357.
- Gupta G, Singh Parihar S, Kumar Ahirwar N, Kumar Snehi S et Singh V. (2015). Plant Growth Promoting Rhizobacteria (PGPR) : Current and Future Prospects for Development of Sustainable Agriculture. *J Microb Biochem Technol.* Volume 7(2), 96-102.
- Guyader Sebastien. (2020). Maladies cryptogamiques : méthodes de lutte. Master biologie-santé. hal-02791127
- Haas, D., & Defago, G. (2005). Biological control of soil-borne pathogens by *pseudomonads fluorescent* . *Nature Reviews Microbiology*, 3: 307-319.
- Haggag,W.M., Mohamed, H.A.-L.A., 2007. Biotechnological aspects of microorganisms used in plant biological control. *Am.-Eurasian J. Sustain. Agric.* 1: 7– 12.
- Han J, Sun L, DongX, Cai Z, Sun X, Yang H, Wang Y, Song W. 2005. Characterization of a novel plant growth-promoting bacteria strain *Delftia tsuruhatensis* HR4 both diazotroph and a potential biocontrol agent against various plant pathogens. *Syst Appl Microbiol* 28(1): 66-76.
- Handelsman J. and Stabb E.V. 1996. Biocontrol of Soilborne Plant Pathogens. *The Plant Cell*, 8: 1855-1869.
- Hardie M. and Doyle R. 2012. Measuring Soil Salinity. *In: S. S. and C. T. A. (eds.) Plant Salt Tolerance: Methods and Protocols, Methods in Molecular Biology.* Springer Science+Business Media LLC, Netherlands. 913: 415-425
- Hassen W.; Bano R .; Bashir F et David J. (2014). Comparative effectiveness of ACC-deaminase and/or nitrogen-fixing rhizobacteria in promotion of maize (*Zea mays* L.) growth under lead pollution. *Comparative study. Environ Sci pollut res int.* 21(18): 10983-96.
- HEIT,S. (2015). Identification de *Fusarium* et détection des mycotoxines associées par MALDI-TOF. Thèse de Doctorat en Pharmacie.

- Henfling J W. (1987). Le mildiou de la pomme de terre. Bulletin d'informations techniques 4.
- Hocking. D, Pitt.J. I, Samson.R.A et Thrane.U. (2006). Advances in food mycology. Springer science. Business media, Inc, New York.
- Houbraken J H., Kocsubé S., Visagie C M., Yilmaz N., Wang X C., Meijer M., Kraak B., Hubka V., Bensch K., Samson A R., Frisvad J C.( 2020). Classification of *Aspergillus*, *Penicillium*, *Talaromyces* and related genera ( eurotiales): an overview of families, genera, subgenera, sections, series and species. Studies in mycology. 95: 5-169.
- Islam M.T et Hossain M.M. (2013). Biological control of perono streptomycete phytopathogen by bacterial D.K (eds). Bacteria in agribiology: Disease Management. 176-218.
- Jaradat Z., Dawagreh A., Ababneh Q. and Saadoun I. (2008). Influence of culture conditions on cellulose production by *Streptomyces* sp. (strain j2). Jordan journal of biological sciences. 1: 141-146.
- Jarvis. W.R., (1977). Botryotinia and Botrytis Species. Taxonomy, physiology and pathogenicity. A guide to the literature. Canada. Monograph No. 15.
- Jemni M., Maaroufi A et Mejri S. (2009). Caractérisation et optimisation des conditions de croissance d'un biopesticide bactérien. Revue des Régions Arides. Jerba, Tunisie. 1367- 1370.
- Jijakly M.H. (2003). La lutte biologique en phytopathologie, *In; Phytopathology. Lepoivre P. (Eds). De Boeck, Bruxelles.*
- Khabbaz, S.E.; Ladhakshmi, 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.
- Khalid A., Arshad M., Zahir Z A. (2004).Screening plant growth-promoting rhizobacteria for improving growth and yield of wheat. J App microbial. 96(3): 473-80.
- Khan N I; Filonow A B and Singleton L L. (1997). Augmentation of soil with *sporangia* of *Actinoplanes* spp for biological control of *pythium damping-off*. Biocontrol sci. technol.7: 11-22.
- 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. Can J Microbiol 53(2): 159-167.

- Kloepper J.W. (1994). Plant Growth Promoting Rhizobacteria. *In* Okon Y. (eds.), *Azospirillum /Plant Associations*. CRC Press, Boca Raton, FL.137-166.
- Knudsen G. R. (2013). *Phytopathologie : étude de la santé des plantes*, 1<sup>ère</sup> édition, université d'Idaho. Moscow USA.
- Krajewska B. (2009).” Urease i. Funcional, catalytic and kinetic properties: A 604 review.” *Journal of molecular catalysis B: Enzymatic*. 59(1-3): 9-21.
- Lachuer. EN. , (2010). *Les produits phytosanitaires. Distribution et Application Tome 1. Les différentes méthodes de lutte et le choix d'un produit en lutte chimique*.
- Lee, Y., Kim B., Jo K., Lee N., Chung C. and Lee J. (2007). Purification and characterization of cellulose produced by *Bacillus amyloliquefaciens* DL3, utilizing rice hull *Bioresource Technology*. 98(2): 288-297.
- Lahlali R., Ezrari S., Redouane N., Kenfaoui J., Esmael Q., EL hamss H., Belabess Z and Ait barka J. (2022). Biological control of plant pathogens: A global prespective. *Microorganisms*, 9;10 (3):596 .
- Lepoivre, P. 2003 - *Phytopathologie*. Editions De Boeck Université, Belgique, 427 p.
- Leroux. P. (2003). *Mode d'Action des Produits Phytosanitaires sur les Organismes Pathogènes des plantes. Biologie et Pathologie Végétale.C. R. Biologies326 : 9–21*.
- Leyral G et Joffin J.N. (2001). *Microbiologie technique. Tome 2. Document technique* 2<sup>ème</sup> édition. CRDP De Bordeaux.
- Lorito M., Peterbauer C., Hayes C.K. and Gary E. Harman. (1994). Synergistic interaction between fungal cell wall degrading enzymes and different antifungal compounds enhances inhibition of spore germination. *Microbiol*, 140: 623-629.
- Lurol S .; Landry P et Bony P. (2016). *Comptabilité se stockage a courte durée, impact de l'éthylène sur les fruits et légumes*. INFO CTIFL (319).
- Maleki M., Mostafae S., Mokhtarnejad L. and Farzaneh M. (2010). Characterization of *Pseudomonas fluorescens* strain CV6 isolated from cucumber rhizosphere in Varamin as a potential biocontrol agent. *Aust. J.Crop. Sci*, 9: 676-683.

- Malik D.M. and Sindhu S.S. (2011). Production of indole acetic acid by *Pseudomonas* sp.: effect of coinoculation with *Mezorhizobium* sp. Cicer on nodulation and plant growth of chickpea (*Cicer arietinum*). *Physiol Mol Biol Plants*. 17 (1): 25-32.
- Mantelin S and Touraine B. (2004). Plant Growth-Promoting Bacteria and Nitrate Availability: Impacts on Root Development and Nitrate Uptake. *Journal of Experimental Botany*. 55: 27-34.
- Martínez-Viveros O., M.A. Jorquera, D.E. Crowley, G. Gajardo et M.L. Mora.(2010). Mechanisms and Practical Considerations Involved in Plant Growth Promotion by Rhizobacteria. *J. Soil Sci. Plant Nutr*, 293 – 319.
- Matthew J.J., Vazhacharickal P.J., Sajesh hkumar NK and Ashokan A. (2016). Amylase production by *Aspergillus niger* through submerged fermentation using starchy food byproducts as substrate. *International journal of herbal medicine*. 4(6): 34-40.
- Mathieu C. and Pieltain F.( 2003). Prélèvement et préparation des échantillons de terre, *In Analyse chimique des sols « méthodes choisies »* Edition TEC&DOC. 1-22.
- Mathulakshmi. C., Duraisamy G., Kumar. D.G., Ravikumar. G., Kalaiselvi. M et Uma. C. (2011). Production, purification and characterization of protease by *Aspergillus flavus* under solid state fermentation. *Biological science*.
- Meena B. (2014). Biological Control of Pest and Diseases Using Fluorescent Pseudomonads. *In K. Sahayaraj (eds.), Basic and Applied Aspects of Biopesticides*. 17-29.
- Messiaen, C. M., et Cassini.R. (1968). La recherche sur les fusarioses. IV- La systémique fusarium.*Ann.Epiphyt*. 19 : 387-454
- Meyer J R. (2003). Pest control tactics chap 19. Department of entomology NC state university.
- Montealegre J.R., Reses R., Perez L.M., Herrera R., Silva P et Besoain X. (2003). Selection of bioantagonistic bacteria to be use in biological control of *Rhizoctonia solani* in tomato. *Electronic Journal of Biotechnology*. 6(2): 115-127.
- Moss Maurice O. (1987). Morphology and physiology of *Penicillium* and *Acremonium*. Springer science, business media, 2.
- Nabti E.H., Bensidhoum L., Tabli N., Dahel D., Weiss A., Rothballer M., Schmid M. and 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 northwestern Algeria. *Europ. J. Soil Biolog*. 61: 20-26.

- Nasraoui , B. (2006). Les champignons parasites des plantes cultivées, biologie, systématique, pathologie, maladies. Centre de publication universitaire, Tunisie. P 456.
- Nasraoui B. (2008). Principales maladies fongiques des céréales et des légumineuses en Tunisie. Main Fungal diseases of cereals in Tunisia. Centre de publication universitaire. Tunisie
- Nelson P. E. , Dignani M. C., and Anaissie E. J. (1994).“Taxonomy, biology, and clinical aspects of Fusarium species.” *Clin. Microbiol. Rev.*7 (4): 479–504.
- Nermeen A.E., Hanan A., Gehan M.A., Hassan A.H.I et Nabil M.K.E. (2005). Optimization, economization and characterization of cellulose produced by marine *Streptomyces ruber* . *Africa journal of biotechnology*. 9: 6355-6364.
- Nierman WC et Nelson KE. (2002). Genomics for applied microbiology. *Adv Appl Microbiol*, 51: 201-45.
- Niwas R., Chand G., Vishwakarma R and Maurya S. (2011). Cultural practices in sustainable plant disease management: the innovative approaches. Chapter11. New Delhi.
- Orozco-Mosquedaa M D C.; Glick B R et Santoyo G. (2020). ACC deaminase in plant growth-promoting bacteria (PGPB): An efficient mechanism to counter salt stress in crops. *Microbiological Research* 235.
- Pal K.K. and Gardener B.Mc.S. (2006). Biological Control of Plant Pathogens. *The Plant Health Instructor* DOI: 10.1094/PHI-A-2006-1117-02.
- Pal, M., Dave, P, and Manna, A. K. (2014). Emerging role of *Aspergillus flavus* in human and animal disorders. *Journal of Mycopathological research*. 52: 211-216.
- Palmero. D, J. M. Rodríguez, M. de Cara, F. Camacho, C. Iglesias, and J. C. Tello. (2010). “Fungal microbiota from rain water and pathogenicity of Fusarium species isolated from atmospheric dust and rainfall dust,” *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* 38(1): 13–20.
- Perez-Montano. F., Alias- Villegas. C., Bellogin. R. A, Cerro. P.A, Espuny. M.R. Jiménez-Guerrero. I, Lopez-Baena. F.J. et Cubo. T. 2013. Plant growth promotion in cereal and leguminous agricultural important plants: From microorganism capacities to crop production. *Microbiological Research*. 169, 325-336.
- Pezet, R., Viret,O., and Gindro,K. (2004) . Plant-microbe interaction : The Botrytis grey mould of grapes-biology, biochemistry, epidemiology and control

management. In: *Advances in Plant Physiology* (Hemantaranjan A., ed ), Scientific publishers, Jodhpur, India, 7: 71-116.

- Pieterse. Corné.M.J et Van Loon. L.C. (2007). Chapter 4 : Signalling cascades involved in induced resistance. *Phytopathology*, Institute of Environmental Biology, Utrecht University, The Netherlands. 65-88.

- Pitt J.I et Hocking A.D. (1997). *Fungi and food spoilage*. 2<sup>ème</sup> Edition. London : Blackie Academic and Professional.

- Ponmurugan P. and Gopi C. (2006). In vitro production of growth regulators and phosphatase activity by phosphate solubilizing bacteria. *Afr. J. Biotechnol*, 54: 348– 350.

- Rai A., Bensidhoum L., Tabli N., Bouaoud Y., Naili F., Cruz C. et Nabti E. (2016). A *Pseudomonas Protegens* with High Antifungal Activity Protects Apple Fruits Against *Botrytis Cinerea* Gray Mold. *I.J.S.R.S.T*, 2 (6): 227-237.

- Rai A.2017. Effet du stress salin sur les bactéries du sol : rôle d'extraits dérivés de *Enteromorpha intestinalis*, *Ulva lactuca* et *Opuntia ficu-indica* sur la relation bactérie-plante sous stress salin. Thèse de doctorat 3ème cycle. Université Ferhat Abas Sétif 1. 246p

- 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 Prot*.20: 1-11.

- Ramette A., Frapolli M., Le Saux M.F., Gruffaz C., Meyer J.M., Défago G. Sutra L. and Moëgne-Loccozy.Y. (2011). *Pseudomonas protegens* sp . nov.,widespread plant producing the biocontrol compounds 2, 4- diacetylphloroglucinol and pyoluteorin. *Syst. Appl.Microbiol*, 34:180-188.

- Ramette Alban, Michele Frapolli, Geneviève Défago, et Yvan Moëgne-Loccozy. (2003). Phylogeny of HCN Synthase-Encoding hcnBC Genes in Biocontrol Fluorescent *Pseudomonads* and Its Relationship with Host Plant Species and HCN Synthesis Ability. *16(6): 525–535*.

- Renard Jean-Luc, De Franqueville Hubert. (1989). La fusariose du palmier a l'huile. *Oléagineux*, 44 (7) : pp. 341-349.

- Rochat A ; Lebleu F et Schwitter P. (2021). la septoriose du céleri. Bio actualites. Ch. FIBL.

- Roger, Pierre & Dommergues, Y. & Balandreau, J. & Dreyfus, Bernard & Sougoufara, B. (1996). La fixation biologique de l'azote : quelles potentialités pour le développement ? : conférence-débat de l'ORSTOM.

- Rouag noureddine.. (2022). Pathologie et protection des plantes.
- Schiffers Bruno et Christine Moreira. (2011). Fondements de la protection des cultures, manuel 7. PIP / COLEACP.
- Seitz I., Sauer D.B., Mohr H.E. et Aldis D.F. (1982). Fungal growth and dry matter loss during bin storage of high-moisture com. *Cereal Chemistry*. 59: 9-14.
- 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.
- Singh A., Mehta S., Singh H.B et Nautiyal C.S. (2003). Biocontrol of collar rot disease of betelvine (piper betle L) caused by *Sclerotium rolfsii* by using rhizosphere competent *Pseudomonas fluorescens* NBRI –N6 and *P. Fluorescens* NBRI-N. *Current Microbiology*. 47: 153-158 .
- Singleton P. (2005). Bactériologie : Pour la médecine, la biologie et la bactériologie. 6ème édition. Dunod-Paris. 480-490.
- Sirko Agnieszka, and Brodzik Robert.(2000). Plant Ureases: Roles and Regulation. *Acta Biochimica Polonica. Institute of Biochemistry and Biophysics, Polish Academy of Sciences*, Vol. 47 No. 4/2000.1189–1195.
- 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.
- Smeesters E., Chouinard G. and Gagnon. S. (2000). Méthodes alternatives de lutte chimique en pomiculture : Principales Techniques Applicables au Québec.ISBN2-550-37101-1.
- Soursac M L. (1922). La pourriture du collet de la laitue et la chicorée. Directeur des services agricoles des Pyrénées orientales. *Journal d’agriculture traditionnelle et de botanique appliquée*. 562p.
- Srividya S, Sasirekha B, Ashwini N. (2012). Multifarious antagonistic potentials of rhizosphere associated bacterial isolates against soil borne diseases of Tomato. *Asian J Plant Sci Res*.2(2):180–186.
- Sticher, L., B. Mauch-Mani & J.P. Métraux, (1997). Systemic acquired resistance. *Annu Rev Plant Pathol* 35: 235–270.

- Summerell. B.A, Salleh. B, Leslie. J.F, “A utilitarian approach to *Fusarium* identification,” Plant Dis., vol. 87, no. 2, pp. 117–128, 2003.
- 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 and Mergias M.G. (2014). Impact of diazotrophic bacteria on germination and growth of tomato, with biocontrol effect, isolated from Algeria soil. Journal of ecology of health and environment. 2(1): 1-7.
- Tabli Nassira., Rai Abdelwahab., Bensidhoum Leila., Palmieri Gianna., Gogliettino Marta., Cocca Ennio., Consiglio Carmela., Cillo Fabrizio., Bubici Giovanni et Nabti Elhafid. (2017). Plant growth promoting and inducible antifungal activities of irrigation well water-bacteria. Biological Control. 117 : 78-117.
- TABUC Cristina . (2007). Flore fongique de différents substrats et conditions optimales de production des mycotoxines. Thèse de doctorat. Pathologie, mycologie, génétique et nutrition. Institut national polytechnique de Toulouse et de l’université de Bucarest.
- Toure Y., Ongena M., Jacques P., Guiro A et Thonart P. (2004). Role of lipopeptides produced by *Bacillus subtilis* GA1 in the reduction of grey mould disease caused by *Botrytis cinerea* on appel. Applied Journal of Microbiol. 96: 1151-1160.
- Toussaint V. (1996). Caractérisation d’un antibiotique produit par la souche d’actinomycète EF-76 antagoniste à *Phytophthora Fragariae* var. *rubi* causant le pourridié des racines du framboisier. Mémoire de Maitrise ès science. Université de Sherbrooke, Québec, Canada.
- Toussaint, V., Valois, D., Dodier, M., Faucher, E., Déry, C., Brzezinski, R., Ruest, L. & Beaulieu, C. (1997). Characterization of actinomycetes antagonistic to *Phytophthora fragariae* var. *rubi*, the causal agent of raspberry root rot. Phytoprotection, 78(2) : 43–51.
- Tsegaye Z., Assefa F. and Beyene D. (2017). Properties and Application of Plant Growth Promoting Rhizobacteria. Int. J. Curr. Trend. Pharmacobiol. Med. Sci. 2 1: 30-43.

- Van Loon. L.C, P. A. H. M. Bakker, and C. M. J. Pieterse. (1998). SYSTEMIC RESISTANCE INDUCED BY RHIZOSPHERE BACTERIA. *Annu. Rev. Phytopathol.* 36:453–83.
- Vidyalakshmi.R ., Paranthaman. R and Indhumathi. J. (2009). Amylase Production on Submerged Fermentation by *Bacillus* spp. *World Journal of Chemistry.* 4 (1): 89-91.
- Vincent. C et Panneton. B. (2001). Les méthodes de lutte physiques comme alternatives aux pesticides ; *vertigio*, 2(2).
- Vinoth RS; Kanikkai RA; Babu VA; Manoj GT; Naman HS; Johnson AJ; Infant SB et 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): 008–013.
- Visagie. C.M, Hou braken.J, Frisvad.J.C , S.-B. Hong, C. H. W. Klassen, G. Perrone, K.A. Seifert, J. Varga, T. Yaguchi and R. A. Samson. (2013). Identification and nomenclature of the genus *Penicillium*. *Studies in mycology*, 78: 343-371.
- Vitullo D, Di Pierto A, Romano A, Lanzotti V et Lima G. (2012). Role of new bacterial surfactins in the antifungal interaction between *Bacillus amyloliquefaciens* and *Fusarium oxysporum*. *Plant Pathology.* 61: 689-699.
- 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.
- Weyens N, Monchy S, Vangronsveld J, Taghari et Lelie DV. (2010). *Plant-Microbe Partnerships* (ed.), *Handbook of Hydrocarbon and Lipid Microbiology.* p. 547-257.
- Whipps J. (2001). Microbial interactions and growth in the rhizosphere. *J. Exp. Bot.* 52: 487-511.
- Whipps J. M. and McQuilken M.P. (2009). Biological control agents in plant disease control. *In* D. Walters (eds.), *Biological control agents in plant disease control.* 39-61.
- Williams G.F., Asher M.J.C. (1996). Selection of rhizobacteria for the control of *Pythium ultimum* and *Aphanomyces cochliodes* on sugar-beet seedlings. *Crops Protection.* 15: 479-486.

- Zakharova, E.A., Shcherbakov, A.A., Brudnik, V.V., Skripko, N.G., Bulkhin, N.S., Ignatov, V.V. (1999). Biosynthesis of indole-3-acetic acid in *Azospirillum brasilense*. *Eur. J. Biochem.* 259 : 572–576.
- Zhou Yi, Yuan Xiaochen, Liang Xu-Fang, Liu Fang, Jie Li, Xiaoze Guo, Xiaoli Bai, Shan He. (2013). Enhancement of growth and intestinal flora in grass carp: The effect of exogenous cellulose. *Aquaculture* 416–417 (2013) 1–7.

# **Annexes**

**Annexe I : Composition des milieux de culture utilisés (pour un litre de milieu)****➤ Gélose nutritive (GN)**

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

**➤ Luria Bertani (LB)**

<b>Composition</b>	<b>Quantité (g)</b>
NaCl	5
Tryptone	10
Extrait de levure	5
pH	7.2±0.2

**➤ PotatoDextrose Agar (PDA)**

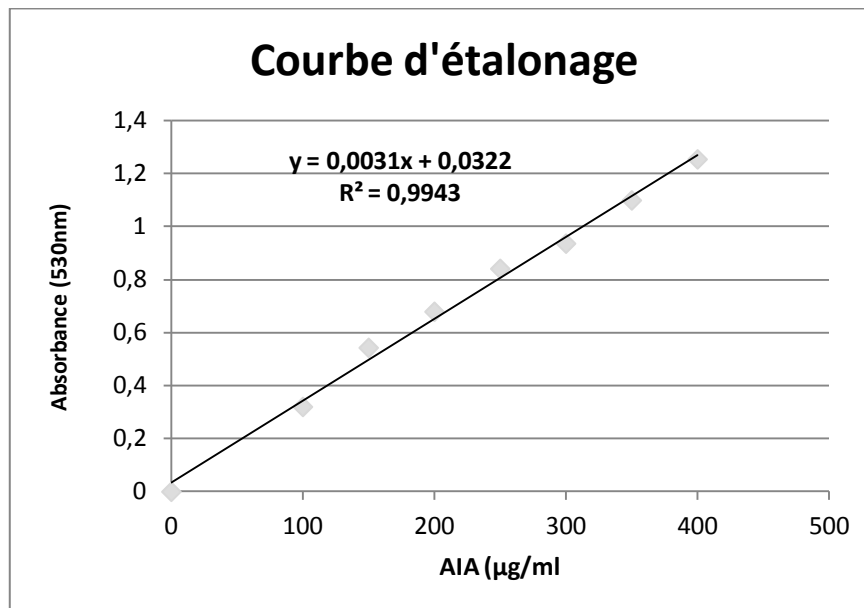
<b>Compositions</b>	<b>Quantité (g)</b>
Pomme de terre	200
Glucose	20
Agar	15
pH	5.4±0.2

**➤ Agar à l'extrait de malt(EM)**

<b>Compositions</b>	<b>Quantité(g)</b>
Extrait de malt	30
Peptone mycologique	5
Agar	15
pH	5.4± 0.2

**➤ Milieux Brain Heart Infusion Broth (BHIB)**

<b>Composition</b>	<b>Quantité(g)</b>
Peptone-protéase	10
Infusion de cervelle de veau	12,5
Infusion de cœur bœuf	5
Glucose	2
Chlorure de sodium	5
Hydrogénophosphate de sodium	2,5
pH	7,4

**Annexe II: Courbe d'étalonnage de l'AIA.****Annexe III : Coloration de Gram.**

## Préparation d'un frottis

- Déposer sur une lame propre une goutte d'eau distillée stérile.
- Prélever une colonie à l'aide d'une anse de platine stérile.
- Dissocier soigneusement la colonie dans la goutte d'eau, puis sécher et fixer le frottis au-dessus de la flamme de bec benzène sans trop chauffer (Leyral et Joffin, 2001).

Une fois refroidis, on entame la coloration de Gram :

- Recouvrir la lame avec du violet de Gentiane et laisser agir 1 minute.
- Recouvrir la lame de Lugol et laisser agir 45 secondes.
- Rincer rapidement à l'eau de robinet et éliminer l'excès d'eau.
- Décolorer la lame avec de l'alcool pendant 30 secondes.
- Rincer rapidement à l'eau de robinet.
- Recouvrir la lame de la fuchsine pendant 1 minute.
- Rincer rapidement à l'eau de robinet.
- Sécher puis observer au microscope grossissement  $\times 1000$  (Singleton, 2005).

## Résumé

En vue des risques croissants des maladies des plantes causées par les champignons phytopathogènes, une première étape de recherche et de sélection de bactéries à pouvoir antifongique a été effectuée dans ce présent travail.

Des échantillons d'eau prélevés d'un puits agricole situé au village Djebira (wilaya de Bejaia) ont fait l'objet de cette étude. 30 isolats 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 cinq champignons phytopathogènes à savoir ; *Aspergillus niger*, *Aspergillus flavipes*, *Penicillium sp*, *Fusarium sp* et *Botrytis sp*. Les meilleurs isolats sélectionnés sont testés pour leurs production de métabolites d'intérêt agricole; production de l'AIA phytohormone et les enzymes lytiques (amylase, protéase, lipase, cellulase, estérase, chitinase et uréase). Les résultats obtenus ont montré que la moitié des isolats ont inhibé la croissance mycélienne d'au moins un champignon dans le test de confrontation directe sur boîtes, avec des PGI% qui varient entre 20 à 79,41%. L'isolat I2 par contre été efficace à l'égard des cinq champignons testés. La plus part des isolats étudiés produisent la majorité des enzymes recherchées, à l'exception de l'uréase. L'AIA phytohormone est produite par 46.66% d'entre eux.

Ces résultats ne nous permettent pas d'expliquer exactement les mécanismes d'antagonisme par lesquels ces isolats ont inhibé le développement des champignons phytopathogènes, mais il a été clairement déterminé que la cohabitation entre les isolats inhibiteurs et les champignons phytopathogènes n'est pas possible. Les isolats sélectionnés peuvent être une alternative efficace pour remplacer les pesticides chimiques et veiller sur la bonne santé et la meilleure croissance des plantes.

**Mots clés :** Puits d'irrigation, isolats, champignons, agents de biocontrôle, plant growth promoting bacteria (PGPB).

## Abstract

In view of the increased risks of plant diseases caused by phytopathogenic fungi, a first stage of research and selection of bacteria with antifungal power was carried out in this present work.

Water samples taken from an agricultural well located in the village of Djebira (wilaya of Bejaia) were the subject of this study. 30 isolates were applied on the basis of a difference in the phenotypic appearance on boxes, then tested for their ability to inhibit the growth of five phytopathogenic fungi, namely; *Aspergillus niger*, *Aspergillus flavipes*, *Penicillium* sp, *Fusarium* sp and *Botrytis* sp. The best selected isolates are tested for their production of metabolites of agricultural interest; production of the phytohormone AIA and lytic enzymes (amylase, protease, lipase, cellulase, esterase, chitinase and urease). The results obtained showed that half of the isolates inhibited the mycelial growth of at least one fungus in the direct confrontation test on dishes, with IGP% varying between 20 and 79.41%. Isolate I2, on the other hand, was effective against the five fungi tested. Most of the isolates sought produce the majority of the enzymes sought, with the exception of urease. The phytohormone AIA is produced by 46.66% of them.

These results do not allow us to explain exactly the mechanisms of antagonism by which these isolates inhibited the development of phytopathogenic fungi, but it was clearly determined that the cohabitation between the prohibited isolates and phytopathogenic fungi is not possible. Selected isolates can be an effective alternative to replace chemical pesticides and ensure the health and best growth of plants.

**Keywords:** Irrigation wells, isolates, fungi, biocontrol agents, plant growth promoting bacteria (PGPB).