

**République Algérienne Démocratique et Populaire**  
**Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique**  
**Université Mouloud Mammeri de Tizi-Ouzou**  
**Faculté des Sciences Biologiques et des Sciences Agronomiques**  
**Département de Biochimie-Microbiologie**



*Mémoire de fin d'études en vue de l'obtention du  
diplôme de Master en sciences de la nature et de la  
vie*

**Filière : Biotechnologie**  
**Spécialité : Biotechnologie Microbienne**

**THEME**

**Isolement de bactéries à activité antagoniste  
contre les champignons phytopathogènes à  
partir des eaux usées**

**Présenté par :**

**M<sup>elle</sup> REKAÏ Kathia**

**M<sup>elle</sup> ZAFANE Nadia**

**Soutenus devant le jury composé de :**

<b>Président</b>	<b>M<sup>me</sup> LEKSIR C.</b>	<b>Maitre de conférence B à l'UMMTO</b>
<b>Promoteur</b>	<b>M<sup>r</sup> OUELHADJ A.</b>	<b>Professeur à l'UMMTO</b>
<b>Examinatrice</b>	<b>M<sup>me</sup> BENZAOUZ K.</b>	<b>Maitre de conférence B à l'UMMTO</b>

**Année universitaire : 2021/2022**

# *Remerciement*

*Nous remercions très singulièrement notre promoteur monsieur OUELHADJ A. pour avoir accepté diriger ce travail, pour ses conseils , son aide, ses suggestions sur la rédaction de ce mémoire ainsi que la confiance qu'il nous a témoigné tout au long de cette étude.*

*Nos vifs remerciements sont adressés à madame BENAZZOUZ K. pour nous avoir fournis des échantillons de champignons essentiels à notre étude, ainsi qu'à l'ensemble des professeurs de la faculté des sciences biologiques et sciences agronomiques à l'UMMTO qui ont assurés notre formation durant le cursus universitaire.*

*Sans oublier tous le personnel administratif et l'ensemble des ingénieurs du laboratoire de microbiologie de la faculté qui ont été à nos coté tout au long de la période expérimentale.*

*Nos remerciements vont plus particulièrement aux membres du jury composé de Madame LEKSIR C., madame BENAZZOUZ K., et de monsieur OUELHADJ A., qui ont eu l'amabilité de juger ce modeste travail.*

*Nous remercions également le directeur et le personnel de la station d'épuration Est de la ville de Tizi-Ouzou pour leur accueil, ainsi que pour nous avoir permis de faire des prélèvement au sein de leur établissement .*

*Enfin, nos remerciement s'adressent a tous nos camarades en master « biotechnologie microbienne », et plus particulièrement mademoiselle ZERROUKI Lila et monsieur KABICHE Hanine qui ont été un soutien et une aide précieuse pour nous.*

# *Dédicaces*

*je dédie ce modeste travail réaliser grâce à dieu à :*

*Ma famille, elle qui m'a doté d'une éducation digne, son amour a fait  
de moi ce que je suis aujourd'hui*

*A mon chère père Arezki, pour le goût à l'effort que tu as suscité en  
moi, par ta rigueur, tu as toujours été à mes cotés pour m'encourager.*

*Que ce travail traduit ma gratitude et mon affection.*

*A ma chère mère Baya, quoi que je fasse ou quoi que je te dise je ne  
saurai point te remercier comme il se doit. Ton amour et ton affection  
me couvre, ta bienveillance me guide et ta présence à mes cotés a  
toujours été ma source de force.*

*A mon adorable petite sœur Lisa, mon petit frère Juba, que dieu les  
protèges et leur offre la chance et le bonheur.*

*A mes grands parents et ma grand Méré Malha, que dieu leur donne  
une longue et joyeuse vie*

*A ma grand mère enterrée Fatima, tu as été une brave femme*

*A ceux qui m'ont donné de l'amour et de la vivacité*

*A ma chère amie et binôme Nadia et toute sa famille*

*A Lydia, Mélissa, Sarah, Tiziri*

**Kathia**

# *Dédicaces*

*je dédie ce modeste travail à :*

*Ma très chère mère partie beaucoup trop tôt, j'espère que elle sera fière et satisfaite de la personne que je suis devenue , et ce malgré son absence.*

*A mon chère père partie cette année, qui je ne remercierais jamais assez pour m'avoir donné une si bonne éducation et pour s'être occupé de moi pendant toutes ces longues années, ainsi que pour m'avoir transmis de si belles valeurs.*

*j'espère que je serais toujours digne et à la hauteur de leurs espérances.*

*A ma précieuse sœur, qui malgré son jeune âge s'est occupé de moi et m'as éduquée telle une mère le ferait avec sa fille.*

*Je ne la remercierais jamais assez pour tous les sacrifices et les effort qu'elle a fourni pour me donner une enfance des plus équilibrée malgré l'absence de notre mère.*

*Je lui en serai redevable toute ma vie .*

*A mes chères frères, Mohammed-Akli, Nadir et Youcef qui se sont également toujours occupé de moi et qui ont fait en sorte que je ne manque de rien. Que dieu les protèges.*

*A mon amie et binôme Kathia*

**Nadia**

## Liste les figures :

<b>Figure 1 :</b> Symptômes d'alternariose sur feuilles (A) et fruits (B) de tomate .....	13
<b>Figure 2 :</b> Symptômes de pourriture grise causée par <i>B. cinerea</i> sur différents hôtes....	14
<b>Figure 3 :</b> Vue globale de la station d'épuration Est de la ville de Tizi-Ouzou.....	22
<b>Figure 4 :</b> Méthode de recherche des microorganismes à 37°C et à 30°C sur milieu PCA pour les entérobactéries et milieu CCA pour les bactéries hétérotrophes .....	25
<b>Figure 5 :</b> Schéma représentatif des étapes de réalisation de la l'antibiogramme.....	37
<b>Figure 6 :</b> Schéma représentatif des étapes de la réalisation d'un teste d'antagoniste....	40
<b>Figure 7 :</b> Culture pure d' <i>E. coli</i> .....	42
<b>Figure 8 :</b> Culture pure des Coliformes.....	42
<b>Figure 9 :</b> Culture pure de bactérie hétérotrophe.....	43
<b>Figure 10 :</b> Résultats de l'antibiogramme sur des Coliformes.....	48
<b>Figure 11 :</b> Résultats de l'antibiogramme de Bacille G (-).....	49
<b>Figure 12:</b> Résultats de l'antibiogramme de <i>E. coli</i> .....	49
<b>Figure 13 :</b> Pourcentage Des bactéries résistantes isolées à partir des eaux usées face aux diffèrent antibiotiques.....	50
<b>Figure 14:</b> Résultats de l'antagonisme direct des bactéries isolées sur <i>Alternaria</i> sp...	52
<b>Figure 15:</b> Résultats de l'antagonisme direct des bactéries isolées sur <i>botrytis cinerea</i> (après 72heures).....	53
<b>Figure 16:</b> Diagramme représentant les pourcentages d'inhibition de la croissance mycélienne en confrontation directe avec les bactéries antagonistes.....	54

## Liste les tableaux :

<b>Tableau I :</b> La classification générales des champignons phytopathogènes et leur caractéristiques.....	10
<b>Tableau II :</b> Quelques maladies fongiques qui touchent les plantes.....	11
<b>Tableau III :</b> Principaux avantages et inconvénients de la lutte chimique.....	17
<b>Tableau IV :</b> Principaux avantages et inconvénients de la lutte biologique.....	20
<b>Tableau V :</b> Résultats du dénombrement des bactéries hétérotrophes et des entérobactéries.....	41
<b>Tableau VI :</b> Résultats de l'examen macroscopique sur les souches isolées des eaux usées.....	44
<b>Tableau VII :</b> Résultats de l'examen macroscopique sur les souches isolées des eaux traitées.....	44
<b>Tableau VIII :</b> Résultats de l'observations microscopique sur les souches isolées à partir des eaux usées ( culture de 24h).....	45
<b>Tableau IX:</b> Résultats de l'observation microscopique sur les souches isolées à partir des eaux usées ( culture de 48h).....	46
<b>Tableau X:</b> Résultats de la galerie biochimique des souches isolées à partir des eaux usées.....	47
<b>Tableau XI :</b> Résultats des diamètres d'inhibition des souches isolées à partir des eaux usées.....	47
<b>Tableau XII:</b> Détermination des profils de sensibilité aux antibiotiques des bactéries isolées à partir des eaux usées, selon la norme française de l'antibiogramme.....	48
<b>Tableau XIII:</b> taux d'inhibition de la croissance mycélienne en confrontation directe avec les bactéries antagonistes.....	51

## Liste des abréviations

**ADN** : Acide désoxyribonucléique.

**Bacille G (-)** : Bacille Gram négatif.

**LPS** : Lipopolysaccharides.

**STEP** : Station d'épuration des eaux usées.

**PCA** : Plate Count Agar.

**CCA** : Chromocult Coliform Agar.

**MH** : Muller Hinton.

**GN** : Gélose Nutritive.

# Table des matières

Liste des figure	
Liste des tableaux	
Liste des abréviations	
Introduction .....	1

## Partie bibliographique

### Premier chapitre : Agents pathogènes dans les eau usées.

1. Les agents pathogènes des eaux usées.....	3
1.1. Les entérobactéries.....	3
1.1.1. <i>Escherichia coli</i> .....	3
1.1.2. <i>Les coliformes</i> .....	3
1.1.3. <i>Salmonella</i> et <i>Sheigella</i> .....	3
1.1.4. <i>Campylobacter</i> et <i>Yersinia</i> .....	3
1.1.5. <i>Proteus</i> sp.....	4
1.1.6. <i>Serratia</i> sp.....	4
1.1.7. <i>Klebsiella</i> .....	4
1.2. Les bactéries hétérotrophes.....	4
1.2.1. <i>Legionella</i> .....	4
1.2.2. Les mycobactéries.....	5
1.2.3. <i>Aeromonas</i> .....	5
1.2.4. <i>Helicobacter pylori</i> .....	5
2. Caractéristiques communes.....	5
2.1. Habitat .....	5
2.2. Pouvoir pathogène .....	5
3. Antibiorésistance .....	5
3.1. Les antibiotiques .....	5
3.2. La résistance bactérienne.....	6
3.3. Les différents types de résistance bactérienne aux antibiotiques.....	7
3.3.1. La résistance naturelle .....	7
3.3.2. La résistance acquise.....	7
3.4. Mécanismes de la résistance bactérienne aux antibiotiques .....	7
3.4.1. Mécanismes génétiques .....	7
3.4.1.1. Résistance chromosomique.....	7
3.4.1.2. Résistance extra-chromosomique.....	8
3.4.2. Mécanismes biochimiques.....	8
3.4.2.1. Diminution de la perméabilité membranaire.....	8
3.4.2.2. Efflux actif.....	8

3.4.2.3. Production d'enzymes inactivantes.....	8
3.4.2.4. La modification de la cible.....	8

## **Deuxième chapitre : Les champignons phytopathogènes**

1. Les champignons phytopathogènes .....	9
2. Classification des champignons phytopathogènes.....	9
3. Les maladies cryptogamiques.....	11
4. Principaux groupes fongiques contaminant des produits agricoles.....	12
4.1. Le genre <i>Alternaria</i> sp.....	12
4.1.1. L'Alternariose .....	12
4.2. <i>Botrytis cinerea</i> .....	13
4.2.1. La pourriture grise.....	14

## **Troisième chapitre : Les moyens de lutte contre les maladies cryptogamiques**

1. Les moyens de lutte contre les maladies cryptogamiques.....	15
1.1. La lutte chimique.....	15
1.1.1. Les fongicides.....	15
1.1.2. Classification des fongicides.....	15
1.1.3. Mode d'action des fongicides.....	16
1.1.4. Avantages et inconvénients de la lutte chimique.....	17
1.2. La lutte biologique .....	17
1.2.1. Antagonisme bactérien.....	17
1.2.2. Antibiose .....	18
1.2.3. La compétition.....	18
1.2.4. Parasitisme .....	18
1.2.5. Production de sidérophores .....	18
1.2.6. Induction des systèmes de résistance de la plante hôte.....	18
1.2.7. Biopesticides.....	19
1.2.8. Avantages et inconvénients de la lutte biologique.....	20

## **Partie expérimentale**

### **Premier chapitre : Matériels et méthodes**

1. Matériels .....	21
1.1. Appareillage et outillage.....	21
1.2. Produits chimiques et milieux de cultures.....	21
1.3. Matériel biologique.....	21
2. Méthodes.....	21
2.1. Présentation de la zone d'échantillonnage.....	21
2.2. Echantillonnage.....	22
2.3. Analyses bactériologiques.....	23
2.3.1. Dénombrement des germes bactériens.....	23
2.3.2. Isolement de colonies pures.....	26

2.3.3. Identification des isolats.....	26
2.3.3.1. Etude macroscopique.....	27
2.3.3.2. Etude microscopique.....	27
2.3.3.3. Etude biochimique.....	28
2.3.4. Réalisation d'un repiquage.....	35
2.3.5. Réalisation de l'antibiogramme.....	35
2.3.6. Antagonisme .....	38

## **Deuxième chapitre : Résultats et discussion**

1. Résultats de l'analyse bactériologique.....	41
1.1. Dénombrement des entérobactéries et des bactéries hétérotrophes.....	41
1.2. Isolement des souches pures .....	42
1.3. Résultats de l'identification .....	43
1.4. Résultats de l'antibiogramme .....	47
1.5. Résultats de l'antagonisme.....	51
Conclusion .....	55
Références bibliographique .....	56
Annexes .....	65

## ***Introduction générale***

### Introduction

L'agriculture constitue la base de l'économie. Malheureusement celle-ci est soumise à plusieurs contraintes. Les producteurs sont confrontés à diverses maladies qui s'attaquent aux cultures, dont la majorité sont engendrées par des champignons phytopathogènes qui occasionnent des dégâts avec des conséquences très importantes sur le rendement et la qualité des récoltes (Van Der Does et Rep, 2017).

Les champignons occupent une place importante dans le monde microbien. Ils sont impliqués dans une multitude de processus biologiques de l'environnement. Ils présentent, en outre, un intérêt économique, en raison à la fois de leur utilité et de leurs activités néfastes multiples: altérations des produits alimentaires et détériorations dans de nombreux autres domaines : production de mycotoxines, vie parasitaire aux dépens de l'homme, des animaux et des plants. Par ailleurs, les champignons synthétisent un grand nombre de substances complexes économiquement très importantes : acides organiques, alcaloïdes, antibiotiques, terpènes et enzymes (Pereira *et al.*, 2013).

En raison des agents chimiques utilisés, des paramètres environnementaux, et l'émergence de nouveaux agents fongiques pathogènes résistants, la fréquence des infections fongiques a augmenté de façon dramatique au cours des deux dernières décennies. De ce fait, la lutte biologique est l'une des alternatives en développement la plus prometteuse, cette méthode consiste en l'utilisation des microorganismes antagonistes. Les microorganismes utilisés dans la lutte microbiologique appartiennent à plusieurs taxons à savoir les virus, les bactéries et les champignons (Perez *et al.*, 2002).

De part leur composition, les eaux usées renferment diverses souches de bactéries pathogènes essentiellement d'origine fécale. Ces microorganismes ayant la particularité d'avoir plusieurs profils de résistance vis-à-vis des antibiotiques, peuvent-ils être exploités dans la lutte microbiologique contre les champignons phytopathogènes ?

Pour tenter de répondre à cette problématique, notre présente étude s'appuie sur l'hypothèse selon laquelle les microorganismes présents dans les effluents de la station d'épuration Est de la ville de Tizi-Ouzou présentent un pouvoir antagoniste vis-à-vis de deux genres de champignons phytopathogènes : *Alternaria* sp., et *Botrytis cinerea*.

Dans ce sens nous avons divisé notre travail en deux grandes parties.

- Une partie bibliographique composée essentiellement de trois chapitres :
- Le premier chapitre qui traite des agents pathogènes présent dans les eaux usées.
- Le deuxième chapitre est consacré à la caractérisation des champignons phytopathogènes.
- Le troisième chapitre décrit les méthodes de lutte contre les maladies cryptogamiques.
- Une partie expérimentale qui porte sur la présentation du matériel et méthodes d'analyse adoptées pour la caractérisation microbiologiques, l'étude de l'antibiorésistance et de l'activité antagoniste des bactéries présentent dans les effluents liquides de la station d'épuration Est de la ville de Tizi-Ouzou.
- Enfin, nous terminons notre étude par une conclusion générale où sont récapitulés les principaux résultats obtenus.

**1<sup>er</sup> Chapitre :**

***Agents pathogènes dans les eaux usées***

## 1. Les agents pathogènes des eaux usées

### 1.1. Les entérobactéries

Les entérobactéries ont une importance particulière par rapport à leur pouvoir pathogène (*Salmonelle*, *E.coli*, *Yersinia pestis*, etc.) , certaines sont utilisées comme indicatrices de contamination fécale ( bactéries coliformes ) (Joly et Reynaud , 2003 ).

#### 1.1.1. *Escherichia coli*

*Escherichia coli* (*E.coli* ) est une bactérie anaérobie facultative, à Gram négatif, en forme de bâtonnet, et qui mesure environ 0,5-2  $\mu\text{m}$  (Awwa, 2006). Certaines souches d'*E. coli* possèdent des gènes supplémentaires, qui codent pour des déterminants de la virulence tels que des facteurs d'adhésion et des toxines, qui leur permettent d'être pathogènes. Ces souches pathogènes peuvent provoquer des gastro-entérites, des diarrhées, des infections des voies urinaires, le syndrome hémolytique et urémique et des méningites (Anastasi *et al.*, 2010) .

#### 1.1.2. Les coliformes

Ce groupe est sans signification taxonomique, elles sont des bactéries utilisées dans le monde comme indicateurs de contamination fécale (marqueur de qualité microbiologique des eaux). Leur classification est basée uniquement sur des critères biochimiques, elles sont des bacilles, non-sporulés, Gram-négatifs, oxydase-négatif, aérobies ou anaérobies facultatifs, poussent à une température de 37°C en 48 heures (Afnor, 1990).

#### 1.1.3. *Salmonella* et *Shigella*

*Salmonella* est une bactérie anaérobie facultative non sporulée à Gram négatif, et qui mesure de 2 à 5  $\mu\text{m}$  de long et de 0,8 à 1,5  $\mu\text{m}$  de large, ce genre se limite uniquement à deux espèces *Salmonella enterica* et *Salmonella bongori* .

*Shigella* est une bactérie anaérobie facultative non-sporulée non-mobile à Gram négatif, en forme de bâtonnet et qui mesure de 0,3 à 1,5  $\mu\text{m}$  de diamètre et de 1 à 6,5  $\mu\text{m}$  de long, l'être humain infecté constitue leur seul véritable réservoir (Awwa, 2006).

#### 1.1.4. *Campylobacter* et *Yersinia*

*Campylobacter* est une bactérie mobile à gram-négatif, en forme de bâtonnet mince et courbé mesurant de 0,2 à 0,5  $\mu\text{m}$  de large et de 0,5 à 5  $\mu\text{m}$  de long, provoque généralement une entérite caractérisée par des symptômes de grippe et/ou des douleurs abdominales, suivi d'une abondante diarrhée aqueuse causée par la présence d'une entérotoxine semblable à la toxine du choléra, cette bactérie possède un taux de résistance aux beta-lactamine élevé.

*Yersinia* est une bactérie anaérobie facultative non-sporulée à Gram négatif, en forme de bâtonnet et qui mesure de 0,5 à 0,8 µm de diamètre et de 1 à 3 µm de long, les symptômes provoqués diffèrent selon l'âge (Awwa, 2006).

#### 1.1.5. *Proteus* sp.

Les bactéries du genre *Proteus* sont des bacilles en forme de bâtonnets, gram-négatifs, aérobies mobiles. Ces micro-organismes capables de produire de l'uréase qui hydrolyse l'urée tout en alcalinisant l'urine, conduisant à la formation de calculs de struvite.

#### 1.1.6. *Serratia* sp.

Les espèces du genre *Serratia* sont des bâtonnets, anaérobies facultatives, chimio-organotrophiques, qui mesurent 0,5 à 0,8 µm de diamètre et de 0,9 à 2 µm de longueur (Van Houd *et al.*, 2007). Ces bactéries exigent un taux faible en besoins nutritionnels (Grimont *et al.*, 1992).

#### 1.1.7. *Klebsiella*

Ce genre de bactéries sont des bacilles à gram-négatifs, anaérobies facultatives, généralement encapsulées, ce sont des bâtonnets, non mobiles, de 0,3 à 1 µm de largeur et de 0,6 à 6 µm de longueur (Abbott, 2007). Responsables de plusieurs infections telles que la pneumonie, cette souche a développé de multiples résistances aux antibiotiques (Janda *et al.*, 2006).

### 1.2. Les bactéries hétérotrophes

Les bactéries hétérotrophes sont présentes partout et elles trouvent dans l'eau de consommation une niche écologique qui permet parfois leur croissance en grand nombre.

Elles vivent à l'état parasitaire ou saprophytique, douées d'un pouvoir de synthèse atténué et qui empruntent l'énergie nécessaire à la scission d'un composé organique du carbone.

#### 1.2.1. *Legionella*

*Legionella* est une bactérie de petite taille se présentant sous forme allongée. Mobiles et faiblement Gram-négatives, elles se multiplient difficilement dans un milieu de culture en raison de leurs besoins nutritifs précis, elle peut provoquer une maladie respiratoire grave impliquant la pneumonie (Lau *et al.*, 2009).

### 1.2.2. Les mycobactéries

Les mycobactéries sont des bactéries mobiles, de forme allongée ou cocciforme, caractérisées par une paroi cellulaire à forte teneur en lipides cireux. Bien qu'elles soient Gram-négatives, on les considère plus couramment comme acido-résistantes, à cause de la réaction de leur paroi cellulaire aux procédures diagnostiques par coloration (Awwa, 2006).

### 1.2.3. *Aeromonas*

Le genre *Aeromonas* regroupent des bactéries gram-négatifs, mobiles, anaérobies facultatifs (Collier *et al.*, 1998). Ce sont des bacilles droits arrondies aux extrémités, chimioorgano-hétérotrophe, oxydase positive et catalase positive (Horneman *et al.*, 2007 ). Le genre *Aeromonas* regroupe plus de 17 espèces génétiques distinctes (Janda et Abbott, 2010).

### 1.2.4. *Helicobacter pylori*

Ce genre de bactéries sont des bacilles mobiles, à Gram négatif, de forme allongée et recourbée, les *Helicobacter* sont étroitement apparentés à *Campylobacter* (Percival et Thomas, 2009) .

## 2. Caractéristiques communes

### 2.1. Habitat

Ces microorganismes sont largement répandues dans l'environnement, ubiquitaires, elles ont une niche écologique étroite, à l'exception de *Salmonella typhi* qui ne se retrouve que dans l'intestin de l'homme (Joly et Reynaud, 2003).

### 2.2. Pouvoir pathogène

Le pouvoir pathogène des micro-organismes chez l'homme est considérable. Les infections peuvent être bien définies et concernent tous les sujets, ou spécifiques elle touche à des sujets immunodéprimés. L'origine de l'infection peut être endogène ou bien exogène (Joly et Reynaud, 2003).

## 3. Antibiorésistance

### 3.1. Les antibiotiques

On appelle « antibiotique » toute substance naturelle d'origine biologique élaborée par un organisme vivant (champignon ou bactérie ) ou substance chimique produite par synthèse ou substance semi- synthétique obtenue par modification chimique d'une molécule de base

naturelle et ayant les propriétés suivantes : activité antibactérienne, toxicité sélective, activité en milieux organique, bonne absorption et bonne diffusion dans l'organisme ( Lemarchand et Courvalin, 2008).

Les antibiotiques ont des mécanismes très différents pour agir sur les bactéries. Ils ont comme caractéristique de s'attaquer à des cibles bien définies dans la bactérie, afin de bloquer un élément d'un processus ou d'une voie de transmission essentielle. En outre, d'autres moyens de désinfections présent telle que le chlore libre, la chloramine, le dioxyde de chlore et l'ozone sont tous des oxydants très puissants qui inactivent les cellules bactériennes en détruisant l'activité des protéines cellulaires susceptibles de contribuer à la structure ou au métabolisme de la cellule.

### **3.2. La résistance bactérienne**

La résistance bactérienne aux antibiotiques résulte soit d'une résistance naturelle (caractéristique propre d'un genre ou une espèce bactérienne, portée par le chromosome bactérien, elle est stable) ou d'une résistance acquise (variable dans le temps et dans l'espace, elle se propage de façon importante, ne concerne que certaines souches bactériennes au sein d'une espèce donnée) (Lavigne et Favet ,2007 ; 2013).

Les pathogènes résistants aux antibiotiques ont la capacité de changer et de devenir moins susceptibles aux médicaments. La résistance bactérienne aux antibiotiques se manifeste de diverses façons ; par exemple, les cellules peuvent ne pas permettre la pénétration de l'antibiotique, elles peuvent être dépourvues de la cible visée ou posséder des enzymes capables de modifier ou de détruire l'antibiotique. Une exposition répétée de la bactérie à des agents antibactériens et son accès à des bassins grandissant de gènes résistants aux antibiotiques dans les populations bactériennes mixtes sont les raisons principales de l'émergence de la résistance bactérienne (Lemarchand et Courvalin, 2008).

Il existe de nombreux types d'antibiotiques, catégorisés en différentes classes d'après leur structure ou leur mode d'action. Les bactéries dotées d'un mécanisme de résistance particulier peuvent se montrer insensibles aux antibiotiques d'une même classe ou visant la même cible. Ces mêmes bactéries peuvent être vulnérables à d'autres antibiotiques, ou posséder des mécanismes qui leur confèrent une résistance à plusieurs classes d'antibiotiques (Leminor et Veron,1989).

Le problème grandissant associé à la résistance bactérienne est la diminution de l'efficacité des agents antibactériens, favorisant des pathogènes résistants aux antibiotiques encore plus virulents que leurs équivalents susceptibles aux antibiotiques, et qui causent des maladies prolongées ou plus graves (Lavigne et Favet, 2007 ; 2013).

### **3.3. Les différents types de résistance bactérienne aux antibiotiques**

#### **3.3.1. La résistance naturelle**

On parle d'une résistance bactérienne naturelle lorsque toutes les souches de la même espèce bactérienne sont résistantes à un antibiotique donné, elle est stable et portée par un chromosome et transmise à la descendance (Corvec, 2008).

#### **3.3.2. La résistance acquise**

On parle d'une résistance bactérienne acquise lorsque certaines souches bactériennes au sein d'une espèce qui sont à la base, sensibles à un antibiotique y deviennent résistantes.

Cette résistance peut être portée par le chromosome, le plasmide, ou des éléments génétiques mobiles. Elle permet une transmission à la descendance voir même une transmission horizontale, entre les différentes espèces (Cover, 2008).

### **3.4. Mécanismes de la résistance bactérienne aux antibiotiques**

On retrouve deux fameux mécanismes de résistance bactérienne aux antibiotiques, mécanismes génétiques et mécanismes biochimiques (Euzéby, 2008).

#### **3.4.1. Mécanismes génétiques**

Dans ce cas de figure la résistance peut être portée sur le chromosome de la cellule donc elle est définie comme résistance chromosomique, elle peut être portée par les plasmides, les éléments transposables ou les intégrons donc elle est dite résistance extra-chromosomique (Euzéby, 2008).

##### **3.4.1.1. Résistance chromosomique**

La résistance chromosomique est persistante, transmissible, permanente jusqu'à la survenue d'une mutation (Navciel et Vilde, 2005).

### 3.4.1.2. Résistance extra-chromosomique

- **La conjugaison**

C'est un transfert d'ADN entre deux bactéries une donatrice et l'autre réceptrice, ce transfert nécessite un contact direct entre ces deux bactéries en présence d'un facteur F de sexualité ou de fidélité chez la bactérie donatrice. Le transfert est de sens unique, orienté, progressif et parfois totale (Lozniewski et *al.*, 2010).

- **La transformation**

Une bactérie donatrice compétente transfère l'ADN à une bactérie réceptrice, ce transfert est partiel et limité à quelques espèces bactériennes (Lozniewski et *al.*, 2010).

- **La transduction**

Ce genre de transfert se fait par un bactériophage qui se multiplie dans des bactéries, après la lise les phages s'intègrent dans les bactéries, ils se répliquent au même temps que le chromosome induisant une résistance chez la bactérie (Yarmolinsky et Sternberg, 1998).

### 3.4.2. Mécanismes biochimiques

Les bactéries ont la capacité de se défendre contre l'action des antibiotiques tout en se rendant imperméable à leur pénétration, la production d'enzyme ou la modification de la structure de leur cible (Lavigne, 2007).

#### 3.4.2.1. Diminution de la perméabilité membranaire

La diminution de la perméabilité peut avoir lieu via l'altération des porines, l'inhibition du transport actif, l'inhibition de la pénétration à travers le peptidoglycane de bactéries gram-positifs ou bien par modifications de la composition des lipopolysaccharides (LPS) (Kall, 2002).

#### 3.4.2.2. Efflux actif

C'est l'un des mécanismes de transport membranaire dont le rôle est le maintien de l'équilibre physico-chimique, le transport de substances nutritives, l'export de substances toxiques (Jacques, 2005).

#### 3.4.2.3. Production d'enzymes inactivantes

Le principe consiste à désamorcer le pouvoir des antibiotiques en les modifiant ou en les détruisant, avec des enzymes spécifiques. Exemple, la pénicillinase capable de détruire la pénicilline (Kall, 2002).

#### 3.4.2.4. La modification de la cible

Dans ce cas la cible subit des modifications dans la structure de sa membrane, les ribosomes, l'ADN, les enzymes de synthèses bactériennes, etc. (Kall, 2002).

## **Deuxième chapitre**

### ***Les champignons phytopathogènes***

## 1. Les champignons phytopathogènes

Les champignons représentent un groupe hétérogène de microorganismes pluricellulaire ubiquistes pouvant se développer à l'état saprophyte ou parasite sur de nombreux substrats (Bennett *et al.*, 2003).

Les champignons phytopathogènes ou dites telluriques constituent un groupe d'organismes microscopiques hétérotrophes, présentant des structures et des caractéristiques biologiques extrêmement diversifiées (Kirk *et al.*, 2001). Ils sont à l'origine de la plupart des maladies cryptogamiques chez les plantes, ces champignons sont capable d'infecter n'importe quel tissu de la plante, en allant de la racine jusqu'au fruit, et ce peut importe le stade de croissance de la plante (Abdelkader, 2012).

La plupart des champignons phytopathogènes peuvent produire des mycotoxines qui conduisent aux différents symptômes de l'infection chez les plantes (Boudih, 2011). Ces mycotoxines sont des métabolites secondaires, de faible poids moléculaire, et qui sont capables d'induire un effet toxique à de faibles concentrations (Tola et Kebede, 2016). La contamination des plantes par les mycotoxines peut se produire avant la récolte lorsque le végétal est en croissance, ou après la récolte pendant la transformation, le conditionnement, la distribution et le stockage des produits alimentaires (Pereira *et al.*, 2014). Parmi les champignons phytopathogènes qui sont connus comme étant producteur de mycotoxines, on cite : *Aspergillus*, *Fusarium*, *Alternaria* et *Penicillium*.

La reproduction chez les champignons phytopathogènes est complexe, reflétant ainsi leur hétérogénéité. Elle peut être sexuée « téléomorphe » qui est un mode de reproduction dit « parfait », Ou asexuée « anamorphe » qui se fait par bourgeonnement, fission binaire, fragmentation ou par formation de spore, ce mode de reproduction est dit soit « imparfait » ou « végétatif » (Lepoivre, 2003).

## 2. Classification des champignons phytopathogènes

Les champignons phytopathogènes représentent environ 1000 espèces différentes. Ils appartiennent aux différents groupe du règne des eumycocètes ou « champignons vrais » : ascomycètes, basidiomycètes, chytridiomycètes, zygomycètes et deutéromycètes (champignons imparfaits) ( voir **Tableau I** ).

**Tableau I** : La classification générale des champignons phytopathogènes et leurs caractéristiques.

Division	Les principaux caractéristiques	Références
Ascomycota	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Reproduction sexuée avec des spores endogènes (ascospores).</li> <li>• Mycélium septé (cloisonné).</li> <li>• Spores non flagellées.</li> </ul>	(Canard et Senequier- Crozet, 2016)
Bazidiomycota	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Reproduction sexuée avec des spore exogènes (basidiospores).</li> <li>• Mycélium septé (cloisonné), septomycètes.</li> <li>• Pores non flagellées.</li> </ul>	(Canard et Senequier- Crozet, 2016)
Chytridiomycota	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Ancêtre de tous les champignons.</li> <li>• Reproduction sexuée et asexuée.</li> <li>• Mycélium siphonné, siphomycètes.</li> <li>• Spores flagellées.</li> </ul>	( Kiffer et Morelet, 1997)
Deuteromycota	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Pas de reproduction sexuée (reste inconnue).</li> <li>• Mycélium cloisonné, septomycètes.</li> <li>• Spores non flagellées.</li> </ul>	( Kiffer et Morelet, 1997)
Glomeromycota	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Pas de reproduction sexuée.</li> <li>• Mycélium siphonné (non cloisonné).</li> <li>• Spores non flagellées.</li> </ul>	(Blandeau, 2012 ;Canard et Senequier- Crozet, 2016)
Zygomycota	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Selon le mode de reproduction on trouve deux classes :</li> <li>• Zygomycètes : reproduction par mitospores (forme asexuée) ;</li> <li>• Trichomycète : reproduction par zygosporés (forme sexuée).</li> </ul>	(Lennartsson, 2012)

### 3. Les maladies cryptogamiques

Les maladies cryptogamiques sont causées par plusieurs champignons phytopathogènes, transportés par le vent, la pluie ou par contact, les spores de ces champignons se disséminent et se déposent sur les plantes. Là, elles germinent et pénètrent les tissus, après une période d'incubation, les champignons se développent et ainsi les premiers symptômes apparaissent : feuilles nécrosées, rameaux tachés, etc. (Agrios, 2005).

Ces maladies peuvent avoir des conséquences économiques, sociales et écologiques à l'échelle mondiale. L'organisation des Nations Unies pour l'alimentation et l'agriculture estime qu'entre 20 et 40% des rendement mondiaux des cultures sont réduits chaque année en raison des dommages causés par les bioagresseurs y compris les phytopathogènes (FAO, 2015).

**Tableau II :** Quelques maladies fongiques qui touchent les plantes (Blancard, 2009).

Maladie	Agent infectieux	Maladie	Agent infectieux
Mildiou	<i>Phytophthora infestans</i>	Fusariose	<i>Fusarium oxysporum f.sp.lycopersici</i>
Alternariose	<i>Alternaria tomatophila</i>	Verticilliose	<i>Verticillium albo-atrum</i> et <i>verticillium dahliae</i>
Moisissure grise	<i>Botrytis cinerea</i>	Cadosporiose	<i>Pasalorafulva</i>
Septoriose	<i>Septoriahy copersici</i>	Racine liégeuses	<i>Pyrenocha et alycopersici</i>
Oïdium	<i>Oidium neolyopersici</i>	Anthracnose	<i>Colletotrichum coccodes</i>

#### 4. Principaux groupes fongiques contaminant des produits agricoles

##### 4.1. Le genre *Alternaria*

Les *Alternaria* sont des champignons saprophytes ou parasites des plantes très répandus dans notre environnement. Ce genre de champignons comprend plusieurs espèces phytopathogènes qui peuvent affecter les cultures au champ ou provoquer la décomposition des produits végétaux après la récolte. Les espèces d'*Alternaria* sont connues pour produire de nombreuses métabolites, principalement des phytotoxines, qui jouent un rôle important dans la pathogénèse des plantes (Logrieco *et al.*, 2009).

De par leur diversité et de leur hétérogénéité, de nombreuses classifications taxonomiques ont été générées pour les *Alternaria*. Cependant l'émergence de la taxonomie moléculaire basée sur la comparaison des séquences nucléotidiques, a abouti au classement du genre parmi les *Ascomycètes* au sein de la classe des *Dothideomycètes*. Ils sont phylogénétiquement proches de nombreuses espèces phytopathogènes comme : *Leptosphaeria*, *Venturia*, *Pleospora*, *Phaeosphaeria*, *Mycosphaerella*, *Cladosporium*, *Pyrenophora*, *Clostridium* etc. (Calmes, 2011).

##### 4.1.1. L'alternariose

L'alternariose est une maladie cryptogamique causée par le champignon parasite *Alternaria*, la gamme de plantes hôtes concernées par l'alternariose est très variée ( carotte : *Alternariadauci* , oignons : *Alternariaporri*, pomme de terre : *Alternaria solani*, etc.), et certaines espèces peuvent provoquer d'importants dégâts sur des espèces cultivées occasionnant des pertes financières significatives (Logrieco *et al.*, 2009). C'est le cas par exemple de l'alternariose de la tomate qui est une maladie importante et largement distribuée dans le monde, causant des pertes économiques de rendement, cette maladie est provoquée par *Alternaria solani* et *Alternaria alternata* (Milet, 2017).

L'alternariose se reconnaît facilement par les lésions nécrotiques sur les feuilles, qui sont principalement concentriques et souvent entourées de tissu chlorotique jaune (Belosokhov *et al.*, 2017).



**Figure 1** : Symptômes d'alternariose sur feuilles (A) et fruits (B) de tomate (Agrios, 2005).

#### **4.2. *Botrytis cinerea***

*Botrytis cinerea* est un champignon aérien, ubiquiste et polyphage capable de se développer sur plusieurs plantes hôtes différentes, ce champignon a la particularité de bien se conserver dans le sol sous forme de petits nodules de consistance dure, de couleur sombre, formé de filaments mycéliens entrelacés appelés sclérotés (Elad, 2007).

Ce champignon phytopathogène, à reproduction asexuée se caractérise par son mode de vie dit nécrotrophe : après infection de son hôte, les cellules touchées meurent et *botrytis cinerea* s'y développe de façon saprophyte (Holz *et al.*, 2007). La température optimale de sa reproduction est estimée entre 1 à 20°C, et des facteurs tels que l'humidité (>90%), les nutriments notamment les sucres comme source de carbone qui est considéré comme un des facteurs clés dans le développement du tube germinatif (Ajouz, 2009).

*Botrytis cinerea* est un champignon doté d'un fort pouvoir adaptatif, ainsi que d'un fort pouvoir de résistance aux fongicides, et ce pour les nombreuses caractéristiques biologiques qui le rendent plus efficace l'effet de la sélection naturelle (grande taille de population, dissémination des conidies par le vent sur de longues distances, importante variabilité génétique, large spectre d'hôtes, etc.), cependant, très peu d'éléments sont connus concernant les mécanismes évolutifs de la sélection au niveau populationnel (Holz *et al.*, 2007).

*Botrytis cinerea* saprophyte est le champignon phytopathogène responsable de la pourriture grise ou dite pourriture noble, capable d'attaquer plus de 230 espèces de plantes engendrant de grave dommage en agriculture, en affectant plusieurs production légumières (tomate, courgette, laitue, etc.), fruitières ( fraise, pomme, kiwi, etc.) et les plantes ornementales ( la rose et le gerbera) (Ajouz, 2009).

#### 4.2.1. La pourriture grise :

La pourriture grise est actuellement la maladie cryptogamique la plus dévastatrice dans le monde, provoquée par *botrytis cinerea* , cet agent pathogène peut entraîner la destruction partielle ou totale de l'organisme infecté. Ainsi sur le plan économique, ce champignon est considéré comme étant un problème phytosanitaire majeur dans le monde de l'agroalimentaire (Martinez *et al .*, 2005).

La pourriture grise peut atteindre toutes les parties d'un fruit, d'un arbre, d'un légume, d'une plante ou d'une fleur et ce jusqu'au racines. L'infection se propage généralement soit par les ouverture naturelles des feuilles( pétales, sépales), soit par des blessures ou encore par les tissus intacts. Cette maladie des nécroses grises sèches ou humides, virant ensuite au brun, et le flétrissement des végétaux, dessèchement, pourriture, taches et mort. Les dégâts sont multiples et diffèrent d'un végétal a un autre (Williamson *et al .*, 2007).



**Figure 2** : Symptômes de la pourriture grise causée par *B. cinerea* sur différents hôtes (Agrios, 2005).

**Troisième chapitre :**

*Les moyens de lutte contre les maladies  
cryptogamiques*

## 1. Les moyens de lutte contre les maladies cryptogamiques

Les méthodes de lutte appliquées en agriculture varient considérablement d'une maladie à une autre en fonction du pathogène, de la plante hôte et de leur interaction chacun avec l'autre et avec l'environnement (Nasraoui, 2006).

Afin d'obtenir des cultures et des récoltes saines ou limiter les dégâts causés par les champignons phytopathogènes, il est nécessaire d'utiliser des méthodes de lutte efficaces, ces méthodes peuvent être chimiques ou biologiques.

### 1.1. La lutte chimique

La lutte chimique se définit par l'utilisation de fongicides pour détruire ou affaiblir l'action des champignons phytopathogènes, ces fongicides affectent directement les fonctions essentielles, tel que la respiration, la biosynthèse des stérols ou la division cellulaire des champignons (Sakhr, 2009).

#### 1.1.1. Les fongicides

Un fongicide désigne tout composé doté d'un pouvoir fongistatique (fongistatique : inhibition de la germination ou de la sporulation) ou bien destructeur (fongicide) sur les champignons (Benad, 2010).

Les fongicides sont classés selon plusieurs critères : mode d'action biologique (préventif/curatif), comportement dans la plante (pénétrant/systémique) et leurs structures chimiques. Cependant, on peut les classer en deux catégories principales selon qu'ils possèdent plusieurs sites d'action (fongicides multisites) ou qu'ils perturbent spécifiquement une seule voie métabolique (fongicides uni-sites) (Leroux *et al.*, 2002).

#### 1.1.2. Classification des fongicides

Les fongicides sont classés selon plusieurs critères : mode d'action biologique (préventif/curatif), comportement dans la plante (pénétrant/systémique) et leurs structures chimiques.

Selon Rocher (2004) et Couvreur (2002), les fongicides sont classés sous trois classes :

- **Les fongicides systémiques**

Ce sont des fongicides qui pénètrent dans l'hôte pour tuer ou inhiber les champignons, ils se déplacent dans les plantes à travers leur système vasculaire (xylème et/ou phloème). Ils sont absorbés par les feuilles, tiges ou racines et sont ensuite répandus dans toute la plante permettant ainsi la protection des parties non traitées et celles émergées après l'application du fongicide.

- **Les fongicides de contact ou de surface**

Appliqués à la surface de la plante, ces produits chimiques forment une barrière protectrice qui est toxique pour la germination des spores ou le mycélium du champignon responsable de la maladie.

Ces fongicides restent et demeurent au niveau du point d'application, présentant ainsi une activité antifongique de surface (au niveau de la cuticule).

- **Les fongicides pénétrants**

Les fongicides pénétrants sont absorbés par la feuille ou la partie racinaire sur laquelle ils ont été appliqué sans atteindre les autres feuilles ou organes.

Le transfert de ces produits se fait sans translocation par le xylème ou le phloème, et donc ils ne se déplacent que localement dans la plante. Les autres parties de la plantes ainsi que les feuilles nouvellement émergées ne sont pas protégées par ce genre de fongicide (Regnault-Roger, 2005).

### 1.1.3. Mode d'action des fongicides

Selon le mode d'action des fongicides, ils est possible de distinguées deux catégories bien distinctes. Les fongicides présentant plusieurs sites d'action appelés fongicides multisites, et les fongicides perturbant spécifiquement une seule voie métabolique dit fongicides uni-site (Leroux *et al.*, 2002 ).

- **Les fongicides multisites**

Les fongicides multisites sont les plus anciennement utilisées, ils sont apparus dès le XIX<sup>e</sup> siècle et étaient à base de cuivre ou de soufre.

Ces fongicides ont la capacité d'interagir avec de nombreux constituants cellulaires, ils peuvent par conséquent inhiber les enzymes impliquées dans le catabolisme primaire, le cycle de Krebs ou la chaine respiratoire. Ils inhibent également d'autres processus comme la perméabilité cellulaire (Batch, 2011).

Ils ont la particularité d'être non sélectif et d'avoir une efficacité à forte dose, engendrant des risques écotoxiques et toxicologiques pour les organismes non cibles.

- **Les fongicides uni-site**

Les fongicides uni-sites sont des fongicides qui ont un seul site d'action, ils ont la particularité de perturber ou d'inhiber le fonctionnement d'une seule réaction cellulaire nécessaire à la survie du champignon. Entraînant la mort de la cellule fongique.

Cependant, si les cellules fongiques subissent une mutation au niveau de l'unique site d'action du fongicide, le produit peut devenir inactif car il ne reconnaîtra plus sa cible. Il en

résulte ce qu'on appelle une résistance du pathogène au fongicide. Il est donc préférable d'utiliser des fongicides qui ont différents modes d'action pour éviter le phénomène de résistance ou « d'accoutumance » du champignon phytopathogène (Regnault-Roger, 2005).

#### 1.1.4. Avantages et inconvénients de la lutte chimique

Bien que la lutte chimique est l'une des méthodes les plus simple et des plus efficace utilisées dans la lutte contre les champignons phytopathogènes, cependant l'utilisation irraisonnée des produits chimiques a eu dans certaines situations, des conséquences inattendues sur la santé humaine et pour l'environnement telles que, la pollution importante des écosystèmes et problèmes de santé publique causé par le chlordécone, aux Antilles (Dallaire *et al.*, 2012).

**Tableau III :** Principaux avantages et inconvénients de la lutte chimique (Tariq *et al.*, 2007).

Avantages	Inconvénients
<ul style="list-style-type: none"> <li>• Excellente efficacité</li> <li>• Rapidité</li> <li>• Les insecticides sont disponibles dans les magasins</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Le coût du traitement est élevé</li> <li>• Non efficacité au bout d'un certain temps</li> <li>• Provoque des problèmes de santé</li> <li>• Effets non négligeables sur l'écosystème (pollution importante, disparition de la biodiversité, etc.)</li> <li>• Ce traitement est largement tributaire des facteurs climatiques (pluie, neige, etc.)</li> <li>• Développement d'une résistance des ravageurs face aux insecticides</li> </ul>

## 1.2. La lutte biologique

La lutte biologique consiste à combattre une maladie causée par un organisme au moyen d'un autre organisme, elle est considérée comme une voie alternative à l'utilisation des produits chimiques, dans le but de diminuer le danger sur l'environnement ainsi que l'homme. (Alabouvette *et al.*, 2006).

### 1.2.1. Antagonisme bactérien

L'antagonisme désigne une d'inhibition ou une action défavorable d'un organisme sur la croissance et l'activité d'un autre microorganisme pathogène. C'est le cas d'un grand nombre de bactéries et/ou champignons .

Le phénomène d'antagonisme est considéré comme étant le moyen de lutte biologique le plus efficace, puisqu'il interagi directement avec l'agent pathogène et/ou indirectement c'est-à-die avec la plante hôte (Tomashow, 1996).

L'antagonisme se manifeste généralement soit par une compétition, un parasitisme, une production de sidérophore ou encore par une antibiose. Par conséquent l'étude de ces mécanismes d'action représente une étape importante dans le développement de la lutte biologique (Jijakli, 2003).

### 1.2.2. Antibiose

C'est l'opposer a symbiose, représente un phénomène biologique existant entre deux ou plusieurs organismes, qui s'effectuent au détriment de l'un d'eux, soit par le truchement de substances qu'elle métabolise et excrète, telle que les antibiotiques, ou par le relargage de composés cellulaires, dans le but de s'opposer à la croissance et au développement de l'autre espèces, voire sa disparition. (Jijakli, 2003).

### 1.2.3. La compétition

Une guerre qui oppose des bactéries à des champignons qui luttent pour s'approprier les nutriments nécessaires à leur survie, elles sont en constante compétition pour les nutriments, l'oxygène (Alabouvette *et al.*, 2006).

### 1.2.4. Parasitisme

Ce mécanisme de lutte consiste en une interaction directe entre deux microorganismes ou les tissus vivants de l'un constituent une base nutritive pour l'autre ( Helluy et Holmes, 2005). L'agent antagoniste dégrade les parois de l'agent pathogène en utilisant des enzymes lytiques ( Valueva et Mosolor, 2004).

### 1.2.5. Production des sidérophores

Les sidérophores sont des molécules extracellulaires qui possèdent une grande affinité pour le fer ferrique ( $Fe^{3+}$ ). Les sidérophores produits par les bactéries(exemple : *Bacillus subtilis*) en séquestrant le fer ferrique au niveau de la rhizosphère peuvent causer l'inhibition des autres micro-organismes y compris les phytopathogènes qui ont une faible affinité pour le fer (Jijakli, 2003).

### 1.2.6. Induction des systèmes de résistance de la plante hôte

Des microorganismes de lutte biologique sont capables de déclencher une résistance systémique induite (ISR) chez la plante hôte, ce qui peut rendre l'hôte plus résistant à l'agression future par des agents pathogènes (Jijakli, 2003).

### 1.2.7. Biopesticides

Ce sont des substances chimiques ou des agents antiparasitaires appelés aussi pesticides biologiques, issus de source naturelles (Leng *et al.*, 2011). Peuvent synthétiser des solutions à la place de produits chimiques pour lutter contre les populations de ravageurs dans les champs cultivés. Leurs spectre d'action est très étroit a une courte durée de vie résiduelle, ils sont non persistants dans l'environnement, ils se détériorent et se dégradent rapidement ( Popp *et al.*, 2013). On trouve de différentes catégories de biopesticides, selon leur nature ils sont classes en 3 catégories : les pesticides microbiens, les pesticides végétaux, les pesticides animaux (Chandler *et al.* ,2011 ; Leng *et al.*, 2011 ).

- **Biopesticides microbiens**

Ils représentent les bactéries, les champignon, les mycètes et les protozoaires capables de synthétiser des substances qui vont à leur tour agir contre les bioagresseurs.

- **Les bactéries** : On cite le genre *Bacillus thuringiensis* qui est capable de produire la pro-toxine Cry, qui représente des protéines cristallines, a la phase stationnaire de croissance. Lors de la sporulation de cette bactérie ces protéines seront libérer et ingérer par les ravageurs (Rosas-Garcia, 2009).

- **Les virus** : Dans ce type de biopesticide microbienne on cite les Baculoviridae, qui sont des virus à ADN double brin circulaire, protégé par une paroi protéique. Il n'a jamais été répertorié dans l'infection des vertébrés ou des plantes, cette propriété le rend un bioinsecticide de qualité (Chen, 2002).

- **Les champignons** : Certains champignons sont aussi exploités en tant que biopesticides de même que les bactéries et virus, telle que *Coniothyrium minitans* qui est connu pour parasiter les champignons du genre *Sclerotinia* sp.. Le parcours est réalisé grâce a des enzymes extracellulaires et divers molécules a actions inhibitrice contre *Sclerotinia* sp. (McQuilken, 2003).

- **Biopesticides végétaux**

Ce sont des substances actives à propriétés insecticides, régulatrices de la croissance des plantes et des insectes, et sont produites par des plantes. Généralement ce sont des métabolites secondaires, qui a l'origine protègent les végétaux des herbivores. L'huile de neem est le pesticide d'origine végétale le plus utiliser, un insecticide extrait des graines d'*Azadirachta indica* (Schmutterer, 1990).

- **Biopesticides animaux**

Les biopesticides d'origine animale sont des signaux chimiques qu'un microorganisme produit pour changer le comportement d'un individu qui est soit de la même espèce ou d'espèces différentes (Grewal *et al.*, 2003).

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

La lutte biologique présente de nombreux avantages du point de vue environnemental, social et économique comme l'indique le **Tableau IV** (Lefort, 2010).

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

Avantages	Inconvénients
<ul style="list-style-type: none"> <li>• Efficace</li> <li>• Permet de restreindre ou d'éliminer l'utilisation des pesticides chimiques</li> <li>• Moins toxique que les pesticides chimiques</li> <li>• Utilisable en serre</li> <li>• Permet de diminuer les risques d'apparition de résistances aux produits chimiques</li> <li>• Plus grande spécificité d'action</li> <li>• Faible coût de développement</li> <li>• Amélioration de la qualité de vie et de la santé des travailleurs agricole</li> <li>• Pas de délai de traitement avant la récolte</li> <li>• Non contamination des produits (pas de résidus chimiques)</li> <li>• Dégradation rapide des biopesticides, diminuant les risques de pollution</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Effet moins drastique que les pesticides (plus d'application)</li> <li>• Effet différé</li> <li>• Efficacité pas toujours constante d'une production à l'autre</li> <li>• Efficacité relative aux conditions climatiques</li> <li>• Activité restreinte lors d'une grande pression du ravageur</li> <li>• Conditions d'entreposage des produits biologiques ( demi-vie et température plus fraîche )</li> <li>• Nécessite d'excellentes connaissances de l'écologie des pathogènes cibles et des agents de contrôles biologiques et de relation pathogène cible-agent de contrôle biologique</li> </ul>

## **Partie expérimentale**

## 1. Matériels

### 1.1. Appareillage et outillage

L'ensemble des appareils utilisées, ainsi que les différents outils en rapport avec la verrerie du laboratoire et de la microbiologie sont présentes en (annexe 01).

### 1.2. Produits chimiques et milieux de cultures

- **Produits chimiques**

Les différents produits chimiques utilisés tout au long de ce travail sont cités en (annexe 02).

- **Milieux de cultures**

Les milieux de culture utilisés durant l'expérimentation, ainsi que leurs compositions sont mentionner en (annexe 03).

### 1.3. Matériel biologique

#### 1.3.1. Souches bactériennes

les souches bactériennes étudiées dans ce travail ont été isolées à partir des eaux usées issue de la station d'épuration Est de la ville de Tizi-Ouzou. Ces bactéries appartiennent principalement aux groupes des *Entérobactéries* et des *Hétérotrophes*.

#### 1.3.2. Souches fongiques

Les champignons utilisés dans cette étude appartiennent au genre *Alternaria* sp. et *Botrytis cinerea*. Ils nous ont été fournis par Madame BENAZZOUZ K. enseignante au niveau de l'UMMTO, et ce afin de tester l'activité antagoniste des bactéries isolées vis-à-vis de ces deux champignons phytopathogènes.

## 2. Méthodes

### 2.1. Présentation de la zone d'échantillonnage

La station d'épuration (STEP) Est de Tizi-Ouzou est un établissement classé ; avec une capacité d'environ 120 000 habitants ; qui a été conçue pour épurer les eaux usées urbaines afin de protéger le milieu récepteur, qui est l'Oued Sebaou.

Située sur la rive gauche d'Oued Sebaou à 200m en amont du pont de bougie sur le chemin n° 124 reliant Tizi-Ouzou à Bejaïa. Cette station d'épuration d'une superficie de 35591 m<sup>2</sup>, est donc implantée à la sortie Est de la ville de Tizi-Ouzou, en dehors du tissu urbain.



**Figure 3 :** Vue globale de la station d'épuration Est de la ville de Tizi-Ouzou.

## 2.2. Echantillonnage

Le prélèvement des échantillons d'eaux usées et d'eaux traitées au niveau de la station d'épuration Est de la ville de Tizi-Ouzou s'est fait à deux reprises : le 6 juin 2022 et le 13 juin 2022.

L'échantillonnage a été effectué en immergeant une bouteille dans l'eau, puis remonter la bouteille tout en exécutant un mouvement en « U ». Cette eau est ensuite conditionnée dans des bouteilles en verre stérile, puis emportée dans une glacière et transportée au laboratoire de la faculté de biologie afin d'entamer les analyses bactériologiques.

Les analyses bactériologiques ont été effectuées au niveau du laboratoire de microbiologie de l'UMMTO durant cinq semaines et selon les étapes suivantes :

- Isolement et dénombrement des germes des bactéries à partir des échantillons ;
- Identification et l'antibiorésistance des bactéries ;
- Réalisation de l'antagonisme.

Dans le cadre de notre étude, l'analyse bactériologique se restreint à la recherche, dénombrement et isolement des germes suivants :

- Des entérobactéries à 37°C ;
- Des bactéries hétérotrophes à 30°C.

## 2.3. Analyse bactériologique

### 2.3.1. Dénombrement des germes bactériens

#### - Principe de la technique

Il s'agit d'une technique de numérotation non spécifique du plus grand nombre de microorganismes après incorporation d'un volume d'échantillon ou de ces dilutions dans un milieu gélosé .

#### - Mode opératoire

#### - Préparation de l'échantillon

- Agiter soigneusement et de façon prolonger le flacon d'échantillon afin d'homogénéiser la suspension ;
- Prélever ensuite 1ml de l'échantillon stérilement et procéder aux dilutions (de  $10^{-1}$  jusqu'à  $10^{-5}$ ).

#### - Ensemencement

- Placer un volume de prise d'essai de 1ml de ses dilutions , de manière stérile ,dans le fond d'une boîte de Pétri ;
- Utiliser une pipette stérile de 1ml , en débutant de la dilution la plus forte jusqu'à la plus faible ;
- Ajouté de 15 à 20 ml de gélose fondue de PCA / CCA ( maintenue en surfusion à  $45^{\circ}\text{C}$ ) et mélanger avec précaution pour rotation de la boîte pétrie, sans faire de bulles et sans mouiller les bords extérieures, afin de répartir les bactéries de façon homogène sur la surface de la boîte. Le temps entre l'addition de la dilution et la gélose fondue ne doit pas dépasser 15 minutes ;
- Laisser le milieu solidifier sur une surface plane , horizontale et fraîche ;
- Retourner les boîtes et incuber une série ( avec répétition ) à  $37^{\circ}\text{C}$  pendant 24h et une autre série (avec répétition) à  $30^{\circ}\text{C}$  pendant 48h ;
- Dénombrement des colonies apparentes à l'aide du compteur de colonies .
- Calculer le nombre d'unité formant colonies (UFC) par millilitre d'échantillon à partir du nombre de colonies apparues sur le milieu de culture et en respectant le mode de calcul donné par la norme , selon la formule suivante :

$$N = \frac{\Sigma \text{Colonies}}{V_{ml} (n_1 + 0,1n_2) \cdot d_1}$$

N : nombre d'UFC par gramme de produit initial.

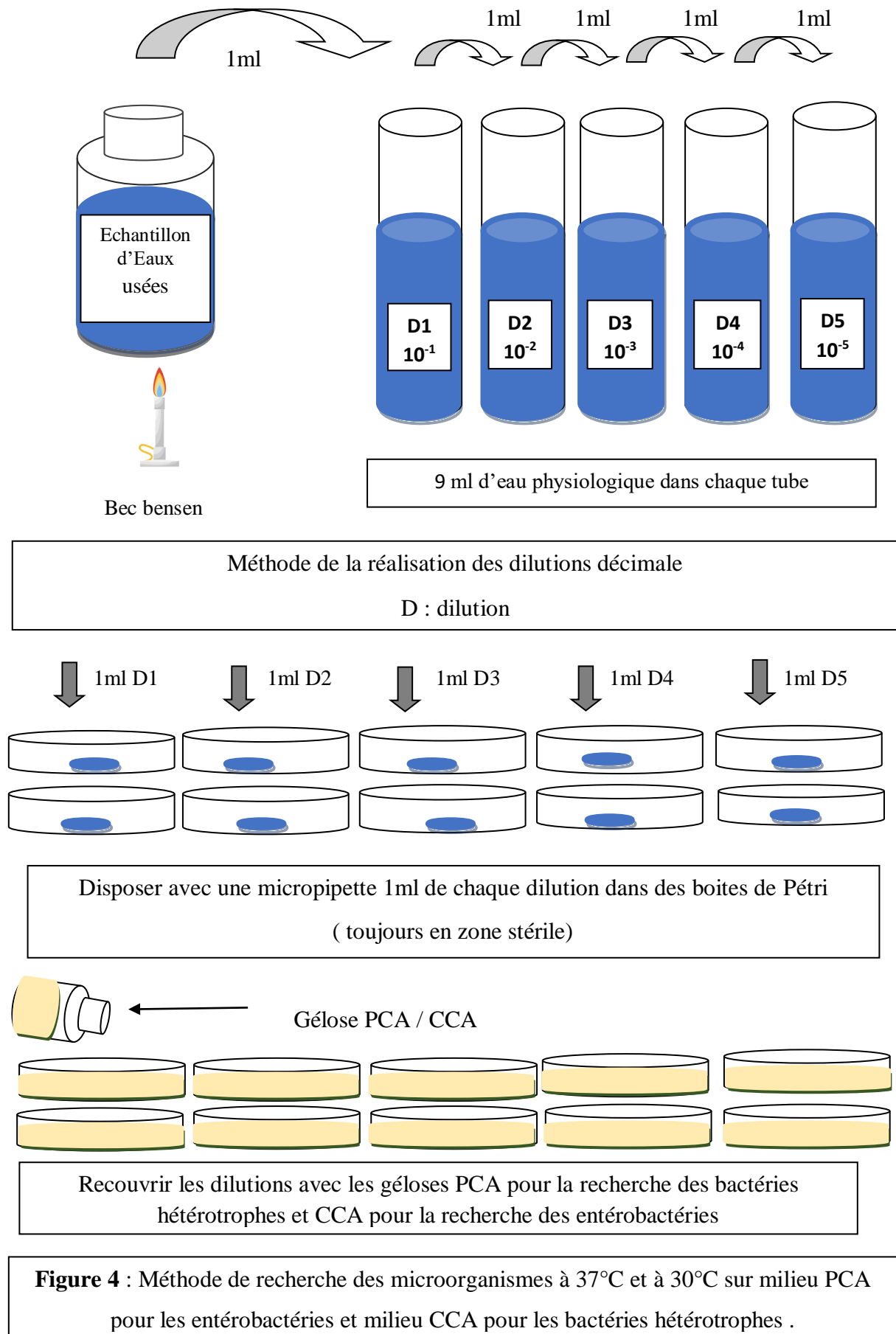
$\Sigma$ Colonies : somme des colonies des boites interprétables.

$V_{ml}$  : volume d'inoculum déposé par boite (1ml) .

$n_1$  : nombre de boites considéré à la première dilution retenue.

$n_2$  : nombre de boites considéré à la seconde dilution retenue.

$d_1$  : facteur de la première dilution retenue.



### 2.3.2. Isolement de colonies pures

#### - Principe de la technique

Cette technique consiste à faire un repiquage de chaque colonies caractéristique sur milieu spécifique ,( PCA/ CCA ), à fin d'obtenir des colonies pures .

#### - Mode opératoire

- Les manipulations doivent être faites dans une zone de stérilité, entre deux bec bunsens ;
- Réalisation de deux répétitions ;
- A l'aide d'une once à boucle stérile, prélever une colonie caractéristique et la transmettre dans un tube stérile contenant de l'eau physiologique stérile ;
- Standardiser la suspension bactérienne à une longueur d'onde de 620 nm , à une densité optique entre [ 0,08 – 0,1 ] , équivalent à une concentration de  $10^7$  UFC/ml ;
- Ensemencer des boîtes de Pétries contenant le milieu de culture (PCA/ CCA) avec la suspension à l'aide d'un écouvillon stérile ;
- Incuber les boîtes de Pétries , couvercle en bas , à 37°C pendant 24heures.

#### - Résultats

- Les colonies de couleur rouge/rose désignent les Coliformes ;
- Les colonies de couleur bleu/ violet correspondent à *E. coli* ;
- Les colonies blanches jaunâtres désignent les bactéries hétérotrophes.

Conserver les souches obtenues à 4°C au réfrigérateur , pour refaire le repiquage et avoir des souche jeunes de 24h à chaque manipulation .

### 2.3.3. Identification des isolats

L'identification est basée sur la détermination des caractères morphologiques et biochimiques :

- Etude macroscopique ;
- Etude microscopique ;
- Etude biochimique.

### 2.3.3.1. Etude macroscopique

Chaque espèce bactérienne est caractérisée par l'aspect de sa colonie en fonction du milieu utilisé.

Cette étude consiste à déterminer les critères caractérisant les colonies de nos souches isolées . Ces critères sont les suivantes :

- La forme ;
- La surface ;
- L'opacité ;
- Allure des contours ;
- L'élévation ( relief) ;
- La couleur .

Cette étude a été effectuée à l'aide d'une loupe binoculaire qui permet une meilleure observation des colonies .

### 2.3.3.2. Etude microscopique

La coloration de Gram est réalisée afin de déterminer le type de Gram de chaque bactérie, elle repose sur une différence fondamentale de la composition et de la structure de la paroi.

Elle consiste à traiter un frottis bactérien fixé à la chaleur, du bec bunsen, par une solution de violet de gentiane, puis par une solution iodo-iodurée (Lugol) : un complexe de colorant teint les cellules . Celles-ci sont soumises ensuite à l'action d'un solvant organique , l'éthanol.

Les cellules réagissent de deux façons et forment deux groupes :

- Les unes dites Gram négatif se décolorent rapidement : les lipides de la paroi bactérienne se dissolvent et rendent celle-ci poreuse , provoquant ainsi la décoloration du cytoplasme ( coloration en rose ) ;
- Les autres conservent leur coloration violette et sont dites à Gram positif : l'éthanol ne décolore pas la cellule car la paroi est de composition en majorité protéique .

**- Mode opératoire**

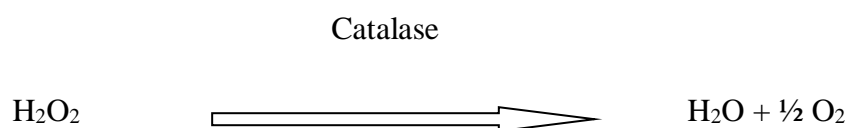
- Dans la zone stérile , à l'aide d'une once à boucle , prélever une colonie bactérienne et déposer la sur une lame ;
- Ajouter une goutte d'eau distillé puis étaler la colonie sur 1/3 de la surface de la lame en couche mince et homogène ;
- Fixer le frotti sur la lame, en la passant de façon rapide 03 fois au dessus de la flamme du bec bunsen sans bruler le frotti ;
- Recouvrir le frotti avec le colorant primaire : le violet de gentiane et laisser agir 1min
- Rejeter le colorant sans laver la lame puis recouvrir avec le Lugol (fixateur) et laisser agir pendant 1min ;
- Décolorer à l'alcool 95° pendant 15 secondes ;
- Rincer à l'eau courante à fin de neutraliser l'action de l'alcool ;
- Recouvrir le frottis avec le colorant secondaire : la fushine et laisser agir pendant 1min;
- En fin , laver a l'eau courante jusqu'à ce que les eaux de rinçage ressortent claire et puis sécher la lame ;
- Ajouter une goutte d'huile d'immersion et observer au microscope optique à (G-1000) (Dellaras, 2007).

**2.3.3.3. Etude biochimique**

l'étude biochimique a été inspiré des travaux de Marchal et Bourdon (1982).

**A. Test de catalase**

La catalase est enzyme présente chez la plupart des bactéries aérobies strictes, aéro-anaérobies facultatives. La fonction principale de la catalase dans les cellules est de prévenir l'accumulation de niveaux toxiques de peroxyde d'hydrogène ( $H_2O_2$ ) formé au cours des réactions d'oxydation. Cette enzyme catalyse la conversion du peroxyde d'hydrogène en eau et en oxygène qui se dégage selon l réaction (Singleton ,2005).



**- Technique**

- Sur une lame propre, déposer une colonie prélevée à l'anse ;
- Ajouté une goutte d'eau oxygénée. Observer immédiatement le résultat .

**- Résultats**

- Apparition de bulles d'oxygène, l' $H_2O_2$  est donc dégradé en  $H_2O$  et  $O_2$ . La bactérie possède une catalase, elle est dite catalase (+).
- Pas d'apparition de bulles d'oxygène,  $H_2O_2$  n'est donc pas dégradé en  $H_2O$  et  $O_2$  : la bactérie ne possède pas de catalase, elle est dite catalase (-).

**B. Test d'oxydase**

Le cytochrome oxydase ou oxydase est une enzyme qui permet à la bactérie d'utiliser pour sa croissance l'oxygène ambiant. Le test consiste à mettre en évidence la capacité que possède la bactérie à oxyder un réactif incolore le N-diméthyle-paraphénylène diamine (PDA) en un dérivé rose violacé. Ce test est essentiel pour continuer l'identification des bacilles à Gram négatif (Singleton ,2005).

**- Technique**

- Utilisation d'un disque imprégné par le réactif dans un tube contenant la suspension bactérienne dans de l'eau physiologique ;
- Observer immédiatement le résultat.

**- Résultat**

- Apparition d'une coloration rose violacée : oxydation du réactif, souche oxydase (+).
- Absence de coloration rose violacée : absence d'oxydation de réactif, souche oxydase (-).

**C. Test de nitrate réductase**

En l'absence d'oxygène, certaines bactéries peuvent obtenir leur énergie par respiration anaérobie. Ces bactéries peuvent utiliser un accepteur d'électrons autre que l'oxygène, le nitrate est l'accepteur le plus utilisé. Cette respiration anaérobie est liée à l'activité d'enzymes localisées dans la membrane plasmique bactérienne. La réaction de réduction des nitrates en nitrites est catalysée par la nitrate réductase (Singleton ,2005). Parfois, certaines bactéries peuvent poursuivre cette réduction jusqu'à une dénitrification selon :



#### D. Test de Mannitol-mobilité

Le Mannitol est un polyalcool. Sa dégradation conduit à la formation du fructose qui est lui même dégradé en acides à chaînes courtes. Le milieu Mannitol-mobilité permet de rechercher simultanément la mobilité et l'utilisation du Mannitol :

- La fermentation du Mannitol : les bactéries mannitol (+) acidifient le milieu qui vire au jaune (virage d'un indicateur coloré, le rouge phénol).
- La mobilité : du fait de la faible teneur en agar du milieu (gélose molle), les bactéries mobiles peuvent s'y déplacer (Singleton, 2005).
- **Technique**
  - Ensemencer le milieu par piqûre centrale jusqu'au fond du tube avec la souche à tester à l'aide d'une anse de platine (fil droit) ;
  - Incubation à 37°C durant 18 heures.
- **Résultats**
- **Fermentation du mannitol :**
  - Coloration jaune, virage du rouge de phénol, acidification du milieu : utilisation du mannitol souche Mannitol (+).
  - Milieu rouge, pas de virage du rouge phénol au jaune, pas d'acidification : souche Mannitol (-).
- **Caractères mobilité :**
  - Répartitions des colonies dans toute la gélose : les bactéries sont mobiles.
  - Développement uniquement dans la piqûre centrale : les bactéries sont immobiles.

#### E. Test d'OrthoNitroPhényl Galactopyranoside (ONPG)

Ce test est particulièrement important pour les Entérobactéries, il consiste à rechercher la présence d'une enzyme du métabolisme du lactose, la B-galactosidase. Le lactose est source de carbone d'énergie pour les bactéries. La dégradation du lactose par les microorganismes passe par sa transformation en glucose (Singleton, 2005). Cette dernière n'est possible que si ces microorganismes possèdent :

- Le lactose perméase qui permet la pénétration du lactose au travers de la membrane plasmique ;
- Une B-galactosidase qui catalyse son hydrolyse en glucose et galactose.

La B-galactosidase peut être mise en évidence facilement car elle est capable d'hydrolyser toute molécule analogue du lactose telle que l'ONPG (OrthoNitroPhényl Galactopyranoside). L'ONPG permet, lorsque la bactérie est lactose (-) de trouver s'il y a présence d'une B-galactosidase que l'on reconnaît grâce à la coloration en jaune du milieu.

- **Technique**

- Réaliser une suspension épaisse de bactéries prélevées obligatoirement sur milieu lactose solide, dans de l'eau physiologique ou de l'eau distillé ;
- Ajouter avec une pince flambée puis refroidie un disque imprégné d'ONPG ;
- Incuber à 37°C pendant 24 h.

- **Résultats**

- Apparition d'une coloration jaune : la bactérie possède donc B-galactosidase, elle est dite OPNG (+), B-galactosidase (+).
- Pas d'apparition d'une coloration jaune : la bactérie ne possède pas la B-galactosidase, elle est ONPG (-), B-galactosidase (-).

**F. Test du Citrate de Sodium**

Certains Entérobactéries sont capables d'assimiler le citrate de sodium comme seule source de carbone et d'énergie et la recherche de cette propriété se fait avec le milieu de Simmons au Citrate de Sodium. Ce milieu ne contient qu'une seule source de carbone ; le citrate. Les bactéries possédant l'enzyme citratase sont capables de se développer sur ce milieu. La bactérie qui utilise le citrate, alcalinise le milieu, ce qui fait virer l'indicateur de pH de couleur verte au bleu en milieu basique (bleu de bromothymol) (Singleton , 2005).

- **Technique**

- Ensemencer le milieu qui se présente sous forme de gélose incliné en strie longitudinale à partir d'une suspension de culture solide en eau distillée stérile ;
- Incuber à 37°C pendant 24h ;
- Virage de l'indicateur de pH au bleu : il y a eu alcalinisation du milieu, la souche est citrate (+) ;
- Pas de virage de l'indicateur de pH : il n'y a pas eu alcalinisation (le milieu ne présente pas de culture) la souche est citrate (-).

**G. Recherche de l'Uréase, de l'Indole et de la tryptophanase désaminase (TDA)**

Il existe des acides aminés qui peuvent être décomposés selon des réactions métaboliques particulières, comme le cas du tryptophane. Ces trois tests biochimiques permettent l'identification de germes, particulièrement les entérobactéries sur le milieu Urée tryptophane ou milieu urée indole.

- Recherche de l'Uréase : les Entérobactéries peuvent dégrader l'urée grâce à une Uréase en carbonate d'ammonium qui alcalinise le milieu et qui fait virer l'indicateur coloré de pH (le rouge de phénol) du jaune au rouge en milieu basique.
- Recherche de la TDA : certaines bactéries dégradent le tryptophane grâce à l'enzyme tryptophane désaminase (TDA) et cette dernière conduit à la désamination de cette acide aminé en produisant l'ammoniac et l'acide indole pyruvique. Ce dernier est révélé par l'apparition d'une couleur marron foncé en présence d'un réactif, le perchlorure de fer.
- Recherche de l'Indole : certaines bactéries dégradent le tryptophane grâce à une tryptophanase en formant de l'indole, de l'acide pyruvique et de l'ammoniac. Après addition du réactif de Kovacs, le diméthyle-amino-benzaldéhyde contenu dans le réactif de Kovacs réagit avec l'indole, qui se traduit par un anneau rouge en surface du milieu. La recherche d'indole se fera dans un tube à part contenant le milieu eau peptonée exempte d'indole (Singleton , 2005).
- **Technique**

Faire une suspension bactérienne en milieu urée –indole. Incuber 24h à 37°C.

- **Résultats**
- Coloration rouge : urée (+).
- Pas de coloration (milieu rouge) : urée (-).
- Coloration marron foncée : TDA (+).
- Pas de coloration TDA (-).
- Formation d'un anneau rouge : indole (+).
- Pas de coloration rouge : indole (-).

## H. Tests de rouge méthyle et Voges- Proskauer (RM et VP)

Le milieu Clarck et Lubs permet de rechercher les voies fermentaires des Entérobactéries et de différencier la fermentation par la voie des acides mixtes et la fermentation par la voie du butylène glycol.

Mise en évidence de l'utilisation de la voie butylène glycol pour fermenter le glucose (fermentation butane diolique) :

- La réaction de Voges-Proskauer (VP) permet de mettre en évidence la production d'acétone (ou 3-hydroxy-butanone) au cours de la fermentation butylène glycolique. En présence d'une base forte (soude ou potasse) et di-naphtol, l'acétone donne une coloration rouge (Singleton ,2005).

### - **Technique**

- Ensemencer un milieu Clarck et Lubs avec quelques gouttes de suspension bactérienne. - Incuber 24 à 48h à 37°C ;
- Après vérification de la culture (trouble du milieu), transférer une partie de la culture dans un autre tube : l'un des deux tubes servira au test RM et l'autre au test VP ;
- Test RM : ajouter 2 gouttes de solution de rouge de méthyle à 2.5% dans de l'éthanol ;
- Test VP : ajouter à 1 ou 2 ml de bouillon, environ 0.5 ml de solution d'I-naphtol et 1 ml de solution soude (ou potasse) diluée (16%).

### - **Résultats**

- **Test RM** : immédiatement après avoir rajouté le RM.
- Coloration rouge, milieu acide, fermentation du glucose par la voie des acides mixtes (production d'acides forts) : souche (RM+).
- Coloration jaune, milieu alcalin pas de fermentation du glucose par la voie des acides mixtes : souche RM (-).
- **Test VP** : agiter et incliner le tube pour favoriser l'oxygénation du milieu.
- Coloration rouge (en surface), présence d'acétone, fermentation du glucose par la voie butylène glycolique avec production d'acétone : souche VP (+).

- Pas de coloration rouge, absence d'acétone, pas de fermentation du glucose par la voie butylène glycolique (pas de production d'acétone) : souche VP (-).

#### 2.3.4. Réalisation d'un repiquage

Dans une zone stérile, on réalise un repiquage sur gélose nutritive à partir des souches pures :

- A l'aide d'une once a boucle , on prélève 4 à 5 colonies ;
- Onensemence un tube stérile contenant de l'eau physiologique stérile ;
- Ensemencer les boites à gélose nutritive , à l'aide d'un écouvillon stérile ;
- Incuber couvercle en bas à 37°C pendant 18h , pour avoir des souche jeunes .

#### 2.3.5. Réalisation de l'antibiogramme

Un antibiogramme est une technique de laboratoire visant à tester la sensibilité d'une bactérie vis-à-vis d'un ou plusieurs antibiotiques, il sert également :

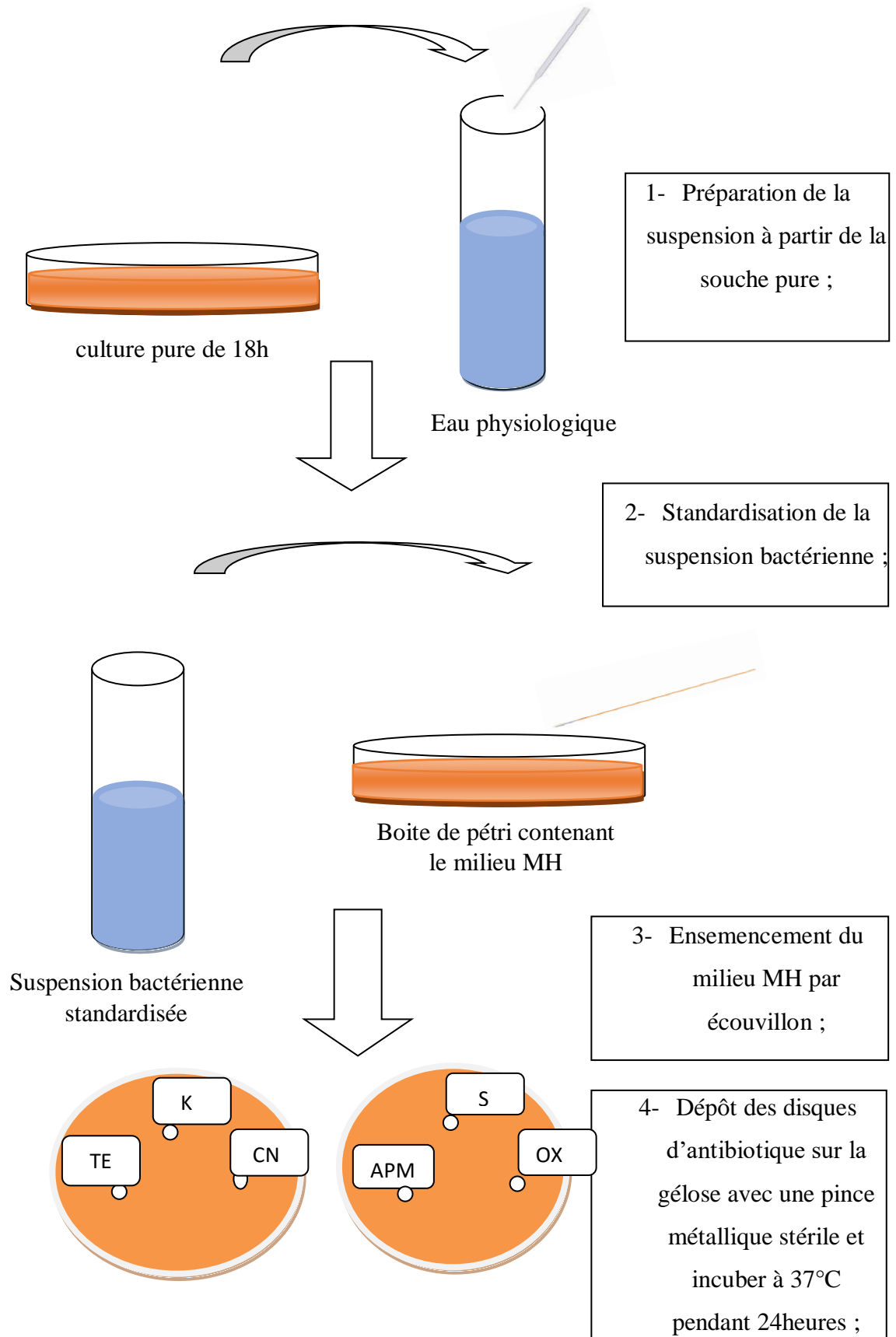
- A la surveillance épidémiologique de la résistance bactérienne ;
- A l'identification par la mise en évidence de résistances naturelles .

Le principe consiste à placer plusieurs disques d'antibiotiques sur les boites gélosées avec le milieu de Mueller-Hinton (MH) préalablement ensemencé avec une dilution calibrée de la souche, puis observer les conséquences sur le développement et la survie des souches bactériennes .

##### - **Mode opératoire**

- Toutes les étapes sont faites dans une zone stérile ;
- Couler la gélose Mueller-Hinton (MH) dans des boites de Pétri , les géloses sont séchés avant l'emploi ;
- à partir du repiquage de 18h , prélever 4 à 5 colonies pures à l'aide d'une pipette Pasteur stérile ;
- Mettre les colonies en suspension dans 10ml d'eau physiologique stérile puis homogénéiser bien la suspension bactérienne ;
- Standardiser la suspension bactérienne à une longueur d'onde de 620 nm ,à une densité optique comprise entre [ 0,08 – 0,1 ] , équivalent à une concentration de  $10^7$  à  $10^8$  UFC/ml ;

- L'inoculum peut être ajusté en ajoutant, soit la culture si elle est trop faible ou de l'eau physiologique stérile si elle est trop forte ;
- Ensemencement des boîtes de 90mm par écouvillonnage, on plongeant l'écouvillon stérile dans la suspension ajustée, ensemençer la boîte en frottant l'écouvillon sur toute la surface de la gélose et en tournant la boîte trois fois afin d'obtenir un tapis de colonies jointives ;
- Laisser sécher de 3 à 5 min ;
- Déposer les disques d'antibiotiques fermement à l'aide d'une pince stérile, flambée sur le bec bunsen puis refroidi à chaque dépôt d'un disque à la surface de la gélose inoculée et séchée ;
- Le contact avec la surface doit être étroit. Les disques une fois déposés ne peuvent être déplacés car la diffusion des antibiotiques est très rapide ;
- Incuber , couvercle en bas , à 37°C pendant 24h .



**Figure 5 :** Schéma représentatif des étapes de la réalisation de l'antibiogramme

K : kanamycine ; CN : Gentamycine ; TE : Tétracycline ;

AMP :Ampicilline ; OX : Oxacilline ; S :Streptomycine

### 2.3.6. Antagonisme

Les eaux usées constituent une niche écologique pour beaucoup de microorganismes. Parmi ces derniers, on rencontre ceux dont la présence dans l'environnement peut nuire à l'équilibre de l'environnement notamment au bon développement des plantes tandis que d'autres, au contraire peuvent présenter des avantages et même être bénéfique pour les plantes.

Le problème qui se pose toutefois, est comment sélectionner et isolées parmi ces bactéries, celles qui pourraient être utiles pour une éventuelle application en lutte biologique.

Dans notre travail, nous avons choisi de confronter deux souches bactérienne qui sont des Coliformes et des Hétérotrophes , contre deux champignons : *Alternaria* sp. et *Botrytis cinerea*.

#### - **Mode opératoire**

- Toutes les étapes sont faites dans une zone stérile ;
- Préparer une suspension bactérienne de chaque souche dans un tube stérile contenant 10ml d'eau physiologique prélever à l'aide d'une seringue stérile ;
- Standardiser la suspension bactérienne à une longueur d'onde de 620 nm , à une densité optique entre [ 0,08 – 0,1 ] , équivalent à une concentration de  $10^7$  UFC/ml ;
- Ensemencer avec un écouvillon chaque souche sur des boites Pétris , gélose nutritive , pour avoir des souches jeunes ;
- Incuber à 37°C pendant 18 h ;
- Préparer des boites Pétris contenant le milieu Sabouraud , séchées préalablement avant l'emploi ;
- Prélever à l'aide d'une pipette Pasteur stérile un disque d'un champignon pure (*Alternaria* sp. / *Botrytis cinerea* ) et le déposer au centre de la boîte pétrie ;
- Prélever à l'aide d'une pipette Pasteur 3 disques à partir de chaque tapi bactérien (Coliformes /Hétérotrophes) pure de 18h puis les déposer sur la boîte pétri sèches, milieu Sabouraud , autour du disque de champignon ;
- Préparer 2 boites sans disques bactériens , on dépose uniquement un disque de champignon(*Alternaria* sp. / *Botrytis cinerea*) au centre de chaque boîte ,milieu Sabouraud, qui serviront de témoins ;
- Incuber les boites, couvercle en bas, à 30°C ; observer le développement du champignon chaque jour .

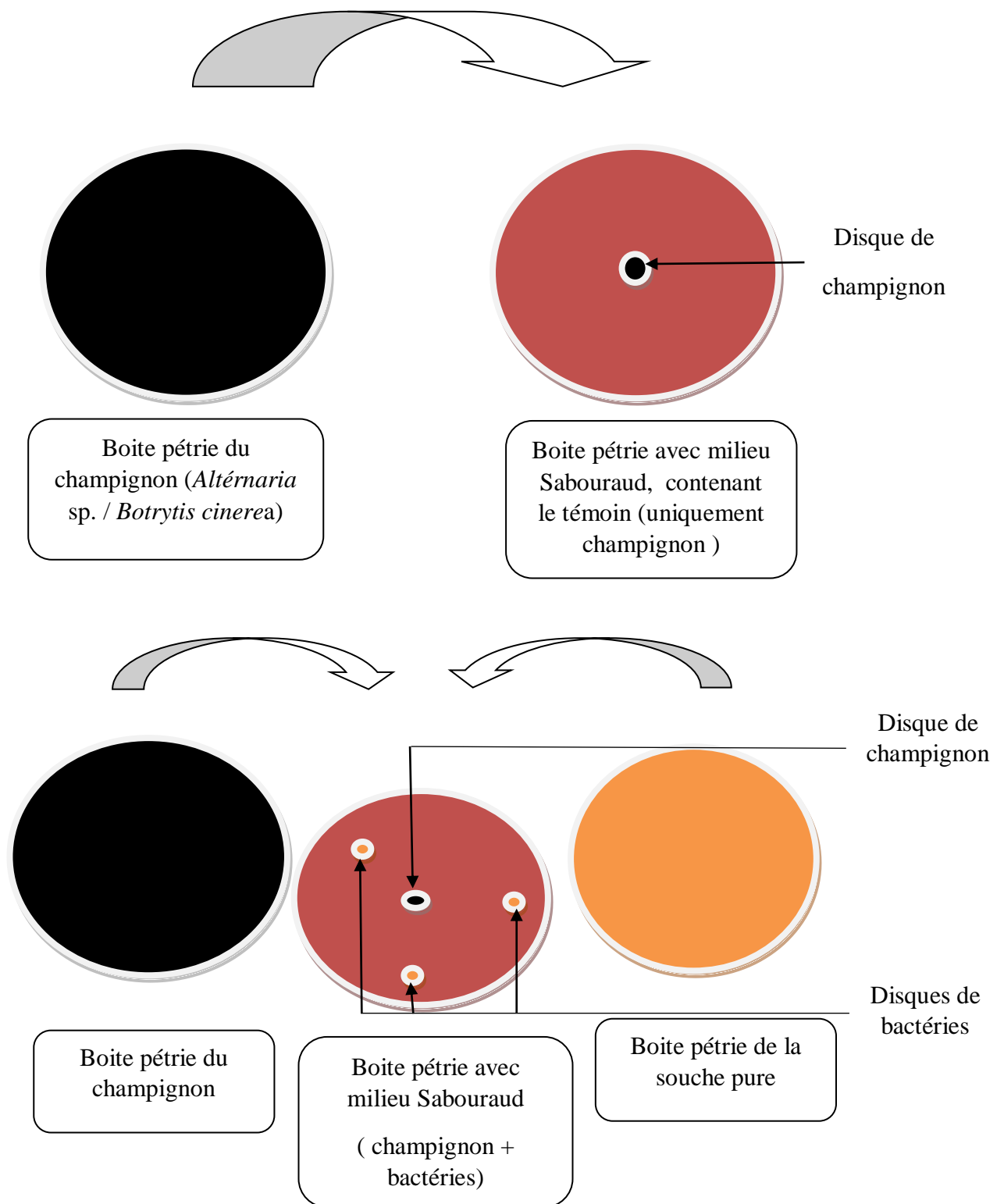
L'antagonisme des bactéries a été évalué par le taux d'inhibition de la croissance mycélienne selon l'équation suivante :

$$PI = \frac{(Mo - Mi) \times 100}{Mo}$$

PI (%) : Pourcentage d'inhibition de la croissance mycélienne.

Mo (cm) : Mesure de la croissance mycélienne normale du champignons témoin.

Mi (cm) : Mesure de la croissance mycélienne en confrontation avec la bactérie.



**Figure 6** : Schéma représentatif des étapes de la réalisation d'un teste d'antagoniste

## **2<sup>em</sup> chapitre**

### ***Résultats et discussion***

## 1. Résultats de l'analyse bactériologique

### 1.1. Dénombrement des entérobactéries et des bactéries hétérotrophes

Après avoir effectué le dénombrement des colonies sur les milieux PCA et CCA, seules les boîtes de pétri contenant un nombre de colonies compris entre 30 et 300 colonies qui ont été prise en compte.

Les résultats obtenus sont donnés en UFC/ml dans le tableau suivant :

**Tableau V** : Résultats du dénombrement des bactéries hétérotrophes et des entérobactéries .

Flore	1 <sup>ère</sup> analyse		2 <sup>ème</sup> analyse	
	Eau brute UFC/ml	Eau épurée UFC/ml	Eau brute UFC/ml	Eau épurée UFC/ml
Hétérotrophes sur milieu PCA	$2,2 \cdot 10^6$	$2,4 \cdot 10^3$	$5,2 \cdot 10^5$	$7,3 \cdot 10^2$
Entérobactéries sur milieu CCA	$1,9 \cdot 10^5$	indénombrable	$9,2 \cdot 10^5$	indénombrable

Concernant les bactéries hétérotrophes présente dans les deux échantillons d'eau brute et épurée, le nombre de colonies par millilitre montre que la charge bactérienne est plus élevée dans les eaux brute (  $2,2 \cdot 10^6$  pour la première analyse,  $5,2 \cdot 10^5$  pour la deuxième analyse) que celle présente dans les eaux épurées ( $2,4 \cdot 10^3$  et  $7,3 \cdot 10^2$  pour la première et deuxième analyse). Cependant malgré le traitement auxquels les eaux ont été soumis, on constate que les bactéries hétérotrophes n'ont pas été éliminer de façon radicale.

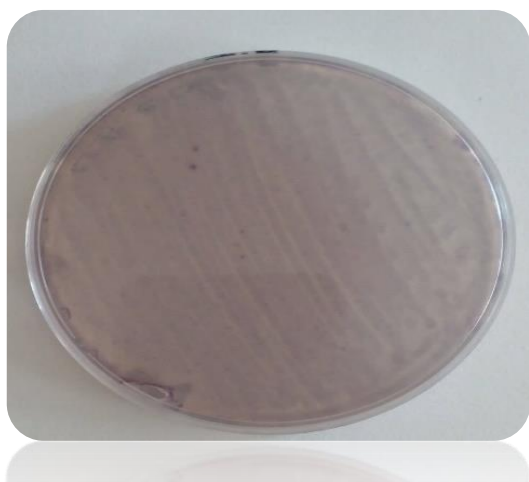
Contrairement aux bactéries hétérotrophes, les entérobactéries enregistre un nombre élevé que ce soit avant et après le traitement des eaux usées, avec des charges de  $1,9 \cdot 10^5$  et de  $9,2 \cdot 10^5$  respectivement pour la première et la deuxième analyse des eaux brute, ainsi que des résultats indénombrable pour les eaux épurée ( première et deuxième analyse) ; la charge bactérienne pour ces bactéries n'a pas diminuer. Cependant nous avons remarqué que la forme des colonies bactérienne obtenus lors de l'analyse des eaux épurée est légèrement différente, plus précisément le centre de ces colonies est vide donnant une forme d'anneau pour les colonies.

La présence des bactéries hétérotrophes et des entérobactéries même après l'épuration de l'eau peut être dû a une mauvaise décantation , ou à un traitement non approprier et inefficace pour l'élimination de ces microorganismes.

## 1.2. Isolement des souches pures

La gélose CCA est un milieu de culture chromogène, sélectif et différentiel, ce milieu permet de détecter, dénombrer et différencier les entérobactéries (*E. coli* et les Coliformes). Conformément aux normes ISO 9308-1 pour l'analyse de la qualité de l'eau, les organismes cibles sont facile à différencier et ce, simplement en se basant sur la couleur des colonies formées : colonies bleu et/ou violet pour *E. coli*, rouge et/ou rose pour les coliformes.

Conformément a cela les résultats obtenus sont illustrés par les **figures 7 et 8**.

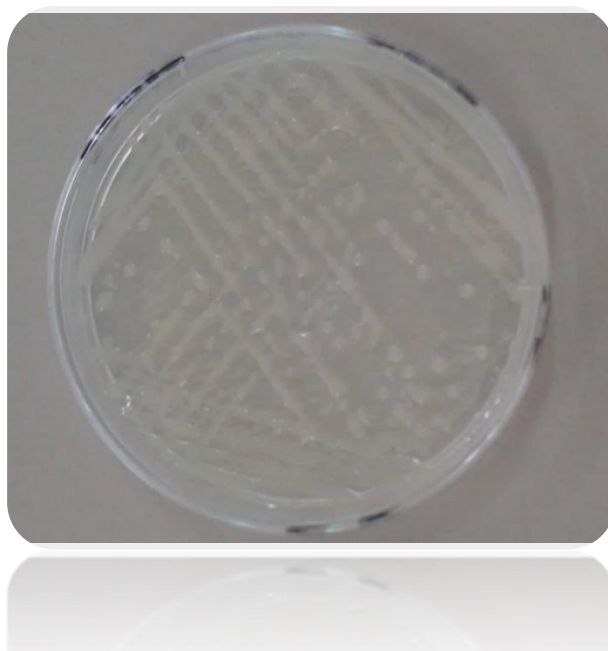


**Figure 7** : Culture pure d' *E. coli*.



**Figure 8** : Culture pure des Coliformes.

Concernant les bactéries hétérotrophes, leurs isolement s'est fait sur le milieu PCA à 30°C pendant 24 heures, le résultats de l'isolement donnent un tapis de colonies blanchâtre uniforme comme l'indique la (**figure 9**).



**Figure 9** : Culture pure de bactérie hétérotrophe.

### 1.3. Résultats de l'identification

- **Examen macroscopique**

Cette étude repose sur un examen des caractéristique générales des colonies visibles à l'œil nue, ces caractéristiques varie d'une souche à une autre, et sont : la forme , la taille, le relief, les contours, la surface, l'opacité, la couleur et le centre.

Les colonies isolées et concernées par cet examen sont :

- les bactéries hétérotrophes sur milieu PCA à 30°C ;
- les coliformes sur milieu CCA à 37°C ;
- *E. coli* sur milieu CCA à 37°C.

Les résultats obtenues sont illustrés dans le tableau suivant :

**Tableau VI** : Résultats de l'examen macroscopique sur les souches isolées des eaux usées.

caractère Souche	Forme	Relief	Allure des Contours	Surface	Opacité	Couleur	centre
<i>E. coli</i>	ronde	Surface Plate	irrégulier	Lisse	Opaque	Violet	plat
coliforme	Ronde	Légèrement bombée	Régulier	Lisse	Opaque	Rose	Bombé
<i>Bactérie</i> hétérotrophe	Ronde	Bombée	Régulier	Lisse	Opaque	Blanche	Légèrement bombé

**Tableau VII** : Résultats de l'examen macroscopique sur les souches isolées des eaux traitées.

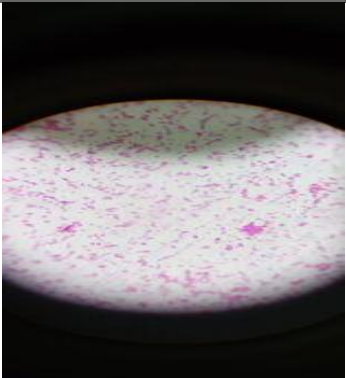
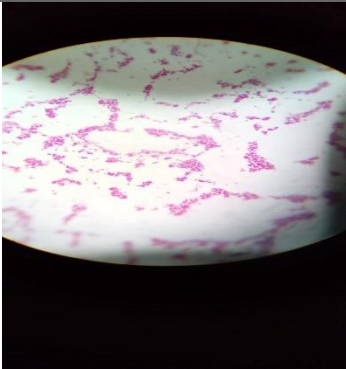
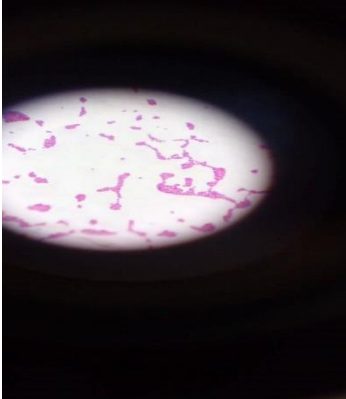
Caractère souche	Forme	Relief	Allure des contours	Surface	Opacité	Couleur	centre
<i>E. coli</i>	ronde	Surface Plate	Régulier	Lisse	Opaque	Violet a centre bleu	plat
Coliforme	Ronde	Surface plate	Régulier	Lisse	Opaque	Rose	Bombé
<i>Bactérie</i> hétérotrophe	Ronde	Surface bombée	Régulier	Lisse	Opaque	Blanche à jaune	bombé

- **Examen microscopique**

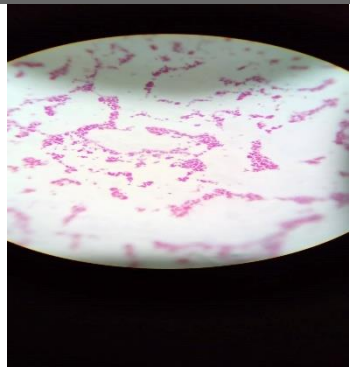
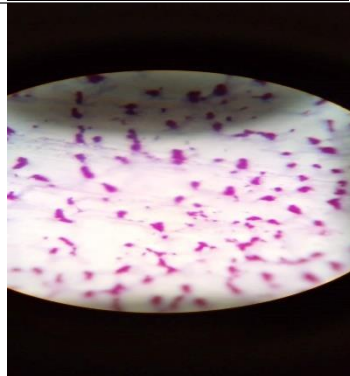
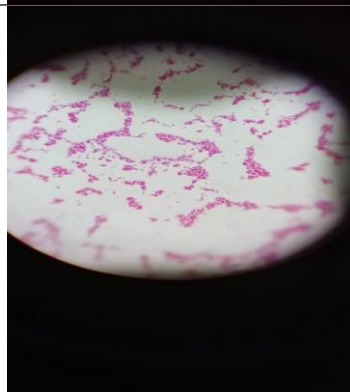
L'observation microscopique est réaliser à l'aide d'un microscopique photonique au G×1000 à l'huile d'immersion des souches pures après avoir effectuer une coloration de Gram.

Les frottis bactériens ont été réaliser à partir de cultures pures de 24h et de 48h et ce afin de déterminer si les bactéries concernées sont sporulant ou non. Les résultats obtenus sont illustrés dans les tableaux suivants :

**Tableau VIII** : Résultats de l'observations microscopique sur les souches isolées à partir des eaux usées ( culture de 24h).

Bactéries	Milieu de culture	Gram	Forme/ agencement	Observation au G×1000
E. coli	CCA	-	Colibacille en chainette	
Coliformes	CCA	-	Colibacille en amas	
Bactérie hétérotrophe	PCA	-	Bacille en amas	

**Tableau IX :** Résultats de l'observation microscopique sur les souches isolées à partir des eaux usées ( culture de 48h).

Bactéries	Milieu de culture	Gram	Forme/ agencement	Observation au G×1000
<b>E. coli</b>	CCA	-	Bacille en amas	
<b>Coliforme</b>	CCA	-	Bacille en grappe de raisin	
<b>Bactérie hétérotrophe</b>	PCA	-	Bacilles sporulant en amas	

- **Galerie biochimique**

Les tests de la galerie biochimiques n'ont été réalisés que sur les souches bactériennes isolées, celles-ci sont : les Coliformes et *E. coli*.

Par conséquent, l'espèce de bactérie hétérotrophe isolée à partir des eaux usées ne peut pas être clairement identifiée, mais en se basant sur l'étude microscopique nous pouvons déduire que la bactérie hétérotrophe isolée est une bacille sporulante à Gram négatif (Bacille G(-)).

Les résultats des tests de la galerie biochimique sont résumés dans le tableau suivant :

**Tableau X:** Résultats de la galerie biochimique des souches isolées à partir des eaux usées.

Test	<i>E. coli</i>	Coliformes
Cat	+	+
Nit	+	+
Mob	mob	mob
Man	+	+
Rm	+	+
Vp	-	-
Cit	-	+
Onpg	+	+
Urée	-	+
Indol	+	+
TDA	-	-
Oxydase	+	+

Cat : catalase ; nit : nitrate réductase ; mob : mobilité ; man : mannitol ; cit : citrate

#### 1.4. Résultats de l'antibiogramme

La valeur des diamètres d'inhibition obtenus lors de la confrontation des bactéries avec les différents antibiotiques (deux répétitions) sont représentés dans les tableaux suivants :

**Tableau XI :** Résultats des diamètres d'inhibition des souches isolées à partir des eaux usées.

Antibiotiques	<i>E. coli</i>	Coliformes	Bacille G (-)
CN	22mm ± 00mm	24mm ± 3mm	25mm ± 2mm
OX	Pas d'inhibition	Pas d'inhibition	Pas d'inhibition
S	15mm ± 1mm	18mm ± 1mm	20mm ± 2mm
K	25mm ± 2mm	24mm ± 2mm	26mm ± 3mm
AMP	18mm ± 0mm	Pas d'inhibition	Pas d'inhibition
TE	25mm ± 0mm	21mm ± 2mm	22mm ± 1mm

CN: Gentamicine ; OX: Oxacilline ; S :Streptomycine ; K : kanamycine ; AMP : Ampicilline ;

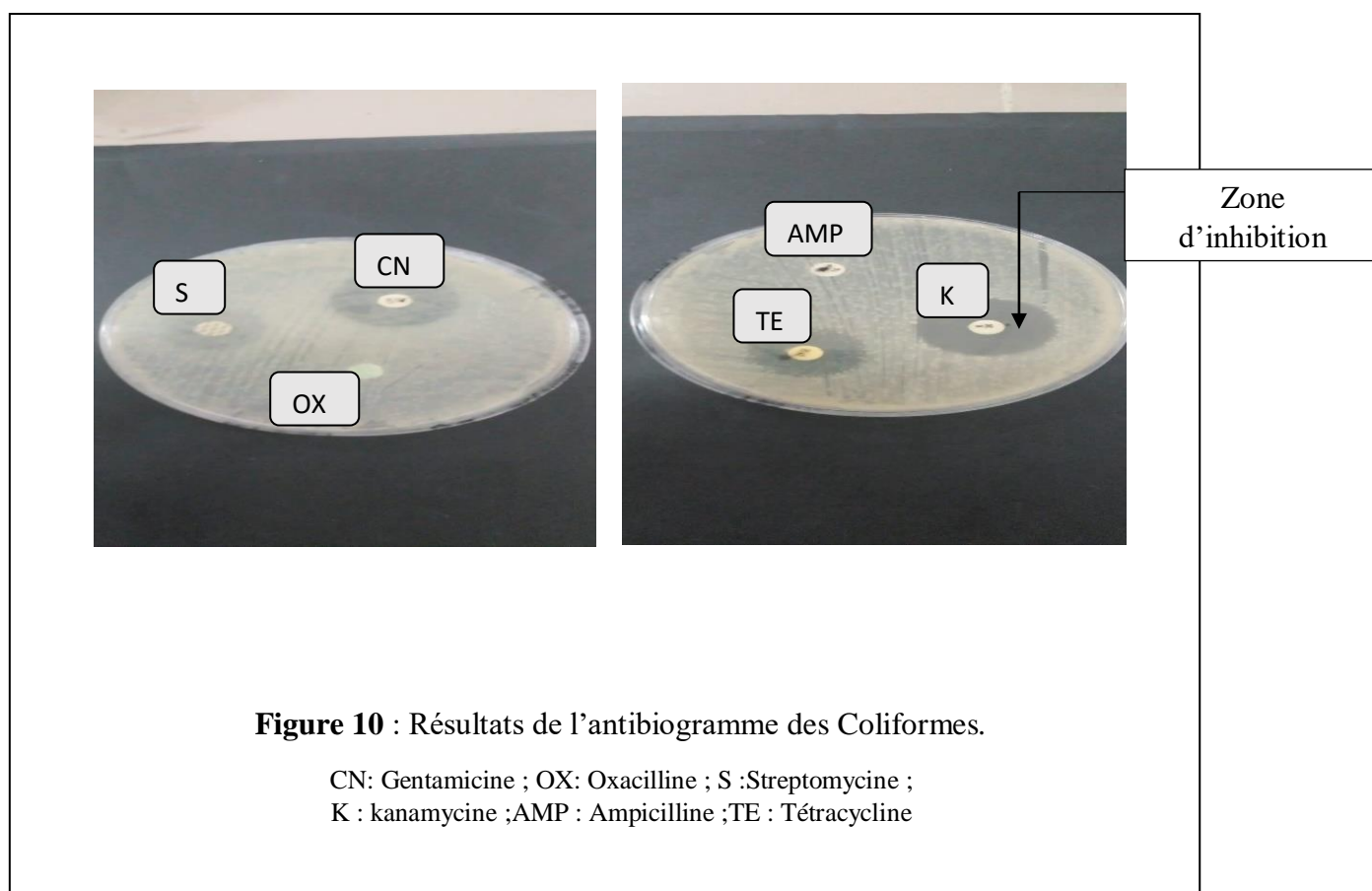
TE : Tétracycline

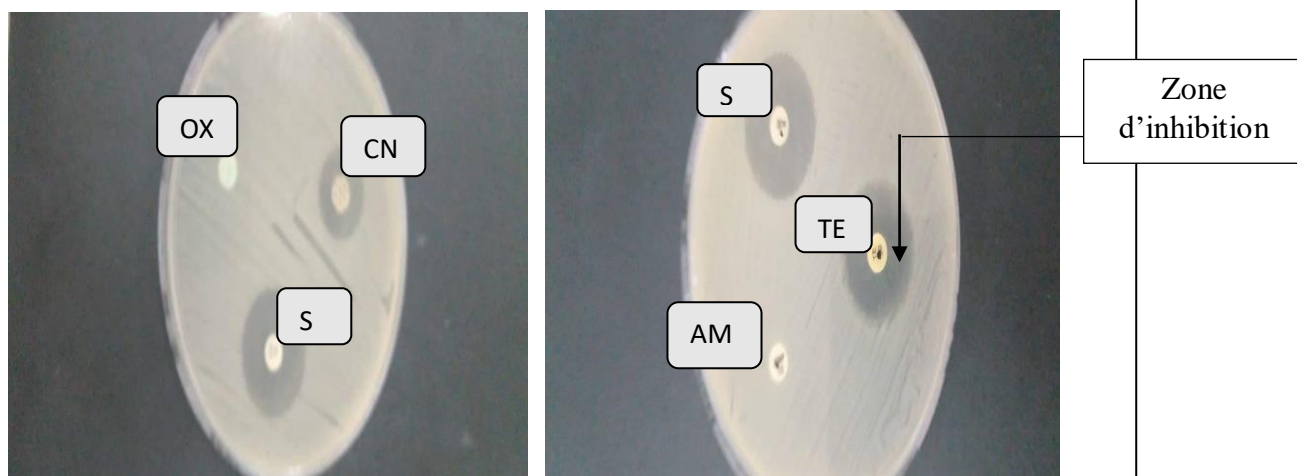
- Selon la norme du comité de l'antibiogramme de la société française de Microbiologie (2015), l'interprétation des résultats obtenus sont donnés dans les tableaux suivant :

**Tableau XII:** Détermination des profils de sensibilité aux antibiotiques des bactéries isolées à partir des eaux usées, selon la norme française de l'antibiogramme.

Antibiotique	<i>E. coli</i>	Coliformes	Bacille G (-)
CN	Sensible	Sensible	Sensible
OX	Résistante	Résistante	Résistante
S	Sensible	Sensible	Sensible
K	Sensible	Sensible	Sensible
AMP	Intermédiaire	Résistante	Résistante
TE	Sensible	Sensible	sensible

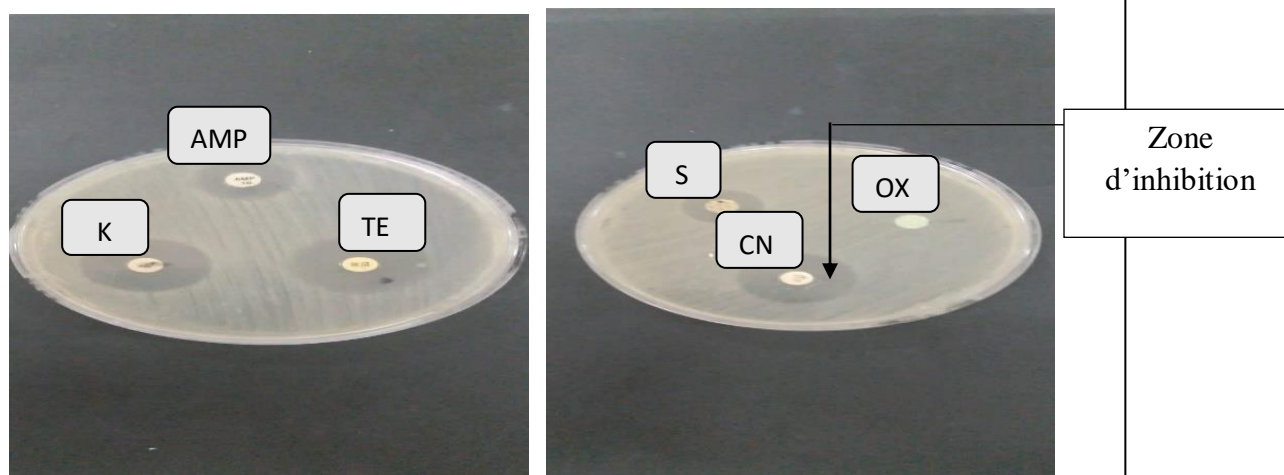
CN: Gentamicine ; OX: Oxacilline ; S :Streptomycine ; K : kanamycine ; AMP : Ampicilline ;  
TE : Tétracycline





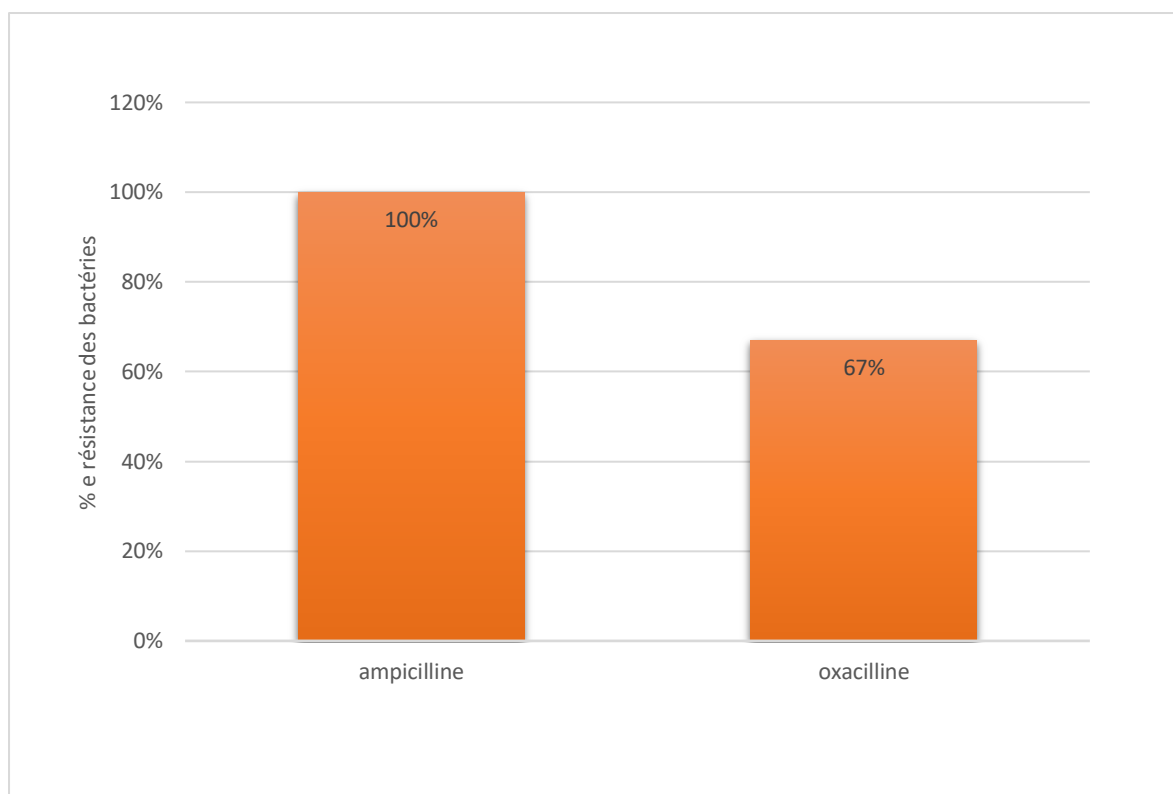
**Figure 11 :** Résultats de l'antibiogramme de Bacille G (-).

CN: Gentamicine ; OX: Oxacilline ; S :Streptomycine ;  
K : kanamycine ;AMP : Ampicilline ;TE : Tétracycline



**Figure 12:** Résultats de l'antibiogramme de *E. coli*.

CN: Gentamicine ; OX: Oxacilline ; S :Streptomycine ;  
K : kanamycine ;AMP : Ampicilline ;TE : Tétracycline



**Figure 13 :** Pourcentage des bactéries résistantes isolées à partir des eaux usées face aux différents antibiotiques.

#### - Interprétation des résultats de l'antibiogramme

D'après nos résultats , 100% des bactéries isolées des eaux usées (*E. coli*, Coliformes et Bacille G(-) ) présentent une résistance à l'oxacilline, et 67% des bactéries (Coliformes, Bacille G(-) ) sont résistante à l'ampicilline.

Selon (Oubrin *et al*, 2012) qui ont réalisé une étude sur les entérocoques féaux et *E. coli* résistante aux antibiotiques à partir es eaux brutes et épurées en cultures, les souches d'*E. coli* montre une sensibilité à la gentamycine et streptomycine. Cependant, certains sérotypes ont montré une certaine résistance à l'ampicilline et la tétracycline. Les différences de résultats entre nos résultats et ceux obtenus au cour de cette étude peuvent être expliqué par la différence de concentration des antibiotiques utilisés , ainsi que par la différence de la capacité de résistance aux conditions environnementales qui diffèrent entre les espèces provenant d'écosystèmes différents.

Une autre étude réaliser par ( Riegal, 2002) sur les infections urinaire en milieu hospitaliers, démontre que les entérobactéries comme les coliformes présentent également une résistance vis-à-vis de l'ampicilline avec un taux de 66% ce qui concorde avec nos résultats.

Concernant la résistance de la Bacille G (-) isolée vis-à-vis de l'ampicilline, l'étude de ( Boureghda, et Benmehenni, 2020) montre que les Bacilles G(-) ont un taux de résistance élevé face à cette antibiotique.

Suivant le rapport du comité de l'antibiogramme de la société française de Microbiologie de 2013, les bactéries à bacilles gram négative non exigeant, dont fait partie les coliformes, présentent une résistance naturelle vis-à-vis d'un certain nombre d'antibiotique, et notamment à l'oxacilline. Ce qui concorde avec les résultats obtenus lors de notre étude.

### 1.5.Résultats de l'antagonisme

Après 10 jours de confrontation direct en culture mixte, l'activité antifongique in vitro met en évidence une action inhibitrice des champignons phytopathogènes testés.

Les résultats du test ont montrés que la croissance mycélienne enregistré chez les témoins négatif sont nettement supérieur à ceux enregistré lors des interactions bactérie-champignons.

Cependant, nous remarquons des résultats plus évident chez le champignons *Alternaria*, qui présente une croissance et des zones d'inhibition bien défini, contrairement au champignon *Botrytis cinerea* qui montre une croissance beaucoup plus lente et des zones d'inhibition quasi inexistante.

Les taux d'inhibitions de la croissance mycélienne varient selon les souches bactériennes, les résultats obtenus sont illustrés par le **tableau XII** et les **figures (14 et 15)**.

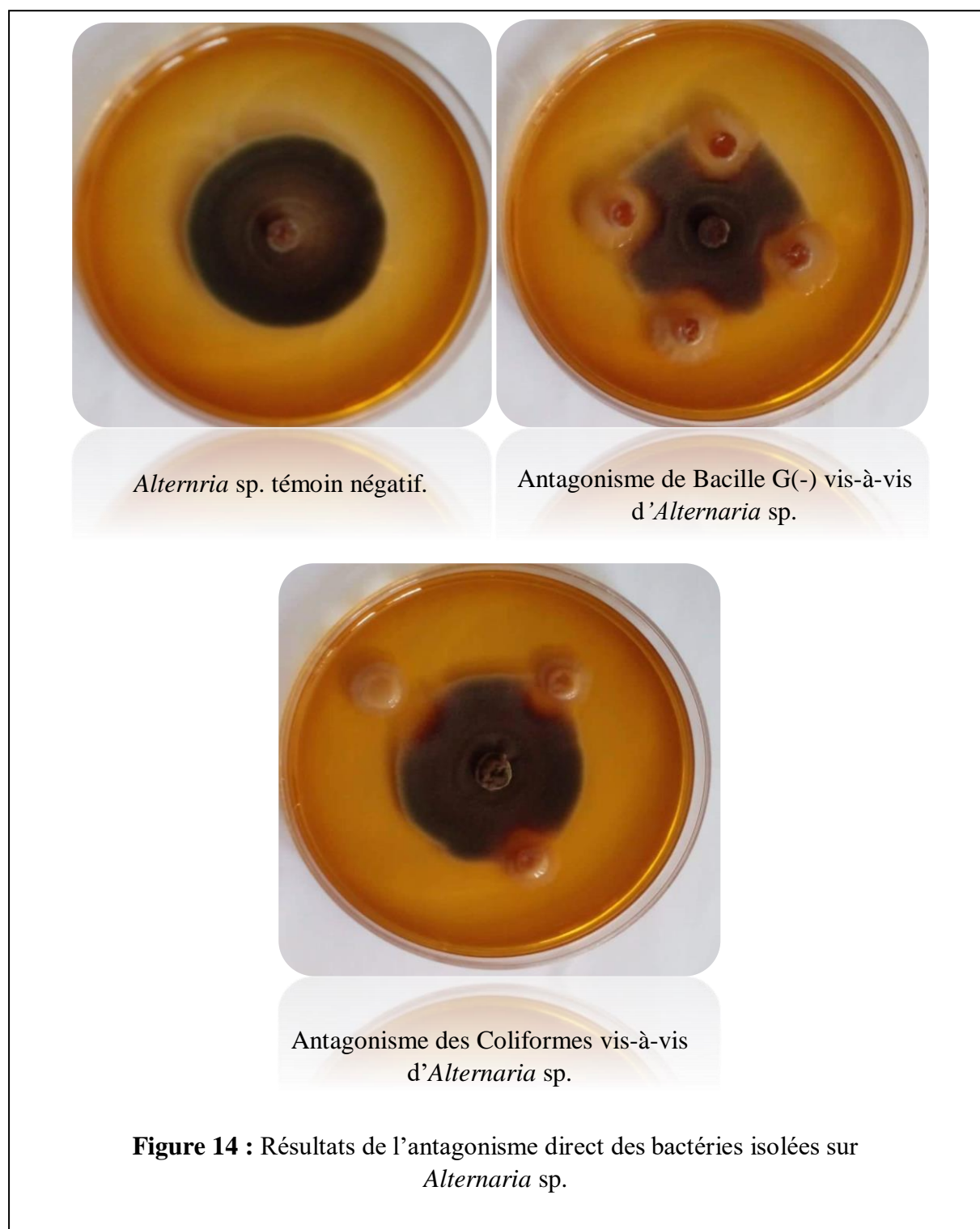
**Tableau XIII:** Taux d'inhibition de la croissance mycélienne en confrontation directe avec les bactéries antagonistes.

Souches	Taux d'inhibitions %	
	<i>Botrytis cinerea</i>	<i>Alternaria sp.</i>
Coliformes	25	34
Bacille G (-)	25	45

Le plus important pourcentage d'inhibition de la croissance mycélienne des deux champignons a été enregistré chez la souche de Bacille G (-) avec des valeurs de 45% pour *Alternaria sp.*, et de 25% pour *Botrytis cinerea*.

Les souches de Coliformes isolées présentent également un effet inhibiteur, avec un taux d'inhibition de 34% pour *Alternaria sp.*, et de 25% pour *Botrytis cinerea*.

En comparant les pourcentages d'inhibition de la croissance mycélienne des deux champignons étudiés, nous constatons que *Alternaria* sp. subit une plus forte activité antagoniste en présence des deux bactéries avec des taux de 34% pour les Coliformes et 45% pour la Bacille G (-). Contrairement à *Botrytis cinerea* qui présente une croissance mycélienne beaucoup plus lente ( **figure 15** ) et des taux d'inhibition de 25% pour les deux souches bactériennes.





*Botrytis cinerea* témoin négatif.

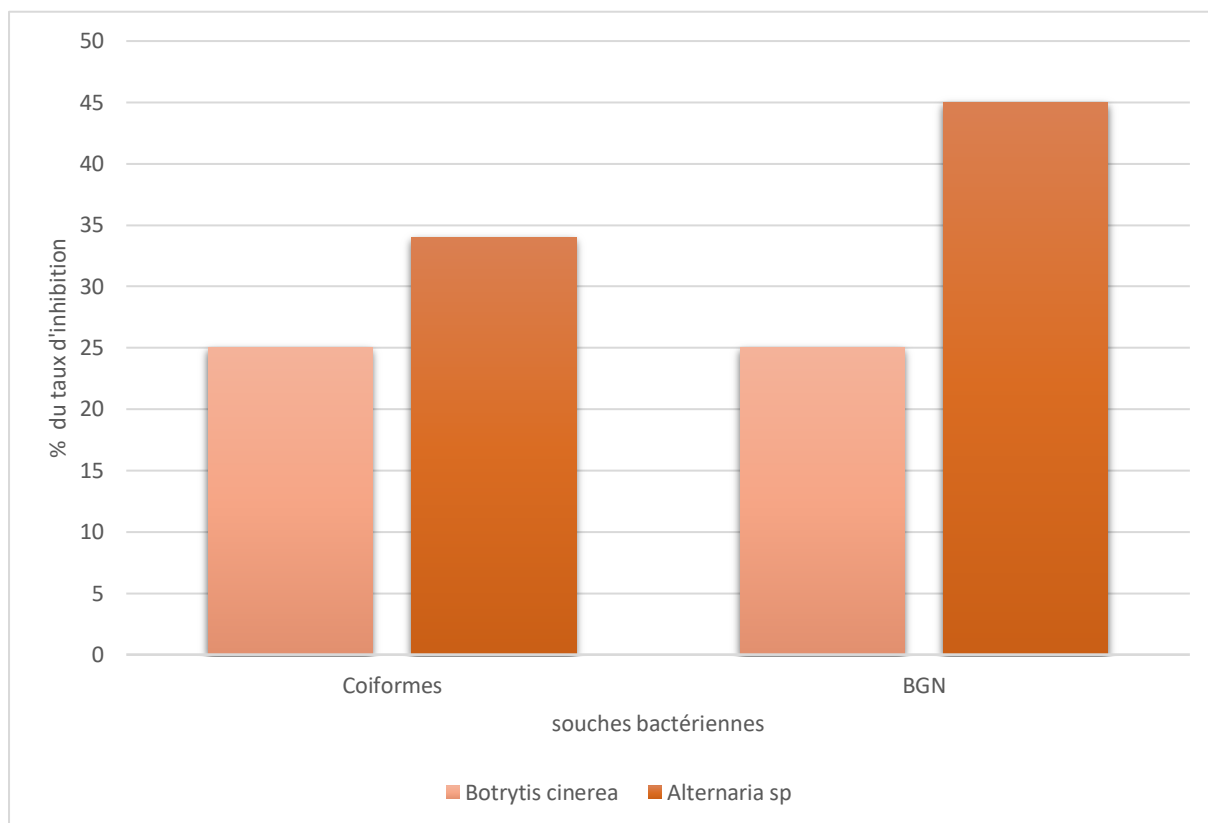


Antagonisme des Coliformes vis-à-vis de *Botrytis cinerea*.



Antagonisme de Bacille G (-) vis-à-vis de *Botrytis cinerea*.

**Figure 15** : Résultats de l'antagonisme direct des bactéries isolées sur *Botrytis cinerea* (après 72heures).



**Figure 16 :** Diagramme représentant les pourcentages d’inhibition de la croissance mycélienne en confrontation directe avec les bactéries antagonistes.

Le test d’antagonisme direct nous a permis d’estimer le potentiel inhibiteur des bactéries isolées à partir des eaux usées vis-à-vis des deux souches fongiques testées. Cette expertise révèle des intensités inhibitrices variables selon la souche bactérienne.

La différence observée sur les pourcentages d’inhibition des souches fongiques testées suggère que le mode d’action et/ou que les métabolites produites par les bactéries peuvent varier d’une bactérie à une autre. Cela peut également être expliqué par la taxonomie qui diffère chez ces bactéries. (Williams et Asher, 1996).

L’action antagoniste des souches isolées : *Coliformes* et *BGN* ne semble pas être spécifique à un seul champignon. Ainsi, Les résultats obtenus suggèrent la possible existence de bactéries ayant un effet antagoniste à large spectre affectant des champignons appartenant à toutes les classes fongiques.

## *Conclusion générale*

### Conclusion

Dans la présente étude nous nous sommes focalisés principalement sur l'isolement et le dénombrement des entérobactéries et des bactéries hétérotrophes présentes dans les eaux usées. Nous avons pu isoler deux souches d'entérobactérie qui sont : les coliformes et *E. coli*, et une souche de bactérie hétérotrophe qui est une Bacille Gram négative.

Les souches isolées ont été soumises à un examen d'antibiorésistance afin de déterminer le profil de résistance de ces bactéries vis-à-vis des antibiotiques testés, il en est ressorti après l'évaluation des zones d'inhibitions que 67% des bactéries isolées présentent une résistance à deux antibiotiques différents. L'émergence de ces bactéries résistantes aux antibiotiques dans les effluents est principalement due à la présence de rejets chargés en résidus d'antibiotiques, qui pour la plupart sont d'origine hospitalière.

Ces bactéries présentant un profil de multirésistance ont ensuite été exploitées dans un test d'antagonisme sur deux souches de champignons phytopathogènes : *Alternaria* sp. et *Botrytis cinerea*. Les résultats obtenus permettent d'affirmer qu'en plus d'avoir un pouvoir d'antibiorésistance sur plus d'un antibiotique, elles possèdent également un pouvoir antagoniste sur ces deux champignons.

Par ailleurs, ces résultats démontrent que certaines bactéries présentes dans les eaux usées possèdent une activité antagoniste sur certains champignons. Il serait donc intéressant d'identifier les métabolites bioactives qui leur confèrent ce pouvoir, et ce dans le but de les exploiter dans la lutte biologique contre les maladies cryptogamiques.

En se basant sur ces résultats, il est important d'élargir les points suivants comme perspectives :

- Isoler d'autres bactéries présentes dans les eaux usées.
- Élargir les tests des isolats bactériens sur une gamme plus large de champignons phytopathogènes.
- Identifier les métabolites bioactives des souches antagonistes.

## *Références*

## Références bibliographiques

### A

Abbott, S. L. (2007). *Klebsirmma, Enterobacter , Citrobacter , Serratia , Plesiomonas, and other Enterobacteraceae*. In P . R, Murray . E. J. Baron, J. H.Jorgensen, M. L. Landry & M. A. Pfflar (Eds.), *Manual of Clinical Microbiology* (9th ed, pp. 698-711). Washington, USA:ASM Press.

Abdelkader F. (2012). *Etude comparative de l'infection des sols par quelques champignons pathogènes en conditions de semis direct et de travail conventionnel*. Diplôme de Magister, Université FERHAT ABBAS,Sétif, Algérie.

Afnor (Association Française de Normalisation). (1990). *Eaux-méthodes d'essais. Recueil de Normes Françaises, 4ème édition*, La Defense, Paris, 735 pp.

Ajouz S. (2009). *Estimation du potentiel de résistance de Botrytis cinerea à des biofongicides*. Thèse de doctorat, Université d'Avignon, France.

Agrios G.N. (2005). *Plant pathology. 5 th ed. Elsevier Academic Press. USA UK.*

Alabouvette C, Olivain C and Steinberg C (2006). *Biological control of plant diseases :theEuropeansituation*. European Journal of Plant Pathology,114, 329-341.

Allen, M.J., Edberg, S.C. et Reasoner, D.J. (2004). *Heterotrophic plate count bacteria – What is theirsignificance in drinking water?* Int. J. Food Microbiol., 92 : 265-274.

Anastasi E., Matthews B., Gundogdu A., Vollmerhausen T., Ramos N.,Stratton H....Katouli M . *Prevalence and persistence of Escherichia coli strains with uropathogenic virulence characteristics in sewage treatment plants. Applied and Environmental Microbiology*. 2010;76:5882–5886

Aquiloni L. Gherardi F.,( 2010). *The use of sex pheromones for the control of invasive populations of the crayfish Procambarus clarkia: a field study*. Hydrobiologia, 649, 249-254.

Awwa (2006). *Awwa manual of water supply practices - M48 Waterborne pathogens*. 2eme édition .

### B

Bach TJ, Benveniste P (1997) *Cloning of cDNAs or genes encoding enzymes of sterol biosynthesis from plants and other eukaryotes: heterologous expression and complementation analysis of mutations for functional characterization*. *Prog Lipid Res* 36: 197-226.

Batch D., 2011. L'impact des pesticides sur la santé humaine. Thèse de Doctorat Université Poincaré, nancy 1 faculté de pharmacie, lorraine, 185p.

Benhamou N, (1996) *Elicitor-induced plant defence pathways*. *Trends Plant Sci* 1: 233-240.

Bennett, R., Mellon, F., Foild, N., Pratt, J., Dupont, M., Perkins, L., Kroon, P.(2003). *Profiling glucosinolates and phenolics in vegetative and reproductive tissues of the multi-purpose tree Moringa oleifera*. *J. Agric. Food Chem.*, 51 (12): 3546-3553.

Belosokhov, A.F. Belov, G.L. Chudinova, E.M. Kokaeva, L.YU. Elansky, S.N. (2017). *Alternaria spp. and Colletotrichum coccodes in potato leaves with early blight symptoms*. *PAGV -Special Report*. (18). 181-190.

Blancard D., Laterrot M., Marchoux G., Candresse T. (2009). *Les maladies de la tomate*. (Eds). INRA. Paris.

Blandeau E. (2012). *Etat des lieux du potentiel anticancéreux de neuf champignons macroscopiques*. Thèse de doctorat, Université de Angers. France.

Bonnemain JL, Delrot S, Despeghel JP (1984) *Mécanismes de l'accumulation des nutriments par les fines nervures* (écrit en russe). *Physiol Rasten* 31: 367-384.

Boudih S. (2011). *Identification des moisissures et leurs métabolites secondaires colonisant des supports papiers. Evaluation de la toxicité sur des cellules épithéliales respiratoires in-vitro*. Thèse de doctorat. Université Paris Est. Paris

Bouregghda, K., benmehenni, H. (2020). Les hémocultures : profil bactériologique et sensibilité aux antibiotiques. Master, université Borj Bou Arreridj .

### C

Canard B. et Senequier-Crozet A. (2016). *Les champignons endophytes : impact sur les écosystèmes et production de molécules d'intérêt thérapeutiques*. Thèse de doctorat, Université de Grenoble Alpes. France.

Calmes, B. (2011) *Réponses adaptatives d'Alternaria brassicicola au stress oxydatif lors de l'interaction avec les brassicacées : Rôle du métabolisme du mannitol et des Glutathion-Stransférases*. Thèse de doctorat Spécialité : Biologie Cellulaire et Moléculaire Végétale Ecole Doctorale VENAM.

Chandler D. et al., (2011). *The development, regulation and use of biopesticides for integrated pest management*. Philos. Trans. R. Soc. London Ser. B., 366(1573), 1987- 1998.

Chen X.,( 2002). Comparative analysis of the complete genome sequences of Helicoverpa zea and Helicoverpa armigera single-nucleocapsid nucleopolyhedroviruses. J. Gen. Virol., 83, 673-684.

Collier ,L., Balows, A., Sussman, M. (Eds). (1998). *Microbial Infection : systematic bacteriology* (9th ed ). USA .

Corvec S. (2008). *Mécanismes de résistances bactérienne, Service de Bactériologie-Hygiène Hospitalière*. CHU de Nantes ( France ).

Couvreur. (2002). Fongicides des céréales et des protéagineuse. Edition ITCF, PP 216.

### D

Dellaras, C. (2007). Microbiologie pratique pour le laboratoire d'analyses ou de contrôle sanitaire : aliments, produits cosmétiques, eaux, produits pharmaceutiques. Editions Medicales Internationales, Lavoisier 476 p.

Dallaire R. G., Mukle F., Rouget P., Kadhel H., Bataille L., Guldner S., Seurin V., Chajes C., Monfort O., Boucher J. P., Thome S., Jacobsen W., Multigner L et Cordier S., (2012). Cognitive, visual, and motor development of month-old Guadeloupean infant exposed to chlordécone. *Environmental Research*. 118: 79:85.

Durand-Tardif M, Pelletier G (2003) . *Apport de la biologie moléculaire et cellulaire et de la génétique à la protection des plantes*. *C R Biologies* 326: 23-35.

### *E*

Elad Y,( 2007). *Botrytis Biology pathology and control: botrytis spp. and diseases they cause in agricultural systems – an introduction*. The Volcani Center, Bet Dagan, Israel:, pp. 1-6.

Euzbey J. P. (2008). *Abrégé de Bactériologie Générale et Médicale à l'usage des étudiants de l'Ecole Nationale Vétérinaire de Toulouse (France )*, 235-260.

### *F*

FAO, (2015). Organisation des Nations Unies pour l'alimentation et l'agriculture, Rome, Italie.

### *G*

Garnier J., Servais P., Billen G.(,1992a). *Dynamics of bacterioplankton in the river Seine (France) :impact of parisian effluents*. *Can. J. Microbiol.*, 38, 56-64.

Grewal P., Grewal S., Tan L. & Adams B.,( 2003). *Parasitism of molluscs by nematodes: types of associations and evolutionary trends*. *J. Nematol.*, 35(2), 146-156.

Grimont, F., & Grimont, P.A. D . (1992) . The genus *Serratia* . *The Prokaryotes*, 3, 2822-2848.

### *H*

Holz G. (2007) .*Botrytis Biology pathology and control: The ecology of botrytis on plant surfaces*.*The Volcani Center, Bet Dagan, Israel*: Elad Yigal, pp. 9-24.

Horneman, A.J ., Ali, A., Abbott, S.L. (2007). *Aeromonas*. In P.R . Murry, E .J . Baron ,M. L. Landry, J. H. Jorgensen , M. A. Pfaller (Eds ),*Manual of clinical microbiology* ( 9th ed.,pp. 715-722). Washington, D.C. :ASM Press .

*J*

Jacques C. (2005). *La résistance par efflux MCU-PH*. UFR Médecine - CHU - Grenoble.

Janda, M.J. and Abbott, S.L. (1998). *Evolving concepts regarding the genus Aeromonas: An expanding panorama of species, disease presentations, and unanswered questions*. Clin. Infect. Dis. 27:332-344.

Janda, J. M., & Abbott, S. L. (2006) . *Ten Genre Klrbisiella and Raoultella. The Enterobacteria* ( 2and ed.,pp. 115-129) . Weshington, USA: AMP Press.

Janda, M.J. et Abbott, S.L. (2010). *The genus Aeromonas: taxonomy,,pathogenicity, and infection*. Clin. Microbiol. Rev., 23: 35-73.

Jijakly M.H. (2003). *La lutte biologique en phytopathologie, In : Phytopathologie*. Lepoivre P. (Eds). DeBoeck, Bruxelles.

Joly, B., Reynaud, A. (2003). *Entérobactéries : systématique ct méthodes de diagnostic*. TEC et DOC (Ed.), Lavoisier, Paris, 356 p

*K*

Kall W . (2002). *La résistance bactérienne, extrait de « le médecin du Québec »* , 37 , 3 , 41-47 .

Kiffer E. et Morelet M. (1997). *Les Deuteromycètes : classification et clés d'identification générique*. Edition Quae, France.

Kirk, P.M., Cannon, P.F., David, J.C., Egham, U.K. and Stophes, J.A. (2001). *Ainsworth and Bysby's Dictionnary of fungi , 9 th edn* .CABI. Bioscience.UK. Center and central Bureau Voie. Utrech. The Net.

*L*

Lefort F., (2010). *Lutte biologique et lutte microbiologique : des concepts anciens pour des méthodes de lutte modernes*. Haute Ecole de Paysage d'ingénierie et d'architecture. Genève.

Lau, H.Y. et Ashbolt, N.J. (2009). *The role of biofilms and protozoa in Legionella pathogenesis: implications for drinking water*. J. Appl.Microbiol., 107 : 368-378.

Lemarchand F., Courvalin P. (2008). *Les antibiotiques*. La recherche, 424, 77.

Leminor L., Veron M. (1989). *Bactériologie médicale*. Flammarion, 1107.

Leng P., Zhiming Z., Guangtang P. & Maojun Z.,( 2011). *Applications and development trends in biopesticides*. Afr. J. Biotechnol., 10(86), 19864-19873.

Lennartsson R.P. (2012). *Zygomycètes and cellulose residuals : hydrolysis, cultivation and applications*. Thèse de doctorat, Université de Borås, Suède.

Lepoivre, Ph. (2003). *Phytopathologie : Bases moléculaires et biologiques des pathosystèmes et fondements des stratégies de lutte*, pp.111-140.

Leroux P.R.,Fritz D.,Debieu C.,Albertini C.,Lanen J., Bach, M., Gred F., Chapeland .(2002). Mechanisms of resistance to fungicides in field strains of Botrytis cinerea. Pest Management Science58: 876-888

Logrieco, A. Moretti, A. Solfrizzo, M.( 2009). *Alternaria toxins and plant diseases: an overview of origin, occurrence and risks*. *World mycotoxin Journal*. 2 (2): 129-140.

Loznieski L A., Rabaud C. (2010) . *Résistances bactérienne aux antibiotiques*. CCLIN Sud-Est Nancy (France ).

## M

Marchal N., Bourdon J.L. (1982). *Les milieux de cultures pour l'isolement et identification biochimique des bactéries*. Doin éditeurs. Paris.

Martinez F.,Dubos et M.Fermaud (2005): *The role of saprophy and virulence in the populations dynamics of B.cenerea in vineyard phytopathology* .95:692-700 . In: *Assignment de différents modes de vie au vignoble a certains entités génétiques du champignons*

*phytopathogene Botrytis cinerea*. Rapport d'activité 2004-2005 Institut National de la Recherche Agronomique , Bordeaux-Aquitaine. 56

McQuilken M., (2003) . *Production of macrospore A by the mycoparasite Coniothyrium minitans*. FEMS Microbiol. Lett., 2009, 27-31.

Milet, A. (2017). *Isolement de microorganismes à partir du sol des régions arides et sélection d'isolats à effet antagoniste sur l'agent de l'Alternariose*. Thèse de Doctorat en Biotechnologies, Biologie et Environnement. Université des Frères Mentouri - Constantine 1. 31-34.

### N

Navciel C., Vilde L. (2005) .*Abrégé de la bactériologie médicale, deuxième édition*.

Nasraoui, B., (2006). Les champignons parasites des plantes cultivées, biologie, systématique, pathologie, maladies. Centre de publication universitaire, Tunis. p 456.

### O

Oubrin, N., cohen, N., hajjami, K., ennaji, M., bennani, M.(2012). Détection des Entérocoques Fécaux et Escherichia Coli Résistant Aux Antibiotiques Isolés à Partir des Eaux Brutes Épurées et Cultures. European Journal of Scientific Research.

### P

Percival, S.L. et Thomas, J.G. (2009). *Transmission of Helicobacter pylori and the role of water and biofilms*. J. Water Health, 7: 469-477.

Pereira E., Santos A., Reis F., Tavares R.M., Baptista P., Lino-Neto T., Almeida-Aguiar C. (2013) . *A new effective assay to detect antimicrobial activity of filamentous fungi*. Microbiological Research, 168 (1): 1-5.

Pereira V.L., Fernandes J.O., Cunha S.C. (2014). *Mycotoxins in cereals and related foodstuffs: A review on occurrence and recent methods of analysis*. Trends Food Sci. Technol.;36:96–136.

Perez S., Patterson T.F.(2002).*Antifungale resistance in pathogenic fungi*. Clin. Infect.Dis. 35: 1073-80.

Popp J., Petö K. & Nagy J., (2013). *Pesticide productivity and food security*. A review. Agron. Sustainable Dev., 33, 243-255.

### R

Regnault-Roger C.( 2005). Produit de protection des plantes innovation et sécurité pour une agriculture durable. Edition Lavoisier, Tec et Doc.pp341.

Rocher F., (2004). Lutte chimique contre les champignons pathogènes des plantes. Evaluation de la systémie phloémienne des nouvelles molécules à effet fongicide et d'activateurs de réaction de défense. Thèse de doctorat. Université de Poitiers. France. 91p.

Rosas-Garcia N.M.,( 2009). *Biopesticide production from Bacillus thuringiensis: an environmentally friendly alternative*. Recent Pat. Biotechnol., 3(1), 28-36.

### S

Schmutterer H., (1990) . *Properties and potentials of natural pesticides from neem tree*. Annu. Rev. Entomol., 35, 271- 298.

### T

Tariq M.I., Afzal S., Hussain I., Sultana N. (2007). Pesticides exposure in Pakistan : A review. Environment international. 33(8) : 1107-1122.

### V

Valueva, T. A., Mosolov, V. (2004). *Role of inhibitors of proteolytic enzymes in plant defense against phytopathogenic microorganisms*. Biochemistry (Moscow), 69(11), 1305-1309.

Van Houdt, R., Givskiv, M.,& Michiel, C. W. (2007). *Quorum sensing in Serratia* . FEMS Microbiology Reviews, 31(4), 407-424. doi :10.1111/j. 1574-6976.

### W

Williamson, B., Tudzynski, B., Tudzynski, P., Van kan, J. (2007). Botrytis cinerea: the Cause of grey mould disease. Mol Plant Pathol 8 : 581-599.

Williams G.F., Asher M.J.C. (1996). Selection of rhizobacteria for the control of *Pythium ultimum* and *Aphanomyces cochlioides* on sugar-beet seedlings. *Crops Protection*. 15: 479-486.

### Y

Yala D., Merad A.S., Mohamedi D, Ouar-korichi M.N. (2001) . *Médecine du Maghreb*, 91, 5-12 .

Yarmolinsky M. B., Sternberg N.(1988). *The bacteriophages*, Plenum Press . New York, 1, 291-438.

# *Annexes*

## Annexe 01 : appareillage et outillage.

Appareillage	Outillage
Flacon stériles	Autoclave
Becher	Etuve
Tubes à essai stériles	Réfrigérateur
Boîtes de pétris	Bain marie
Pipettes pasteur	Spectrophotomètre
Ecouvillons	Microscope optique
Embouts stériles	Compteur de colonies ( Funke gerber)
Erlenmeyer	Four pasteur
Pinces	Bec bensen
Lames	
Anse de platine	
Anse à boucle	
Seringue	
Micropipette automatique	
Portoirs de tubes	
Pinces	

## Annexe 02 : Les produits chimiques utilisés lors de l'étude expérimentale.

- Eau distillée ;
- Eau physiologique ;
- Fushine ;
- Violet de Gentiane ;
- Huile à immersion ;
- Solution de Lugol ;
- Disques d'oxydases ;
- Eau oxygénée,
- Alcool ( Ethanol) ;
- Bouillon nitraté ;
- Réactifs de Gries ;
- Poudre de Zinc ;
- Disque d'ONPG ;
- Disques d'Antibiotiques

Annexe 03 : Composition des milieux de cultures utilisés pour l'analyse  
bactériologique ( en g/l).

- Milieu Chromocult Coliforme Agar ( CCA)

Digestat enzymatique de caséine.....	1,0
Extrait autolytique de levure.....	2,0
Chlorure de sodium.....	5,0
Dihydrogénophosphate de sodium x 2 H <sub>2</sub> O.....	2,2
Hydrogénophosphate disodique.....	2,7
Pyruvate de sodium.....	1,0
Sorbitol.....	1,0
Tryptophane.....	1,0
Tensioactif à l'éthoxylate d'alcool secondaire.....	0,15
6-Chloro-3-indoxyl-β-D-galactopyranoside.....	0,2
Acide 5-Bromo-4-chloro-3-indoxyl- β-D-glucuronique.....	0,1
Isopropyl-β-D-thiogalactopyranoside (IPTG).....	0,1
Agar agar.....	16,0

pH du milieu prêt à l'emploi à 25 °C : 6,8 ± 0,2.

- Milieu Plate Count Agar (PCA)

Digest enzymatique caséine/tryptone.....	5,0
Extrait de levure.....	2,5
Glucose.....	1,0
Agar-agar.....	15,0

pH du milieu prêt à l'emploi à 25)C : 7,0 ± 0,2

- Milieu Gelose Nutritive (GN)

Tryptone.....	5
Extrait de viande.....	1
Extrait de levure.....	2
Chlorure de sodium.....	5
Agar-agar bactériologique.....	12

- Milieu Muller Hinton

Extrait de bœuf.....	2
Hydrolysate acide de caséine.....	17,5
Amidon.....	1,5
Agar-agar.....	17
Eau distillée.....	11

- Milieu Sabouraud

Peptones.....	10
Glucose (ou Dextrose).....	40
Agar.....	15
Eau distillée.....	11

pH du milieu prêt à l'emploi : 5,6

## Résumé

Les champignons phytopathogènes occupent une place importante parmi les microorganismes phytopathogènes. A l'origine de la majorité des maladies cryptogamiques, ils constituent une menace persistante pour l'agriculture. Le développement de méthodes adéquates de lutte contre la prolifération de ces derniers est donc impératif.

Les micro-organismes utilisés au cours de cette étude ont été isolés à partir des eaux usées de la station d'épuration Est de la ville de Tizi-ouzou. Ils ont été soumis à un test d'antibiogramme afin de définir leurs profils de résistance ou de sensibilité vis-à-vis des six antibiotiques testés : Gentamycine, Ampicilline, Streptomycine, Oxacilline, Kanamycine et Tétracycline. Les résultats montrent que 100% des bactéries isolées à partir des effluents ont une résistance pour l'ampicilline, contre 67% pour l'oxacilline. Parmi ces bactéries deux d'entre elles présentent un profil de multirésistance, ces bactéries sont les Coliformes et la Bacille Gram Négatif.

Ces bactéries ayant un profil de multirésistance sont par la suite soumises à un test d'antagonisme sur deux champignons phytopathogènes : *Alternaria* sp. et *Botrytis cinerea*. Les résultats obtenus suggèrent que les deux souches bactériennes possèdent un pouvoir d'inhibition de la croissance mycélienne sur les deux champignons testés, avec des taux variant de 34% à 45% pour *Alternaria* sp. et de 25% pour *Botrytis cinerea*.

**Mots clés :** Champignons Phytopathogènes, Entérobactéries, Hétérotrophes, Multirésistance, Antagonisme

## Summary

Phytopathogenic fungi occupy an important place among plant pathogenic microorganisms. At the origin of the majority of cryptogamic diseases they constitute a persistent threat to agriculture. The development of adequate methods to combat the proliferation of the latter is therefore imperative.

The microorganisms used in this study were isolated from wastewater from the eastern wastewater treatment plant of the city of Tizi-ouzou. They were subjected to an antibiogram in order to define their resistance or sensitivity profile with respect to the six antibiotics tested: Gentamycin, Ampicillin, Streptomycin, Oxacillin, Kanamycin and Tetracycline. The results show that 100% of the bacteria isolated from the effluents have resistance for ampicillin, against 67% for oxacillin. Among these bacteria, two of them have a multi-resistance profile, these bacteria are Coliforms and the Gram-Negative Bacillus.

These bacteria with a multi-resistance profile are then subjected to an antagonism test on two phytopathogenic fungi: *Alternaria* sp. and *Botrytis cinerea*. The results obtained suggest that the two bacterial strains have a power of inhibition of mycelial growth on the two fungi tested, with rates varying from 45% to 34% for *Alternaria* sp. and 25% for *Botrytis cinerea*.

**Key words:** Phytopathogenic Fungi, Enterobacteriaceae, Heterotrophs, Multi-resistance, Antagonism