

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



*Mémoire de fin d'études*

*En vue de l'obtention du diplôme de master*

*Spécialité : Microbiologie Appliquée*

**Thème**

**Isolement de bactéries rhizosphériques à activité  
antagoniste et essai dans le biocontrôle de *Botrytis  
cinerea* sur la tomate**

**Travail réalisé par :**

**soutenu le : 15/09/2016**

**Melle : BELKADI Zahoua**

**Melle : KOLIAI Yasmina**

**Devant le jury :**

**Président : Mr TAZDAITD. : Maître de conférences B à l'UMMTO**

**Promoteur : Mr OUELHADJ A. : Maître de conférences A à l'UMMTO**

**Examineur : Mme TAZDAITR. : Maître de conférences B à l'UMMTO**

**Examineur : Mme HELLALZ. : Maître assistante B à l'UMMTO**

**Année universitaire : 2015 - 2016**

# Remerciements

*Nous exprimons d'abord nos profonds remerciements et notre vive reconnaissance à Mr OUELHADJ. A : Maître de conférences A à l'UMMTO Pour avoir encadré et dirigé ce travail avec une grande rigueur scientifique, sa disponibilité, et ses conseils qui nous ont permis de réaliser ce travail.*

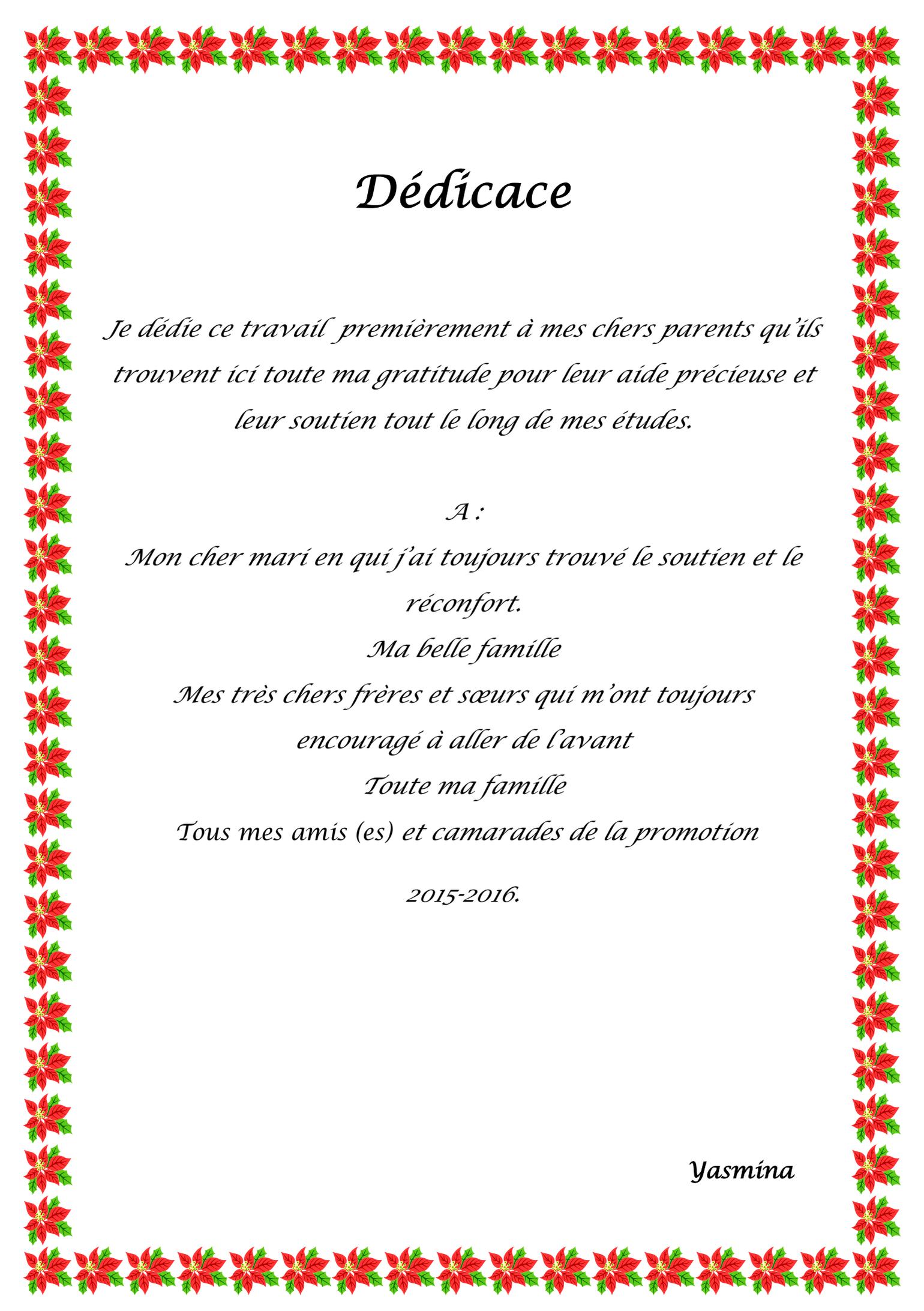
*Nous tenons à exprimer notre très grande considération et notre vive reconnaissance à Mr TAZDAIT.D : Maître de conférences B à l'UMMTO pour l'honneur qu'il nous a fait en acceptant de présider le jury de ce mémoire.*

*Nous exprimons nos vifs remerciements à M<sup>me</sup> TAZDAIT.R: Maître de conférences B à l'UMMTO d'avoir accepté d'examiner ce modeste travail et d'être parmi le jury.*

*Nous remercions M<sup>me</sup> HELLAAL.Z : Maître assistante B à l'UMMTO d'avoir accepté d'examiner ce modeste travail et d'être parmi le jury.*

*Un grand merci à nos familles respectives pour leur soutien et leur affection sans retenue au cours de nos longues années d'études.*

*Sans oublier l'ensemble de nos camarades et amis(es), ainsi qu'à toutes les personnes qui ont contribué à la réalisation de ce travail de près ou de loin.*



# Dédicace

*Je dédie ce travail premièrement à mes chers parents qu'ils trouvent ici toute ma gratitude pour leur aide précieuse et leur soutien tout le long de mes études.*

*A :*

*Mon cher mari en qui j'ai toujours trouvé le soutien et le réconfort.*

*Ma belle famille*

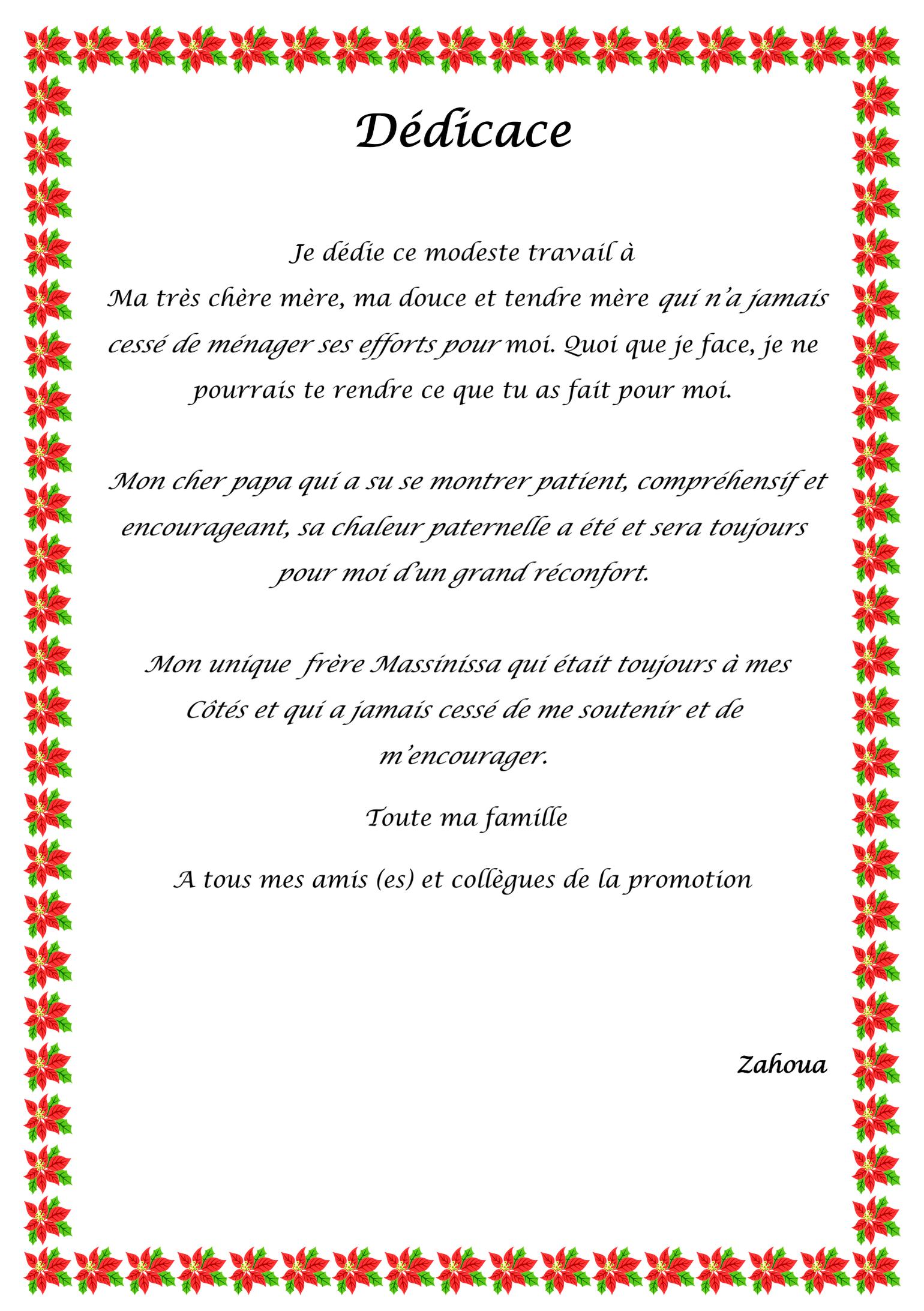
*Mes très chers frères et sœurs qui m'ont toujours encouragé à aller de l'avant*

*Toute ma famille*

*Tous mes amis (es) et camarades de la promotion*

*2015-2016.*

*Yasmína*



# *Dédicace*

*Je dédie ce modeste travail à*

*Ma très chère mère, ma douce et tendre mère qui n'a jamais cessé de ménager ses efforts pour moi. Quoi que je face, je ne pourrais te rendre ce que tu as fait pour moi.*

*Mon cher papa qui a su se montrer patient, compréhensif et encourageant, sa chaleur paternelle a été et sera toujours pour moi d'un grand réconfort.*

*Mon unique frère Massinissa qui était toujours à mes côtés et qui a jamais cessé de me soutenir et de m'encourager.*

*Toute ma famille*

*A tous mes amis (es) et collègues de la promotion*

*Zahoua*

## Liste des abréviations

**AAF** : Aéro-anaérobie facultatif

**AMC** : Acétyle méthyle carbonyl

**AS** : Aérobie stricte

**DDT**: Dichloro diphényl trichloroéthane

**DO**: Densité optique

**FOA**: *Fusarium oxysporum albedinis*

**GN**: Gélose nutritive

**INRA** : Institut National de la Recherche Agronomique

**ISR** : Résistance systémique induite

**MEVAG** : Milieud'étude de la voie d'attaque des glucides

**MH**: Mueller-Hinton

**OF**: Oxidatif et fermentaire

**ONPG**: Ortho-nitrophényl- $\beta$ -galactoside

**PGPR**: Plant Growth-Promoting Rhizobacteria

**RM**: Rouge de méthyle

**TDA** :Tryptophane désaminase

**TSI**: Triple-Sugar-Iron

**UI** : Urée-indole

**Vf** : Viande-foie

**VP** : Vogs Proskaur

## Index des tableaux

Numéro du tableau	Titre du tableau	Page
<b>Tableau I</b>	Liste de quelques bactéries utiles vivantes dans le sol	<b>5</b>
<b>Tableau II</b>	Agents de la lutte biologique utilisés pour la lutte contre des agents phytopathogènes	<b>27</b>
<b>Tableau III</b>	Résultats de l'examen macroscopique des souches bactériennes isolées à partir des sols rhizosphériques de l'oignon et de l'ail sur milieu GN à 37 °C pendant 24h	<b>4</b>
<b>Tableau IV</b>	Résultats de la coloration de Gram des souches bactériennes isolées à partir des rhizosphères de l'ail et de l'oignon	<b>51</b>
<b>Tableau V</b>	Identification biochimique des souches isolées	<b>54</b>
<b>Tableau VI</b>	Taux d'inhibition de la croissance mycélienne (moyenne $\pm$ écart type) (n=3)	<b>56</b>
<b>Tableau VII</b>	Taux d'inhibition de la croissance mycélienne par les composés volatiles (moyenne $\pm$ écart type) (n=3).	<b>59</b>
<b>Tableau VIII</b>	Taux d'inhibition de la croissance mycélienne à pH 8 et 11(moyenne $\pm$ écart type) (n=3).	<b>62</b>
<b>Tableau IX</b>	Diamètre de développement de <i>B.cinerea</i> inoculé sur l'orange (moyenne $\pm$ écart type) (n=3)	<b>65</b>

## Index des figures

Numéro de la figure	Titre de la figure	Page
<b>Figure 1</b>	Pourriture grise des fraises	<b>15</b>
<b>Figure 2</b>	Moisissure noire du bulbe d'oignon( <i>Aspergillus niger</i> )	<b>15</b>
<b>Figure 3</b>	Le mildiou de la pomme de terre	<b>18</b>
<b>Figure 4</b>	Photos du site de prélèvement des échantillons	<b>32</b>
<b>Figure 5</b>	Localisation géographique du site de prélèvement du sol rhizosphérique	<b>33</b>
<b>Figure 6</b>	Photo des tomates après lavage	<b>46</b>
<b>Figure 7</b>	Photographie des témoins négatifs : A ; Tomate contaminée par <i>Botrytis cinerea</i> : B ; tomate pulvérisée : C	<b>47</b>
<b>Figure 8</b>	Photo des tomates mises dans des récipients propres	<b>48</b>
<b>Figure 9</b>	Aspect de quelques souches bactériennes isolées sur milieu GN	<b>50</b>
<b>Figure 10</b>	Inhibition de la croissance de <i>Penicillium</i> sp. par <i>Bacillus</i> sp.4 et <i>Bacillus</i> sp.5	<b>57</b>
<b>Figure 11</b>	Inhibition de la croissance d' <i>A.niger</i> par <i>Bacillus</i> sp.1 et <i>Bacillus</i> sp.2	<b>57</b>
<b>Figure 12</b>	Inhibition de la croissance de <i>Botrytis cinerea</i> par <i>Bacillus</i> sp.4	<b>58</b>
<b>Figure 13</b>	Diagramme représentant les pourcentages d'inhibition de la croissance mycélienne d' <i>A.niger</i> , <i>B.cinerea</i> et <i>Penicillium</i> sp.par les bactéries antagonistes	<b>58</b>
<b>Figure 14</b>	Inhibition de la croissance d' <i>A.niger</i> par production de substances volatiles par <i>Bacillus</i> sp.3	<b>60</b>
<b>Figure 15</b>	Inhibition de la croissance de <i>Penicillium</i> sp. par production de substances volatiles par <i>Bacillus</i> sp.4	<b>60</b>
<b>Figure 16</b>	Inhibition de la croissance de <i>B.cinerea</i> par production de substances volatiles par <i>Bacillus</i> sp.3 et <i>Bacillus</i> sp.4	<b>61</b>
<b>Figure 17</b>	Diagramme représentant les pourcentages d'inhibition de la croissance mycélienne d' <i>A.niger</i> , <i>B.cinerea</i> et <i>penicillium</i> sp.par les composés volatiles	<b>61</b>
<b>Figure 18</b>	inhibition de la croissance d' <i>A.niger</i> <i>Bacillus</i> sp.4 à pH= 8	<b>63</b>
<b>Figure 19</b>	inhibition de la croissance d' <i>A.niger</i> par <i>Acinetobacter</i> et <i>Bacillus</i> sp.4 à pH=11	<b>63</b>
<b>Figure 20</b>	Effet de différents pH sur l'activité antifongique d' <i>Acinetobacter</i> sp.contre <i>A.niger</i> et <i>penicillium</i> sp.	<b>64</b>

<b>Figure 21</b>	Effet de différents pH sur l'activité antifongique de <i>Bacillus</i> sp. contre <i>A.niger</i> et <i>Penicillium</i> sp.	<b>64</b>
<b>Figure 22</b>	Photos montrant la différence entre la croissance fongique de <i>B.cinerea</i> sur des tomates pulvérisées par une suspension de <i>Bacillus</i> sp.4 et des tomates non pulvérisées avec le témoin négatif	<b>66</b>

# SOMMAIRE

## Sommaire

Liste des abréviations.  
Index des tableaux.  
Index des figures.

Introduction ..... 1

### Première partie : Synthèse bibliographique

#### Chapitre 1: les bactéries rhizosphériques.

1. Définition de la rhizosphère .....	3
2. Exsudats.....	3
3. Microflore rhizosphérique .....	4
4. Les interactions entre les microorganismes de la rhizosphère .....	6
4.1. Commensalisme .....	7
4.2. Mutualisme .....	7
4.3. Antagonisme.....	7
4.3.1. Compétitions.....	7
4.3.2. Hyperparasitisme .....	7
5. Les rhizobactéries promotrices de la croissance des plantes (PGPR) .....	8

#### Chapitre 2:les maladies phytopathogènes.

1.les champignons phytopathogènes .....	9
1.1. Généralité sur les champignons.....	9
1.1.1. Classification .....	9
1.2. Les grands groupes des champignons phytopathogènes .....	9
1.2.1. Les champignons à plasmode ( <i>Plasmodiophoromycota</i> ).....	9
1.2.2. Les champignons à thalle unicellulaire ou filamenteux coenocytiques .....	10
1.2.3. Les Ascomycètes .....	10
1.2.4. Les Deutéromycètes .....	10
1.2.5. Les Basidiomycètes .....	10
1.3. Les champignons phytopathogènes utilisés dans le cadre de cette étude.....	10

1.3.1. <i>Aspergillus niger</i> .....	10
1.3.2. <i>Penicillium sp</i> .....	11
1.3.3. <i>Botrytis cinerea</i> .....	11
1.4. Caractéristiques des champignons pathogènes.....	12
2.les maladies des plantes.....	13
2.1. Les maladies non parasitaires .....	14
2.2. Les maladies parasitaires .....	14
2.2.1. Pourritures grise par <i>Botrytis</i> .....	14
2.2.2 La moisissure des bulbes d'oignon .....	15
2.2.3. Piétins .....	16
2.2.4. Charbons.....	16
2.2.5. La fusariose .....	16
2.2.6. Mildiou .....	17

### **Chapitre 3 : la lutte chimique et biologique.**

1. La lutte chimique.....	19
1.1 Les fongicides.....	19
1.2. Les stimulateurs de défenses naturelles des plantes .....	19
1.3. Les inconvénients de la lutte chimique .....	20
1.4. Résistance aux fongicide .....	20
2. Lutte biologique.....	21
2.1. Définition.....	21
2.2. Mécanismes d'action des microorganismes antagonistes .....	22
2.2.1. Antibiose.....	23
2.2.2. Compétition .....	24
2.2.3. Parasitisme.....	25

2.2.4. Induction des systèmes de résistance de la plante hôte .....	25
2.2.5. Diminution de l'agressivité du pathogène .....	26
2.2.6. Modification des propriétés de surface des feuilles de la plante .....	26
2.3. Produits commercialisés .....	28

## **Deuxième partie : Partie expérimentale.**

### **Chapitre 1 : Matériel et méthodes.**

1. Matériel.....	29
1.1. Les souches fongiques.....	29
1.2. Milieux de culture .....	29
1.3 Solutions et réactifs .....	30
1.4 Appareillage .....	30
2. Méthode .....	31
2.1 Echantillonnage .....	31
2.2 Suspension et dilution .....	34
2.3. Isolement et purification des souches bactériennes.....	34
2.3.1 Ensemencement.....	34
2.3.2. Purification des souches bactériennes .....	34
2.3.3 Conservation des souches bactériennes.....	35
2.4. Identification des souches bactérienne .....	35
2.4.1. Critères morphologiques.....	35
2.4.1.1. Examen macroscopique.....	35
2.4.1.2 Examen microscopique.....	36
2.4.2. Critères biochimiques.....	36
2.4.2.1. Etude du type respiratoire.....	36
2.4.2.2. Etude des enzymes respiratoires.....	37
2.4.2.2.1 Test de la catalase .....	37
2.4.2.2.2. Test d'oxydase.....	37

2.4.2.2.3. Nitrate réductase .....	38
2.4.2.3. Etude de l'utilisation de citrate de sodium comme source de carbone.....	38
2.4.2.4. Etude des réactions cataboliques .....	39
2.4.2.4.1 Métabolisme des glucides.....	39
2.4.2.4.1.1. Milieu d'étude de la voie d'attaque des glucides (MEVAG) .....	39
2.4.2.4.1.2 Etude des dérivés de l'acide pyruvique .....	40
2.4.2.4.1.3. Etude de la fermentation des glucides .....	40
2.4.2.4.1.4. Etude de la fermentation du mannitol .....	41
2.4.2.4.1.5 Recherche de la $\beta$ -galactosidase(ONPG) .....	42
2.4.2.4.2. Métabolisme des protides .....	42
2.4.2.4.2.1. Recherche de l'uréase .....	42
2.4.2.4.2.2. Recherche de la production d'indole .....	43
2.4.2.4.2.3. Recherche du tryptophane désaminase (TDA).....	43
2.4.2.4.2.4. Recherche de la gélatinase .....	44
2.5. Isolement de la souche <i>Penicillium</i> sp.....	44
2.6. Confrontation du champignon et de la bactérie en boîte de Pétri.....	44
2.6.1. Préparation de l'inoculum .....	44
2.6.2. Préparation de la suspension bactérienne .....	45
2.6.3. Tests d'activités antifongiques .....	45
2.7. Recherche d'une substance inhibitrice volatile.....	45
2.8. Effet du pH du milieu sur la l'activité antifongique.....	46
2.8. Test d'antagonisme <i>in vivo</i> .....	46
2.8.1 Préparation des fruits de la tomate .....	46
2.8.3. Les étapes suivies pour le test .....	47
3. Analyse statistique.....	48

## **Chapitre 2 : Résultats et discussions.**

1. Isolement et identification des souches bactériennes .....	49
1.1. Critères morphologiques .....	49
1.1.1. Examen macroscopique.....	49
1.1.2. Examen microscopique .....	51
1.2. Critères biochimiques.....	53
2. Identification de <i>peneciliump</i> .....	55
2.1. Morphologie macroscopique .....	55
2.2. Morphologie microscopique.....	55
3. Confrontation du champignon et de la bactérie en boîte de Pétri.....	55
4. Activité antifongique des bactéries par les composés volatils .....	59
5. Effet du pH sur l'activité antifongique.....	62
6. Evaluation de l'activité antifongique <i>in vivo</i> .....	65
7. Discussion générale.....	68
Conclusion.....	74

### **Références bibliographiques.**

### **Annexes.**

### **Résumé.**

# INTRODUCTION

Les plantes subissent les attaques de nombreux bio-agresseurs. Parmi eux, les champignons pathogènes causent des maladies sur tous les organes des plantes. Ils appartiennent à de nombreux genres et espèces des différents phylums de champignons vrais (Ascomycètes, Basidiomycètes, Deutéromycètes et Zygomycètes) et plus largement aussi au phylum des Oomycètes (microorganismes fongiques, phylogénétiquement proche des algues que des champignons (**Lepoivre, 2003**). Pour diminuer les pertes de rendement occasionnées sur les plantes d'intérêt agricole, des méthodes de lutte classique, comme l'utilisation de la résistance des plantes et l'application de fongicides, sont déployées. Leurs limites d'efficacité sont maintenant connues. Les fongicides chimiques peuvent contaminer l'environnement de par leur haute toxicité, et se retrouver sur les produits finis (fruits), et induire à la longue une résistance du pathogène (**Moenne-Loccoz et al., 1998**).

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

Si les traitements avec des pesticides présentent de bons résultats à court terme, à long terme leur action secondaire devient inquiétante. Le traitement chimique représente une solution de facilité, qui correspond aussi au besoin d'absolu de l'homme désirant un résultat rapide et total. La lutte biologique au contraire n'a qu'une efficacité relative et demande d'avantage de connaissances et d'observation, mais à long terme, elle est plus intéressante sur tous les plans. C'est ainsi que la lutte biologique s'est avérée le moyen le plus respectueux pour l'environnement. Parmi les agents biologiques possibles, les *Pseudomonas* et les *Bacillus* semblent actuellement les plus intéressants et les plus étudiés ces dernières années.

Nous avons fixé comme objectif dans ce travail, l'isolement et l'identification de bactéries rhizosphériques antagonistes des champignons phytopathogènes à partir de sol rhizosphérique de l'ail et de l'oignon. En second lieu, nous avons étudiés l'effet antagoniste

de ces bactéries sur les trois agents phytopathogènes : *Botrytis cinerea*, *Aspergillus niger* et *Penicillium* sp., et ceci par des confrontations *in vitro* en boîtes de pétri et à l'aide de différentes méthodes. Une deuxième série d'essais a été effectuée *in vivo* afin d'apprécier l'effet protecteur des bactéries vis-à-vis des fruits de tomate infectées par *Botrytis cinerea*.

PREMIÈRE PARTIE

SYNTHÈSE

BIBLIOGRAPHIQUE

CHAPITRE I  
LES BACTÉRIES  
RHIZOSPHERIQUES

## 1. Définition de la rhizosphère

Le terme rhizosphère fut utilisé pour la première fois par Lorenz Hiltner en 1904 (Bactériologiste du sol et professeur d'agronomie à Munich) en désignant spécifiquement l'interaction entre les bactéries et les racines des légumineuses.

Actuellement, la définition de la rhizosphère est plus précise et elle correspond à la zone du sol dans laquelle la microflore tellurique est soumise aux influences des racines (**Campbell et Greaves 1990; Westover *et al.*, 1997**).

On considère généralement deux parties dans la rhizosphère:

- La rhizosphère au sens strict: elle correspond à la fine couche de sol qui adhère fermement aux racines.

- Le rhizoplan ou surface des racines dont la microflore est extraite par agitation vigoureuse des racines (**Brahim, 1998**).

## 2. Exsudats

L'exsudation est définie comme la libération de composés solubles de faible poids moléculaire (**Lesuffleur, 2007**). Au niveau de la rhizosphère, les racines libèrent beaucoup de matières organiques sous forme de mucilage, plus de 40% des produits de photosynthèse passent dans le système racinaire (**Whipps, 1990**).

Les exsudats représentent la partie la plus importante des substances libérées par les racines, surtout dans la région apicale. C'est également celle la plus rapidement métabolisée par les microorganismes. Ils sont généralement composés de sucres, d'acides aminés, de facteurs de croissance, de vitamines, d'enzymes et d'acides organiques. Ils représentent une source nutritionnelle pour la microflore rhizosphérique, et qui agissent soit en stimulant ou en inhibant certaines espèces (effet rhizosphérique) (**Brahim, 1998**).

Les microorganismes stimulés peuvent agir directement sur la plante en mettant à sa disposition des phytohormones (**Lebuhnet *al.*, 1997**), des vitamines ou des molécules organiques absorbables par les racines ou bien indirectement en améliorant sa nutrition minérale par solubilisation ou minéralisation de certains éléments (**Brahim, 1998**).

## 3. Microflore rhizosphérique

Dans la rhizosphère, les bactéries sont les organismes les plus nombreux (leur densité est de l'ordre de  $10^9$  par gramme de sol) et les plus variés (Tableau I). Elles sont plus fortement stimulées par l'effet rhizosphérique que les actinomycètes, les champignons, les algues et les protozoaires (**Dommergues et Mangenot, 1970**).

L'activité microbiologique dans la rhizosphère est de grande importance et a diverses conséquences pour les plantes. Tout d'abord, elle joue un rôle important dans le recyclage des éléments minéraux, entraînant alors presque toujours leur meilleure assimilation par les plantes. D'autre part, la respiration des racines et des microorganismes qui consomment de grandes quantités d'oxygène, elle provoque une diminution du potentiel d'oxydo-réduction, ce qui peut favoriser l'absorption de certains cations par les plantes, tels le fer et le manganèse. De même, les sidérophores, agents chélateurs synthétisés par les microorganismes, peuvent également favoriser ou freiner l'assimilation d'éléments comme le fer, le manganèse et le zinc. Certains microorganismes produisent également des régulateurs de croissance qui peuvent influencer le métabolisme de la plante. D'un autre côté, la production de composés toxiques par certains microorganismes ou la capacité de détoxification par exemple de composés phénoliques par d'autres peuvent directement agir positivement ou négativement sur la physiologie de la plante (**Jacques et Hérisse, 1999**).

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

## Synthèse bibliographique

---

De manière globale et simplifiée, on peut diviser les microorganismes des racines en trois groupes: ceux étant bénéfiques pour la plante, comme les mycorhizes et les endophytes fixatrices d'azote, ceux lui étant négatifs, comme de nombreuses bactéries et champignons pathogènes, et ceux lui étant indifférents. Parmi les bénéfiques, on trouve également les antagonistes qui peuvent protéger les plantes contre les attaques des microorganismes pathogènes (Sobti, 2013).

**Tableau I** : Liste de quelques bactéries utiles vivantes dans le sol (Sobti, 2013).

Les microorganismes	Leurs rôles
<i>Actinomycètes</i>	groupe de bactéries appartenant à la flore du sol, qui jouent un rôle important dans la décomposition des matières organiques
<i>Azotobacter</i>	bactérie aérobie stricte et libre dans le sol qui fixe l'azote atmosphérique chez la plupart des végétaux et le transforme en ammonium.
<i>Azospirillum</i>	bactérie aérobie stricte et libre dans le sol qui fixe l'azote atmosphérique chez la plupart des végétaux et le transforme en ammonium.
<i>Bacillus Amyloliquefaciens</i>	bactérie aérobie stricte et libre dans le sol qui génère une enzyme phythase qui permet de libérer d'avantage de phosphore organique du sol. Elle colonise les racines et ralentie les champignons nuisibles et génère également des auxines (hormone de croissance).
<i>Bacillus Megaterium</i>	une des plus grosses bactéries rencontrées dans les sols. Cette bactérie est capable de produire des endospores (résiste à la sécheresse). Elle est impliquée dans le cycle du phosphore (minéralisation microbienne du phosphore organique). Elle produit également une pénicilline amidase (antibiotique).
	bactérie aérobie stricte et libre dans le sol qui s'associe au Rhizobium. Cette bactérie est

## Synthèse bibliographique

<i>Bacillus Radicola</i>	productrice de phytohormones ce qui permet de développer le système racinaire du végétal.
<i>Lactobacillus Rhamnosus</i>	bactérie aérobie stricte et libre dans le sol qui sécrète des enzymes permettant de dégrader la matière organique fraîche (lignine, cellulose,...). Elle inhibe également certains germes pathogènes.
<i>Lactobacillus Faciminis</i>	bactérie aérobie stricte et libre dans le sol qui sécrète des enzymes permettant de dégrader la matière organique fraîche (lignine, cellulose,...). Elle inhibe également certains germes pathogènes.
<i>Pseudomonas</i> spp	bactérie aérobie stricte et libre dans le sol. C'est une bactérie rhizosphérique phytoprotectrice des racines (PGPR). Elle crée un bio film adhésif et protecteur (mucilage microbien). Elle a également la capacité de solubiliser le fer
<i>Rhizobium</i>	bactérie aérobie stricte qui fixe l'azote atmosphérique en association avec des plantes hôtes (légumineuses) et le transforme en ammonium.

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

Au niveau de la rhizosphère qui est une zone riche en matière organique et où les populations microbiennes sont très abondantes. Les interactions entre les microorganismes sont nombreuses et très intenses, ces interactions sont catalysées par les exsudats racinaires qui favorisent certains groupes de microorganismes au dépend d'autres au sein de la communauté microbienne (Curl et Truelove, 1986). Les interactions sont les suivantes :

## 4.1. Commensalisme

Le commensalisme existe au niveau de la rhizosphère notamment par des changements dans les conditions environnementales (humidité, pH, le potentiel osmotique, etc....) par un micro-organisme rendant ainsi un climat favorable pour le développement d'un autre. Aussi, certains organismes dégradent ou neutralisent des substances toxiques favorisant ainsi la croissance des autres (**Curl et Truelove, 1986**).

## 4.2. Mutualisme

Le mutualisme ou symbiose est une association mutuellement avantageuse aux microorganismes partenaires, exemple : de *Proterisvulgaris* qui a besoin de biotine, mais qui synthétise l'acide nicotinique requis par *Bacillus polymyxa* qui le transforme en biotine (**Dommergues et Mangenot, 1970**).

## 4.3. Antagonisme

En écologie, le terme d'antagonisme désigne une inhibition ou une action défavorable d'un organisme vis-à-vis d'un autre à l'intérieur d'une population microbienne mixte (**Curl et Truelove, 1986**). L'antagonisme se manifeste généralement soit par une compétition, un hyperparasitisme, une production de sidérophores ou par une antibiose.

### 4.3.1. Compétitions

La compétition entre deux ou plusieurs microorganismes concerne soit les éléments nutritifs, l'espace ou les autres facteurs environnementaux qui deviennent limitatifs pour la croissance. L'effet sélectif des exsudats racinaires sur la microflore serait le résultat de la compétition qui oppose des souches à croissance lente et des souches à croissance rapide, ces dernières sont particulièrement favorisées dans la rhizosphère. La fréquence élevée des *Fusarium* dans la rhizosphère serait due au pouvoir compétitif de ce champignon (**Dommergues et Mangenot, 1970**).

### 4.3.2. Hyperparasitisme

L'hyperparasitisme est l'attaque directe d'un microorganisme par un autre dans un but nutritionnel. La rhizosphère qui héberge une large variété de populations microbiennes, constitue un milieu favorable pour l'apparition du parasitisme (**Gagné, 1984**).

### 1.5. Les rhizobactéries promotrices de la croissance des plantes (PGPR)

Les rhizobactéries sont fortement stimulées par l'effet rhizosphérique. Elles activent la croissance des plantes, influencent de manière bénéfique la plante en stimulant sa croissance et/ou en la protégeant contre des infections par des agents phytopathogènes (**Dommergues et Mangenot 1970**). Au cours des dernières années, le nombre des PGPR identifiées a connu une grande augmentation 2 à 5% des rhizobactéries; elles comprennent de nombreuses espèces bactériennes. (**Wipps, 2001; Ahmed *et al.*,2008**). Les PGPR colonisent la rhizosphère en utilisant les exsudats racinaires comme substrats nutritifs, mais à la différence des autres bactéries rhizosphériques elles ont, en retour, un effet bénéfique sur la plante via divers mécanismes. Cet effet bénéfique peut être directe, lorsque la bactérie stimule la croissance racinaire (symbiose associative entre la bactérie PGPR et sa plante-hôte) ou indirecte, lorsqu'elle contrôle des organismes phytoparasites (antagonisme) (**Dobbelaere *et al.*,2003**).

Les modes d'action des PGPR sont : la production de phytohormones (**Frankenberger et Arshad, 1991**), la production de sidérophore(**O'Sullivan et O'Gara, 1992; LoperetHenkels, 1999**), la solubilisation du phosphate (**Kloepper *et al.*,1989**), l'inhibition des microorganismes pathogène (**Antoun *et al.*, 1980**) et la détoxification du milieu (**Beauchamp, 1993**).

CHAPITRE II

LES MALADIES

PHYTOPATHOGENE

## 1. Les champignons phytopathogènes

### 1.1. Généralités sur les champignons

Les moisissures peuvent être définies comme des microorganismes hétérotrophes filamenteux et immobiles, dont la structure cellulaire est celle d'une cellule eucaryote classique (Nicklin *et al.*, 2000). Certaines vivent en symbiose avec des végétaux, d'autres sont des parasites des végétaux ou des animaux, d'autres enfin sont des saprophytes se développant aux dépens de substrats inertes ou en voie de décomposition (Bourgeois, 1989 ; Leveau et Bouix, 1993). Les moisissures possèdent un appareil végétatif constitué par un thalle filamenteux, le mycélium, dont les filaments s'appellent des hyphes. Le mycélium peut différencier des organes forts variés selon les groupes, spécialisés dans la multiplication et la dissémination, auxquels on accorde la dénomination globale de spores (Bourgeois, 1989).

Les champignons se reproduisent essentiellement par des spores uni-ou pluricellulaire. On distingue, selon leur origine, les spores sexuées et les asexuées. La forme sexuée, ou téléomorphe, a pour fonction de maintenir l'espèce et apparaît souvent en fin de saison alors que la forme asexuée, dite aussi forme imparfaite ou anamorphe, assure la propagation. Comme la relation entre les deux formes n'a pas été aussitôt reconnue, certains champignons ont porté d'abord le nom donné à la forme imparfaite puis celui définitif, de la forme sexuée. (Roger, 2008).

#### 1.1.1. Classification

Les moisissures ne correspondent pas à un groupe systématique homogène, mais se situent en diverses familles de champignons microscopiques. Leur classification est basée sur des caractères morphologiques (structure du mycélium) et le mode de reproduction (Davet, 1996). Les Eumycètes (les vrais champignons) forment un groupe très vaste incluant les classes principales des moisissures (Bourgeois, 1989), à savoir les Zygomycètes, les Ascomycètes, les Basidiomycètes et les Deutéromycètes.

## 1.2. Les grands groupes des champignons phytopathogènes

### 1.2.1. Les champignons à plasmode (*Plasmodiophoromycota*)

Sont des organismes fungiformes dépourvus de paroi dans la majeure partie de leur cycle de développement. Leur thalle est constitué d'un plasmode. Ils sont des parasites d'organes souterrains et de tiges de plantes terrestres chez lesquelles ils provoquent souvent

## Synthèse bibliographique

---

une hypertrophie ou une hyperplasie des tissus infectés. Trois genres présentent des effets pathogènes directs sur la plante : *Plasmodiophora*, *Polymyxa* et *Spongospora*.

### 1.2.2. Les champignons à thalle unicellulaire ou filamenteux coenocytiques

Ces espèces sont regroupées au sein de 3 phylums : *Oomycota*, *Chytridiomycota*, *Zygomycota*.

### 1.2.3. Les Ascomycètes

Ce sont des champignons à mycélium cloisonné dont les spores sexuées se forment sur des asques. Les principaux taxons appartenant à ce phylum sont : Archiascomycètes, Pyrénomycètes, Loluloascomycètes et Discomycètes.

### 1.2.4. Les Deutéromycètes

Encore appelés champignons imparfaits, sont caractérisés par un mycélium septé et par l'absence de reproduction sexuée. Les principaux genres phytopathogènes sont : *Moniliales*, *Sphaeropsidales* et *Mélanconiales*.

### 2.1.2.5. Les Basidiomycètes

Sont des champignons caractérisés par la production de spores monocaryotiques, haploïdes, appelées basidiospores, à l'extérieur de sporocystes appelés basides. Sur le plan de la systématique, on distingue : les Urédinomycètes, les Ustilaginomycètes, les Hyménomycètes.

Les principaux groupes de maladies causées par les Basidiomycètes sont les caries et les charbons nus et couverts, caractérisés par la formation des téliospores (**Nasraoui et Lepoivre, 2003**).

### 2.1.3. Les champignons phytopathogènes utilisés dans le cadre de cette étude

#### 1.3.1. *Aspergillus niger*

Les champignons du genre *Aspergillus* font partie des Deuteromycetes (champignons imparfaits, reproduction asexuelle), ordre des Hyphomycetes, famille des Moniliaceae (**Cahagnier et al., 1998**).

*Aspergillus niger* est une espèce cosmopolite, bien que signalée dans le monde entier elle est un peu plus fréquente dans les zones tièdes et les sites exposés au sud (**Botton et**

## Synthèse bibliographique

---

*al.*,1990). On peut la trouver aussi bien sur les sols glacés, dans les environnements marins que dans les stèpes, pâturages, forêts et dunes. *A. nigerse* développe aussi bien sous peu de lumière (à l'intérieur) que sous la forte lumière de l'extérieur (**Botton et al., 1990**). Colonies à croissance rapide d'aspect de velours ou de feutre, blanc cotonneux au départ, devenant poudreux avec l'apparition de spores noires Les espèces possèdent des fructifications asexuelles de grande taille. Les têtes conidiennes sont très grandes globuleuses à radiales des phialides de 7-20 x 3-5 µm. Les conidiophores très abondants et très fragiles sont longs à parois lisses. Les phialides et métules sont généralement colorées. Les conidies sont globuleuses à sous-globuleuses, elliptiques ou aplaties (**Botton et al., 1990**) Cette espèce est capable de se développer sur des pH inférieurs à 2 quand l'humidité relative est élevée. Contenu en eau des conidies : 55%.

Pour bien l'isoler de manière sélective, on peut ajouter du tanin ou du sucre (glucose, saccharose) au milieu de culture (**Subramanian, 1983**)

### 1.3.2 *Penicillium* sp.

Le genre *penicillium* appartient à la classe des ascomycètes, à l'ordre des eurotiales et à la famille des eurotiaceae (**Alexopoulos et Mims, 1979**). Il est caractérisé par un mycélium septé et ramifié. La base non ramifiée des conidiophores correspond au stipe. Les conidiophores septés ou non, peuvent être ramifiés (ou verticillés) jusqu'aux trois fois de manière symétrique ou non. Leurs extrémités sont porteuses de plusieurs phialides. Généralement en forme de quille ou de bouteille. Comme chez les *Aspergillus*, les phialides sont les cellules des reproductrices, porteuses de conidies arrangées en chaînettes. Les conidies de *Penicillium* sont généralement lisses, rondes ou ovoïdes, presque toujours pigmentées en bleu ou en vert, pouvant virer au jaune (**Pitt, 1979**).

### 1.3.3. *Botrytis cinerea*

Le genre *Botrytis* se caractérise par un thalle à croissance très rapide, d'abord blanc puis gris à brun noir. Les conidiophores sont grands, dressés, bruns à reflets métalliques, très ramifiés vers le haut. Les conidies solitaires, sèches, unicellulaires, hyalines à brun pâle, naissent sur de courts denticules. Les sclérotés sont souvent présents. (**Elad et Evensen, 1995**).

*Botrytis cinerea* est un Ascomycète responsable de la pourriture grise de nombreuses plantes cultivées et sauvages. L'étymologie de son nom fait référence directement à sa morphologie : « *Botrytis* » signifie « en forme de grappe », indiquant ainsi la morphologie des

conidiophores, et « *cinerea* » renvoie à la couleur grisâtre de la sporulation (**Groves et al., 1953 ; Hennebert, 1973**). Cet Ascomycète appartient à la classe des Léotiomycètes, ordre des Héliotiales et la famille des Sclerotiniaceae (**Beever et al., 2004**). La forme parfaite (ou sexuée) est nommée *Botryotinia fuckeliana* (**Whetzel, 1945**). Récemment, il a été proposé par des taxonomistes des champignons d'abandonner la double nomenclature (téléomorphes/anamorphe), au profit du « *One fungus, one name* » (**Wingfield et al., 2012**).

*Botrytis cinerea* est un pathogène nécrotrophique ubiquiste avec une large gamme de plantes hôtes. Il occasionne des dommages importants dans plusieurs cultures d'importance économique comme le Fraisier et la Vigne. C'est un important pathogène de post-récolte car la sensibilité des cultures et les conditions environnementales tendent à favoriser son développement (**Elad et Evensen, 1995**).

### 1.4. Caractéristiques des champignons pathogènes

Les champignons pathogènes peuvent survivre de différentes façons dans le sol : sous forme saprophyte, avec des spores de résistances (oospores, chlamydospores, ...), avec des scléroties (ramifications intensives du mycélium) ou en formant des rhizomorphes leur permettant d'aller d'une plante-hôte à l'autre. Chaque champignon a sa propre stratégie, adaptée à son mode de vie. (**Elad et Evensen, 1995**).

La plupart des champignons pathogènes du sol attaquent les plantes par les racines, alors que quelques-uns pénètrent par l'hypocotyle ou le collet. Dans le sol, la desquamation des poils absorbants et des cellules corticales, l'émission de racines secondaires, les déchirures provoquées par le frottement sur les particules du sol, les blessures faites par d'autres microorganismes ou par des nématodes, etc., sont des brèches dans l'enveloppe protectrice des tissus. Aussi les champignons parasites des racines peuvent s'insinuer entre les cellules épidermiques des jeunes racines, coloniser les parties sénescents du cortex puis se développer plus avant dans les tissus de la plante. Tous les champignons n'attaquent toutefois pas les racines de la même manière et aux mêmes emplacements. Alors que les champignons à croissance rapide attaquent principalement les extrémités des racines, d'autres, plus lents, attaquent plutôt des régions déjà différenciées. Pendant que certains champignons restent au niveau des racines, d'autres gagnent le xylème des plantes et se développent systématiquement dans celles-ci, par exemple dans le cas des fusarioses vasculaires. Alors que dans le premier cas un nombre important d'attaques est nécessaire pour faire dépérir la plante, une seule

## Synthèse bibliographique

---

attaque d'un *Fusarium* peut théoriquement conduire à la mort de la plante (Jacque et Hérissé, 1999).

### 2. les maladies des plantes

Les plantes (arbres, herbes, fleurs, ...) constituent la majorité des ressources énergétiques dont dépendent directement ou indirectement les hommes et les animaux. Elles sont également les seuls organismes supérieurs à pouvoir convertir et stocker l'énergie lumineuse sous forme de glucides, lipides et protéines (énergie chimique). Tous les animaux, l'homme y compris, dépendent des plantes pour leur survie. Quelle soit cultivée ou non, une plante grandit et produit aussi longtemps que le sol lui fournit suffisamment d'humidité et de nutriments, que suffisamment de lumière soit captée par ces feuilles et que la température reste dans ses limites de tolérance. Malheureusement, lorsqu'une plante est atteinte d'une maladie, sa croissance, sa fertilité et sa productivité sont affectées. Des symptômes se développent et tout ou partie de l'organisme peut mourir. Les agents responsables des maladies de plantes sont très similaires à ceux rencontrés chez l'homme et les animaux. Ils peuvent être biologiques (micro-organismes pathogènes ; compétition avec d'autres plantes ; attaque d'insectes) ou physique (manque de nutriments, lumière, eau ; présence de produits toxiques dans le sol ou l'air) (Jacque et Hérissé, 1999).

La phytopathologie se définit comme étant l'étude des micro-organismes et des facteurs environnementaux qui induisent des maladies chez les plantes, des mécanismes par lesquels ces différents éléments agissent et des méthodes de prévention ou de contrôle des maladies. Définition d'une maladie de plante : une maladie de plante peut être définie par une succession de réponses invisibles et visibles des cellules et des tissus d'une plante, suite à l'attaque d'un micro-organisme ou à la modification d'un facteur environnemental qui provoquent des bouleversements de forme, de fonction ou d'intégrité de la plante, ces réponses peuvent induire une altération partielle voire la mort de la plante ou de certaines de ses parties.

Les anomalies du phénotype par rapport à la norme attendue portent le nom de symptômes. La pathogenèse représente l'ensemble des processus inducteurs de la maladie qui aboutissent à l'expression des symptômes. Ces derniers comportent essentiellement des changements de couleurs, des altérations d'organes, des modifications anatomiques et des altérations du métabolisme. Nous distinguons deux grands types de maladies phytopathogènes : les maladies parasitaires et non parasitaires (Semal et Lepoivre, 2003).

### 2.1. Les maladies non parasitaires

Elles résultent d'une inadéquation des conditions écologiques. Il peut s'agir de problèmes liés aux conditions climatiques, aux phénomènes de pollution ou à des problèmes nutritifs et la toxicité des pesticides (**Paul et Impens, 2003**).

### 2.2. Les maladies parasitaires

Ce sont les maladies causées par l'action d'agents pathogènes (virus, phytoplasmes, bactéries, champignons, protozoaires, les phanérogames parasites, etc...). Ces parasites sont généralement infectieux car ils envahissent l'hôte et s'y multiplient et sont contagieux, par leur transmission d'une plante infectée à une plante saine. Les champignons sont responsables de près de la moitié des maladies connues à ce jour chez les plantes cultivées (**Lepoivre, 2003**).

#### 2.2.1. Pourritures grise par *Botrytis*

Les *Botrytis* sp. sont des champignons capables de provoquer la pourriture de certains organes fragiles (fleurs, bourgeon, tissus très jeunes ou très âgés) des plantes en croissance, quand les conditions leurs sont favorables. Les *Botrytis* attaquent les bourgeons, les fleurs, les feuilles et les extrémités des tiges, en leur causant une brûlure. La maladie se manifeste d'abord par une tache allant du brun pâle au brun foncé. Cette moisissure grise peut attaquer les fruits et les légumes, chez lesquels elle provoque une pourriture. Un duvet grisâtre plutôt grossier couvre la surface des organes affectés.

Parmi les moisissures **frises**, on donne les exemples les plus fréquents : la pourriture grise du bégonia, la pourriture grise du fraisier (Figure 1), et la pourriture grise du col de l'oignon.

L'infection de l'oignon par *Botrytis bissoidea* se manifeste d'abord sur les plants qui poussent dans les champs, au niveau du collet et des blessures, ce n'est que plus tard, à l'entreposage, que la pourriture les gagne, celle-ci attaque la partie supérieure du bulbe, près du col, et progresse vers le bas. Il y a ramollissement des tissus, comme si l'humidité est élevée, une moisissure grisâtre recouvre la pourriture ; les écailles cachent les sclérotés (**Roger, 2008**).



**Figure 1** : Pourriture grise des fraises (Mouden *et al.*, 2013).

### 2.2.2. La moisissure des bulbes d'oignon

Selon Claude (1990), la moisissure des bulbes d'oignon est provoquée par *Aspergillus niger*, les dégâts interviennent au cours du stockage des bulbes d'oignon porte-graines. Les écailles sont atteintes de pourriture sèche qui les détruit par plages arrondies, de 1 à 2 cm, recouvertes d'une abondante poudre noire (fructifications du champignon). Le terme ultime est la momification et la nécrose totale des bulbes. Les superficies à planter en deuxième année (cycle grainier) sont souvent compromises par défaut d'effectifs (Figure 2)



**Figure 2** : Moisissure noire du bulbe d'oignon (Claude, 1990).

### 2.2.3. Piétins

En phytopathologie, le piétin est une maladie du pied et de la racine des graminées d'origine parasitaire. Il y a plusieurs types de piétin : le piétin fusarien (*Fusarium*), le piétin brun (*Phytium*), le piétin commun (*Cochliobolus*). Les champignons qui en sont responsables vivent sur les déchets de cultures et dans le sol, ce sont surtout *Fusarium* et *Pythium* qui causent la fonte des semis des céréales ; ils peuvent ensuite attaquer les plantes à tout les stades de leur développement.

Le piétin se caractérise par la présence de ronds ou de plaques sur les plants malades. Cependant, il affecte presque exclusivement les racines, qui se couvrent de lésions brunes ou noires qu'il est difficile d'observer à moins de les laver ; très rarement, des lésions similaires sont visibles sur le collet et à la base de la tige (**Roger, 2008**).

### 2.2.4. Charbons

Le charbon est une maladie qui se manifeste par une masse importante de spores noires charbonneuses ou brun foncé, contenues dans des pustules ou des galles blanchâtres ou grisâtres. Ces pustules apparaissent sur les feuilles, les tiges, les bulbes, les fleurs et les graines. D'autres provoquent des tumeurs sur les différentes parties aériennes et souterraines de la plante. Le charbon s'attaque principalement aux céréales, mais aussi à de nombreuses autres graminées, de même qu'à l'oignon, à l'ail.

Le charbon de l'oignon, dont l'agent pathogène est le champignon basidiomycète *Urocystismagica*, se présente sous la forme de pustules noirâtres ou des lésions renflées, allongées et gonflées de spores. Ces pustules sont présentes aussi bien sur les feuilles que sur le bulbe.

Quand l'infection est grave, les jeunes plantes peuvent mourir ; ceux qui survivent végètent jusqu'à la récolte. De plus les bulbes affectés se conservent mal et pourrissent plus facilement (**Roger, 2008**).

### 2.2.5. La fusariose

La fusariose est une maladie causée par des champignons du genre *Fusarium* qui vivent dans le sol, et attaquent de nombreuses plantes (**Ghorri, 2015**). Il existe plusieurs espèces recensées de ce champignon dont à savoir *Fusariumoxysporum*. Ce dernier est un agent vasculaire qui se conserve dans le sol sous forme de chlamydospores et infecte les plantes via

## Synthèse bibliographique

---

les racines qu'elles pénètrent directement ou par des blessures d'origine mécanique ou biologique (percées des racines secondaires, piqûres de nématodes,...). Les maladies dues à l'espèce *F. oxysporum* sont largement répandues dans le monde. Elles sont dommageables pour de nombreuses plantes maraîchères (tomate, cucurbitacées,...) et ornementales (œillet), ainsi que pour des cultures en plein champ telles que le coton, le bananier (la maladie de Panama) et le palmier dattier (maladie du Bayoud) causée par *Fusariumoxysporumalbedinis* (Foa). Ce champignon qui se trouve dans le sol, pénètre par les racines en cheminant la sève et envahissant le bourgeon terminal du palmier dattier. Par conséquent, il provoque un dessèchement puis un dépérissement rapide des arbres. Le bayoud ou la fusariose du palmier dattier se caractérise par sa résistance à la sécheresse et par sa capacité de rester dangereux après plus de trente ans passés sous sol. Il est également très prolifique soit par le repiquage de rejets apparemment sains, soit par l'irrigation, soit par les vents de sables qui peuvent transporter de minuscules éléments végétaux (El Hadrami *et al.*, 1998).

### 2.2.6. Mildiou

Le mildiou se manifeste par l'apparition soudaine de tache vert pâle ou jaunâtre sur la face supérieure des feuilles. Tôt ou tard, on verra aussi sous la feuille une moisissure duveteuse grise, blanche ou pourpre, couvrant les surfaces correspondant aux taches en surface. Ces tache s'agrandissent et deviennent jaunes ou brunes et parfois presque noires. Les feuilles peuvent se faner et, la plupart du temps, elles sèchent et meurent (Figure 3). Le mildiou affecte plusieurs légumes, surtout quand l'humidité se maintient à 100% pendant quelques jours, dont la laitue par *Bremialactuae*, le chou et d'autre crucifère par *Peronosporaparasitica*, notamment les transplants. Le champignon peut même infecter les fruits, les tiges et les bourgeons(Roger, 2008).

Chez la tomate Le mildiou est causé par *Phytophthora infestans*, anciennement classé parmi les mycètes. Cette maladie peut dévaster les cultures de tomates durant les périodes fraîches et pluvieuses. Le mildiou peut s'attaquer à tous les organes aériens de la plante. Il se manifeste par des taches nécrotiques, irrégulières, d'extension rapide, entourées d'une marge livide. Sur les tiges on voit des plages brunes pouvant les ceinturer. Les fruits mildioués bruns marbrés, irrégulièrement bosselés en surface (Blancard *et al.*, 2003).



**Figure 3 :** Le mildiou de la pomme de terre(Claude, 1990).

CHAPITRE III  
LA LUTTE CHIMIQUE  
ET BIOLOGIQUE

## 1. La lutte chimique

A côté des méthodes de lutttes culturales, génétiques ou biologiques, les traitements chimiques sont largement utilisés pour combattre les maladies fongiques et bactériennes. Toutefois, aucune chimiothérapie n'est développée en pratique contre les virus et les viroïdes à l'exception des interventions contre les vecteurs (notamment les insectes)(**Lepoivre, 2003**).

### 1.1. Les fongicides

La lutte chimique se définit par l'utilisation de fongicides pour détruire, affaiblir ou réprimer le champignon. A partir des années 1950, il y a eu une expansion rapide de l'emploi de produits phytopharmaceutiques, liée à l'essor de la chimie de synthèse (**Ajouz, 2009**).

Plusieurs critères de classifications des fongicides ont été proposés en fonction de leurs modes d'action biologique (exemple : préventif/curatif), de leurs comportements dans les plantes (exemple : contact, pénétrant, systémique) ou de leurs structures chimiques. Mais, finalement, l'émergence des résistances a conduit les scientifiques, mais aussi les prescripteurs, à classer les matières actives selon leur mode d'action biochimique. Ainsi, parmi les fongicides agissant directement sur les champignons, il est possible de mettre en premier ceux qui réduisent la production d'énergie cellulaire, suite généralement à un effet sur les processus respiratoires. Par ailleurs, il en existe qui affectent la biosynthèse de composants majeurs, comme des glucides (exemple : chitine), des lipides (exemple : phospholipides, stérols), des mélanines, des acides aminés (exemple : méthionine), des protéines ou des acides nucléiques. Quelques matières actives perturbent la formation et/ou le fonctionnement des microtubules. Enfin, une dernière catégorie de fongicides est constituée par ceux dont le mode d'action n'est pas élucidé (**Bonnemain, 2002**).

### 1.2. Les stimulateurs de défenses naturelles des plantes

Les mécanismes de défenses naturelles sont complexes mais de mieux en mieux connus grâce aux approches génétiques et moléculaires. Il est alors possible d'intervenir à différents niveaux en appliquant sur les plantes des substances naturelles ou des analogues dont le rôle est de stimuler les réactions de défense vis-à-vis des pathogènes (**Rocher, 2004**).

### 1.3. Les inconvénients de la lutte chimique

L'utilisation abondante des produits chimiques de synthèse pour contrer le développement de maladies a des effets néfastes sur l'environnement et la santé des écosystèmes. En dépit des résultats spectaculaires apportés par la lutte chimique dans la protection des plantes contre le *phytophthora*, des inconvénients majeurs sont apparus tels que la présence de résidus chimiques sur les plantes et dans l'environnement ainsi que l'apparition de souches résistantes au métalaxyl(ridomyl) ou à l'aliette(phosétyl-aluminium ou phosétyl-Al). (Veighet *al.*,1977 ;Davidseet *al.*,1981;Dowley et O'Sullivan, 1981 ; Bower et Coffey, 1985;Dolan et Coffey,1985 ;Fenn et Coffey,1985 ; Erwin et Ribeiro,1996 ).

Les pesticides chimiques, dans une large mesure, représentent une classe de composés qui, malgré leur aide incontestable apportés dans la protection des végétaux, produisent très souvent, voire systématiquement, une grande variété de résidus toxiques dans l'environnement. Ceux-ci ont une répercussion directe sur la santé des végétaux, des animaux et des êtres humains.ces effets néfastes incluent des changements importants dans la variété des plantes autochtones, le déclin de la population de papillons, l'augmentation du nombre de malformations chez les amphibiens),l'implication dans le cancer du sein chez la femme et la contamination du lait maternel(Agebessi, 2002),ainsi que des effets associés à l'augmentation du nombre d'autres cancers et aux maladies génétiques, à la baisse de fertilité masculine et au vieillissement(Carbonell *et al.*,1995 ;BainetLeblanc,1996 ;Ribaset *al.*,1997).

Le bromure de méthyle utilisé comme gaz de fumigation des sols de fraisières et framboisières contre le *p.fragariae* et autres champignons, pose le problème de l'exposition des agriculteurs. Ce pesticide est toxique envers le système nerveux central et cause des dommages aux poumons, aux yeux et à la peau. L'exposition directe provoque des maux de tête, un affaiblissement général, une vision floue, des vertiges, des symptômes de psychoses et léthargie, ainsi que des pneumonies, paralysies, problèmes cardiaques et possiblement le cancer (Agebessi, 2002).

### 1.4. Résistance aux fongicide

Alors qu'en médecine la résistance des bactéries aux antibiotiques est connue depuis longtemps et qu'en entomologie le problème des insectes résistants s'est posé peu après l'utilisation du DDT, il est curieux de constater que ce problème est récent en phytopathologie. Tant que des fongicides préventifs à action multiple ont été utilisés, on ne remarqua que des adaptations sans grandes conséquences pratiques (Delp, 1980).

Dès l'apparition des produits systémiques, le problème s'est posé rapidement, soit trois ou quatre ans après leur utilisation généralisée en plein champ, dans un délai plus court en serre ou les applications sont très fréquentes (**Staub et Sozzi, 1981**).

Les fongicides systémiques n'agissant que sur un site précis du métabolisme, il est aisé pour le champignon de contourner cet obstacle (**Koller et Scheinpflug, 1987**), l'apparition de souches résistantes a deux origines possibles :

La sélection de souches résistantes préexistantes dans la population du pathogène. On citera comme exemple *phytophthora megasperma* : de 35 souches isolées avant l'emploi de métalaxyl, quinze sont très sensibles, huit le sont modérément et douze hautement résistantes (**Hunger et al., 1982**).

Par un taux de mutation établi à  $10^8$  il se crée dans toute population des individus hautement résistants, d'autant plus vite sélectionnés que la pression des traitements fongicides est plus forte.

## 2. Lutte biologique

Face aux nombreux inconvénients survenus après l'utilisation de fongicides ou de produits fongistatiques chimiques, d'autres alternatives ont été recherchées afin de protéger les végétaux contre leurs agents pathogènes. Elles tentent de relever un double défi, soit celui de limiter efficacement les pertes agricoles dues aux maladies végétales et de préserver l'environnement et la santé des êtres vivants. L'une de ces alternatives faisant l'objet d'une recherche intensive est la lutte biologique (**Agebessi, 2002**).

### 2.1. Définition

La lutte biologique se définit comme une méthode de lutte contre un ravageur, une maladie ou une plante adventice, utilisant des agents naturels antagonistes de ceux-ci, c'est-à-dire des phytophages (s'il s'agit d'une plante adventice), des parasites, des prédateurs, des agents pathogènes (bactéries, virus, champignon...). Dans tous les cas les agents naturels utilisés sont réunis sous le nom de biopesticide.

Certain, notamment les auteurs anglo-saxons, en donnent une définition plus large en incluant toutes les substances organiques qui ont un effet protecteur sur les plantes, qu'elles soient trouvées dans la nature ou synthétisées chimiquement (extrait végétal, hormones, phéromones...) (**Fravalet Silvy, 1999**).

Une autre définition plus large de la lutte biologique est parfois utilisée :

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

La destruction ou la stabilisation d'une population d'agents pathogènes par des champignons ou des bactéries du sol survient communément dans la nature. Il existe des sols ou malgré des conditions de température, de pH et de teneur en eau favorables, la présence de la plante hôte et de son agent pathogène, la maladie ne se développe pas. De tels sols sont appelés sols suppressifs et le phénomène décrit est la fongistase lorsque ces sols sont traités à la chaleur ou par fumigation, ce qui a pour effet d'éliminer les formes végétatives de champignons et de bactéries, la maladie se développe chez la plante suite à l'introduction de l'agent pathogène (**Davet, 1996**).

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

### 2.2. Mécanismes d'action des microorganismes antagonistes

La première qualité que doit posséder un microorganisme antagoniste dans le sol est la capacité à coloniser la rhizosphère de la plante (**Mezaache, 2012**). Selon **Weller (1988)**, les bactéries sont considérées colonisatrices de racines si dès qu'introduites dans le sol elles se distribuent le long des racines, se multiplient, survivent plusieurs semaines en dépit de la compétition due à la microflore rhizosphérique indigène. Cette définition élimine les bactéries transitoires de la rhizosphère ou celles qui ne s'établissent sur les racines qu'en absence de compétition.

La protection conférée par un microorganisme de lutte biologique s'appuie sur un ou plusieurs mécanismes d'action tels que la compétition (pour éléments nutritifs, l'oxygène, l'espace), l'antibiose, le parasitisme, la diminution de l'agressivité du pathogène et l'induction de la résistance chez la plante. L'étude de ces mécanismes d'action est une étape importante dans le développement de la lutte biologique. (Tableau II) (**Jijakli, 2003**).

## 2.2.1. Antibiose

L'antibiose est définie comme « l'inhibition d'un organisme par le produit métabolique d'un autre organisme » (**Angélique, 2011**). Les produits métaboliques sont de différentes natures comme des enzymes lytiques, des peptides ou protéines antimicrobiens, des polyketides, des composés phénoliques, des biosurfactants etc. Ils sont classés en deux catégories selon leur volatilité (**Fernando et coll, 2006**) :

### a) Composés non-volatils

- Polyketides (2,4-diacétylphloroglucinol mupirocine)
- Dérivés de la phénazine
- Phénylpyrrole
- Lipopeptides cycliques
- Lipopeptides
- Aminopolyols (Zwittermycine-A)

### b) Composés volatils

- Cyanide d'hydrogène
- Aldéhydes, alcools, cétones et sulfides

Dans le cas d'un mode d'action par antibiose, l'organisme antagoniste produit des métabolites secondaires toxiques pour l'agent pathogène cible. Ces métabolites produits à faibles concentrations peuvent inhiber la germination, la croissance mycélienne et/ou la sporulation des agents pathogènes (**Montesinos et al., 2009**). L'antibiose est le mode d'action le plus étudié chez les agents de protection biologique (**Montesinos et al., 2009**). **Haas et Kell (2003)** ont décrit les conditions de production optimale de ces composés *in vitro*. La production semble optimale dans le cas d'une densité élevée de cellules bactériennes et dans des conditions d'une croissance limitée. Il existe de nombreux exemples de bactéries et de champignons producteurs de composés toxiques. Des substances responsables de l'antibiose ont pu être caractérisées chez des souches appartenant à diverses espèces d'agents de lutte biologique (notamment *Bacillus subtilis*, *Serratia plymuthica*, *Pseudomonas fluorescens*), et les gènes impliqués dans la production de certaines de ces substances ont été identifiés (**Raaijmakers et al., 2002 ; Duffy et al., 2003**). Les espèces de *Pseudomonas* par exemple produisent de nombreuses substances antifongiques: pyoverdine, pyoluteorine, phenazine, pyrrolnitrine, 2,4- diacetylphloroglucinol (**Haas et Keel, 2003**). L'antibiotique gramicidine S secrété par l'agent de protection biologique *Brevibacillus brevis* (nommé auparavant *Bacillus brevis*) inhibe par exemple la germination et la croissance mycélienne de *B. cinerea* (**Edwards et Seddon, 2001 ; Haggag, 2008**). La pyrrolnitrine (3-chloro-4-(2'-nitro-3'-chlorophenyl)-

pyrrole) est un antibiotique à large spectre d'action isolé pour la première fois dans les années soixante à partir de *Pseudomonas pyrocinia* (Arima *et al.*, 1964 ; Arima *et al.*, 1965). Par la suite, ce composé a été isolé chez plusieurs autres espèces de bactéries, incluant *Myxococcus fluvius*, *Enterobacter agglomerans*, *Serratia sp.*, ainsi que plusieurs espèces de *Pseudomonas* et *Burkholderia* (Hammer *et al.*, 1997 ; El Banna et Winkelmann, 1998). Cet antibiotique inhibe la croissance des champignons, la production de cet antibiotique par *P. fluorescens* et *B. cepacia* est impliquée dans le contrôle de certains agents pathogènes de plantes comme *Rhizoctonia solani*, *Verticillium dahliae* et *Fusarium oxysporum* (Ajouz, 2009).

La pyrrolnitrine s'avère efficace pour lutter contre *B. cinerea*. Par exemple, la pyrrolnitrine a été testée pour le contrôle des infections de roses en post-récolte par *B. cinerea* (Hammer *et al.*, 1993). Le trempage des tiges avec 100 mg/L réduit le développement des lésions d'environ 90% par rapport à des fleurs témoins non traitées (Hammer *et al.*, 1997). L'un des composés produit par *Pseudomonas chlororaphis* et responsable de l'activité antagoniste contre *B. cinerea* est la pyrrolnitrine. Dans le domaine agricole, un dérivé de la molécule, le fludioxonil, a été développé comme fongicide (Ajouz, 2009).

### 2.2.2. Compétition

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

En occupant la même niche écologique qu'un agent pathogène, un microorganisme peut entrer en compétition avec l'agent pathogène au niveau des nutriments, ce qui peut diminuer ou même empêcher la croissance de cet agent pathogène. Par exemple, certaines bactéries produisant des sidérophores ont un avantage écologique. Les sidérophores de ces microorganismes captent le fer, pouvant le rendre ainsi non disponible pour l'agent pathogène ce qui, conséquemment, limite sa croissance. Ce mécanisme est souvent attribué aux agents antagonistes de l'espèce *Pseudomonas fluorescens*. Des sidérophores produits par *P. fluorescens* formeraient un complexe avec les métaux du sol et les rendraient non disponibles pour les autres microorganismes de son environnement dont le *Pythium multivium*, causant la fonte des semis (Corbaz, 1990).

Outre la compétition nutritionnelle, la compétition spatiale contribue aussi à la réduction des infections racinaires par les agents phytopathogènes (Benítez *et al.*, 2004). En effet, les microorganismes ayant la capacité de coloniser les racines comme les bactéries promotrices

de la croissance des plantes (Plant Growth Promoting Bacteria, PGPB) protègent les racines et occupent les sites d'infection aux agents phytopathogènes (Benítez *et al.*, 2004).

### 2.2.3. Parasitisme

Ce mécanisme de lutte consiste en une interaction directe entre deux microorganismes où les tissus vivants de l'un constituent une base nutritive pour l'autre. Il implique l'invasion des cellules de l'agent pathogène par le microorganisme antagoniste (Corbaz, 1990). L'agent antagoniste utilisera des enzymes lytiques tels que des glucanases, des chitinases et des lysozymes pour dégrader les parois de l'agent pathogène. (Valueva et Mosolor, 2004) ont montré que les enzymes utilisées par les antagonistes ont souvent une activité en mélange ou en synergie avec les antibiotiques. Par exemple, il a été démontré que les hyphes de l'agent pathogène *Rhizoctonia solani* et les spores de l'agent pathogène *Cochliobolus* sp. peuvent être perforées dans le sol par des myxobactéries du genre *Polyangium* et des amibes vampyrellides. Cette dégradation entraîne une diminution de la population des agents pathogènes. Certains actinomycètes produisent aussi des chitinases et glucanases pour dégrader les parois de *Fusarium oxysporum* (El-Tarabily *et al.*, 1997; Sabaouet *et al.*, 1998; Errakhi, 2008).

### 2.2.4. 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). L'induction des systèmes de résistance chez la plante a été démontrée pour la première fois par Kempe et Sequira (1983). Ces derniers ont remarqué que des pré-traitements par des bactéries ont protégé des tubercules de pomme de terre des infections de *Pseudomonas solanacearum*.

Le microorganisme antagoniste peut consister en une souche avirulente occupant la même niche écologique qu'un agent pathogène. L'induction des systèmes de résistance se manifeste par des modifications au niveau de la composition des parois cellulaires ou la libération des éliciteurs. Ces derniers sont des substances mettant en branle les mécanismes de défense de la plante. Celle-ci produira alors des phytoalexines et des protéines PR qui lui confèrent une résistance systémique (Toussaint, 1996). Par exemple, *Trichoderma harzianum* T-203 induit des changements structuraux et chimiques des parois cellulaires des plantes ce qui augmente leur résistance aux infections par les phytopathogènes (Ajouz, 2009).

### **2.2.5. Diminution de l'agressivité du pathogène**

Un agent de biocontrôle peut également agir en affectant les facteurs de pathogénicité de l'agent pathogène. L'intensité de symptômes de *Botrytis cinerea* sur les feuilles de l'haricot est réduite en présence de la souche *Trichoderma*T39. La réduction du développement du parasite ne s'observant qu'au cours du second jour d'incubation. Ce retard s'expliquerait par une production réduite par le pathogène des enzymes dégradant la pectine (**Jijakli, 2003**).

### **2.2.6. Modification des propriétés de surface des feuilles de la plante**

Certaines bactéries possèdent la capacité de changer les caractéristiques de surface des feuilles des plantes. Ceci a pour conséquence de gêner le processus d'attachement et de croissance des agents pathogènes sur les feuilles (**Bunsteret al., 1989**). Par exemple, certains microorganismes comme *Pseudomonas* sp. sont capables de modifier la mouillabilité de la surface des feuilles et d'interférer ainsi avec le développement de certains agents pathogènes (**Bunsteret al., 1989**). *Bacillus brevis* entraîne l'extension et le dessèchement des gouttes d'eau sur les feuilles de choux chinois, diminuant les périodes d'humidité sur les feuilles et empêchant ainsi l'apparition de conditions favorables pour le développement de *B. cinerea* (**Edwards et Seddon, 2001**).

## Synthèse bibliographique

**Tableau II :** Agents de la lutte biologique utilisés pour la lutte contre des agents phytopathogènes (Errakhi, 2008).

Agent de biocontrôle Agents	phytopathogènes cibles	Mécanisme (s) d'action
<i>Trichodermaharzianum.</i>	<i>Rosellinianasp</i>	Parasitisme
<i>Trichodermakoningii</i>	<i>Sclerotiumrolfsii</i>	Parasitisme
<i>Pseudomonas</i> sp. DF-41 et PA-2	<i>Sclerotiniasclerotiorum</i>	Antibiose
<i>Streptomyces</i> sp. Di-944	<i>Rhizoctoniasolani</i>	Antibiose
<i>Streptomyces</i> sp. 93.	<i>Pythium</i> , <i>aphanomyces</i> , <i>Phytophthora</i> , <i>Rhizoctonia</i> et <i>Fusarium</i> sp.	Antibiose
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	<i>Aspergillusflavus</i> , <i>A.niger</i> , <i>Rhizoctoniabataticola</i> , <i>Rhizoctoniasolani</i> , <i>Sclerotiumrolfsii</i> et <i>Pucciniaarachi</i> <i>dis</i>	Antibiose Compétition
<i>Streptomycesdiastatochromogenes</i> PonS SII	<i>Streptomycescabies</i>	Antibiose Compétition
<i>Pseudomonas</i> sp.	<i>Gaeumannomycesgraminis</i> var. <i>tritici</i> , <i>Pseudomonas tolaasii</i> , <i>Fusariumoxysporum</i> et <i>Erwiniaamylovora</i>	Antibiose Compétition
<i>Trichodermasp</i>	Plusieurs champignons phytopathogènes	Parasitisme Antibiose Compétition
<i>Bacillus subtilis</i>	<i>Fusarium</i> sp.	Antibiose

### 2.3. Produits commercialisés

Une liste de produits de lutte biologique commercialisés sur l'ensemble des maladies de plantes a été proposée par **Fravel en 2005**. Contre *Botrytis*, un nombre élevé d'agents de protection biologique a été identifié en laboratoire au cours de ces dernières années, mais très peu de ces agents ont été mis sur le marché (**Decoinet al., 2002; Fravel, 2005**). A notre connaissance, seuls 9 produits de protection biologique sont commercialisés dans le monde pour lutter contre *B. cinerea*. Le champignon *T. harzianum* est présent dans 3 des formulations élaborées sur les 9 produits commercialisés. En France, seul Serenade, contenant la souche QST 713 de *Bacillus subtilis*, est homologué pour utilisation contre *B. cinerea* sur la vigne. D'autre part, à notre connaissance, d'autres produits sont en cours d'homologation. L'INRA a, par exemple, concédé à la société Agrauxine une licence d'exploitation de la souche L13 de *Microdochium dimerum* pour qu'elle développe et mette sur le marché le produit AntiBot (**Fravalet Silvy, 1999**).

PARTIE

EXPÉRIMENTALE

CHAPITRE I  
MATÉRIEL ET  
MÉTHODES

## Matériel et méthodes

---

Notre travail a été réalisé au niveau de laboratoire pédagogique de microbiologie de l'université MOULOUD MAMMERI de Tizi-Ouzou, durant la période allant du mois de Mars au mois de Juin de l'année 2016.

### 1. Matériel

#### 1.1. Les souches fongiques

Les souches utilisées dans cette étude appartiennent à un trois genre de moisissures :

*Aspergillus niger*, *Botrytis cinerea* et *Penicillium* sp.

Les deux champignons *Botrytis cinerea* et *Aspergillus niger* nous ont été offerts par notre promoteur Monsieur OUELHADJ.

La souche *Penicillium* sp.a été isolée à partir des oranges infectées.

#### 1.2. Milieux de culture

Gélose nutritive : CondaPronadisa. Espagne

Gélose de sabouraud : Institut Pasteur. Algérie

Gélose Mueller-Hinton (gélose MH) : CondaPronadisa. Espagne

Gélose Citrate de SIMMONS : Institut Pasteur. Algérie

Milieu MEVAG : CondaPronadisa. Espagne

Milieu mannitol-mobilité : CondaPronadisa. Espagne

Milieu Urée-indole (UI) : Institut Pasteur. Algérie

Milieu Clark et Lubs : CondaPronadisa. Espagne

Milieu Triple-Sugar-Iron (TSI) : CondaPronadisa. Espagne

Bouillon nitraté : Institut Pasteur. Algérie

Bouillon nutritif : Institut Pasteur. Algérie

Eau peptonnée exempte d'indole : CondaPronadisa. Espagne

### 1.3 Solutions et réactifs

Alcool : Sigma Aldrich. Allemagne

Disque d'oxydase ;BiochemChemopharma. Québec

Disque d'ONPG :BiochemChemopharma. Québec

Eau distillée ;

Eau oxygénée (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) ;

Fushine : FlukaAnalytical. Allemagne

Violet de Gentiane : Sigma Aldrich. Allemagne

Huile de vaseline : BiochemChemopharma. France

Huile à immersion :BiochemChemopharma. France

Réactif de Kovacs : Sigma Aldrich. Allemagne

Solution de Lugol : BiochemChemopharma. Québec

Créatinine a 1% (VP1) : Sigma Aldrich. Allemagne

La potasse à 10% (VP2) : Sigma Aldrich. Allemagne

Réactif NR1 : Sigma Aldrich. Allemagne

Réactif NR2 : Sigma Aldrich. Allemagne

Rouge de méthyle (RM) : Sigma Aldrich. Allemagne

NaOH : Sigma Aldrich. Allemagne

HCl : Sigma Aldrich. Allemagne

### 1.4 Appareillage

Microscope optique : Hondwetzlar. Allemagne.

Spectrophotomètre: Vis-7220G. Biotech Engineering.Management CO.LTD (UK).

Etuve : BINDER. Allemagne.

## Matériel et méthodes

---

Balance de précision : KERN 770. Allemagne.

Centrifugeuse : HettichUniversal / K2S.

Autoclave : WEBECO. Allemagne.

Four Pasteur : BINDER. Allemagne.

Bain Marie : MEMMERT. Allemagne.

Agitateur à barreau magnétique non chauffant : GERHARDT. Allemagne.

Réfrigérateur : ENIEM. Algérie.)

## 2. Méthode

### 2.1 Echantillonnage

Les échantillons de sols que nous avons utilisés ont été prélevés à partir de sites situés sur les champs cultivés de l'oignon et l'ail, dans la région de Ouaguenoun, située à 15 Km au nord-est de Tizi-Ouzou.

Deux prélèvements ont été effectués ; l'un à partir de la rhizosphère de l'oignon et l'autre à partir de la rhizosphère de l'ail. Ces échantillons ont été prélevés sur plusieurs parcelles après l'arrachement des plantes, à une profondeur de 10 cm de la surface. Les échantillons prélevés ont été mis dans des récipients stériles.



**Figure 4** : photo du site de prélèvement des échantillons

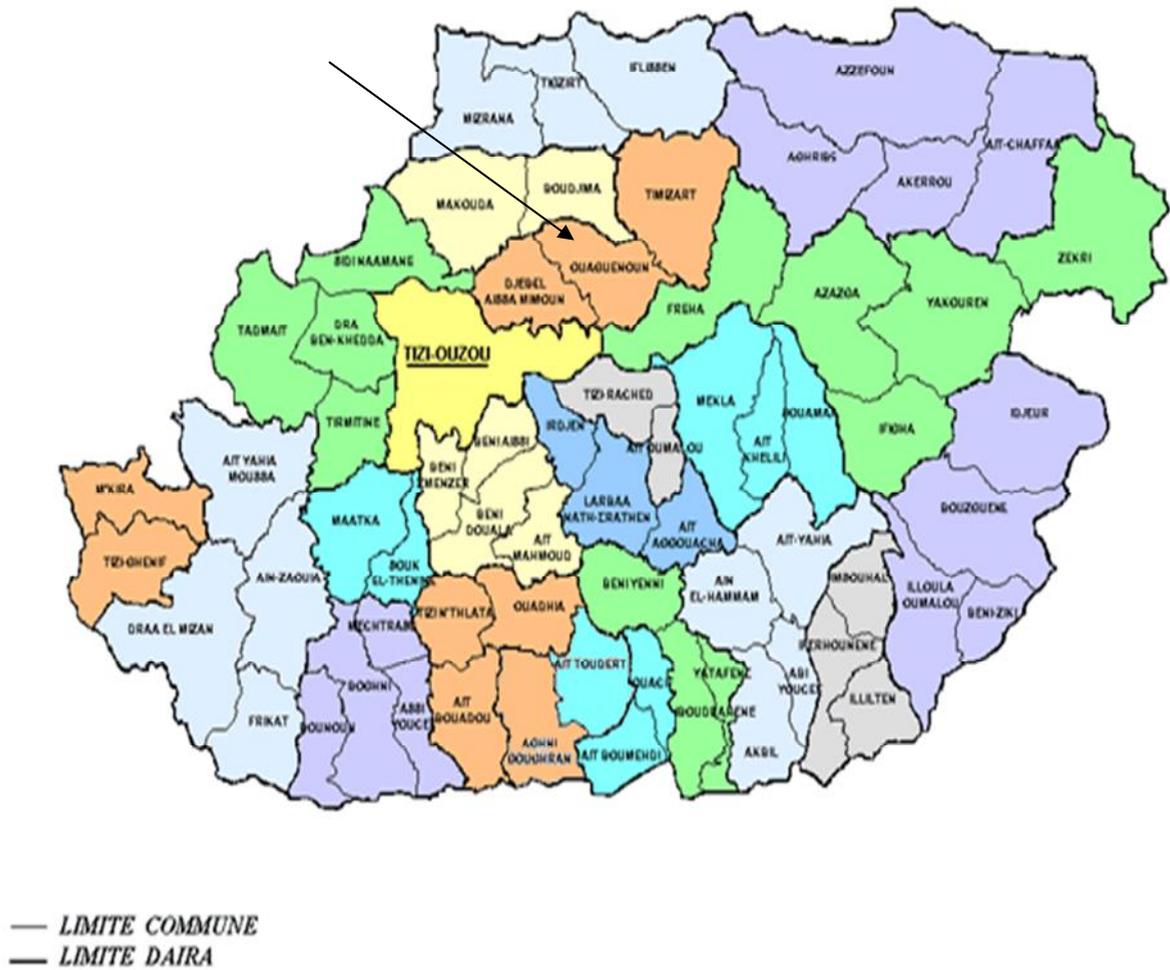


Figure 5 : Localisation géographique du site de prélèvement du sol rhizosphérique

### 2.2 Suspension et dilution

Après séchage, 5g de chaque prélèvement sont dilués dans 20 ml d'eau distillée stérile. Cette suspension est homogénéisée avec un agitateur magnétique pendant 15 minutes ensuite filtrer à l'aide d'une gaze stérile. Le filtrat obtenu constituait la solution mère.

A partir de celle-ci, 0,5 ml sont ajoutés à 5 ml du bouillon nutritif (BN) à raison de deux tubes pour chaque échantillon. Ensuite les quatre tubes ont été incubés à 37°C pendant 24 heures.

Après incubation, des dilutions décimales dans 9 ml d'eau physiologique ont été réalisées pour chaque tube.

### 2.3. Isolement et purification des souches bactériennes

Le milieu utilisé pour l'isolement et la purification est la gélose nutritive (GN).

#### 2.3.1 Ensemencement

Un ensemencement en masse est réalisé. Un volume de 200 µl de chaque dilution est dispersé dans le fond d'une boîte de Pétri, et la GN liquéfiée en surfusion est ensuite coulée par-dessus.

Après solidification, on a incubé les boîtes à 37°C pendant 72h.

#### 2.3.2. Purification des souches bactériennes

Après isolement des souches, nous avons procédé à la purification, c'est une étape très importante et très délicate, qui demande beaucoup de temps, puisqu'il s'agit d'un prélèvement qui abrite des milliers de microorganismes, et c'est de la pureté des cultures que va dépendre notre expérimentation. Après le premier ensemencement sur boîte de Pétri, différentes colonies sont obtenues. Chaque colonie d'aspect différent est ensemencée à part. Les boîtes ensemencées sont incubées 18 à 24h à 37°C. La purification des souches se fait par des repiquages successifs par la méthode des quatre quadrants en milieu solide (GN) jusqu'à l'obtention au sein d'une boîte de Pétri de colonies identiques par l'aspect et la couleur.

### 2.3.3 Conservation des souches bactériennes

Les souches isolées sont conservées dans des tubes contenant un milieu GN incliné (Les souches sont ensemencées sur la pente des tubes par la méthode des stries), puis incubées à 37°C pendant 24 heures. Les tubes dans lesquels il y a eu une croissance sont conservés à 4°C.

### 2.4. Identification des souches bactérienne

L'identification des souches bactériennes a été basée sur la détermination des caractères morphologiques et biochimiques.

#### 2.4.1. Critères morphologiques

Cette étude est basée sur des observations macroscopiques et microscopiques (x100) permettant de différencier le type de Gram, les coques, les bacilles ainsi que la disposition des cellules

##### 2.4.1.1. Examen macroscopique

L'aspect des colonies est observé après culture pendant 24 heures à 37 °C sur le milieu GN.

L'observation de l'aspect macroscopique des colonies permet d'effectuer une première caractérisation, avec une orientation possible des résultats au cours de l'identification.

L'étude macroscopique a été réalisée en tenant compte de : La forme des colonies : rondes, irrégulières,...etc.

La taille des colonies par la mesure du diamètre : pinctiformes ou non pinctiformes.

La chromogénèse : couleur de la colonie.

L'élévation : convexe, concave, plate.

L'opacité : opaque, translucide ou transparente.

La surface : lisse, rugueuse, sèche...etc.

### 2.4.1.2 Examen microscopique

A partir de chaque souche pure, une toute petite quantité de bactéries a été prélevée pour effectuer l'observation microscopique des caractères morphologiques des cellules. Cette étude nous a permis de distinguer entre les différentes espèces bactériennes par rapport à l'agencement et la forme de leurs cellules.

Pour vérifier la pureté des isolats et s'orienter dans l'identification nous avons utilisé la coloration de Gram.

La coloration de Gram est un aspect important et essentiel pour l'identification d'une bactérie isolée et la vérification de la pureté de l'isolat. A partir d'une colonie de 24h, un frottis est fixé à la chaleur puis recouvert par le violet de Gentiane pendant une minute, ensuite il est éliminé par l'ajout du Lugol pendant une minute. Le frottis est ensuite décoloré avec de l'éthanol jusqu'à ce que le colorant cesse de s'échapper librement du frottis. A ce stade, les cellules Gram négatives seront incolores et les cellules Gram positives violettes. Ensuite, le frottis est soumis à une contre coloration de 30 secondes à la fuchsine, pour colorer les cellules Gram- présentes. Après un bref rinçage, le frottis est séché puis examiné, consécutivement, à l'objectif 40X et à immersion 100 X (**Singleton, 2005**).

### 2.4.2. Critères biochimiques

Pour compléter l'identification morphologique, nous avons déterminé l'activité biochimique des souches bactériennes. En recherchant les modifications apportées aux milieux de culture par le métabolisme bactérien.

#### 2.4.2.1. Etude du type respiratoire

Faute de moyen, le type respiratoire qui devait être étudié sur milieu Vf (viande-foie) a été étudié sur milieu MEVAG. La technique effectuée est la suivante :

On a ensemencé deux tubes pour chaque souche bactérienne par pique centrale tout en créant deux environnements adéquats : l'un en présence d'oxygène (aérobiose) et l'autre en absence d'oxygène (anaérobiose) par l'ajout d'une couche importante d'huile de vaseline.

On a incubé les tubes à 37°C pendant 24 heures et on lit les résultats :

Aérobie stricte : développement des bactéries dans le tube sans l'huile de vaseline.

Anaérobie stricte : développement des bactéries dans les tubes avec l'huile de vaseline.

Aéro-anaérobie facultatif : développement de la souche dans les deux tubes avec ou sans huile de vaseline.

### 2.4.2.2. Etude des enzymes respiratoires

#### 2.4.2.2.1 Test de la catalase (Tortora *et al.*, 2003).

La catalase est une enzyme ayant la propriété de décomposer le peroxyde d'hydrogène(H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) avec dégagement d'oxygène selon la réaction suivante :



Sur une lame et à l'aide d'une pipette Pasteur, on dépose une colonie bactérienne à laquelle on ajoute de l'eau oxygénée (à 10 volumes). La présence d'une catalase est révélée par l'apparition immédiate de bulles de gaz qui correspondent à l'oxygène dégagé.

#### 2.4.2.2.2. Test d'oxydase (Delarras, 2007)

Intervenant à la fin de la chaîne d'oxydoréduction, l'oxydase est une enzyme qui catalyse la fixation d'hydrogène et des électrons sur une molécule d'oxygène (Leveau et Bouix, 1991).

Elle présente dans certaines chaînes respiratoires cytochromiques bactériennes (Delarras, 2007).

- on dépose sur une lame en verre stérile un disque d'oxydase stérile ;
- imprégner le disque avec une goutte d'eau physiologique stérile ;
- déposer au dessus une colonie bactérienne avec une pipette Pasteur stérile ;
- observer le résultat avant 30 secondes ;

L'interprétation des résultats sera :

- Bactérie oxydase + : s'il y'a apparition d'une couleur violet sur le disque.
- Bactérie oxydase - : si le si le disque reste incolore.

### 2.4.2.2.3. Nitrate réductase(Guiraud, 2003 ; Delarras, 2007)

Certaines bactéries ont la capacité de réduire le Nitrate en Nitrite selon la réaction suivante :



Tandis que d'autres peuvent poursuivre cette réaction jusqu'au stade d'azote gazeux :



La première et la dernière réaction sont respectivement catalysées par la nitrate et la nitrite réductase. La mise en évidence de la nitrate réductase se base sur la recherche des nitrites formés en fin de réaction en utilisant les réactifs NR1 et NR2.

Après ensemencement et incubation pendant 24 heures à 37°C d'un tube contenant du bouillon nitraté, on rajoute 4 gouttes du réactif NR1 et 4 gouttes du réactif NR2, puis on agite bien le tube. Les résultats probables seront les suivants :

Apparition d'une couleur rouge : ce qui se traduirait par la présence d'une nitrate réductase donc la souche sera dite nitrate réductase positive (NR+).

La couleur du milieu ne change pas : dans ce cas on rajoute un peu de zinc (réducteur de nitrates) et on agite :

-si le milieu devient rose ou rouge, donc il y'a présence des nitrates dans le milieu, ces derniers n'ont pas été réduits par la bactérie ; donc cette dernière est nitrate réductase négative (NR-).

-si le milieu reste incolore, donc il ne reste plus de nitrate dans le milieu ; dans ce cas la bactérie les a réduits au-delà du stade nitrite atteignant le stade azote gazeux.

### 2.4.2.3. Etude de l'utilisation de citrate de sodium comme source de carbone(Marchal et Bourdon, 1982)

Le milieu utilisé pour ce test est le milieu Citrate de SIMMONS. Ce milieu ne contient qu'une seule source de carbone : le citrate de sodium. Seules les bactéries possédant une citrate perméase sont capables de se développer sur ce milieu.

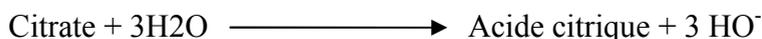
## Matériel et méthodes

---

Après dépôt de 3 à 4 gouttes de la suspension bactérienne au fond du tube à l'aide d'une anse, on réalise des stries longitudinales sur la pente.

Incuber à 37°C pendant 24h.

Pour les bactéries citrate réductase positive : la culture se traduit par un développement et /ou une alcalinisation du milieu (virage de l'indicateur du vert au bleu). Les enzymes utilisent le citrate de sodium comme substrat sous forme d'acide citrique donc :



Pour les bactéries citrate réductase négative : il n'y'aura ni développement ni changement de couleur du milieu.

Les voies métaboliques du citrate de sodium (oxydative ou fermentaire) traduisent une libération des radicaux  $\text{HO}^-$  qui alcalinisent le milieu.

### 2.4.2.4. Etude des réactions cataboliques

#### 2.4.2.4.1 Métabolisme des glucides

##### 2.4.2.4.1.1. Milieu d'étude de la voie d'attaque des glucides (MEVAG) (Marchal et Bourdon, 1982)

Le milieu utilisé pour ce test est le milieu MEVAG, contenant comme source de carbone : le glucose. Ce milieu nous permet de distinguer les bactéries à métabolisme oxydatif ou fermentaire ou les deux à la fois. La technique utilisée est la suivante :

On ensemence par piqure centrale deux tubes de milieu MEVAG. L'un sera étuvé tel quel, l'autre sera recouvert d'une couche épaisse d'huile de vaseline stérile (pour créer l'anaérobiose) ;

Deux tube ensemencés, l'un additionné d'huile de vaseline stérile, sont prévus comme témoin. Incuber les tubes avec les témoins à 37 °C pendant 1 à 8 jours.

Le virage du rouge au jaune nous révèle la positivité du test :

-bactéries à métabolisme fermentatif : virage au jaune de tube avec l'huile de vaseline.

-bactérie à métabolisme oxydatif : virage au jaune du tube sans huile de vaseline.

## Matériel et méthodes

---

-bactéries à métabolisme à la fois oxydatif et fermentatif : virage au jaune du tube avec et sans huile de vaseline.

La production de gaz et la mobilité peuvent aussi être observées sur ce milieu.

### **2.4.2.4.1.2 Etude des dérivés de l'acide pyruvique (Marchal et Bourdon, 1982)**

Cette étude consiste à une différenciation entre la fermentation d'acides mixtes mise en évidence par la réaction au rouge de méthyle (RM), et la fermentation butylène glycolique mise en évidence par la recherche de l'acétoïne (acétyl méthyle carbynol : AMC), appelée aussi la réaction de VogsProskaur (VP).

5 ml du milieu Clarck et Lubs sontensemencé avec la souche à étudier

Après incubation à 37°C on transverse 2 ml du milieu dans un autre tube stérile.

Le premier tube sera utilisé pour la révélation de la réaction VogsProskaur : on rajoute 5 gouttes de chaque réactif VP1 et VP2 et on laisse le tube ouvert pendant 15 min.

Le deuxième tube sera utilisé pour la révélation de la réaction de rouge de méthyle : on rajoute 3 gouttes de la solution de rouge de méthyle ; la lecture est instantanée :

Premier tube

VP+ : coloration rouge en surface pouvant diffuser dans le milieu.

VP- : aucune coloration n'est produite.

Deuxième tube

Réaction RM+ : teinte rouge (pH<4,2).

Réaction RM- : teinte jaune (pH>6,3).

### **2.4.2.4.1.3. Etude de la fermentation des glucides (Pharmacopée Européenne Addendum, 2000)**

Le milieu utilisé est le milieu Triple SugarIron (TSI). Ce milieu permet la mise en évidence rapide de la fermentation des trois sucres qui le compose : le lactose, le glucose (avec ou sans production du gaz) et le saccharose ainsi que la production d'hydrogène sulfureux (H<sub>2</sub>S).

## Matériel et méthodes

---

On ensemence le milieu TSI incliné par piqure centrale pour le culot et par stries pour la pente. On incube le tube à 37°C pendant 24 heures.

L'utilisation de l'un des sucres contenus dans le milieu se traduit par une acidification (virage au jaune du rouge de phénol). Une alcalinisation se révèle par une coloration rouge foncée.

La production de sulfure d'hydrogène à partir du thiosulfate est mise en évidence par la formation d'une coloration noire.

- Fermentation du glucose :

Glucose fermenté : culot jaune.

Glucose non fermenté : culot rouge.

- Fermentation du lactose et/ou du saccharose :

Lactose et /ou saccharose fermenté(s) : pente inclinée jaune.

Lactose et saccharose non fermenté : pente inclinée rouge.

- Production de gaz :

Formation de bulles et/ou de poche gazeuse qui décollent complètement la gélose du fond de tube.

- Formation d'hydrogène sulfureux (H<sub>2</sub>S) :

Formation d'une coloration noire entre le culot et la pente, ou tout au long de la piqure.

### **2.4.2.4.1.4. Etude de la fermentation du mannitol(Marchal et Bourdon, 1982)**

La dégradation du mannitol conduit à la formation de fructose dont l'attaque aboutit à des acides à chaînes très courtes (acide acétique, acide formique). Le milieu utilisé est le milieu mannitol-mobilité, aussi utilisé pour l'étude de la mobilité.

Les souches bactériennes sont ensemencées dans le milieu mannitol-mobilité en tube par piqure centrale à l'aide d'une Pipette pasteur scellée chargée de culture en milieu solide ou liquide ; incuber à 37°C pendant 24 heures, puis on observe les résultats :

-Mannitol positive : le milieu vire du rouge au jaune.

## Matériel et méthodes

-Mannitol négative : le milieu reste rouge.

Mobilité positive : diffusion des bactéries à partir de la ligne d'ensemencement en créant un trouble du milieu.

Mobilité négative : les bactéries croissent uniquement le long de la piqure d'ensemencement.

### 2.4.2.4.1.5 Recherche de la $\beta$ -galactosidase(ONPG)

Pour dégrader activement le lactose, les microorganismes doivent posséder deux enzymes ; la perméase et la  $\beta$ -galactosidase. L'épreuve ONPG permet de mettre en évidence la  $\beta$ -galactosidase qui dégrade l'ONPG soit l'orthonitrophényl-  $\beta$ -D- galactopyranoside qui possède une structure analogue au lactose. Le lactose est composé d'une molécule de glucose et une molécule de galactose, tandis que l'ONPG est composé d'une molécule d'orthonitrophényl liée à un galactose. Selon Marchal et Bourdon (1982), L'hydrolyse de l'ONPG (composé incolore) libère l'orthonitrophényl qui est responsable de la coloration jaunâtre de milieu.

Préparer une suspension bactérienne dense de la souche bactérienne voulue étudier dans 0,5 ml d'eau physiologique stérile, y ajouté un disque d'ONPG. Incuber a 37°C pendant 24 heures. La lecture se fait après 15min, 30 min, 1 heure, 6 heures, 24 heures.

ONPG+ : la suspension se colore en jaune citron.

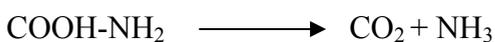
ONPG- : la couleur de la suspension ne change pas (incolore).

### 2.4.2.4.2. Métabolisme des protides

#### 2.4.2.4.2.1. Recherche de l'uréase (Marchal et Bourdon, 1982)



Mais seule, une uréase très active aboutit finalement à la réaction :



## Matériel et méthodes

---

Le CO<sub>2</sub> et le NH<sub>3</sub> se combinent en donnant le carbonate d'ammonium:



On réalise une suspension aussi dense que possible de bactéries à étudier dans un tube de milieu urée-indole. Incuber à 37°C pendant 24 heures et on observe les résultats :

-Uréase + : virage du jaune au rouge violacé ou rose rouge.

-Uréase - : pas de changement de coloration.

### 2.4.2.4.2.2. Recherche de la production d'indole (Marchal et Bourdon, 1982)

Certaines bactéries dégradent le tryptophane en indole grâce à une tryptophanase :

Tryptophane



La recherche d'indole est effectuée sur milieu riche en tryptophane et exempt d'indole préformé (urée-indole). L'indole produit est révélé par le réactif de Kovacs.

On rajoute 5 gouttes du réactif de Kovacs à un tube contenant le milieu urée-indole après l'avoirensemencé et incubé à 37°C pendant 24 heures. Agiter, puis laisser le réactif remonter en surface.

Le résultat est immédiat :

-Indole + : anneau rouge en surface.

-Indole - : anneau brunâtre (teinte originelle du réactif).

### 2.4.2.4.2.3. Recherche du tryptophane désaminase (TDA)

La désaminase agit sur le L-tryptophane en donnant l'acide pyruvique. Ce dernier donne avec le perchlorure de fer une coloration brune (Singleton, 1999).

La technique sera effectuée comme suite :

A partir d'un milieu solide on prélève une bonne quantité de colonies bactériennes et on ensemence le milieu urée-indole (UI). Incuber à 37°C pendant 24 heures.

## Matériel et méthodes

---

Après incubation on rajoute 2 à 3 gouttes de perchlorure de fer.

-Résultat TDA+ : coloration brube rouge avec présence fréquente d'un précipité.

-Résultats TDA- ; coloration jaune orangé.

### 2.4.2.4.2.4.Rcherche de la gélatinase

La gélatine peut être incorporée dans un milieu de culture afin de mettre en évidence sa dégradation par certaines bactéries possédant une gélatinase. Cette enzyme hydrolyse le collagène en acides aminés ou peptides (**Joffin et Lyerl, 2006**).

Une quantité importante de la souche bactérienne à tester estensemencée dans un tube contenant 5ml de la gélatine, puis on a incubé à 37°C pendant 24h. Après incubation, on a mis directement le tube à 4 °C pendant 30 min et juste après on a fait la lecture :

- Si la gélatine a demeuré liquide, donc la souche bactérienne est gélatinase positive (+).
- Si la gélatine est devenue solide, donc la souche bactérienne est gélatinase négative (-)

### 2.5. Isolement de la souche *Penicillium* sp.

A partir des oranges infectés, on a coupé des petits fragments des zones infectées par *Penicillium* sp. Les fragments sont lavés avec de l'eau de robinet puis rincés avec de l'eau de javel diluée à 3% pendant 3 minutes un lavage suivi avec de l'eau distillée trois fois successivement. Après avoir égoutté les fragments, on les a placé dans des boites de Pétri contenant le milieu de culture Sabouraud puis incubés à 25 °C.

### 2.6. Confrontation du champignon et de la bactérie en boîte de Pétri

#### 2.6.1. Préparation de l'inoculum

Les tests antifongiques doivent être réalisés à partir des cultures jeunes de (18 à 24 heures) pour les bactéries, et (4 à 5jours) pour les champignons.

Des repiquages ont été réalisé dans des boites de pétri contenant la gélose nutritive(GN), incubé à 37 °C pendant 24heures pour les bactéries, et dans des boites de pétri contenant le milieu sabouraud, incubé à 28 °C pendant 4 à 5 jours pour les champignons

### 2.6.2. Préparation de la suspension bactérienne

A partir des cultures jeunes, on prélève 3 à 5 colonies de bactéries et de champignons qu'on va mettre dans un tube contenant l'eau physiologique stérile. On agite pendant quelques secondes. La standardisation de la suspension à  $10^7$  UFC /ml, est réalisée à l'aide d'un spectrophotomètre réglé sur une longueur d'onde de 620nm. Selon Mac Farland, on admet une DO comprise entre 0,08 et 0,1 correspond à une concentration de  $10^7$  à  $10^8$  germes/ml.

### 2.6.3. Tests d'activités antifongiques

Les tests d'antagonisme fongique ont été réalisés sur des milieux de cultures solides (Sabouraud) ; en utilisant la méthode des disques de gélose décrite par Patel et Brown (1969). Cette méthode permet le contact direct entre les champignons et les bactéries. Des disques fongiques de 7mm de diamètre provenant d'une jeune culture de 5 jours, ont été déposés au centre des boîtes gélosées. Trois disques bactériens du même diamètre provenant d'une culture de 24h ont été déposés autour de chaque disque fongique à une distance égale environ 2 cm.

Des témoins négatifs de champignons ont été réalisés en déposant un disque de chaque champignons au centre des boîtes contenant le milieu sabouraud.

Cette confrontation des bactéries avec les champignons cryptogamiques est suivit chaque deux jours pendant une semaine (jusqu'à que le développement des témoins négatifs des champignons a atteint son maximum dans la boîte) à 28°C.

Les observations ont portées sur l'existence ou l'absence d'une inhibition de la croissance mycélienne. Cette dernière a été estimée par la mesure du diamètre moyen de la colonie fongique entourée des disques bactériens et est comparée au diamètre du témoin ne contenant que le disque fongique.

### 2.7. Recherche d'une substance inhibitrice volatile

La recherche d'une substance inhibitrice volatile a été réalisée par l'utilisation de boîtes de Pétri contenant une couche de gélose dans le fond de la boîte et une couche de gélose sur le couvercle : Le champignon estensemencé dans le fond de la boîte sur le milieu sabouraud. La bactérie estensemencée dans la boîte contenant le milieu MH sur le couvercle. Les boîtes témoins ne sont pasensemencées avec la bactérie.

### 2.8. Effet du pH du milieu sur la l'activité antifongique

L'activité antifongique a été évaluée par la méthode décrite par Patel et Brown (1969), avec une variation du pH du milieu sabouraud, pH=8 et pH=11. Le pH initial qui a donné une bonne activité antifongique est notée (diamètre des zones d'inhibition).

### 2.8. Test d'antagonisme *in vivo*

Le test d'antagonisme *in vivo* a été effectué en testant l'activité de *Bacillus* sp.4 sur les fruits de tomates infectées par *Botrytis cinerea* agent de la « pourriture grise ». Ce champignon possède un large spectre d'action et infecte les feuilles et les fruits de nombreuses plantes(Adam, 2008).

#### 2.8.1 Préparation des fruits de la tomate

Douze tomates de même calibre, de même couleur, et de même poids, ont été achetées au marché local de Tizi-Ouzou (Figure 6) .Après un rinçage à l'eau distillée et à l'eau de javel dans le but d'éliminer les saprophytes, les tomates ont été bien essuyées et mise dans des récipients propres. (Figure 8).



**Figure 6** : Photo des tomates après lavage

## Matériel et méthodes

### 2.8.3. Les étapes suivies pour le test

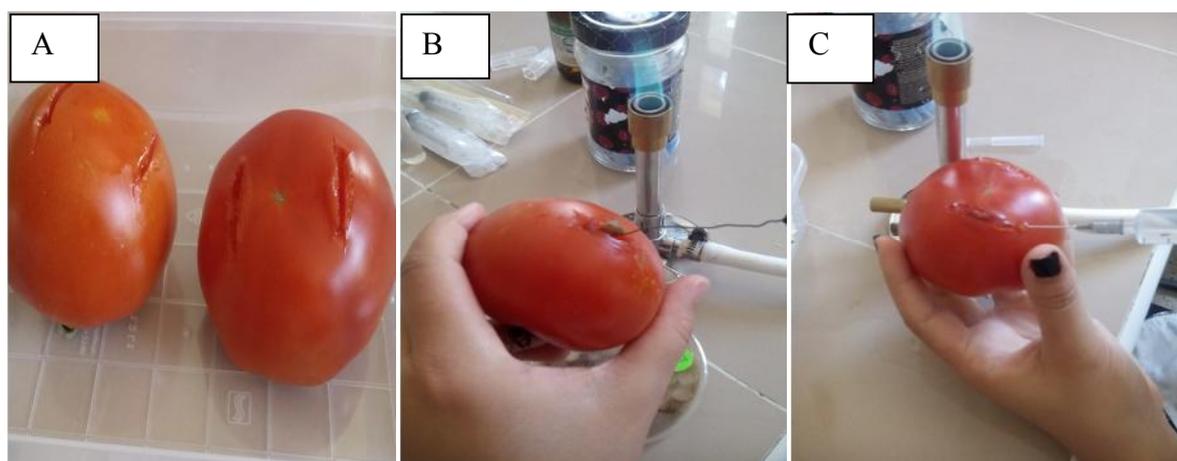
Préparation des témoins négatifs : quatre tomates préalablement incisées à l'aide d'un bistouri sont placées dans deux récipients à raison de deux tomates par récipient (Figure 7A)

Contamination des tomates : quatre autres tomates ont été incisées et contaminées par des disques de *Botrytis cinerea* provenant d'une culture de cinq jours. (Figure 7B).

Pulvérisation : la pulvérisation a été effectuée en prenant quatre nouvelles tomates incisées et contaminées par *Botrytis cinerea*, ensuite chacune des tomates est inoculée de 5ml de la suspension bactérienne standardisée à l'aide d'une seringue. (Figure 7C)

Ainsi, les récipients contenant les douze tomates ont été bien fermés et laissés à la température ambiante.

Les observations ont porté sur l'existence ou l'absence de la croissance mycélienne au niveau des tomates pulvérisées en comparant avec les tomates contaminées et les témoins négatifs, pendant 10 jours.



**Figure 7:** A : Photographie des témoins négatifs ; B : Tomate contaminée par *Botrytis cinerea* ; C : tomate pulvérisée.



**Figure 8** : Photo des tomates mises dans des récipients propres.

### 3. Analyse statistique

Les résultats ont été présentés par la moyenne suivie de l'écart-type ( $n=3$ ) pour chaque extrait en utilisant le test de Student.

L'analyse statistique a été réalisée par le logiciel Statistica version 7.1 en utilisant le test de l'analyse de la variance (ANOVA) à un facteur. Ce test nous permet de vérifier si les échantillons sont issus de la même population ou présentant des différences significatives.

S'il existe une différence significative, le test de l'ANOVA est suivi par le test complémentaire de Newman-Keuls afin d'établir les différents groupes homogènes. Le niveau de signification était de 5 %.

CHAPITRE II

RÉSULTATS ET

DISCUSSION

## Résultats et discussion

### 1. Isolement et identification des souches bactériennes

Huit (8) souches bactérienne pures sont obtenus dont 2 proviennent du sol rhizosphérique de l'ail et 6 de l'oignon. Celles-ci ont été sélectionnées en tenant compte de leurs caractéristiques macroscopiques.

L'identification biochimique a porté sur les 8 souches bactériennes isolées. Elle a été menée selon les clefs d'identification (**Marshall et Bourdon, 1982**).

#### 1.1. Critères morphologiques

##### 1.1.1. Examen macroscopique

Les cultures obtenues sur les boîtes de Pétri sont observées à l'œil nu pour caractériser la forme, la taille, la couleur, l'opacité, le contour, le relief, ainsi que la surface des colonies.

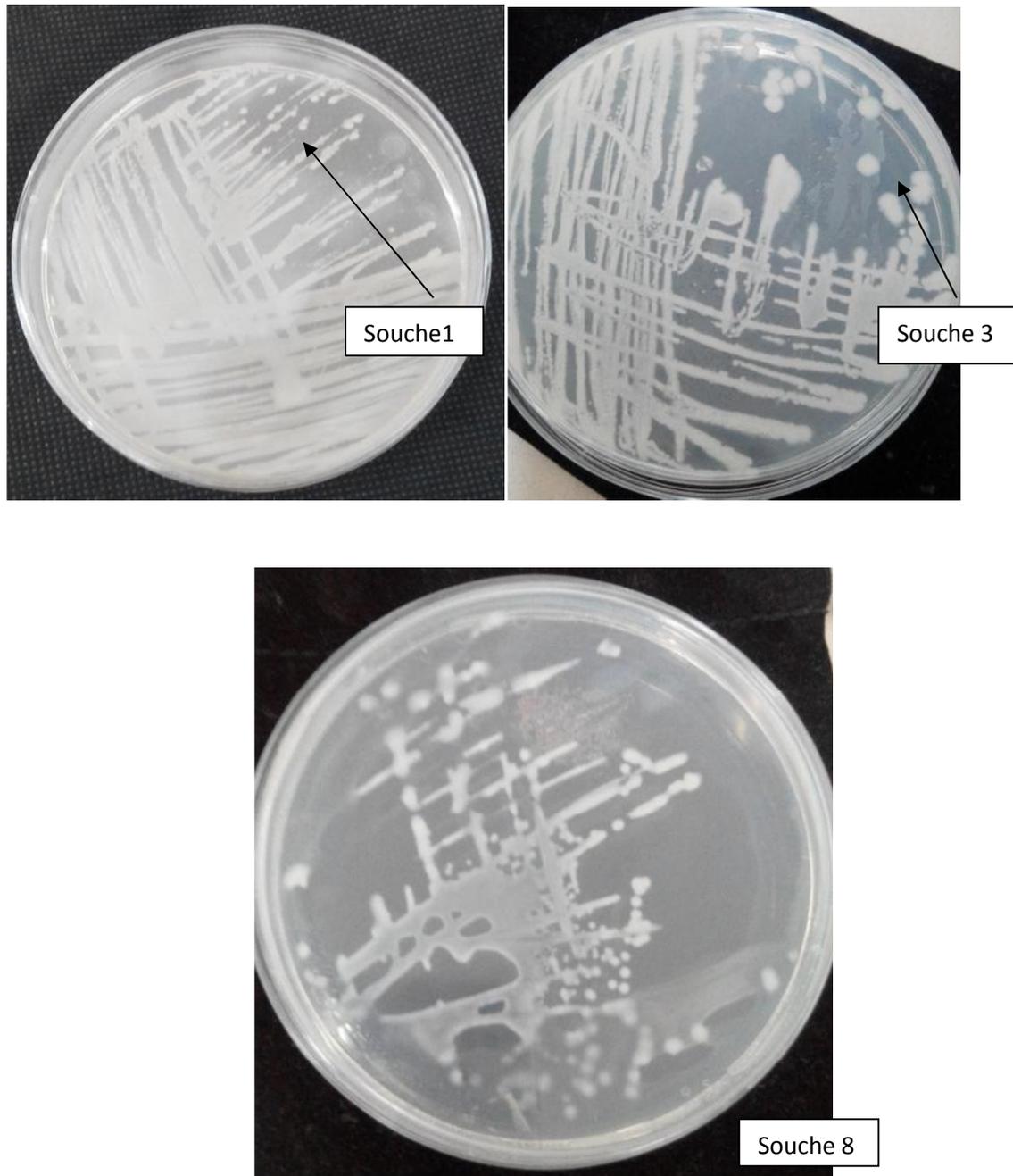
Les critères morphologiques des 8 souches bactériennes isolées sur milieu gélose nutritive (GN) sont représentés' dans le **tableau III**.

**Tableau III** : Résultats de l'examen macroscopique des souches bactériennes isolées à partir des sols rhizosphériques de l'oignon et de l'ail sur milieu GN à 37 °C pendant 24h

Bactéries	Forme	Conteur	Relief	Taille	Surface	Couleur	Opacité
<b>Souche 1</b>	Ronde	Régulier	Convexe	1 à 2 mm	Lisse brillante	Crème	Translucide
<b>Souche 2</b>	Irrégulière	Plissé	Plate	3mm	Rugueuse sèche	Crème	Translucide
<b>Souche 3</b>	Ronde	Irrégulier	Légèrement convexe	4 mm	lisse brillante	Blanc jaunâtre	Translucide
<b>Souche 4</b>	Irrégulière	Plissé	Légèrement convexe	3mm	Rugueuse sèche	Blanc jaunâtre	Translucide
<b>Souche 5</b>	Irrégulière	Irrégulier	Légèrement convexe	4mm	Lisse brillante	Crème	Opaque

## Résultats et discussion

<b>Souche 6</b>	Ronde	Régulier	Légèrement convexe	3mm	Lisse brillante	Blanc jaunâtre	Translucide
<b>Souche 7</b>	Irrégulière	Irrégulier	Légèrement convexe	2mm	Lisse brillante	Blanc jaunâtre	Opaque
<b>Souche 8</b>	Ronde	Régulier	Bombé	1 mm	Lisse brillante	Blanc jaunâtre	Translucide



**Figure 9** : Aspect de quelques souches bactériennes isolées sur milieuGN

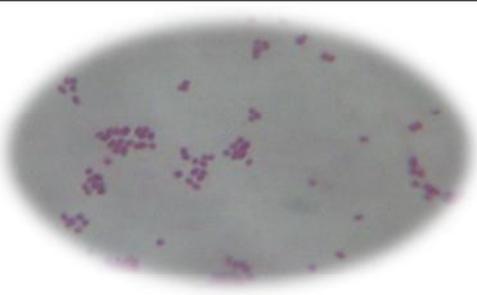
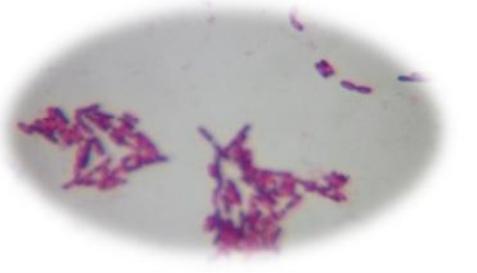
## Résultats et discussion

### 1.1.2. Examen microscopique

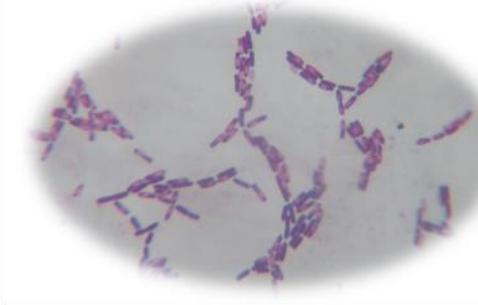
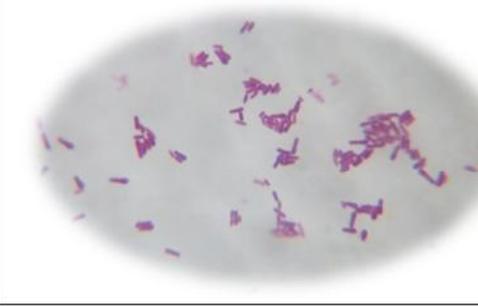
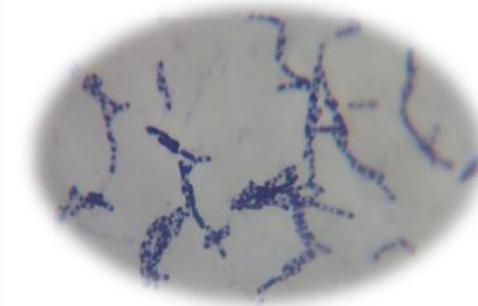
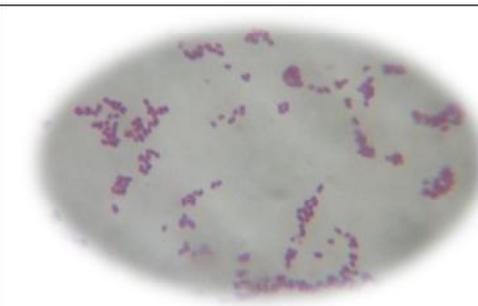
L'étude microscopique est basée sur la coloration de Gram, Cette technique nous a révélé des bactéries Gram négatifs et des bactéries Gram positif apparaissent sous différentes formes avec différent modes d'associations. Cette observation a montré que les souches étudiées sont des gros bacilles sporulés et des Coccobacille.

L'examen microscopique des 8 souches bactériennes isolées à partir du sol rhizosphérique de l'ail et de l'oignon a révélé 6 souches bactériennes à Gram positif dont une est isolée à partir du sol rhizosphérique de l'ail et 5 à partir de celui de l'oignon et 2 Gram négatif dont une est isolée à partir du sol rhizosphérique de l'ail et l'autre à partir de celui de l'oignon. Les résultats de l'examen microscopique sont illustrés dans le **tableau IV**

**Tableau IV** : Résultats de la coloration de Gram des souches bactériennes isolées à partir des rhizosphères de l'ail et de l'oignon.

Souche	Coloration de Gram			
	Forme	Gram	Agencement	Aspect microscopique
<b>Souche 1</b>	Colibacilles	Négatif	Isolées ; Diplobacille ; En palissade	
<b>Souche2</b>	Gros bacilles avec des spores ovales non déformantes centrales	Positif	Diplobacilles	
<b>Souche 3</b>	Gros bacilles avec des spores ovales non déformantes subterminales	Positif	En chaînette ; En lettre V	

## Résultats et discussion

<b>Souche 4</b>	Gros bacilles avec des spores ovales non déformantes subterminales	Positif	En chaînette ; En lettre V	
<b>Souche 5</b>	Gros bacilles avec des spores ovales non déformantes centrales	Positif	En chaînette	
<b>Souche 6</b>	Gros bacilles avec des spores ovales déformantes terminales	Positif	Isolées ; En palissade	
<b>Souche 7</b>	Gros bacilles avec des spores ovales non déformantes subterminales	Positif	En chaînette.	
<b>Souche 8</b>	Colibacilles	Négatif	Isolées ; Diplobacille ; En palissade.	

### 1.2. Critères biochimiques

Les tests d'identification biochimiques des 8 souches bactériennes nous ont révélé 3 genres bactériens.

Les résultats sont présentés dans le **tableau V**

Les caractères biochimiques des deux souches S1 et S8 suggèrent qu'elles appartiennent aux genres d'*Acinetobacter* sp. et *Pseudomonas* sp. respectivement.

Le genre *Acinetobacter* est souvent rattaché aux « *Pseudomonas* et apparentés », regroupant des bacilles Gram négatifs aérobies stricts (non fermentatifs). Selon la classification de **Bergey (2002)**, il appartient en fait à l'ordre des *Pseudomonadales*.

On constate que *Acinetobacter* sp. et *Pseudomonas* sp. ont presque les mêmes critères biochimiques, les deux souches sont aérobies stricts, catalase positif, nitrate réductase positif, non fermentaire et uréase négatif.

La différence entre les deux souches est au niveau de la mobilité et de l'oxydase. *Acinetobacter* sp. est immobile et oxydase négative par contre *Pseudomonas* sp. est une bactérie mobile et oxydase positive.

Les souches S2, S3, S4, S5, S6 et S7 ont été rattachées au genre *Bacillus* sp. pour leurs morphologies microscopiques (présence de la spore). D'après les résultats obtenus on constate que ces 6 souches bactériennes sont : aéro-anaérobie facultatif, oxydase positif, catalase positif et uréase négatif.

## Résultats et discussion

**Tableau V:** Identification biochimique des souches isolées

Souches		S 1	S 2	S 3	S 4	S 5	S 6	S 7	S 8
Tests									
<b>Forme</b>		Colibacille	Gros bacille	Collibacille					
<b>Gram</b>		-	+	+	+	+	+	+	-
<b>Catalase</b>		+	+	+	+	+	+	+	+
<b>Oxydase</b>		-	+	+	+	+	+	+	+
<b>Mobilité</b>		-	+	+	+	+	-	-	+
<b>Métabolisme des glucides sur MEVAG</b>		O	OF	OF	OF	OF	OF	OF	O
<b>Citrate</b>		+	+	+	-	-	+	+	-
<b>NR</b>		-	-	+	-	-	+	+	-
<b>VP</b>		-	+	+	-	-	+	+	-
<b>RM</b>		+	-	-	+	+	-	-	+
<b>Uréase</b>		-	-	-	-	-	-	-	-
<b>ONPG</b>		-	-	+	+	-	-	+	-
<b>TDA</b>		-		-		-	-	-	-
<b>Indole</b>		-	-	-	-	-	-	-	-
<b>H<sub>2</sub>S</b>		-	-	+	+	-	-	-	-
<b>Production du Gaz</b>		+	-	+	-	-	-		-
<b>Type respiratoire</b>		AS	AAF	AAF	AAF	AAF	AAF	AAF	AS
<b>Gélatinase</b>		-	-	+		-	+	-	-
<b>Fermentation des sucres</b>	<b>Glucose</b>	+	+	+	+	+	+	+	+
	<b>Lactose</b>	+	+	+	+	-	-	+	-
	<b>Mannitol</b>	+	-	-	+	+	-	-	+

AAF :Aéro-anaérobie facultatif ;AS : Aérobie stricte ; S : souche ; O : Oxydatif ; OF : Oxydatif et fermentif.

### 2. Identification de *Penicillium* sp.

#### 2.1. Morphologie macroscopique

Les colonies de ces espèces sont habituellement de croissance rapide ; elles peuvent être de différentes teintes de vert, blanc ou d'autres couleurs. Elles se composent la plus part du temps d'une masse feutrée de conidiophores.

#### 2.2. Morphologie microscopique

Les hyphes hyalin septés portent des conidiophores ramifiés ou non ramifiés. La première cellule du conidiophore est appelée cellule pied ; les branches secondaires sont connues sous le nom de métueles. Les métueles sont plus ou moins cylindriques, à parois lisses, portant de trois à six phialides en forme de bouteille. Les phialides produisent de longues chaînes sèches de petites spores rondes à ovale.

### 3. Confrontation du champignon et de la bactérie en boîte de Pétri

Le test consiste à étudier l'effet antifongique des bactéries isolées à partir de la rhizosphère de l'ail et de l'oignon vis-à-vis des souches fongiques.

Les résultats obtenus montrent que la croissance mycélienne des souches témoins est plus importante par rapport à celle obtenue avec les différentes confrontations (Pathogène-Antagoniste). Pour chaque confrontation nous avons calculé le pourcentage d'inhibition de la croissance mycélienne à partir de la formule suivante décrite par **Albuquerque, (2006)**.

Les pourcentages d'inhibition, calculés pour les différentes confrontations sont indiqués dans le **Tableau VI**

$$I (\%) = \frac{Dt - De}{Dt} \times 100$$

**I (%)** : Inhibition de la croissance fongique en pourcentage

**Dt (mm)** : diamètre de la croissance fongique dans la boîte témoin

**De (mm)** : diamètre de la croissance fongique dans la boîte

Parmi les 8 souches isolées, *Pseudomonas* sp. et *Bacillus* sp.6 ne montrent aucune activité antifongique, par contre les trois souches *Bacillus* sp.2, 4 et 5 inhibent la croissance des trois champignons phytopathogènes (*Aspergillus niger*, *Botrytis cinerea* et *Penicillium* sp), *Acinetobacter* sp. et *Bacillus* sp.1 inhibent respectivement la croissance de deux

## Résultats et discussion

champignons, *Aspergillus niger* et *Penicillium* sp. ; *Botrytis cinerea* et *Aspergillus niger*. Cependant la souche *Bacillus* sp.3 inhibe seulement la croissance d'un seul champignon (*Penicillium* sp.).

La souche *Bacillus* sp.4 inhibe le développement des trois champignons dans des proportions variant de 26,29±2,6 à 54,60±1,03%. Les autres souches ont une efficacité beaucoup plus spécifique. *Acinetobactersp.* par exemple, provoque une forte inhibition de 55,29±3,12% de la croissance de *Penicillium* sp, une inhibition de seulement 9,12±1,02% de la croissance de *Botrytis cinerea* et aucun pouvoir inhibiteur vis-à-vis d'*Aspergillus niger*. La souche la plus active vis-à-vis d'*A. niger* est *Bacillus* sp.2 avec un pouvoir inhibiteur de 30±3 %.

La **figure 13** montre que *Penicillium* sp. est le plus sensible à l'action des isolats avec une activité inhibitrice estimée de 43,53% à 55,29% par contre *Botrytis cinerea* est le plus résistant.

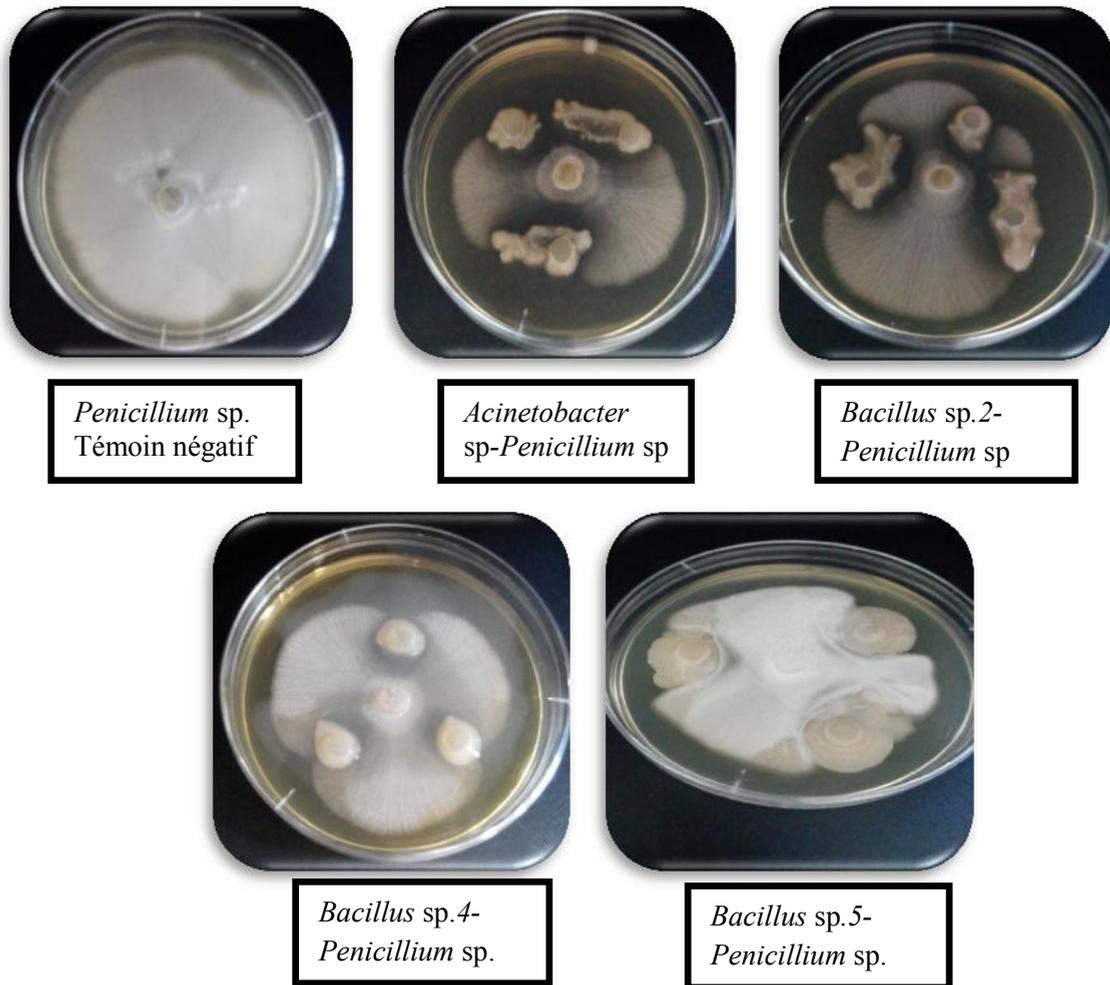
On peut constater que la croissance de certains champignons est fortement inhibée par une bactérie et peu par une autre alors que celle-ci démontre son efficacité sur un autre champignon.

**Tableau VI** : Taux d'inhibition (%) de la croissance mycélienne (moyenne ±écart type) (n=3)

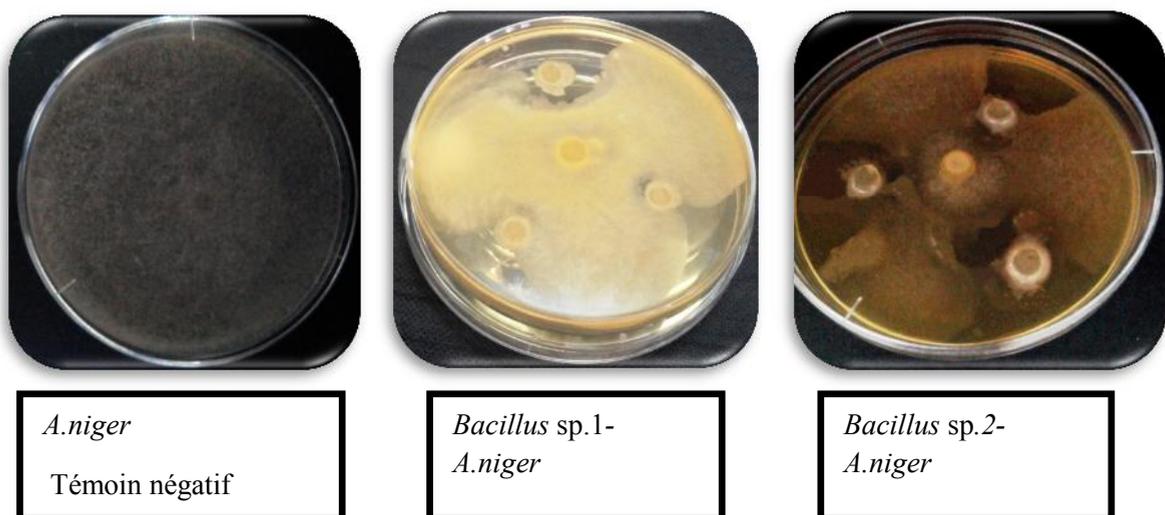
Bactéries	Champignons		
	<i>Aspergillus niger</i>	<i>Botrytis cinerea</i>	<i>Penicillium</i> sp
<i>Acinetobactersp.</i>	0±0,00	9,12±1,02	55,29±3,12
<i>Bacillus</i> sp.1	28,50±2,4	10±1,73	0±00
<i>Bacillus</i> sp.2	30±3	11,17±2,09	48,24±1,91
<i>Bacillus</i> sp.3	0±0,00	0±0,00	55±2,01
<i>Bacillus</i> sp.4	26,29±2,6	27±3	54,60±1,03
<i>Bacillus</i> sp.5	5,98±1,01	14,30±1,9	43,53±2,95
<i>Bacillus</i> sp.6	0±0,00	0±0,00	0±0,00
<i>Pseudomonas</i> sp.	0±0,00	0±0,00	0±0,00

Les valeurs de ce tableau nous ont permis de réaliser le diagramme de la **figure 13**.

## Résultats et discussion



**Figure 10:** Inhibition de la croissance de *Penicillium* sp. par *Bacillus* sp.4 et *Bacillus* sp.5



**Figure 11:** Inhibition de la croissance d'*A. niger* par *Bacillus* sp.1 et *Bacillus* sp.2

## Résultats et discussion

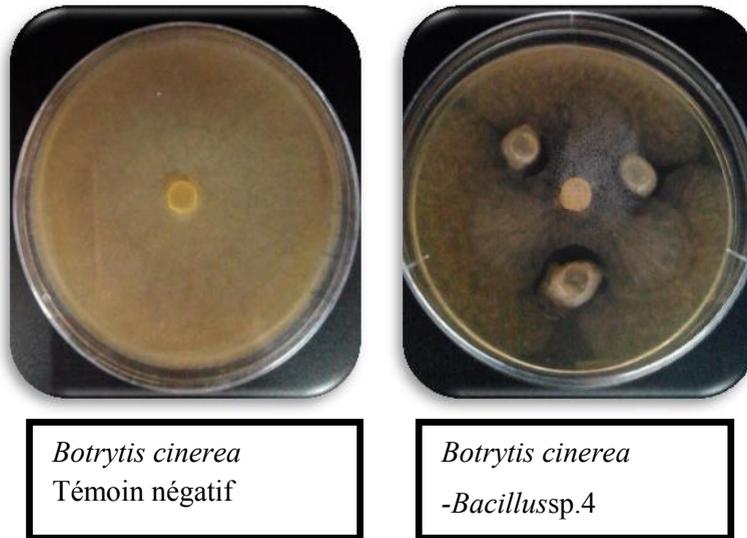


Figure 12: Inhibition de la croissance de *Botrytis cinerea* par *Bacillus* sp.4

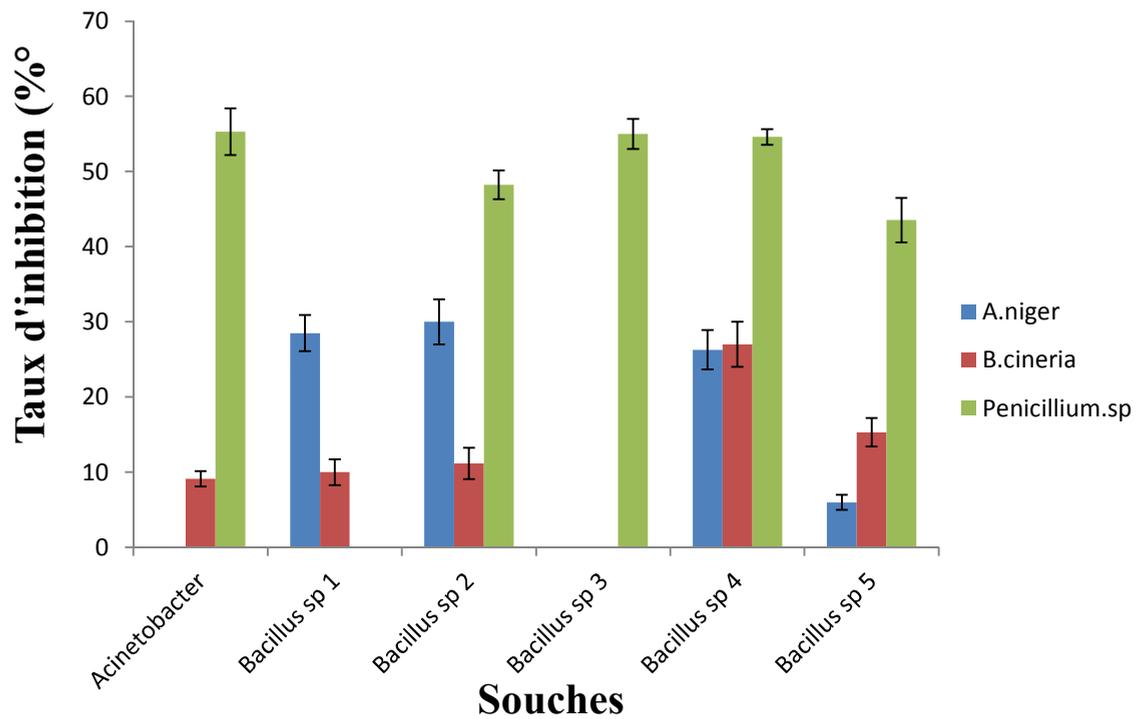


Figure 13 : Diagramme représentant les pourcentages d'inhibition de la croissance mycélienne d'*A.niger*, *B.cinerea* et *penicillium* sp.par les bactéries antagonistes.

## Résultats et discussion

### 4. Activité antifongique des bactéries par les composés volatils

L'activité antifongique des bactéries par les composés volatils a été testé sur les trois champignons phytopathogènes : *Botrytis cinerea*, *Aspergillus niger*, et *Penicillium* sp. en utilisant deux bactéries *Bacillus* sp.3 et *Bacillus* sp.4.

Nous avons calculé le pourcentage d'inhibition de la croissance mycélienne par les composés volatils à partir de la formule décrite par **Albuquerque (2006)**. Les résultats sont présentés dans **le tableau VII** et **la figure 16**

L'antagonisme fongique par production de substances volatiles est retrouvé chez les deux bactéries : *Bacillus* sp.3 et *Bacillus* sp.4, la première a montré une inhibition importante de la croissance de l'*Aspergillus niger* avec un taux estimé à 60 %, par contre elle ne montre aucune activité antifongique vis-à-vis de *Botrytis cinerea* et *Penicillium* sp.

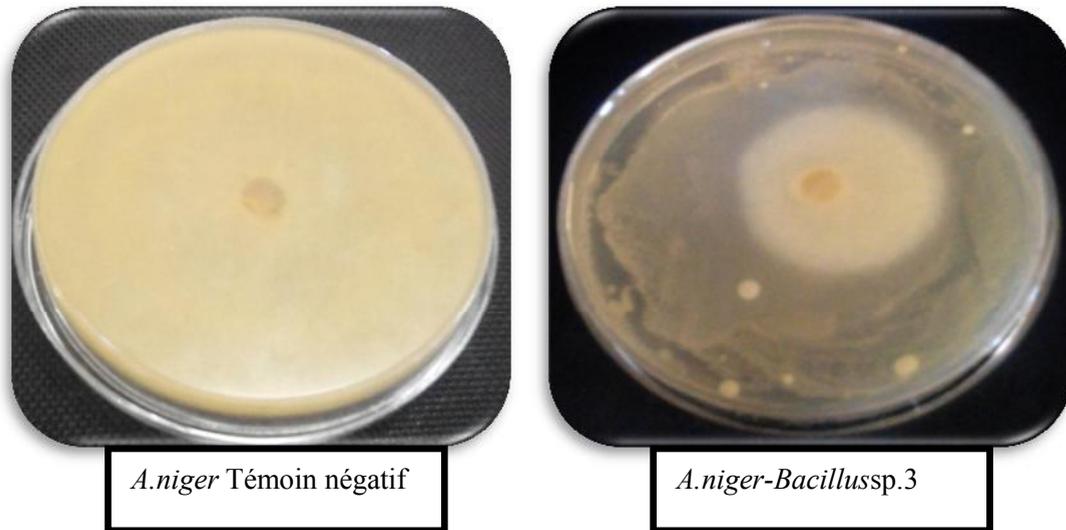
Quand à *Bacillus* sp.4, elle ne montre aucun antagonisme fongique contre *Aspergillus niger*, mais une inhibition très élevée de la croissance mycélienne est noté contre *Botrytis cinerea* avec un taux d'inhibition estimé à 81,36% et contre *Penicillium* sp. à 69,21%

**Tableau VII** : Taux d'inhibition (%) de la croissance mycélienne par les composés volatiles (moyenne  $\pm$  écart type) (n=3).

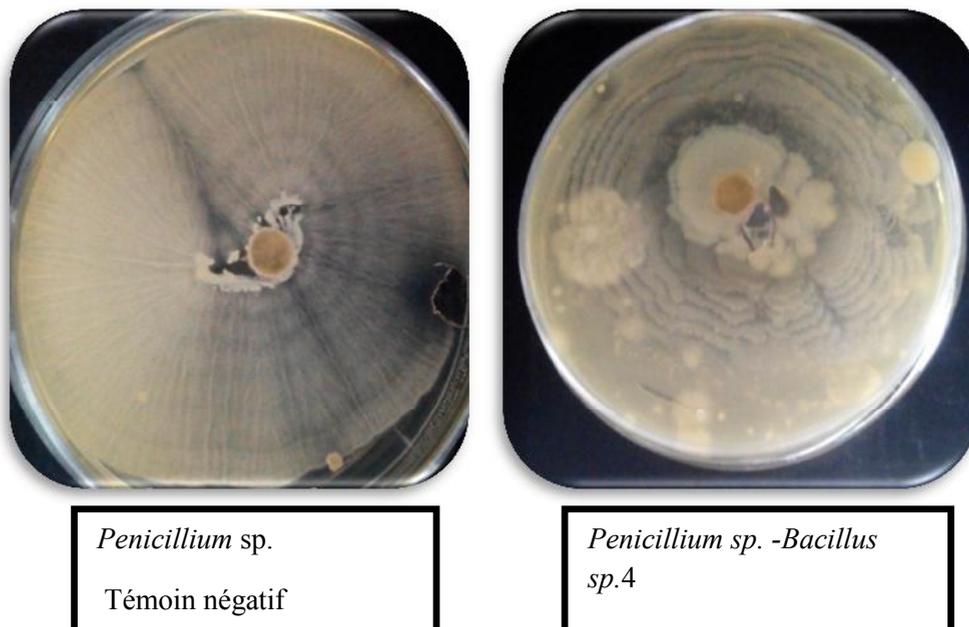
Bactéries	Champignons		
	<i>Aspergillus niger</i>	<i>Botrytis cinerea</i>	<i>Penicillium</i> sp.
<i>Bacillus</i> sp.3	60 $\pm$ 1,00	0 $\pm$ 0,00	0 $\pm$ 0,00
<i>Bacillus</i> sp.4	0 $\pm$ 0,00	81,36 $\pm$ 2,06	69,21 $\pm$ 1,22

On constate que la croissance de certains champignons est fortement inhibée par la production de substances volatils, alors qu'en contact direct avec la même souche est peu importante ou complètement absente ; et vice versa. C'est le cas par exemple de la souche *Bacillus* sp.3 qui a montré un antagonisme fongique élevé contre *Penicillium* sp. en contact direct estimé à 55%, en revanche l'inhibition de la croissance du même champignon avec la même souche dans le cas de la production des substances volatiles est complètement absente.

## Résultats et discussion

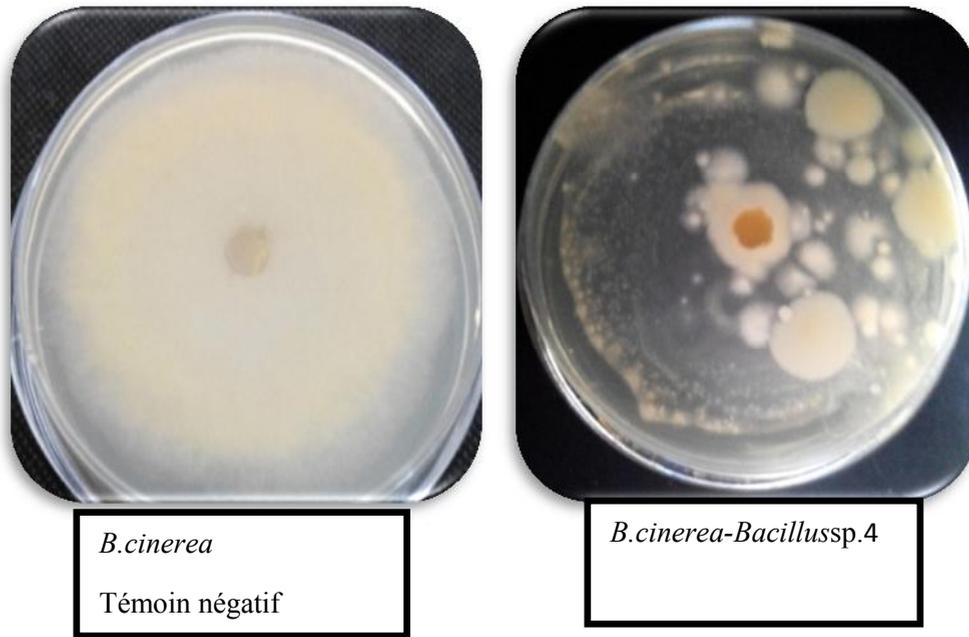


**Figure 14:** Inhibition de la croissance d'*A.niger* par les substances volatiles produites par *Bacillus* sp.3.

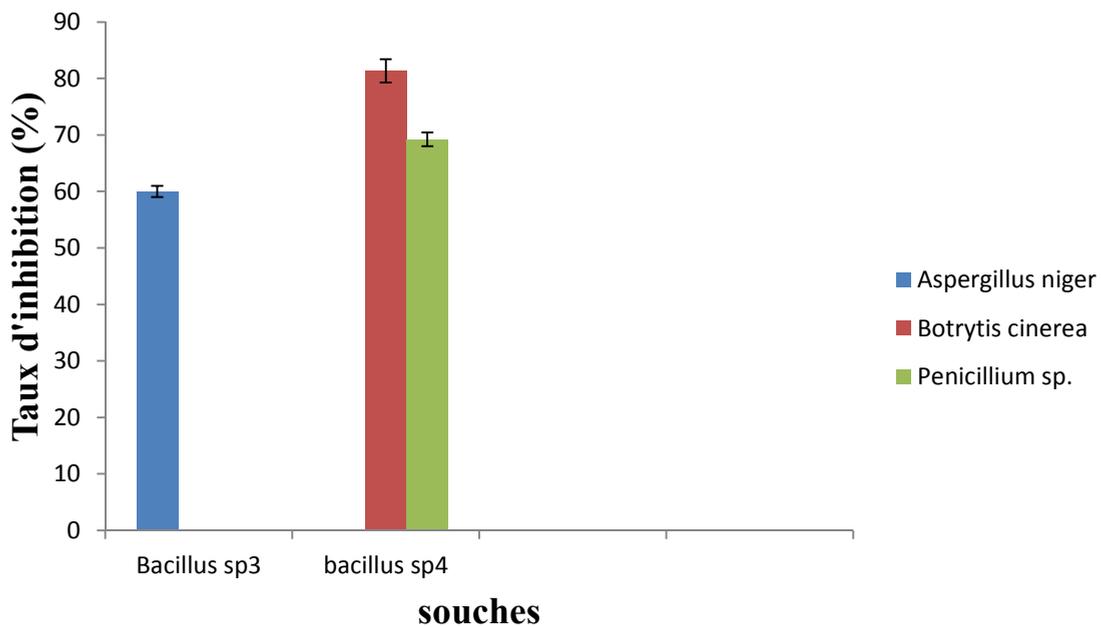


**Figure 15 :** Inhibition de la croissance de *Penicillium* sp. par les substances volatiles produites par *Bacillus* sp.4.

## Résultats et discussion



**Figure 16:** Inhibition de la croissance de *B.cinerea* par les substances volatiles produites par *Bacillus sp.3* et *Bacillus sp.4*



**Figure 17 :** Diagramme représentant les pourcentages d'inhibition de la croissance mycélienne d'*A.niger*, *B.cinerea* et *penicillium sp.* par les composés volatiles produites par *Bacillus sp.3* et *Bacillus sp.4*

## Résultats et discussion

### 5. Effet du pH sur l'activité antifongique

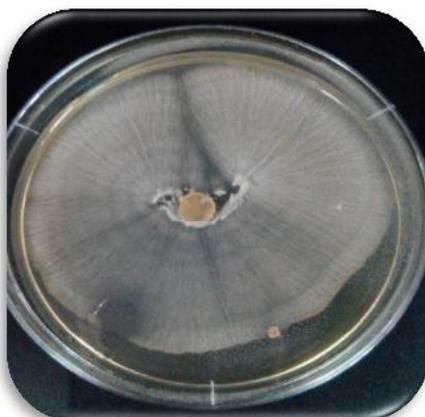
L'activité antifongique d'*Acinetobacter* sp. et *Bacillus* sp.4 sur *A.niger* et *Penicillium* sp. a été étudiée sur le milieu sabouraud à deux pH différents (8,11).

Les résultats de l'effet du pH sur l'activité antifongique des deux souches bactériennes sur les deux champignons sont représentés dans le **tableau VIII** et à la **figures 20 et 21**

**Tableau VIII** : Taux d'inhibition (%) de la croissance mycélienne à pH 8 et 11 (moyenne  $\pm$  écart type) (n=3).

Champignons Bactéries	<i>A.niger</i>		<i>Penicillium</i> sp.	
	pH= 8	pH =11	pH= 8	pH= 11
<i>Acinetobacter</i> sp.	40 $\pm$ 2,2	21,25 $\pm$ 2,7	34,19 $\pm$ 2,14	35,88 $\pm$ 2,9
<i>Bacillus</i> sp.4	23,53 $\pm$ 1,15	39 $\pm$ 2,1	44,12 $\pm$ 1,67	31,76 $\pm$ 1,98

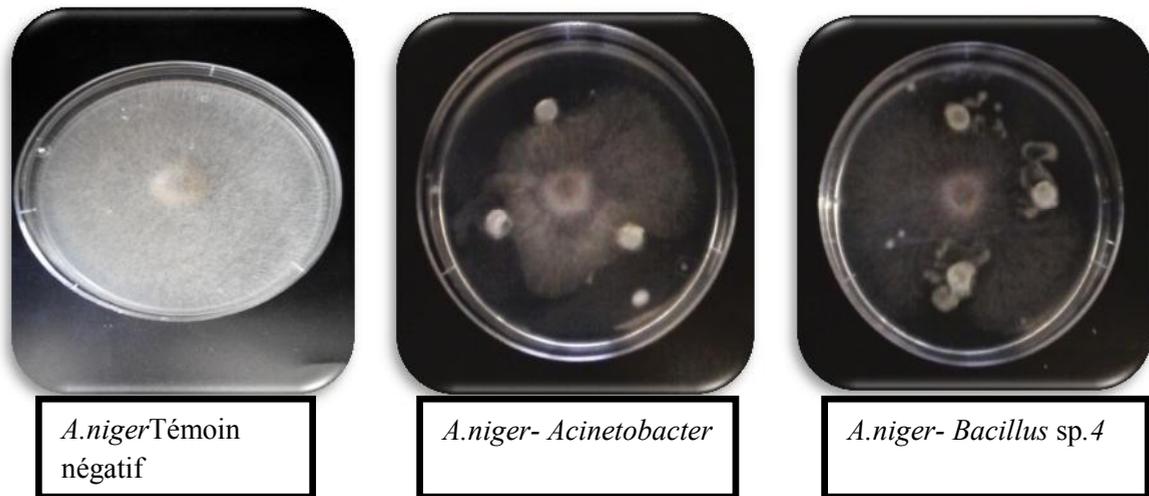
Les résultats indiquent que l'activité inhibitrice des deux souches contre les deux champignons phytopathogènes est variable d'une valeur à une autre. *Acinetobacter* sp. montre une activité contre *A.niger* et *Penicillium* sp. pour les deux valeurs de pH 8 et 11 mais elle a une forte production d'antifongique contre *A.niger* avec un pourcentage d'inhibition de 40 % pour le pH=8. Cependant, la souche *Bacillus* sp.4 montre une activité antifongique différente contre les 2 champignons pour les deux valeurs de pH, mais elle est fortement antagoniste vis-à-vis de *Penicillium* sp. avec un pouvoir inhibiteur de 44,12% à pH=8, et vis-à-vis *A.niger* avec un pourcentage d'inhibition de 39% pour le pH=11.



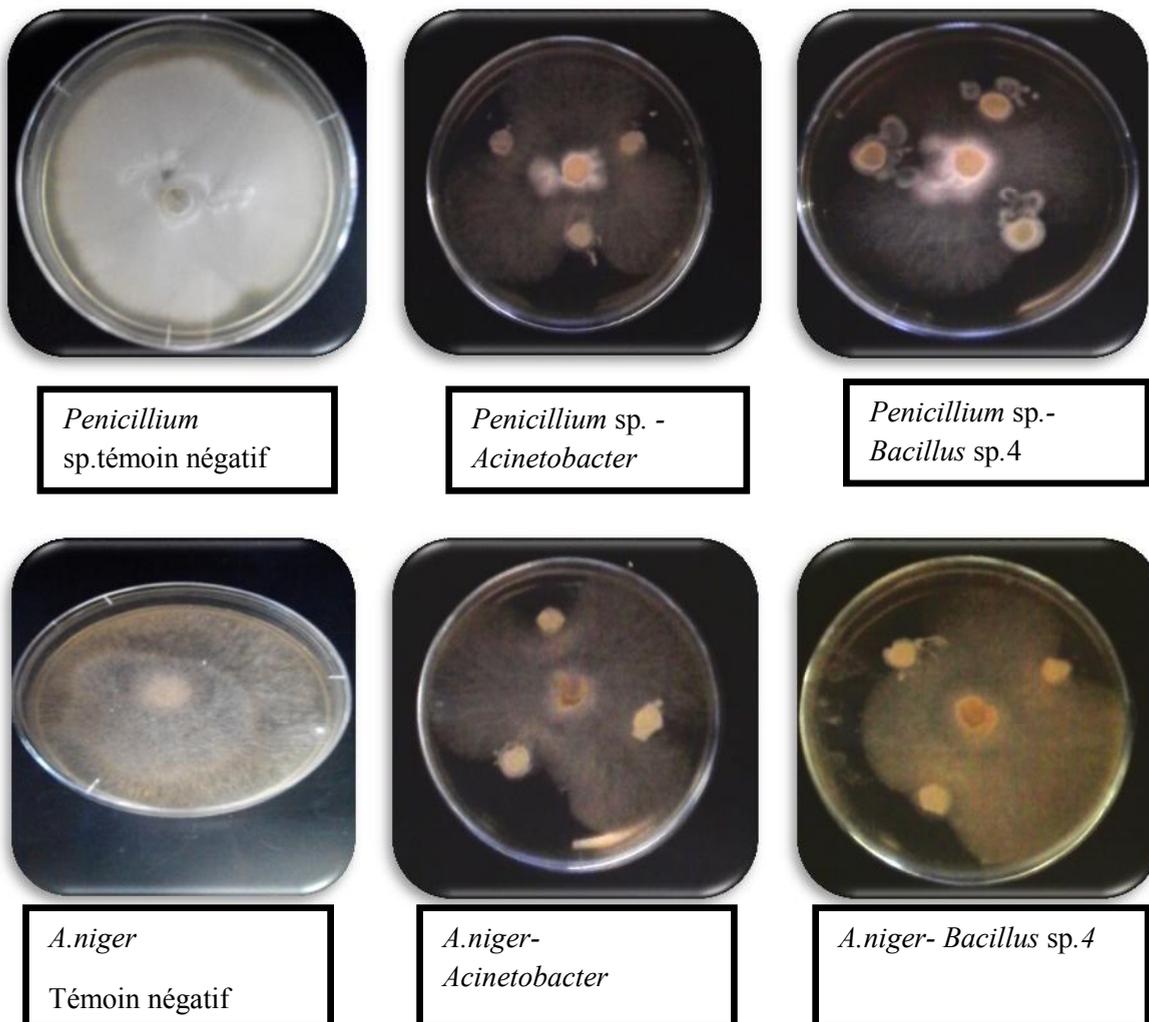
*Penicillium* sp. Témoin négatif



*Penicillium* sp. - *Acinetobacter*



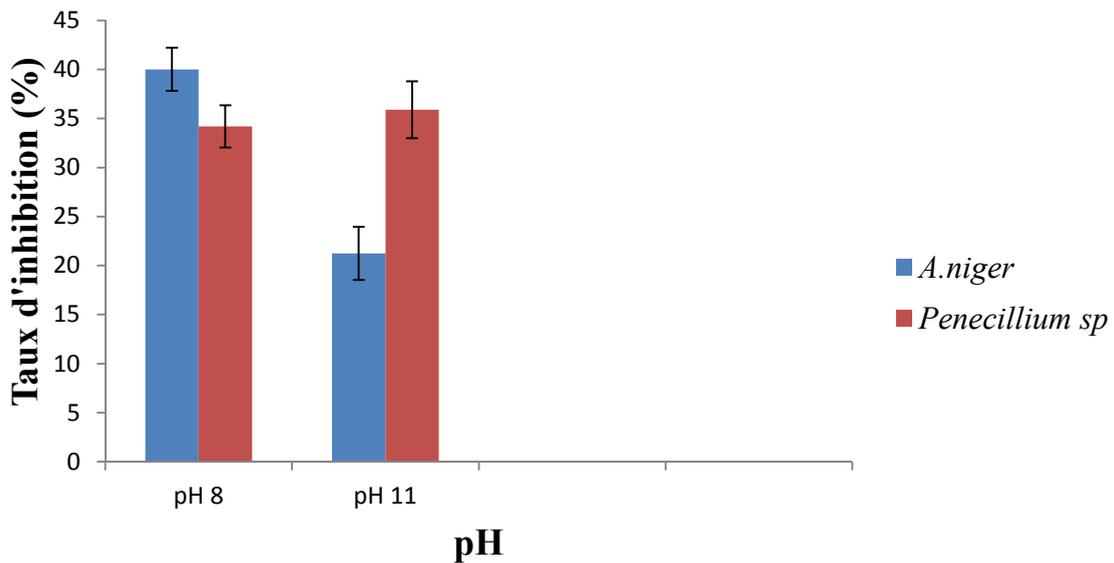
**Figure 18:** Inhibition de la croissance d'*A.niger* par *Acinetobacter* et *Bacillus* sp.4 à pH= 8



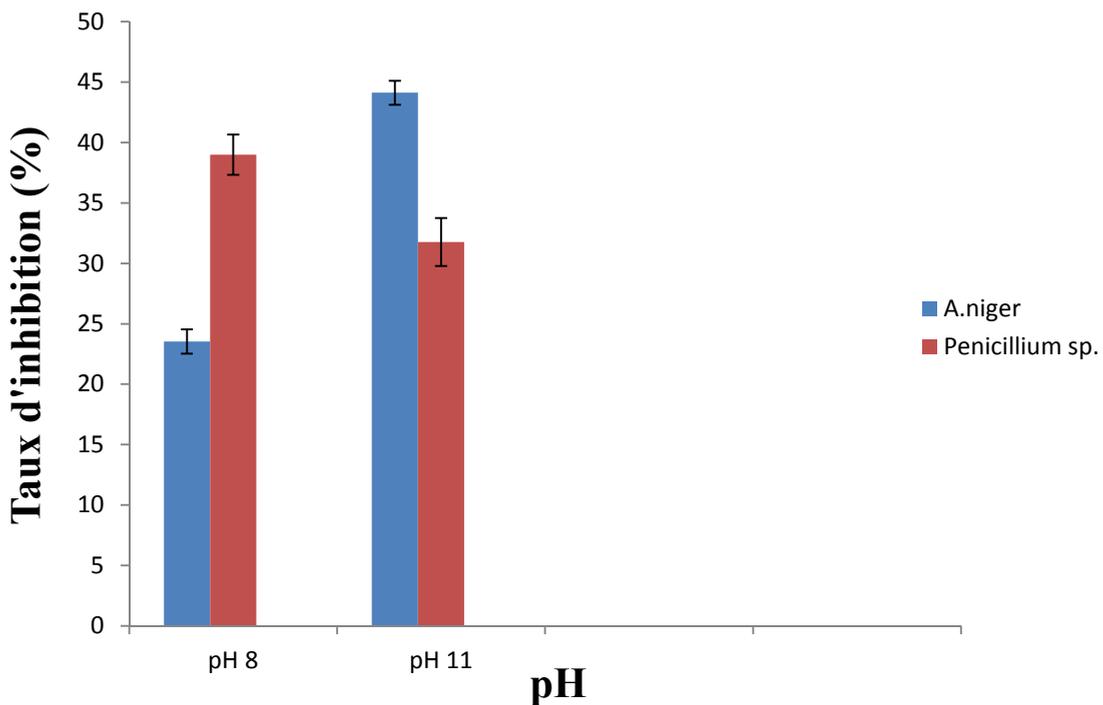
**Figure 19:** Inhibition de la croissance d'*A.niger* par *Acinetobacter* et *Bacillus* sp.4 à pH=11

## Résultats et discussion

Les valeurs du **tableau VIII** nous ont permis de réaliser les diagrammes de **figure 20** et **21**.



**Figure 20:** Effet de différents pH sur l'activité antifongique d'*Acinetobacter* sp. vis-à-vis *A.niger* et *penicillium* sp.



**Figure 21:** Effet de différents pH sur l'activité antifongique de *Bacillus* sp. vis à vis *A.niger* et *penicillium* sp.

## Résultats et discussion

---

### 6. Evaluation de l'activité antifongique *in vivo*

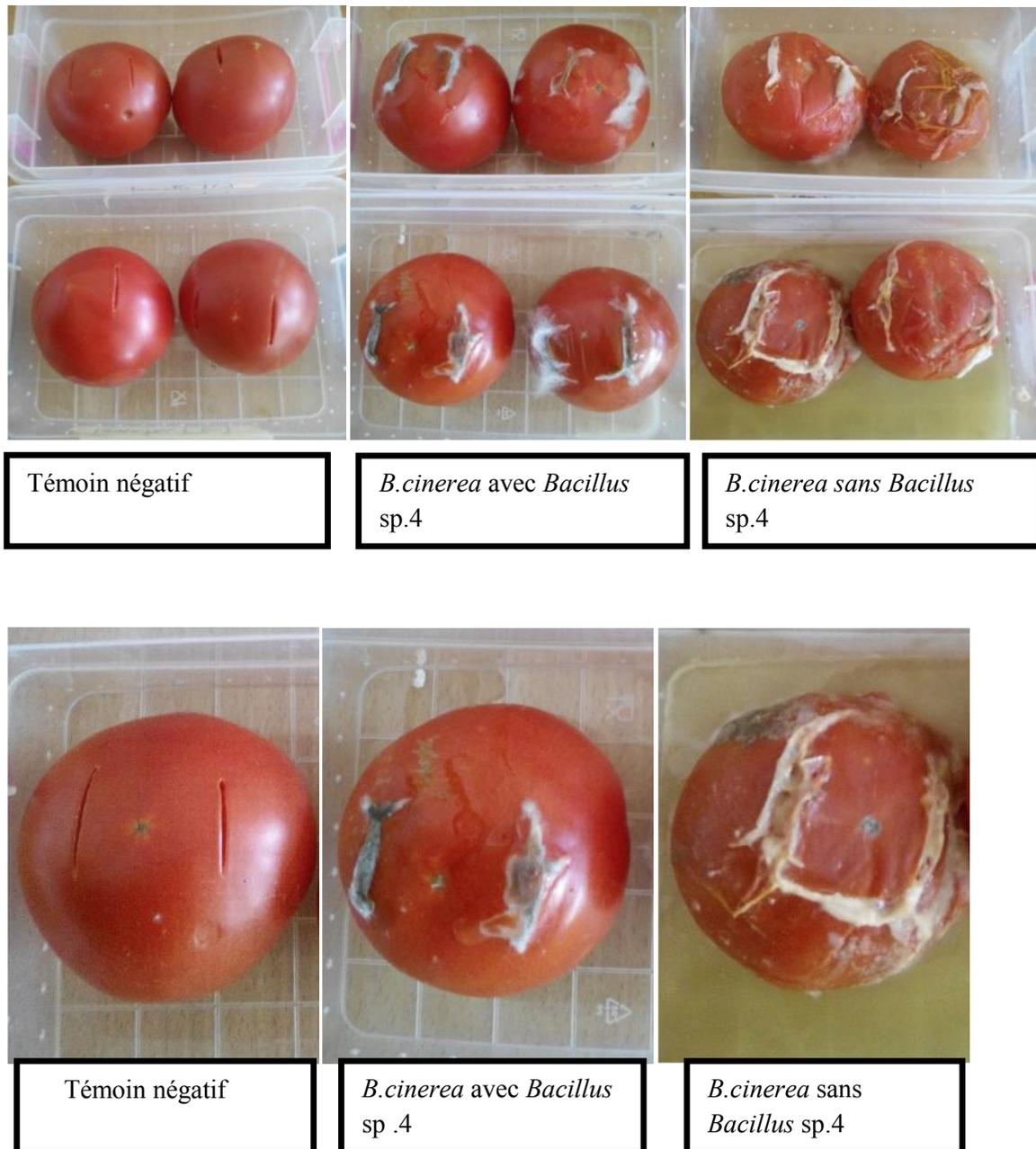
Le traitement des tomates par pulvérisation avec une suspension de *Bacillus* sp.4 a montré la capacité de cette dernière à protéger les tomates pendant l'entreposage, des pourritures occasionnées par *B.cinerea*.

Les résultats du test *in vivo* sur les tomates sont présentés dans le **tableau IX** et la **figure 22**.

**Tableau IX** : Diamètre de développement de *B.cinerea* inoculé sur la tomate (moyenne± écart type)

Echantillons	Témoin négatif	<i>B.cinerea</i> avec <i>Bacillus</i> sp.4	<i>B.cinerea</i> sans <i>Bacillus</i> sp.4
Diamètre de développement de la moisissure (cm)	00±0,00	1,5±0,08	2.4±0,25

## Résultats et discussion



**Figure 22** : Photos montrant la différence entre la croissance fongique de *B. cinerea* sur des tomates pulvérisées par une suspension de *Bacillus* sp.4 et des tomates non pulvérisées avec le témoin négatif.

Le développement de *B. cinerea* pour les échantillons non traités se traduit par la pourriture de la tomate accompagné d'une forte odeur désagréable. Cependant les tomates infectés en présence de *Bacillus* sp.4 n'ont présenté de signe d'altération qu'après une semaine avec une pourriture superficielle au tour de la partie inoculé alors que les autres parties du fruit demeuraient fermes.

## Résultats et discussion

---

La sévérité de la maladie est déterminée subjectivement grâce à l'échelle de 0 à 5 (**Elazaret al., 1993**) ou :

0=pas de développement d'affaiblissement

1=affaiblissement supérieur à 0,5 cm de diamètre sans sporulation ;

2=affaiblissement entre 0,5 et 1 cm de diamètre avec sporulation ;

3=affaiblissement entre 1 et 2,5 cm de diamètre avec sporulation ;

4=affaiblissement entre 2,5 et 4 cm de diamètre avec sporulation ;

5=fruit complètement pourri et massivement recouvert de mycélium.

L'effet de la pulvérisation des tomates par la suspension bactérienne *Bacillus* sp.4 à un volume de 5ml par blessure infectée par *B.cinerea* a montré une efficacité élevée, en effet selon l'échelle utilisée par (**Elazar et al.,1993**) le niveau de sévérité de la maladie a diminué d'un niveau par rapport au témoins négatifs. Cette efficacité est due aux divers mécanismes développés par la bactérie. Selon **Pérez-Garcia et al. (2011)**, des espèces bactériennes du genre *Bacillus* utilisant des mécanismes d'action peuvent protéger les plantes. Il y a, parmi ces espèces, des souches de *Bacillus licheniformis*, *Bacillus amyloliquefaciens* et *B. subtilis* sont capables de coloniser les racines des plantes et de produire des molécules de nature lipopeptidique qui sont les surfactines, les iturines et les fengycines. Ces bactéries peuvent soit activer les défenses des plantes, soit avoir un effet antibactérien ou antifongique direct.

De plus selon **Schrey et Tarkka. (2008)**, les *Streptomyces* peuvent moduler la défense des plantes face à des phytopathogènes en stimulant les mécanismes de défense locaux ou systémiques. La production d'oxyde par les *Streptomyces* permettrait d'activer les défenses de plantes ce qui serait un moyen supplémentaire pour protéger les plantes des organismes pathogènes. (**Kinkel et al., 2012**).

### Discussion générale

L'isolement des bactéries antagonistes a été réalisé à partir de la rhizosphère de l'ail et de l'oignon. Ce biotope a été choisi car il se caractérise par un accroissement considérable des populations microbiennes suite à l'abondance des substrats énergétiques. **Khan (1982)** et **Davet (1996)** ont rapporté que les bactéries sont plus abondantes dans la rhizosphère que dans le sol avoisinant. Dans notre étude, nous avons remarqué que la microflore rhizosphérique diffère d'une espèce végétale à une autre. La majorité des micro-organismes antagonistes sélectionnés ont été isolés de la rhizosphère de l'oignon (6 souches) et deux souches ont été isolées de la rhizosphère de l'ail. L'abondance et l'activité des micro-organismes du sol sont influencées par de nombreux facteurs, notamment les facteurs environnementaux. Cependant, la matière organique qui constitue une source de carbone pour les populations microbiennes du sol influence énormément la composition de cette microflore. D'après les travaux de **Grayston et al. (1998)**, la diversité des microorganismes rhizosphériques de différentes espèces végétales peut être due à la variation des sources de carbone exsudées par ces plantes.

Après identification des souches isolées selon les caractères morphologiques et culturels, la majorité appartient au genre *Bacillus* (6 souches) et 2 souches appartiennent respectivement aux genres *Acinetobacter* et *Pseudomonas*.

Dans le présent travail, les analyses de la variance révèlent un effet inhibiteur non significatif au seuil de 5% ( $P > 0,05$ ), les résultats montrent que les bactéries isolées ont presque la même activité antifongique contre les trois champignons testés à l'exception de *Pseudomonas* sp. et *Bacillus* sp.6, aucune ne possède une activité antifongique. Des résultats analogues ont été obtenus par **Lamari et al. (2014)** qui ont montré que des souches de *Pseudomonas* ne possèdent aucune activité antifongique vis-à-vis *Fusarium oxysporum* (**Amir, 1991**) a également constaté que 4 souches de *Pseudomonas* fluorescents ont montré une aptitude faible ou nulle sur *Fusarium oxysporum*.

La souche de *Pseudomonas* n'a pas donné des résultats attendus. Son rôle très important, dans la résistance des sols aux maladies et dans la lutte biologique, a été signalé par de nombreux auteurs. L'efficacité de ce groupe a été expliquée par la production de sidérophores, composés chélatant le fer et le rendant indisponible pour les agents pathogènes, la quel est alors inhibés, ainsi que par des composés antifongiques tels que les phénazines (**Haas et Défago, 2005; Lemanceau et al., 2009**).

## Résultats et discussion

---

Les pourcentages les plus élevés des souches *Bacillus* sp. et *Acinetobacter* ont été obtenus contre *Penicillium* sp. ont donné des résultats intéressants de  $43,53 \pm 2,95$  à  $55,29 \pm 3,12\%$ , ces résultats sont proches à ceux de **Alloue-Boraud et al. (2015)** qui ont obtenu avec *Bacillus subtilis* un pourcentage d'inhibition de la croissance de *Penicillium* sp. estimé à  $61,36\%$ . Et sont aussi cohérents à ceux obtenus par **Aouar (2012)** qui a estimé des pourcentages d'inhibition de *F. oxysporum* à  $49\%$  et  $54\%$ . Cette proportion élevée n'est pas surprenante, car **Sessitsch et al. (2004)** ont constaté que  $43\%$  des bactéries associés aux pommes de terre présentaient des activités antagonistes contre les agents pathogènes. Les souches les plus actives vis-à-vis d'*A. niger* sont *Bacillus* sp. 1, 2 et 4, leur activité antagoniste est respectivement de  $28,50 \pm 2,4\%$ ,  $30 \pm 3\%$ ,  $26,29 \pm 2,6$ . Nos résultats sont proches à ceux obtenus par **Kaïoua et Graïri (2015)** qui ont montré que des actinomycètes isolés à partir de la rhizosphère de forêt en montagne présentent une activité inhibitrice contre *A. niger* estimée à  $29,73$  à  $42,22\%$ .

**Kong et al. (2010)** ont signalé que les métabolites de *Bacillus megaterium* sont inhibitrices d'*Aspergillus flavus* sur des plaques de PDA, qui a suggéré que *B. megaterium* peut inhiber les pathogènes en raison de certains composés toxiques accumulés dans le milieu de culture ou à cause de la production d'antibiotiques. Des bacilles produisant des antibiotiques ont été utilisés comme agents de lutte biologique contre les champignons pathogènes (**Magnusson et al., 2003**). La souche *Bacillus* produit des antibiotiques importants et ils sont utilisés pour contrôler les maladies des plantes (**Souto et al., 2004**) Selon **Ongena et Jacque (2014)**, l'inhibition de la flore d'altération par *B. subtilis* proviendrait de sa capacité à produire des lipopeptides ayant des propriétés antibactériennes et antifongiques par l'éclatement de la paroi cellulaire des champignons. Une des caractéristiques principales des lipopeptides de *B. subtilis* réside dans leurs propriétés tensioactives qui s'expliquent par la diminution de la tension de surface, de la modification et la perturbation des bicouches lipidiques (**Deleu et al., 2003 ; Heerklotz et Seelig, 2007**).

*Acinetobacter* sp. provoque une forte inhibition de  $55,29\%$  de la croissance de *Penicillium* sp. et une inhibition de  $9,12\%$  de la croissance de *Botrytis cinerea*. L'activité antimicrobienne de cette bactérie était cohérente avec celle obtenue par **Toufouti (2013)** qui a montré que *Acinetobacter* inhibe le développement des microorganismes phytopathogènes et que cette bactérie pourrait faire l'objet d'une utilisation ultérieurement comme agent de lutte biologique pour protéger les plantes.

## Résultats et discussion

---

Cette inhibition des phytopathogènes est due soit à la production des antibiotiques par les antagonistes, soit à la compétition vis-à-vis des éléments nutritifs, soit à des inhibiteurs. En effet, **Vernekare *et al.* (1999)** ont découvert un inhibiteur la protéase alcaline (API) en tant que nouvelle classe de protéines antifongiques contre les champignons phytopathogène, la compétition pour le fer peut également être l'origine de l'inhibition des champignons phytopathogènes dans la rhizosphère (**Lockwood et Schippers 1978 ; Vandenberghe *et al.*, 1983**).

Le nombre de bactéries présentant une action antifongique contre *B.cinerea* est relativement faible. En effet, parmi les 8 souches bactériennes testées, seule *Bacillus* sp.4 présente une activité moyenne de  $27 \pm 3$  %. Par contre les autres souches ont montrés une aptitude faible ou nul, elles inhibent son développement dans des proportions variant de 0 à  $14,30 \pm 1,9$  %. Peu d'exemples de perte d'efficacité d'agents de lutte biologique contre *B. cinerea* ont été publiés. Les résultats obtenus par **Li et Leifert (1994)** suggèrent que *B. cinerea* est capable de développer une résistance contre la bactérie *Bacillus subtilis*. **Buck et Jeffers (2004)** ont montré que sur 29 isolats de *B. cinerea* testés, 3 isolats n'ont pas été inhibés par une levure *Rhodotorula glutinis*. des études faites par **Ajouzet *et al.* (2009)**, ont aussi montrés que *B.cinerea* développe une résistance à la pyrrolnitrin.

D'une manière générale, la résistance des champignons aux molécules fongitoxiques naturelles résulte d'une détoxification accrue de ces substances, d'une moindre pénétration intracellulaire **Duffy *et al.* (2003)**, de dégradation de l'antibiotique (**Schouten *et al.*, 2008**), ou de modifications qualitatives ou quantitatives des cibles (**Duffy *et al.*, 2003**).

L'utilisation de boîtes contenant une couche de gélose dans le fond de la boîte et une couche de gélose sur le couvercle nous a permis de mettre en évidence la production de substance volatile par les souches *Bacillus* sp.3 et 4. Le test d'ANOVA a donné une  $p$ -value  $> 0.05$ , donc statistiquement il n'existe pas de différence significative, c'est-à-dire que les deux bactéries ont le même effet sur les trois champignons en produisant les composés volatils. Seules les substances volatiles produites par la bactérie pourront dans cet essai provoquer une inhibition de la croissance du champignon. D'après les résultats qu'on a obtenus à la suite de cette expérience, Il ressort que, malgré l'absence d'un contact direct entre les champignons testés et les souches *Bacillus* sp.3 et 4, ces bactéries ont pu exercer une activité inhibitrice sur le développement des champignons phytopathogènes. Les pourcentages

## Résultats et discussion

---

d'inhibition varient de 60 à 81,36%. Ceci s'expliquerait par l'aptitude de l'antagoniste à produire des substances volatiles qui sont capables de limiter et même de stopper le développement des agents pathogènes, citons que *Bacillus* sp.4 a une forte activité inhibitrice vis à vis d'*A.niger* estimé à 81,36% par la production de composés volatiles, alors qu'en contacte directe elle présente une activité moyenne de 27%. Ces résultats sont plus importants à ceux obtenus par **Bounoua (2008)** qui a montré la capacité des bactéries de genre *Bacillus* à réduire la croissance de *F.oxysporum* par la production de composés volatiles. De même **Lounaci et Athmani-Guemouri (2014)** ont mis en évidence la production d'une substance volatile par la souche *Paenibacillus polymyxa*.

Les composés volatils tels que l'ammoniac et le cyanure d'hydrogène sont produits par un grand nombre de rhizobactéries et jouent un grand rôle dans le biocontrôle (**Brimecombe et al., 2001**). **Alabouvette et al. (1993)** ont démontré que l'efficacité d'un agent de contrôle biologique n'était pas due à un seul mécanisme mais une combinaison, de différents modes d'action.

L'effet de différentes valeurs de pH sur l'activité antifongique a été étudié sur le milieu sabouraud. Les résultats de l'analyse de la variance ne sont pas significativement différents au seuil de 5% ( $P > 0,05$ ), donc le pH n'influence pas l'activité antifongique des souches. Les deux bactéries montrent une activité contre *A.niger* et *Penicillium* sp. pour toutes les valeurs de pH. *Acinetobacter* a montré une activité plus élevée à pH=8 (40%) vis-à-vis de *A.niger*, alors qu'à pH=7 elle n'a eu aucun effet contre *A.niger*. Le pH=8 semble le pH idéal pour l'inhibition de la croissance d'*A.niger*. Cependant, cette bactérie a une activité presque identique vis-à-vis de *Penicillium* sp. pour les deux valeurs du pH (8 et 11). Quant à *Bacillus* sp.4, révèle le taux d'inhibition le plus élevé à pH=8 contre *penicillium* sp. estimé à 44,12%.

**Kaioua et Grairi (2015)** ont obtenu un pourcentage d'inhibition de 50% et de 63% en testant l'activité antifongique des actinomycètes contre *A.niger* et *F.oxysporum* sur le milieu Bennett à pH=8, la différence entre les pourcentages d'inhibition suggère que la composition des milieux utilisés n'est pas la même, mais aussi que les souches sont taxonomiquement différentes.

Notre étude *in vitro* a été complétée par une étude *in vivo* sur des tomates, on a choisi pour cette étude la bactérie *Bacillus* sp.4 qui a présenté la plus grande efficacité contre *B.cinerea*.

## Résultats et discussion

---

L'effet de l'application exogène de la bactérie *Bacillus* sp.4 par blessure infectée par *B.cinerea* a montré un résultat prometteur. En effet selon l'échelle utilisée par **Elazar et al. (1993)**, le degré de sévérité de la maladie a diminué d'un niveau par rapport aux témoins négatifs, ce résultat est conforme avec celui obtenu par (**Alloue-Boraudet et al.,2015**) qui ont montré la capacité de *Bacillus subtilis* à protéger des fruits de mangues par l'inhibition de la croissance des champignons inoculé sur des fruits sains. Des résultats similaires ont été retrouvés par (**Ismaël. Kebeet et al., 2009**). Cette étude est réalisée *in vivo* sur des disques de feuilles de cacaoyer. Le test consiste à mesurer la sensibilité foliaire à *Phytophthorapalmivora* selon une échelle qui varie de 0 à 5 décrite par (**Nyasse et al., 1995**) en présence du microorganisme. Les effets les plus significatifs ont été enregistrés avec les souches bactériennes appartenant au genre *Bacillus*. Des résultats analogues ont été obtenus par (**Maurhofer et al., 1994**) sur le tabac, (**Duijff et al.,1997**) sur la tomate et (**Chen et al.,1998**) sur le concombre. L'efficacité des souches bactérienne appartenant au genre *Bacillus*, fait de ces dernières des candidats potentiels à la lutte biologique. Elles sont dotées d'une aptitude à sporuler, ce qui pourrait présager une bonne aptitude à la dissémination dans le cadre d'un programme de lutte biologique.

Une étude menée par **Adam (2008)** confirme aussi nos résultats. Elle consiste à vérifier l'effet protecteur *in vivo* des *Bacillus subtilis* vivantes sur des plants de tomate cultivés en terreau, contre *Botrytis cinerea*. Les expériences d'infection de tomate ont été effectuées sur les feuilles détachées. L'incidence de la maladie a été ainsi évaluée en termes de pourcentage des lésions de *B.cinerea* qui se sont clairement développées hors zone d'inoculation pour produire les lésions brunâtres s'étendant rapidement. Sur la base des résultats de quatre expériences indépendantes, ils ont observé une réduction de la maladie significative chez les plantes traitées avec *B. subtilis*BC21,BC25 et BC27 avec une moyenne de 36%, 43% et 26% respectivement en comparant avec les plants témoins.

Plusieurs espèces de *Bacillus* sont fréquemment utilisées comme agents de biocontrôle, surtout puisque elles secrètent des enzymes hydrolytiques capables de dégrader la paroi cellulaire. **Cherninet al. (2002)** ;**Alkhatib et al. (2010)** ont signalé que *B.megaterium* inhibe efficacement la croissance des champignons de *Cyloconiumoleaginum* et de *Rhizoctoniasolanis* sur les plants de soja en raison de la concurrence pour l'espace et nutriments.

## Résultats et discussion

---

Les résultats de ce travail apportent de forte présomptions, à partir des essais *in vitro* et *invivo*. Ils peuvent être utilisés pour renforcer les moyens de lutte contre les champignons phytopathogènes, et incitent à poursuivre cette étude par la recherche d'autres microorganismes antagonistes.

# CONCLUSION

Notre étude nous a permis d'isoler des bactéries à partir des sols rhizosphériques de l'oignon et de l'ail, antagonistes aux champignons phytopathogènes, *A.niger*, *Botrytis cinerea* et *Penicillium* sp. Nous avons identifié 8 souches dont 6 souches appartiennent au genre *Bacillus* et 2 souches aux genres *Pseudomonas* et *Acinetobacter*.

L'effet de l'activité antagoniste des isolats contre les 3 champignons phytopathogènes a été étudié selon la méthode de confrontation directe et la méthode indirecte pour 2 souches, *Bacillus* sp.3 et 4.

Sur les huit isolats, 6 inhibent au moins un des trois champignons. Les résultats de la confrontation directe montrent un pourcentage d'inhibition varie de 5,98 % à 55,29% selon les espèces pathogènes et antagonistes testées, il en est ressorti que la méthode la plus efficace pour *Bacillus* sp.4 sur la croissance des champignons était la méthode indirecte par l'action des composés volatiles avec un taux d'inhibition de 69,21% de la croissance *Penicillium* sp. et 81,36% de la croissance de *B.cinerea*. Cependant, la confrontation directe de *Bacillus* sp.3 et *A.niger* n'a donné aucun effet inhibiteur, par contre l'action des composés volatiles sur le champignon a empêché sa croissance avec un taux d'inhibition de 60%. Nous avons choisi à la lumière de ces résultats un meilleur antagoniste vis-à-vis de *B.cinerea*, pour les essais sur les fruits de tomate. Les résultats des essais *in vivo* ont montré des résultats encourageant de suppression de la croissance de *B.cinerea* sur des tomates pendant l'entreposage.

Les essais effectués *in vivo* et *in vitro* nous ont permis de mettre en évidence des effets antagonistes de quelques souches. Les tests que nous avons développés peuvent servir de base à la mise en évidence de propriétés antibiotiques des *Bacillus* et d'*Acinetobacter*, Ces résultats confirment l'importance des métabolites secondaires produites par ces souches dans l'amélioration de la croissance des plantes et le contrôle des pathogènes fongiques.

L'utilisation de ces microorganismes constitue une alternative biologique à l'emploi d'intrants chimiques, essentielle à une agriculture durable dans un souci de protection de l'environnement.

En perspectives pour cette étude, il est recommandé :

- ✓ De compléter l'identification des souches jusqu'au niveau de l'espèce par les caractéristiques chimiotaxonomiques et moléculaires plus approfondies ;
- ✓ Purifier les molécules antifongiques produites par ces isolats et déterminer leur structure,
- ✓ D'élucider les mécanismes par lesquels les PGPR stimulent la croissance et protègent les

Plantes : production de phytohormones, production de sidérophores, solubilisation du phosphate, induction du système de la résistance de la plante.

- ✓ Afin d'améliorer les niveaux de protection par un agent de biocontrôle, une stratégie consiste à combiner plusieurs micro-organismes. Les combinaisons peuvent être faites en associant, soit des souches de la même espèce, soit de plusieurs espèces différentes ;
- ✓ Evaluer l'efficacité de ces agents de lutte biologique potentiels sur une grande échelle (en serre puis en champ).

RÉFÉRENCES

BIBLIOGRAPHIQUES

## Références bibliographiques

---

**Adam A. (2008).** Elicitation de la résistance systémique induite chez la tomate et le concombre et activation de la voie de la lipoxygénase par des rhizobactéries non-pathogènes, Thèse de Doctorat, Université de Liège, Belgique.

**Agbessi S. (2002).** Caractérisation moléculaire et pouvoir antagoniste de souches des Melanosporofaciens, agents potentiels de lutte biologique contre des agents phytopathogènes. Thèse de Doctorat. Université de Sherbrook, Canada.

**Ahmed O.H., Aminuddin H., Husni M.H.A. (2008).** Ammonia volatilization and ammonium accumulation from urea mixed with zeolite and triple superphosphate. *Acta Agriculturae Scandinavica*. 58: 182-186.

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

**Ajouz S., Nicot, P.C. and Bardin, M. (2009).** Adaptation to pyrrolnitrin in *Botrytis cinerea* and cost of resistance. *Plant Pathology*. INRA.

**Alabouvette C., Rouxel F., Louvet J. (1980).** Recherche sur la résistance des sols aux maladies. VII. Etude comparative de la germination des chlamydospores de *Fusarium oxysporum* et *Fusarium solani* au contact de sol résistant et sensible aux fusarioses vasculaires. *Annales de phytopathologie*, 12: 21-30.

**Albuquerque C.C., Camara T.R., Marian R.D., Willadino L., Marcellino C., Ulisses C. (2006).** Antimicrobial action of the essential oil of *Lippia gracilis* Schauer. *Brazilian Archives of Biologie Archives of Biologie and Technology*. 49: 527-535.

**Alexopoulos C.J., Mims C.W. (1979).** *Introductory mycology*. Third edition. John Wiley & Sons, New-York, Chichester, Brisbane, Toronto.

**Alkhatib M., Alhussaen K., ElBanna N., Zyadeh M. (2010).** Biological control of olive leaf spot (peacock spot disease) caused by *Cycloconium moleaginum*. *Journal of Microbiology and Antimicrobials*. 2: 64-67.

**Alloue-Boraud, W.A. Mireille., Louis Ban Koffi., Dadie A., Thomas Dje K., Marcellin Ongena Marc. (2015).** Utilisation de *Bacillus subtilis* GA1 pour la lutte contre les germes d'altération de la mangue en Côte D'ivoire. *Journal of Animal and Plant Sciences*. 3: 3954-3965.

## Références bibliographiques

---

- Amir A. (1991).** Rôle des facteurs biotiques et abiotiques dans le déterminisme de la réceptivité de quelques sols de palmeraies algériennes aux fusarioses vasculaires. Thèse de Doctorat, USTHB, Alger, 129 p.
- Angélique B. (2011).** Molécules antifongiques et activité antagoniste de deux souches de *Pseudomonas* envers *Helminthosporium solani*, agent responsable de la tache argentée de la pomme de terre. Mémoire de maîtrise. Université Laval. Québec.
- Antoun H., Bordeleau L. M. and Gagnon C. (1980).** Identification d'un isolat d'actinomycète par la caractérisation partielle d'un antibiotique qu'il produit. *Phytoprotection*. 61: 79-87.
- Aouar L. (2012).** Isolement et identification des actinomycètes antagonistes des microorganismes phytopathogènes, Thèse de Doctorat. Université Mentouri-Constantine., Constantine, Algérie.
- Arima K., Imanaka H., Kousaka M., Fukuda, A., Tamura, G.(1965).** Studies on pyrrolnitrin, a new antibiotic. Isolation and properties of pyrrolnitrin. *Journal of Antibiotics*. 18: 201-204.
- Bain L.J et Leblanc G.A. (1996).** Interaction of structurally diverse pesticides with the human *MDRI* gene product p-glycoprotein. *Toxicology and Applied Pharmacology*. 141:288-298.
- Beauchamp C. J. (1993).** Mode d'action des rhizobactéries favorisant la croissance des plantes et potentiel de leur utilisation comme agent de lutte biologique. *Phytoprotection*. 74: 19-27.
- Beever R.E., Weeds P.L. (2004).** Taxonomic and genetic variation of *Botrytis* and *Botryotinia*. In *Botrytis: Biology, pathology and control*, edited by Y. Elad, B. Williamson, P. Tudzynski and N. Delen. Dordrecht, the Netherlands: Kluwer Academic Publisher.
- Benítez T., Rincón A.M., Limón M.C., Codón A.C. (2004).** Biocontrol mechanisms of *Trichoderma* strains. *International Microbiology*. 7:249-260.
- Blancard D., Laterrot H., Marchoux G., Candresse T. (2009).** Les maladies de la tomate. ed. INRA.
- Bojanowski A. (2011).** Molécules antifongiques et activité antagoniste de deux souches de *Pseudomonas* envers *Helminthosporium solani*, agent responsable de la tache argentée de la pomme de terre. Mémoire de maîtrise. Université Laval. Québec
- Botton ; Breton A ; Fevre M ; Guy P.H ; Larpeni J ; Veau P. (1990).** Moisissures utiles et nuisibles importance industrielle. 2<sup>e</sup> Edition Massan, Paris.

## Références bibliographiques

---

- Bounoua Mohammed Djellel. (2008).** Essais d'utilisation des *Pseudomonas* sp. et *Bacillus* sp. Dans le biocontrôle de *Fusarium oxysporum*. sp. lycopersici sur tomate et *Verticilliumdahliae* sur l'olivier. Mémoire de Magister. Université d'ORAN, Algérie.
- Bourgeois C.M., Mescle J.F., Zucca J. (1989).** Microbiologie alimentaire. Aspect microbiologique de la sécurité et de la qualité des aliments. Lavoisier. Paris. P. 216-244.
- Bower L.A. et Coffey M.D. (1985).** Development of tolerance to phosphorus acid, fosetyl-Al, and metalaxyl in *phytophthora capici*. *Canadian Journal of Pathology*. 7:1-6.
- Brahim S. (1998).** Isolement à partir de la rhizosphère des conifères de bactéries et d'actinomycètes antagonistes aux champignons phytopathogènes. Mémoire de maîtrise. Faculté des sciences de l'agriculture et de l'alimentation. Université Laval, Québec.
- Brimecombe M.J., Eliej D., Lynch, J. M.(2001).** The effect of root exudates on rhizosphere microbial populations. In: Pinton, R., Varanini., Nannipieri, P. Ed. The rhizosphere. Mecel Dekker, New York.
- Buck J.W., Jeffers S.N.(2004).** Effect of pathogen aggressiveness and vinclozolin on efficacy of *Rhodotorulaglutinis* PM4 against *Botrytis cinerea* on geranium leaf disks and seedlings. *Plant Disease*. 88: 1262-1268.
- Bunster L., Fokkema N.J., Schippers B. (1989.)** Effect of surface-active *Pseudomonas* spp. on leaf wettability. *Applied and Environmental Microbiology*. 55: 1340-1345.
- Cahagnier B., Dragacc S., Frayssinet C., Frémy J.M., Hennebert G.L., Lesage-meessen L., Multon J.L., Richard-Molard D., Roquebert, M.F. (1998).** Moisissures des aliments peu hydratés. Lavoisier Tec&Doc, France.
- Campbell R., Greaves M. P. (1990).** Anatomy and community structure of the rhizosphere. In: the rhizosphere. Lynch I. M. (Eds). *Wiley Series in Ecological and Applied Microbiology*. 11-34.
- Carbonell E., Xamena.N., Creus A., Marcos R.(1995).** Chromosomal aberration and sister-chromatid exchanges as biomarkers of exposure to pesticides. *Clinical chemistry*. 41 :1917-1919.
- Cavaglieri L., Orlando J., Rodriguez M.I., Chulze S., Etcheverry M. (2005).** Biocontrol of *Bacillus subtilis* against *Fusarium verticillioides* *in vitro* and at the maize root level. *Research in microbiology*. 156 : 748-754

## Références bibliographiques

---

- Chen C, Bélanger R.R., Benhamou N., Paulitz T.C. (1998).** Induced systemic resistance (ISR) by *Pseudomonas* spp. Impairs pre-and postinfection development of *Pythium aphanidermatum* on cucumber roots. *European Journal of Plant Pathology*. 104:877-886.
- Chernin L., Chet I. (2002).** Microbial enzymes in biocontrol of plant pathogens and pests in *Enzymes in the Environment: Activity, Ecology, and Applications*. 171–225.
- Claude D. (1990).** Manuel de phytopathologie maraichère tropicale. Eds. ORSTOM. Paris. p68 p69.
- Cook R., Baker K. (1974).** Biological control of plant pathogens. Freeman, San Francisco, CA, USA. 380 pages
- Corbaz R. (1990).** Principe de phytopathologie et de lutte contre les maladies des plantes. Presse polytechniques et universitaires romandes.
- Curl E A., Truelove B. (1986).** The rhizosphere, Advanced series in agriculture sciences. Springer-Verlag Berlin Heidelberg. 288.
- Davet P. (1996).** Vie microbienne du sol et production végétale. INRA. Paris. P. 52-57.
- Davidse L.C., Looijen D., Turkensteen L.J., Van Der Wal D.(1981).** Occurrence of metalaxyl-resistant strains of *phytophthora infestans* in Dutch potato fields. *Netherlands Journal Plant Pathology*. 87:65-68.
- Decoin M., Whipps J.M., Nicot P., Gullino M.L., Spadaro, D. (2002).** Micro-organismes contre agents pathogènes. *Phytoma-La Défense des Végétaux*. 549: 32-36.
- Delarras, C. (2007).** Microbiologie pratique pour le laboratoire d'Analyse ou de contrôle sanitaire. Ed, Lavoisier, Paris.
- Deleu M., Bouffieux O., Razafindralambo H., Paquot M., Hbid C., Thonart P. (2003).** Interaction of surfactin with membranes: a computational approach. *Langmuir*. 19: 3377-3385.
- Delp C.J. (1980).** Coping with resistance to plant disease control agent, *plant Disease*. 64:652-667.
- Dobbelaere S.J; Vanderleyden; Okon Y., (2003).** Plant growthpromoting effects of diazotrophs in the rhizosphere. *Critical Reviews in Plant Sciences*. 22: 107-149
- Dolan T.E, offey., M.D. (1985).** *In vitro* assessment of *phytophthora palmivora* strains resistant to phosphorous acid. *Phytopathology* . 75:1330(Abstract)
- Dommergues Y., F.Mangenot. (1970).** Ecologie Microbienne du sol. Eds. Masson et Cie, Paris, 796 p.

## Références bibliographiques

---

- Dowley L.J., O'sullivan E.(1981).** Metalaxyl-resistant strains of *Phytophthora infestans* (Mont.) de Bary in Ireland. *Potato Res.*24:417-421.
- Duffy B., Schouten A., and Raaijmakers J.M.( 2003).** Pathogen self-defense: mechanisms to counteract microbial antagonism. *Annual Review of Phytopathology.* 41: 501-538.
- Duijff B.J.,Gianinazzi-Pearson V., Lemanceau P.(1997).** Involvement of the outer membrane lipopolysaccharides in the endophytic colonization of tomato roots by biocontrol *Pseudomonas fluorescens* strain WCS417r. *New Phytologist*135: 325-334.
- Edwards, S.G., and Seddon, B. (2001).** Mode of antagonism of *Brevibacillus brevis* against *Botrytis cinerea* in vitro. *Journal of Applied Microbiology.* 91: 652-659.
- Elad Y., Evensen. K. (1995).** Physiological aspects of resistance of *Botrytis cinerea*. *Phytopathology*, 1995, 85:637-643
- Elazar F., Klein J., Grimberg S., Lomaniec E. Lurie S., Lalzar A. (1993).** Effect of postharvest heat treatment of tomatoes on fruit ripening and decay caused by *Botrytis cinerea*. Departement of Fruit and Vegetable Storage.
- El-Banna N.,Winkelmann, G. (1998).** Pyrrolnitrin from *Burkholderiacepacia*: antibiotic activity against fungi and novel activities against streptomycetes. *Journal of Applied Microbiology.* 85: 69-78.
- El Hadrami I., Bellaj M., Idrissi A., J'Aiti F., Jaafari S., Daayf F. (1998).** Biotechnologie végétales et amelioration du palmier dattier (*Phoenix dactilifera* L.), pivot de l'agriculture oasienne marocaine. *Cahiers Agriculture.* 7 (6): 463-468.
- El-Tarabily K.A., Hardy G.E.St.J., Sivasithamparam K., Hussain A.M., Kurtboke D.I. (1997).** The potential for the biological cavity-spot disease of carrot, caused by *Pythiumcoloratum*, by Streptomycetes and non-Streptomycetesactinomycetes. *New Phytologist.* 137: 495-507.
- Errakhi R. (2008).** Contribution d'actinomycètes (Actinobactéries) à la lutte biologique contre *Sclerotiumrolfsii* et rôle de l'acide oxalique dans l'induction des mécanismes de défense. Thèse de Doctorat. Université Cadi Ayyad, Marrakech Maroc.
- Erwin D.C., Ribeiro O.K. *Phytophthora. Diseases worldwide.* (1996).** APS Press. *The American phytopathological Society.* St Paul, Minnesota.
- Fenn M.E., Coffey M.D. (1985).** Further evidence for the direct mode of action of fosetyl-Al and phosphorous acid. *Phytopathology.* 75:1064-1068.

## Références bibliographiques

---

**Fernando W., Nakkeeran, S., Zhang Y. (2006).** Biosynthesis of antibiotics by PGPR and its relation in biocontrol of plant diseases. Dans: PGPR: Biocontrol and Biofertilization (Siddiqui, Z.A.), Springer, Dordrecht, The Netherlands. 67-109

**Frankenberger W.T., Arshad M. (1991).** Microbial production of plant growth regulating substances in soil. *In: Plant growth-promoting rhizobacteria- progress and prospects.* Keel C., Koller B. and Défago V. (Eds).

**Fravel D. R. (2005).** Commercialization and implementation of biocontrol. *Annual Review of Phytopathology* 43: 337-359.

**Fraval A., Silvy C. (1999).** La lutte biologique. Dossiers de l'Environnement de l'INRA n°19, Paris, 274 p.

**Gagné S., Antoun H., Richard C. (1985).** Inhibition of phytopathogenic fungi by bacteria from soils and legume rhizosphere. *Canadian Journal of Microbiology.* 31:856-860.

**Ghorri S. (2015).** Isolement des microorganismes possédant une activité anti- *Fusarium* thèse de doctorat. Université frères Mentouri. Constantine.

**Grayston S., Wang S., Campbell C.D., Edwards A.C. (1998).** Selective influence of plant species on microbial diversity in the rhizosphere. *Soil Biology and Biochemistry Journal.* 30 : 369- 378

**Guiraud J.P. (2003).** Microbiologie alimentaire. Ed, Dunod, Paris.

**Groves, J.W., Loveland C.A. (1953).** The connection between *Botryotinia fuckeliana* and *Botrytis cinerea*. *Mycologia*(45):415-425.

**Haas D., Défago G (2005).** Biological control of soil-borne pathogens by fluorescent pseudomonads. *Nature Reviews Microbiology.* 3: 307-319.

**Haas D., and Keel, C. (2003).** Regulation of antibiotic production in root-colonizing. *Annual Review of Phytopathology.* 41: 117-53.

**Haggag W.M. ( 2008).** Isolation of bioactive antibiotic peptides from *Bacillus brevis* and *Bacillus polymyxa* against *Botrytis* grey mould in strawberry. *Archives of Phytopathology and Plant Protection.* 41: 477-491.

**Hammer P.E., Hill D.S., Lam S.T., Van Pee K.H., Ligon, J.M. (1997).** Four genes from *Pseudomonas fluorescens* that encode the biosynthesis of pyrrolnitrin. *Applied and Environmental Microbiology.* 63: 2147-2154.

**Heerklotz H., Seelig J. (2007).** Leakage and lysis of lipid membranes induced by the lipopeptide surfactin. *European Biophysics Journal.* 36(5):305-314.

## Références bibliographiques

---

- Hunger R.M., Hamm P.B., Horner C.E., Hansen E.M. (1982).** Tolerance of *Phytophthora megasperma* isolates to metalaxyl, *Plant Disease*.66645-649.
- Ismaël B. Kebe, Joseph Mpika., Kouamé F., N'guessanl.,Prakash K. Hebbar., Gary S. Samuels.(2009).**Isolement et identification de microorganismes indigènes de cacaoyères en Côte d'Ivoire et mise en évidence de leurs effets antagonistes vis-à-vis de *Phytophthora palmivora*, agent de la pourriture brune des cabosses. Thèse de Doctorat. Université de Cocody, UFR Biosciences, Côte d'Ivoire.
- Jacque G et Hérisssé J.M. (1999).**fertilité des sols : les produits biologiques : bien les connaître pour mieux les utiliser. Biophyt sa. Paris.
- Jijakly M.H. (2003).** La lutte biologique en phytopathologie, *In: Phytopathology*. Lepoivre P.(Eds). De Boeck, Bruxelles.
- Joffin J. N., Leyral G. (2006).** Microbiologie technique, Tom1 : Dictionnaire des techniques. Edition CRDP d'aquitaine. 368p
- Kaioua A., Grairi I. (2015).** Solubilisation du phosphate, production de sidérophores et activité antifongique de souches d'actinomycètes et du genre *Pseudomonas* isolées des sols rhizosphériques. Mémoire Master. Université des Frères Mentouri Constantine, Algérie.
- Kempe J., Sequeira L. (1983).** Biological control of bacterial wilt of potatoes: Attempts to induce resistance by treating tubers with bacteria. *Plant Disease*.67:499-501.
- Khan Mohamed Z. (1982).** Physiological and antagonistic activities of Streptomycetes in rhizosphere of some plants. *Egypt. Journal of Phytopathology*. 14 :121-128.
- Kinkel L.L, Schlatter D.C, Bakker M.G, Arenz B.E. (2012).** Streptomyces competition and co-evolution in relation to plant disease suppression. *Research in Microbiology*. 163:490–499.
- Kloepper J.W., Lifchitz R., Zablutowicss R.M. (1989).** Free-living bacterial inocula for enhancing crop productivity. *Trends in Biotechnology*. 7:39-44.
- Koller W., Scheinpflug H.,Fungal.(1987).** resistance to sterol biosynthesis inhibitors:a new challenge,*plant Disease*.711066-291.
- Kong Q., Shan S., Liu Q., Wang X., Yu F. (2010).** *International Journal of Food Microbiol*.139: 31–35.
- Lamari L., Bouras N., Boudjellah H., Ould El Hadj-Khelil A., Ould El Hadj M. D., Sabaou N.(2014).** Influence de quelques souches bactériennes d'origine saharienne sur l'expression de la fusariose du lin et du palmier dattier. *Algerian journal of arid environment*. 4:19-30.

## Références bibliographiques

---

- Lebuhn M., Heulin T., Hartmann A. (1997).** Production of auxine and other indolic and phenolic compounds by *Paenibacilluspolymyxa* strains isolated from different proximity to plant roots. *FEMS Microbiology Ecology*.22: 325-334.
- Lemanceau P., Expert D., Gaymard F., Bakker P. A. H. M., Briat J. F.( 2009).** Role of iron in plant–microbe interactions.*Advances in Botanical Research*. 51: 491-549.
- Lockwoodj L., Schippers B. (1978).** Evaluation of siderophores as a factor in soil mycostasis. *Trans. Br. Mycol. Soc.* 82: 589-594. MCKEAGUEJ, .A. (Editeur). 1978. Manuel de méthodes d'échantillonnage et d'analyse des sols. Société canadienne de la science du sol.
- Loper J.E., Henkels M.D. (1999).** Utilization of heterologous siderophore senchances levels of iron available to *Pseudomonas putida* in the rhizosphere. *Applied and Environmental Microbiology*. 65 : 5357-5363.
- Lepoivre P. (2003).** Les bactéries phytopathogènes, In : *Phytopathology*. Lepoivre P. (Eds). De Boeck, Bruxelles.
- Lesuffleur F. (2007).** Rhizodéposition à court terme de l'azote et exsudation racinaire des acides aminés par le trèfle blanc (*Trifolium repens* L.). Thèse de doctorat. Institut de biologie fondamentale et appliquée (IBFA). Université de CAEN, France.
- Leveau S. B., Bouix M. (1993).** Les microorganismes d'intérêt industriel. Lavoisier Apria. 110-163.
- Li H., Leifert C. (1994).** Development of resistance in *Botryotiniafuckeliana* (de Barry) Whetzel against the biological control agent *Bacillus subtilis*CL27. *Zeitschriftfür Pflanzenkrankheiten und Pflanzenschutz*. 101: 414-418.
- Lounaci L ; Athmani-Guemouri S.(2014).** Action de *Paenibacilluspolymyxa*SGK2 sur quelques champignons de la fusariose du blé dur (*Triticumdurum*) en Algérie. *Algerian Journal of Natural Products*. 2: 35-42
- Magnusson J., Stron K.,Rooa R., Sjogren J., Schniirer J.(2003)** Broad and complex antifungal activity among environmental isolates of lactic acid bacteria.. *FEMS Microbiology Letters*. 219:129-135.
- Marchal N., Bourdon J.L. (1982).** Les milieux de culture pour isolement et identification biochimique des bactéries. DOIN éditeur, Paris, 442p.
- Marsh R.W. (1977).**Systemic fungicides, 2<sup>nd</sup>ed., Ed. longman, Londres, New York,401p.

## Références bibliographiques

---

- Maurhofer M., Hase C., Meuwly P.H., Métraux J.P., Défago G. (1994).** Induction of systemic resistance of tobacco to tobacco necrosis virus by the root colonizing *Pseudomonas fluorescens* strain CHAO: influence of the *gac A* gene and of pyoverdine production. *Phytopathology*. 84: 139-146.
- Mezaache S. (2012).** Localisation des déterminants de la suppression de quelques souches de *Pseudomonas* de la rhizosphère de la pomme de terre. Thèse de doctorat. Université Ferhat Abbas, Sétif.
- Moenne-locco., Powell J., Higgins P., McCarthy J., O’Gara F. (1998).** An investigation of the impact of biocontrol *Pseudomonas fluorescens* F113 on the growth of sugar beet and the performance of subsequent clover- *Rhizobium* symbiosis. *Applied Soil Ecology*. 7:225-237.
- Montesinos E., Bonaterra A., Moselio S.( 2009).** Pesticides, microbial, p. 110-120, in: Encyclopedia of microbiology. Academic Press, Oxford, UK.
- Mouden N., Benkirane R., Ouazzani. A., Douira T.A. (2013).** Microflore de quelques variétés du fraiser (*Fragariaananassa* L) cultivées en Maroc. *Journal of Applied Biosciences*. 61: 4490 – 4514.
- Nasraoui B. and Lepoivre R. (2003).** Les champignons phytopathogènes. In :*Phytopathol.* Lepoivre P. (Eds). De Boeck, Bruxelles
- Nicklin J., Graeme-Cook K., Paget T., Killington R. (2000).** L’essentiel en microbiologie. Berti. Paris. P. 210-216.
- Nyassé S., Cilas C., Hérail C., Blaha G. (1995).** Leaf inoculation as an early screening test for cocoa (*Theobroma cacao* L.) resistance to *Phytophthora* black pod disease. *Crop Protection* 14: 57-663.
- Ongena M. Jacques P. (2008).** *Bacillus* lipopeptides: versatile weapons for plant disease biocontrol. *Trends in Microbiology*. 16:115–125
- O’sullivan D.J., O’gara F. (1992).** Traits of fluorescent *Pseudomonas* spp. involved in suppression of plant root pathogens. *Microbiology Review*. 56: 662-676.
- Patel J. J., Brown M.E. (1969).** Interactions of *Azotobacter* with rhizosphere and root-surface microflora. *Plant Soil*. 31: 273-281.
- Paul R., Impens P. (2003).** Les maladies non parasitaires. In: *Phytopathology*. Lepoivre P. (Eds). De Boeck, Bruxelles.
- Pérez-García A., Romero D. de Vicente A. (2011).** Plant protection and growth stimulation by microorganisms: biotechnological applications of *Bacilli* in agriculture. *Curr. Opin. Biotechnol.* 22 :187-193.

## Références bibliographiques

---

- Pitt J.I. (1979)** The genus *Penicillium* and its teleomorphic states *Eupenicillium* and *Talaromyces*. Academic press, London, New-York, Toronto, Sydney, San Francisco.
- Pseudomonas* spp. and relevance for biological control of plant disease. *Annual Review of Phytopathology*. 41: 117-153.
- Quatresous N. (2011)**. Aspergillose humaine. Épidémiologie, diagnostic biologique, contrôle. Thèse de Doctorat, Université de Limoges, Limoges.
- Raaijmakers J.M., Vlami, M. Souza, J.T. (2002)**. Antibiotic production by bacterial biocontrol agents. *Antonie van Leeuwenhoek*. 81(1-4):537-547
- Ribas G., Carbonelle., Creus A., Xamena N., Marcos R. (1997)**. Genotoxicity of humic acid in cultured human lymphocytes and its interaction with the herbicides alachlor and meclozpridazine. *Environmental and Molecular Mutagenesis*. 29 :272-276.
- Rocher F. (2004)**. Lutte chimique contre les champignons pathogènes des plantes : évaluation de la systémie phloémienne de nouvelles molécules à effet fongicide et d'activateurs de réactions de défense. Thèse de Doctorat, université de Poitiers, France.
- Roger D. (2008)**. Les plantes agricoles et leurs maladies. Eds. Berger .Canada.369-409
- Roquebert M.F. (1998)**. Moisissures des aliments peu hydratés. *Lavoisier Tec&Doc*, France.
- Sabaou N., Boudjella H., Bennadji A., Mostefaoui A., Zitouni A., Lamari L. (1998)**. Les sols du Sahara algérien, source d'actinomycètes rares producteurs d'antibiotiques. *Sécheresse*. 9: 147-153.
- Semal J., Lepoivre P. (2003)**. Les maladies des plantes: concepts généraux. In: *Phytopathology*. Lepoivre P. (Eds). De Boeck, Bruxelles.
- Sessitsch A., Reiter B., Berg G. (2004)**. Endophytic bacterial communities of field-grown potato plants and their plant-growth-promoting and antagonistic abilities. *Canadian Journal of Microbiology*. 50: 239-249.
- Schrey S.D, Tarkka M.T.(2008)**. Friends and foes: streptomycetes as modulators of plant disease and symbiosis. *Antonie Van Leeuwenhoek* 94:11–19.
- Schouten A., Maksimova O., Cuesta-Arenas Y., van den Berg G., Raaijmakers J.M. (2008)**. Involvement of the ABC transporter BcAtrB and the laccase BcLCC2 in defence of *Botrytis cinerea* against the broad-spectrum antibiotic 2,4- diacetylphloroglucinol. *Environmental Microbiology*. 10: 1145-1157.
- Singleton P. (1999)**. Bactériologie. Edition Dunod, Paris, 415p.
- Singleton P. (2005)**. Bactériologie: Pour la médecine, la biologie et les biotechnologies. 6<sup>ème</sup> édition. Dunod- Paris, p.480-490.

## Références bibliographiques

---

- Sobti S. (2013).** Isolement des bactéries telluriques résistantes aux effets de salinité. Mémoire Master. UNIVERSITE KASDI MERBAH, OUARGLA.
- Souto G.I., Correa O.S., Montecchia M. S. (2004).** Genetic and functional characterization of a *Bacillus* sp. strain excreting surfactin and antifungal metabolites partially identified as iturin-like compounds. *Journal of Applied Microbiology*. 97:1247–1256.
- Staub T., Sozzi D. (1981).** Résistance au métalaxyl et les conséquences pour son utilisation. *phytiarie phytopharmacie*.30283-291.
- Subramanian C.V (1983).** Hyphomycetes : Taxonomy and Biology. *Academic Press Inc.* 179-409.
- Thakore Y. (2006).** The biopesticide market for global agricultural use. *Industrial Biotechnology*. 2: 194-208.
- Tomlin C.D.S. (2000).** The pesticide manual, 12th edition, British Crop Protection Council, Farnham, UK.
- Tortora G.J., Fuke B.R., Case C.L. (2003).** Introduction à la microbiologie. Ed. de Renouveau pédagogique Inc. p : 157-335
- Toufouti Z. H. (2013).** Contribution à l'étude des maladies bactériennes de la tomate (*Lycopersicon esculentum* Mill) cultivée en serres dans l'Est Algérien. Mémoire de Magister Université Constantine, Algérie.
- Toussaint V. (1996).** Caractérisation d'un antibiotique produit par la souche d'actinomycète EF-76 antagoniste à *Phytophthora Fragariae* var. *rubica* causant le pourridié des racines du framboisier. Mémoire de Maitrise ès science. Université de Sherbrooke, Québec, Canada.
- Valueva T.A., Mosolov V.V. (2004).** Role of inhibitors of proteolytic enzymes in plant defense against phytopathogenic microorganisms. *Biochemistry*. 69: 1305-1309.
- Vandenbergh A., Gonzalezac F., Wright M., Kunka B.S. (1983).** Iron-chelating compounds produced by soil pseudomonads: correlation with fungal growth inhibition. *Applied and Environmental Microbiology*. 46: 128- 132.
- Vegh I., Baillot. F., J.roy. (1977).** Etude de l'activité de l'éthylphosphite d'aluminium (LS 74.783) vis-à-vis de *phytophthora cinnamomi* Rands, agent du l'épérissement des arbustes d'ornement. *phytiarie phytopharmacie*.26 :85-95.
- Vernekar J.V., M.S. Ghatge, and V.V. Deshpande. (1999).** Alkaline protease inhibitor: a novel class of antifungal proteins against phytopathogenic fungi. 262: 702-707.
- Weller D.M. (1988).** Biological control of soilborne plant pathogens in the rhizosphere with Bacteria, *Annual Review of Phytopathology*. 26: 379–407.

## Références bibliographiques

---

**Westover K.M., Kennedy A.C., Kelley S.E. (1997).** Patterns of rhizosphere microbial community structure associated with Co-occurring plant species. *Journal of Ecology*. 85: 563-873.

**Whetzel H.H. (1945).** A synopsis of the genera and species of the *Sclerotinaiceae*, a family of stromaticino perculated iscomycetes. *Mycologia*37: 648-714.

**Whipps J. M. (1990).** Carbon economy *in* the rhizosphere. *In*: Ecological and applied microbiology. Lynch J.M. (Eds). Wiley Series. 59-97.

**Wingfield M.J., De Beer Z.W., Slippers. b, B., Wingfield Z., Groenewald J Z., Lombard L., Crous P.W. (2012).** One fungus, one name promotes progressive plant pathology. *Molecular Plant Pathology* 13:604-613.

**Wipps J.M. (2001).** Microbial interactions and biocontrol in the rhizosphere. *Journal of Experimental Botany*. 52: 487-511.

# ANNEXES

## Annexe 1

### Composition des solutions et milieux de culture utilisés

- **Eau physiologique stérile** (composition en g/l)

Chlorure de sodium (NaCl) .....9 g.  
Eau distillée .....1000 ml.  
pH = 7.  
Stérilisation à 120 °C/15 min.

- **Gélose nutritive** (composition en g/l).Extrait de viande 1,0g

Extrait de levure .....2,0 g  
Peptone ..... 5,0 g  
Chlorure de sodium .....5,0 g  
Agar .....15,0 g  
Eau distillée .....1000 ml  
pH =7,4

- **Gélose Mueller Hinton** (composition en g/l)

Extrait de viande .....3 g  
Amidon .....1,5 g  
Hydrolysate acide de caséine .....17,5 g  
Agar .....18 g  
Eau distillée .....1000 ml

pH = 7,4

- **Milieu SABOUREAUD**

Peptone .....10 g  
Agar .....20 g  
Glucose .....20 g  
Eau distillée .....1 000 ml

pH = 7,0

pH=8, pH=11 pour l'étude de l'effet de Ph sur l'activité antifongique

**Bouillon nutritif :**

Peptone .....15g  
 Extrait de .....5g  
 NaCl.....5g  
 Eau distillée .....1000ml

pH= 7

**Annexe 2****Résultats des tests statistiques**

Effet	Tests Univariés de Significativité pour inhibition (%) (Feuille de données1)				
	Paramétrisation sigma-restreinte Décomposition efficace de l'hypothèse				
	SC	Degr. de Liberté	MC	F	P
ord. origine	125834,7	1	125834,7	69,29013	0,000002
Souche	14387,6	5	2877,5	1,58449	0,237619
Erreur	21792,7	12	1816,1		

**Tableau 1 :** tables de l'ANOVA pour les résultats de pourcentage d'inhibition par confrontation directe

Effet	Tests Univariés de Significativité pour inhibition (%) (Feuille de données1)				
	Paramétrisation sigma-restreinte Décomposition efficace de l'hypothèse				
	SC	Degr. de Liberté	MC	F	P
ord. origine	15606,00	1	15606,00	4,521731	0,100610
Souche	1802,67	1	1802,67	0,522310	0,509854
Erreur	13805,33	4	3451,33		

**Tableau 2 :** tables de l'ANOVA pour les résultats de pourcentage d'inhibition par confrontation indirecte

Effet	Tests Univariés de Significativité pour inhibition (%) (Feuille de données1)				
	Paramétrisation sigma-restreinte				
	Décomposition efficace de l'hypothèse				
	SC	Degr. de Liberté	MC	F	P
ord. origine	112326,8	1	112326,8	129,2970	0,000001
pH	2475,5	2	1237,7	1,4247	0,290029
Erreur	7818,8	9	868,8		

**Tableau 3 :** tables de l'ANOVA pour les résultats de l'effet de pH sur l'activité antifongique