

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
Filière : Biologie
Spécialité : Biotechnologie Microbienne

Thème

**Isolement de bactéries halophiles à activité
antagoniste et essai dans le biocontrôle de *Botrytis
cinerea* sur la courgette.**

Travail réalisé par :

soutenu le : 18/09/2017

M^{lle} : BENAMRANE Zaina

M^{lle} : MAOUCHI Yasmine

Devant le jury :

Président	: M^{me} BEN AHMED DJILALI A.	Maitre de conférences A	UMMTO
Promoteur	: M^r OUELHADJ A.	Maitre de conférences A	UMMTO
Examineur	: M^{me} BENAZZOUC K.	Maitre assistant A	UMMTO
Examineur	: M^{me} TAZDAIT R.	Maitre de conférences B	UMMTO

Année universitaire : 2016 – 2017

REMERCIEMENTS

*Nous tenons à adresser nos plus vifs remerciements à notre promoteur **M' OUELHADJ A.**, Maître de conférences A à l'UMMTO, de nous avoir encadré durant ce travail de recherche, en nous faisant bénéficier de ses compétences scientifiques. Nous profitons de cette occasion pour exprimer notre profonde reconnaissance pour l'attention qu'il a porté à ce travail, pour les encouragements, pour la confiance qu'il nous a toujours témoignée, sa constante disponibilité et la gentillesse dont il a fait preuve à nos égards.*

*Nos remerciements les plus chaleureux et respectueux pour **M^{me} BEN AHMED DJILALI A.**, Maître de conférences A à l'UMMTO, de nous avoir fait l'honneur de présider le jury.*

*Nos remerciements vont aussi à **M^{me} BENAZZOUZ K.**, Maître assistant A à l'UMMTO, pour avoir accepté de lire et d'examiner ce travail. Qu'elle trouve ici nos sincères sentiments de gratitude et de respect.*

*Nos profonds remerciements à **M^{me} TAZDAIT R.**, Maître de conférences B, pour nous avoir accordé de son temps et accepté d'examiner notre modeste travail. Qu'elle trouve ici l'expression de notre profond respect.*

Nos sentiments les plus profonds et remerciements infinis, à tous ceux et celles qui ont contribué à la réalisation de ce travail.

Dédicaces

*A mes chers frères et sœurs
qui ont tous sacrifié pour mon bonheur et ma réussite
je leurs souhaite tout ce qu'il ya
de bon au monde ;*

A mes chère(s) ami(e)s que j'aime beaucoup ;

A mon binôme ZAINA ;

Je dédie mon travail.

Yasmine

Dédicaces

Je dédie ce modeste travail:

A ma très chère mère; qu'elle trouve ici hommage de ma gratitude qui, si grande qu'elle puisse être, ne sera à la hauteur de ses sacrifices et ses prières pour moi ;

A celui qui a toujours garni mes chemins avec force et lumière, mon cher papa ;

A mes sœurs adorées «Karima et Nouara» et ma chère petite Susane ;

A mes chers frères «Mohamed, Djilali, Rachid, Saadi et Ahmed» à qui je souhaite beaucoup de réussite dans la vie ;

Mon binôme Yasmine, avec qui j'ai partagé les plus beaux et difficiles moments ;

A mes chère(s) et adorables ami(e)s.

Liste des abréviations

- **Aw** Activité de l'eau
- **BN** Bouillon Nutritif
- **DO** Densité optique
- **GB** Glycine Betaine
- **GN** Gélose nutritive
- **HCN** Acide cyanhydrique
- **KCl** Chlorure de Potassium
- **MEVAG** Milieu d'étude de la voie d'attaque des glucides
- **MH** Mueller-Hinton
- **NR** Nitrate réductase
- **ONPG** Ortho-nitrophényl- β -galactoside
- **pH** Potentiel d'hydrogène
- **TDA** Tryptophane désaminase
- **TSI** Triple-Sugar-Iron
- **UFC/ml** Unité Formant une Colonie par millilitre

Liste des figures

Figure 1 : Caractères morphologiques des structures asexuées	11
Figure 2 : Caractères morphologiques de <i>Botrytis cinerea</i>	12
Figure 3 : Caractères morphologiques des structures asexuées du genre <i>Penicillium</i>	13
Figure 4 : Fonte des semis de pin	14
Figure 5 : Pois chiche avec la pourriture des racines	14
Figure 6 : Piment et fraise infecté par la pathologie du blanc	15
Figure 7 : Cercosporiose noire du bananier.....	15
Figure 8 : Mildiou de la tomate	17
Figure 9 : Pomme de terre atteinte par le mildiou	17
Figure 10 : Pourriture grise des tomates.....	18
Figure 11 : Les symptômes de la rouille du café causés par <i>Hemilei avastatrix</i> sur le feuillage	18
Figure 12 : Localisation géographique du site de prélèvement de sable.....	29
Figure 13 : Zone de prélèvement des échantillons de sable, et les échantillons prélevés	29
Figure 14 : Photo de courgettes utilisées après essuyage.....	38
Figure 15 : préparation des courgettes pour le test antifongique <i>in vivo</i> . A : témoins négatifs ; B : Courgette contaminée par <i>Botrytis cinerea</i> ; C : Courgette contaminée par <i>Botrytis cinerea</i> puis pulvérisée par la suspension bactérienne.	39
Figure 16 : Courgettes mises dans des récipients propres.....	40
Figure 17 : Courgettes contaminer par <i>Botrytis cinerea</i> , placées dans un récipient en présence de disques bactériens	40
Figure 18 : Aspect de souches bactériennes pures sur milieu GN	43
Figure 19 : Histogramme représentatif des taux d'inhibition de la croissance mycélienne en confrontation directe entre les souches fongiques et les souches bactériennes.....	49
Figure 20 : Histogramme représentatif des taux d'inhibition de la croissance mycélienne des champignons par les composés volatils des bactéries testées.	54

Figure 21 : Résultats de test de confrontation direct effectué <i>in vivo</i> sur courgettes contaminées par <i>Botrytis cinerea</i> (A), et d'autres contaminées et pulvérisées par la suspension bactérienne de <i>Staphylococcus</i> (B), comparées aux témoins négatifs (C)	56
Figure 22 : Résultats de test de la recherche de substances volatiles <i>in vivo</i> . A : Témoin négatif ; B : courgettes contaminées par <i>Botrytis cinerea</i> , en présence de disques bactériens (de la souche <i>Staphylococcus</i>).....	57
Figure 23 : Histogramme représentatif de la tolérance de la bactérie <i>Staphylococcus</i> à différentes concentration de NaCl	59

Liste des tableaux

Tableau I : Les trois principaux types de bactéries halophiles et leur condition de vie	4
Tableau II : Liste de quelques microorganismes qui peuvent survivre dans des sols sablonneux.....	5
Tableau III : La classification générales des champignons phytopathogènes et leur caractéristiques	9
Tableau IV: La classification de l'espèce <i>Aspergillus niger</i>	10
Tableau V : La classification de l'espèce <i>Botrytis cinerea</i>	11
Tableau VI: La classification du genre <i>Penicillium</i>	12
Tableau VII : Quelques agents et produits commercialisés dans le monde, pour la lutte biologique contre les agents phytopathogènes	26
Tableau VIII : Résultats de l'observation macroscopique des souches bactériennes isolées à partir du sable sur milieu GN à 30°C pendant 24h.....	42
Tableau IX : Résultats de l'examen microscopiques des souches bactériennes isolées à partir du sable de mer.....	44
Tableau X : Identification biochimiques des souches isolées.....	46
Tableau XII : Résultats de développement mycélien des champignons, après le test de confrontation direct avec les bactéries sur boîtes de pétri, à 30°C pendant 7 jours d'incubation.....	48
Tableau XIII : Résultats de l'effet inhibiteur des composés volatils des bactéries vis-à-vis des champignons testés.....	53
Tableau XIV : Résultats de la tolérance de <i>Staphylococcus</i> aux différentes concentrations en NaCl.....	58



Sommaire

Liste des abréviations.

Liste des figures.

Liste des tableaux.

Introduction 1

Première partie : synthèse bibliographique

Chapitre I: Microflore de sable

1. sable de mer	3
1.1. La salinité de sable de mer	3
1.1.1. Définition de la salinité	3
1.1.2. Effet de la salinité sur l'activité physiologique des bactéries	3
2. diversité microbienne dans le sable	3
2.1. Définition de bactéries halophiles	4
2.2. La microflore du sable	4
2.3. Méthodes d'adaptation des bactéries halophiles	6
2.3.1. Adaptation à la salinité par la production d'osmoprotecteurs	6
2.3.2. Adaptation à la salinité par accumulation de KCl	7
2.4. Activité antagoniste des bactéries halophiles	7

Chapitre II: Champignons phytopathogènes

1. les champignons	8
1.1. Généralités sur les champignons	8
1.1.1. Mode de reproduction	8
1.1.1.1. Reproduction sexuée	8
1.1.1.2. Reproduction asexuée	9
2. Champignons phytopathogènes	9
2.1. Définition des champignons phytopathogènes	9
2.2. Classification des champignons phytopathogènes	9
2.3. Champignons phytopathogènes utilisés	10
3. Pathologies liées aux champignons phytopathogènes	13

3.1. Les maladies physiologiques	14
3.2. Les maladies des organismes pathogènes (parasitaires)	14
3.2.1. Fonte des semis et la pourriture des racines	14
3.2.2. L'oidium ou le blanc	14
3.2.3. Maladie des raies noires des bananiers (cercosporiose noir)	15
3.2.4. Le mildiou	16
3.2.5. Pourriture grise	17
3.2.6. La rouille du café	17
Chapitre III: Moyens de lutte contre les champignons phytopathogènes	
1. Lutte chimique	19
1.1. Les fongicides	19
1.1.1 Particularités des fongicides	19
1.1.1.1 Préventive	19
1.1.1.2 curative	19
1.1.2 Classification des fongicides	19
1.1.2.1 fongicides non systémique	20
1.1.2.2 fongicides systémiques	20
1.2 Les stimulateurs de défense naturelle des plantes	20
2. Lutte biologique	20
2.1. Définition	20
2.2. Les différentes catégories de biopesticides	21
2.2.1 Biopesticides microbiens	21
2.2.1.1 Les bactéries	21
2.2.1.2. Les virus	22
2.2.1.3. Les champignons	22
2.2.2 Biopesticides végétaux	22
2.2.3 Biopesticides animaux	22
2.3. Mode d'action des agents de protection biologique	23
2.3.1. Antibiose	23

2.3.2. Hyperparasitisme	23
2.3.3. Compétition nutritive	24
2.3.4. Interférence avec le pouvoir pathogène	24
2.3.5. Stimulation des défenses de la plante	24
3. la lutte physique.....	25
4. La lutte génétique	25

Deuxième partie : Partie expérimentale

Matériel et méthodes

1. Matériel.....	27
1.1. Les souches fongiques	27
1.2. Milieux de culture.....	27
1.3. Solutions et réactifs.....	27
1.4. Appareillage.....	28
2. Méthode.....	28
2.1 Echantillonnage	28
2.2 Suspension et dilution.....	29
2.3. Isolement et purification des souches bactériennes	30
2.3.1 Ensemencement	30
2.3.2. Purification des souches bactériennes.....	30
2.3.3 Conservation des souches bactériennes	30
2.4. Identification des souches bactériennes.....	30
2.4.1. Critères morphologiques	30
2.4.1.1. Observation macroscopique	30
2.4.1.2 Observation microscopique.....	31
2.4.2. Critères biochimiques	31
2.4.2.1. Étude de la voie d'attaque des glucides (MEVAG) et l'étude du type respiratoire sur milieu MEVAG	31
2.4.2.2. Etude des enzymes respiratoires	32
2.4.2.3. Le test de Citrate de SIMMONS	33

2.4.2.4. Etudes des réactions cataboliques	34
2.5. Confrontation du champignon et de la bactérie en boîte de Pétri	36
2.5.1. Préparation de l'inoculum	36
2.5.2. Préparation de la suspension bactérienne.....	36
2.5.3. Tests d'activités antifongiques (confrontation direct <i>in vitro</i>)	37
2.6. Recherche d'une substance inhibitrice volatile	37
2.7. Test d'antagonisme <i>in vivo</i>	38
2.7.1. Préparation des fruits de courgette.....	38
2.7.2. Les étapes suivies pour les tests	38
2.8. Croissance des bactéries isolées à différentes concentrations de NaCl	40
3. Analyse statistique.....	41

Résultats et discussions

1. Isolement et identification des souches bactériennes	42
1.1. Critères morphologiques.....	42
1.1.1. Examen macroscopique	42
1.1.2. Examen microscopique	43
1.2. Critères biochimiques	45
2. Confrontation du champignon et de la bactérie en boîte de Pétri.....	47
3. Activité antifongique des bactéries par les composés volatils	52
4. Evaluation de l'activité antifongique <i>in vivo</i>	56
5. Croissance à différentes concentrations d'NaCl.....	58
Conclusion.....	60

Références bibliographiques

Annexes



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 et plus largement aussi aux phylums des oomycètes (LEPOIVRE, 2003). Pour diminuer les pertes de rendements occasionnées sur les plantes d'intérêt agricole, des méthodes de lutttes classique, comme l'utilisation de la résistance des plantes et l'application des fongicides, sont déployées.

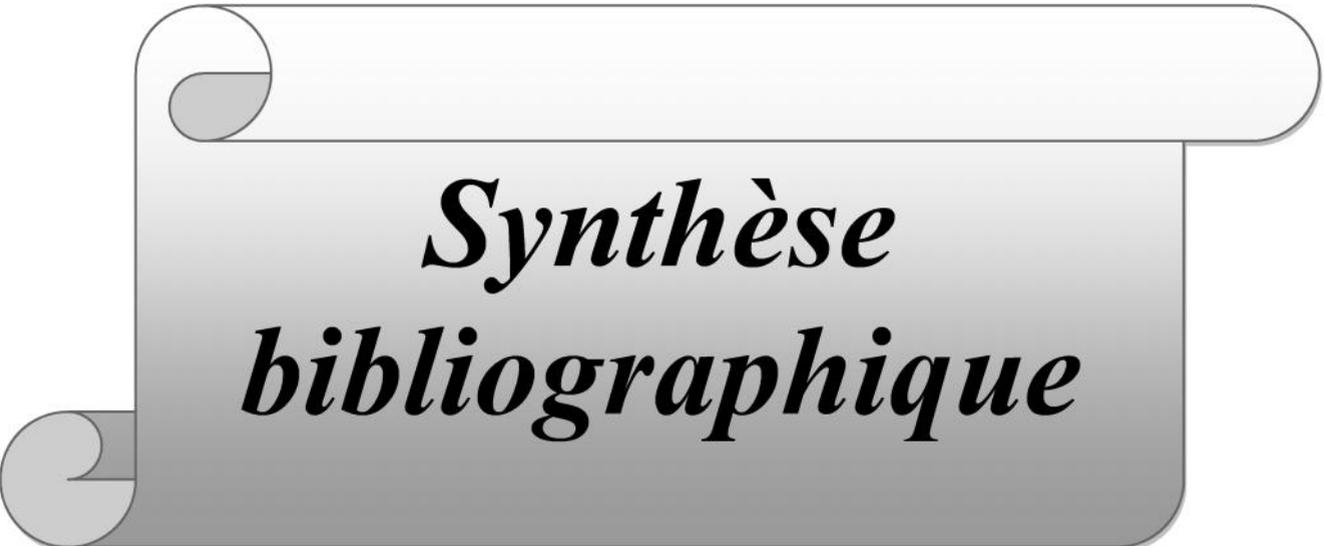
Les agents phytopathogènes occasionnent des dégâts avec des conséquences très importantes sur le rendement et la qualité des récoltes. Bien que certaines pratiques culturales soient recommandées, il n'existe aucune méthode permettant de lutter officiellement contre ces maladies. Parmi les alternatives à la seule lutte chimique, le recours à la protection biologique, consiste l'une des solutions alternative qui permettra de lutter contre les agents phytopathogènes tout en diminuant l'emploi de produits chimiques.

Les mesures de contrôle alternatif telle que l'utilisation d'antagonistes sont nécessaires et ont besoins d'être explorés. Cette stratégie est basée sur l'utilisation de micro-organismes (bactéries, levures ou champignons saprophytes) qui ont soit un potentiel inhibiteur de l'agent causal, soit l'habilité d'accroître le mécanisme de défense de la plante (PIGA *et al.*, 1997 ; FRAVEL et LARKIN, 1998 ; BENHAMOU et NICOLE, 1999, DE BOER *et al.*, 1999 ; CHERIF *et al.*, 2002 ; SILVA *et al.*, 2004).

Parallèlement à leur diversité, l'étude des bactéries halophiles a mené à les considérer comme des bactéries à fort potentiel biotechnologiques par leur production d'enzymes extracellulaires, des solutés compatibles, de polymères à grand intérêt dans différents industries. Aussi ces bactéries sont utilisées dans les procédés de bioremédiation, et comme moyen de lutte biologique contre certains micro-organismes phytopahtogènes (VENTOSA *et al.*, 1998 ; MARGESIN et SCHINNER, 2001 ; MELLADO et VENTOSA, 2003 ; SADFI-ZOUAOUI *et al.*, 2008).

Dans ce travail, nous nous proposons d'étudier la diversité bactérienne du sable de mer localisées au niveau de la grande plage de TIGZIRT. Le sujet étant nouveau, il nous permettra de construire une base de données de bactéries halophiles de ces milieux hyper salins, tout en cherchant d'éventuelles potentialités biotechnologiques de bactéries halophiles d'origine de ce site par la recherche de potentiel d'antagonisme de ces bactéries sur les trois agents phytopathogènes : *Botrytis cinerea*, *Aspergillus niger* et *Penicillium* sp., et ceci par des

confrontations *in vitro* sur boîtes de Petri et *in vivo*, afin d'apprécier l'effet protecteur des bactéries vis-à-vis des fruits de courgette infectés par *Botrytis cinerea*.



***Synthèse
bibliographique***

1. sable de mer

1.1. La salinité de sable de mer

1.1.1. Définition de la salinité

La salinisation est un processus d'accumulation des sels minéraux solubles dans le sol et dans le sable. Ces derniers sont constitués d'un mélange d'anions et de cations (RABHI, 2011). Selon BONGOUA DEVISME (2009), ces sels minéraux sont : Ca^{2+} , Mg^{2+} , K^+ , Na^+ , Cl^- , SO_4^{2-} , HCO_3^- , CO_3^{2-} et NO_3^- .

1.1.2. Effet de la salinité sur l'activité physiologique des bactéries

Fréquemment, les micro-organismes dans leurs habitats naturels sont exposés à des variations de pression osmotique du milieu environnant (ROMEO *et al.*, 2001). En effet, la salinité élevée du milieu peut interférer avec la croissance et l'activité des bactéries. (RABHI, 2011).

Dans le cas où la salinité du milieu diminue, il y aura accumulation de la matière organique non dégradée, ce qui agit négativement sur la disponibilité des nutriments nécessaires à la croissance (ZAHKAN, 1997). Et dans le cas où il y a augmentation de ce facteur, cela peut engendrer une modification de la disponibilité de l'eau à la cellule (CSONKA, 1989).

2. diversité microbienne dans le sable

La vie dans le sable de mer connaît des variations à différentes échelles. On peut trouver une prolifération de divers animaux tels que les puces de mer (*Tarlitres saltator*), mais aussi d'autres crustacées, ainsi que de nombreux microorganismes et espèces bactériennes (qui résistent à la forte concentration du sel dans ce milieu) (MESSAOUI, 2011).

2.1. Définition de bactéries halophiles

Les bactéries halophiles sont des bactéries qui exigent pour leur croissance une présence de sel généralement sous forme de chlorure de sodium NaCl et elles prolifèrent aux basses valeurs d'activité de l'eau (LOZACH, 2001).

Selon la concentration de NaCl du milieu, les bactéries halophiles sont classées en trois catégories, présentées dans le tableau I.

Tableau I : Les trois principaux types de bactéries halophiles et leur condition de vie (BRANGER *et al.*, 2007 ; GREGOIRE *et al.*, 2009).

Les Conditions du milieu Les types d'halophiles	NaCl (%)	Activité de l'eau (Aw)
Les bactéries légèrement halophiles	2,00 à 5,00 %	0,97 à 0,99
Les halophiles modérés	5,00 à 20,00 %	0,87 à 0,97
Les halophiles extrêmes	20,00 à 30,00 %	< 0,87

2.2. La microflore du sable

Malgré les conditions de vie différents par rapport aux autres sols, les microorganismes arrivent à s'adapter et se développer dans le sable de mer, grâce à leurs résistances à la forte salinité de ce milieu. Les principaux microorganismes retrouvés dans le sable, sont cités dans le tableau II.

Tableau II : Liste de quelques microorganismes qui peuvent survivre dans des sols sablonneux (MESSAOUI, 2011).

Les microorganismes	Critères
La composition de sable en agents pathogènes	➤ Plusieurs agents pathogènes ont été identifiés dans les plages sablonneuses, tel que, les bactéries, les protozoaires, les virus et autres, qui peut provenir des différents déchets humains et animales, les boues de vidanges, ...etc.
Les bactéries entériques	➤ Tel que <i>Campylobacter jejuni</i> , <i>Clostridium perfringens</i> et <i>Shigella</i> . Ce sont des bactéries qui peuvent causer la gastroentérite.
Les mycètes	➤ Tel que l' <i>Aspergillus</i> , <i>Alternaria</i> , <i>Candida</i> , <i>Cephalosporium</i> , <i>Cladosporium</i> , <i>Fusarium</i> , <i>Monilia</i> , <i>Mucor</i> , <i>Penicillium</i> , ...etc.
Les <i>staphylocoques</i>	➤ Leur présence est due à l'activité humaine. On trouve <i>Staphylocoques</i> dorés, <i>Staphylocoques épidermite</i> et <i>Staphylococcus haemolyticus</i>
Les virus et les parasites	➤ <i>Toxocaracanis</i> est trouvé avec une grande concentration dans le sable des deux plages de sable à Marseille, France.
Microorganismes d'indication fécale	<p>➤ C'est des microorganismes non pathogènes, faciles à isoler, à identifier et à énumérer, employés pour indiquer le degré de la contamination fécale.</p> <p>➤ Ils incluent des coliformes (totales, thermotolérants, et <i>Escherichia coli</i>), des entérocoques intestinaux, des bactériophages et <i>Clostridium</i>.</p>
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	➤ Pathogène opportuniste (MEZZACHE, 2012), (en Israël, Portugal,...etc.).
<i>Vibrio</i>	➤ Tel que, <i>Vibrio harvey</i> et <i>Vibrio parahaemolyticus</i>

2.3 Méthodes d'adaptation des bactéries halophiles

Selon BERREGUI et BIRECHE (2014) les microorganismes halophiles et halotolérants utilisent différents mécanismes pour une meilleure adaptation à la pression osmotique exercée par la très haute salinité du milieu. Deux principales stratégies sont employées par différents groupes de microorganismes.

2.3.1. Adaptation à la salinité par la production d'osmoprotecteurs

L'adaptation est basée sur l'expulsion des sels du cytoplasme et l'accumulation de solutés organiques afin de maintenir la balance osmotique, les solutés peuvent être des acides aminés, des sucres, des polyalcools et des ectoïne (acides aminés cycliques) (BERREGUI et BIRECHE, 2014). Comme on peut trouver la glycine betaine (GB) qui est une molécule osmoprotectrice la plus puissante. Elle est fréquemment accumulée par de nombreux microorganismes halophiles (RABHI, 2011).

Dans ce cas, les osmoprotecteurs peuvent être des solutés compatibles inoffensifs, comme ils pourraient jouer un rôle protecteur actif interagissant avec les protéines et les protègent de cette façon de l'action destructrice due à l'osmolarité (PAPAGEORGION et MURATA, 1995).

2.3.2. Adaptation à la salinité par accumulation de KCl

Cette stratégie est adoptée par des groupes de bactéries halophiles anaérobies et aérobies. Ils accumulent essentiellement du KCl. L'exclusion du Na⁺ du cytoplasme se fait grâce à un antiport Na⁺/H⁺, localisé au niveau de la membrane cytoplasmique. Généralement, les ions K⁺ entrent passivement via un système uniport sous l'impulsion du potentiel de la membrane. Ce système revient à remplacer une partie du sodium cellulaire par du potassium. Des systèmes multiples de transport actif des ions K⁺ (OREN, 2001 ; OREN, 2002 ; GRANT, 2004).

2.4. Activité antagoniste des bactéries halophiles

L'étude des activités antagonistes des bactéries halophiles pour contrôler les champignons phytopathogènes a été récemment mise en évidence par de nombreux travaux, ainsi l'efficacité des bactéries halophiles modérées isolées de sols salins pour inhiber plusieurs champignons comme le *Fusarium sambucinum*. Ces bactéries halophiles modérées appartiennent aux genres *Bacillus*, *Halomonas*, *Planococcus*, ...etc (SADFI *et al.*, 2001 ;

ZHAO *et al.*, 2003). Ces bactéries ont été même décrites comme étant de bonnes candidates pour contrôler l'activité des champignons phytopathogènes et même recherchées pour leur production de substances antifongiques pouvant être aussi bien volatiles que diffusibles (SADFI-ZOUAOUI *et al.*, 2007).

1. Les champignons

1.1. Généralités sur les champignons

Les champignons sont des microorganismes uni ou pluricellulaire (BELMESSIKH, 2011), sporogènes et non chlorophylliens (DENIS, 1996), qui possèdent selon DENDOUGA (2006) un thalle comme appareil végétatif (sont dites donc des thallophytes), mycélium, dont les filaments s'appellent des hyphes.

Les champignons sont des organismes hétérotrophes incapables de synthétiser de la matière organique à partir de substances inorganiques (CANARD, CROZET et SENEQUIER, 2016). Généralement, la paroi cellulaire rigide (BRANDT et WARNOCK, 2011) des champignons est chitineuse (dont la chitine est un polymère formé d'unités de N-acétylglucosamine), mais aussi elle est composée de β -glucanes (CANARD, CROZET et SENEQUIER, 2016).

1.1.1. Mode de reproduction selon LAMRANI (2009) et TOMAS (2009)

En général, la reproduction chez les champignons peut se faire grâce à l'existence des particules dites spores (ce sont des Cryptogames), qui sont issues de trois types de reproductions différentes qui sont : la reproduction sexuée (champignons télémorphes), reproduction asexuée (champignons anamorphes) et dans le troisième cas, on trouve que certains champignons présentent les deux formes, dont on parle de champignons holomorphes.

1.1.1.1. La reproduction sexuée

Où les spores résultent d'une fécondation (gamètes mâles et femelles) et cette reproduction se fait suivant trois étapes successives :

- **La plasmogamie** : qui donne naissance à un dicaryon (à $2n$ chromosomes) à deux noyaux différents, résultants d'une fusion de deux cellules haploïdes initiales (n).
- **La caryogamie** : qui est l'étape où les noyaux (n) de dicaryon ($2n$) se fusionnent, pour avoir une cellule ($2n$) à un seul noyau.
- **La méiose** : qui est l'étape finale de division, où la cellule diploïde à un seul noyau se divise pour donner naissance à quatre cellules haploïdes.

1.1.1.2. La reproduction asexuée

Où la production de spores (conidies) se fait par une division mitotique qui s'initie par une germination d'une spore, pour produire un simple filament qui se croit et s'allonge par l'extrémité apicale, et ensuite, il subit une ramification pour avoir un nouveau mycélium.

2. Champignons phytopathogènes

2.1. Définition des champignons phytopathogènes

Les champignons phytopathogènes ou dites telluriques constituent un groupe d'organismes microscopiques hétérotrophes Ubiquistes, qui présentent des structures et des caractéristiques biologiques extrêmement diversifiées (KIRK et *al.*, 2001). Ils établissent des interactions antagonistes avec les plantes (VANDER, 2003). Plusieurs genres de champignons telluriques sont capables d'infecter les racines de plantes ainsi que les autres parties et même le fruit (ABDELKADER, 2012). Dans cette catégorie de champignon on peut trouver les *Aspergillus*, les *Penicillium*, les *Fusarium*, *Rhizoctonia*, *Alternaria*, *Pythium*, *verticilium*...etc. L'ensemble de ces microorganismes provoquent des maladies sur diverses cultures maraîchères, céréales, plantes (AGRIOS, 2005).

2.2. Classification des champignons phytopathogènes

Tableau III : La classification générales des champignons phytopathogènes et leur caractéristiques.

Division	Les principaux caractéristiques	Références
Ascomycota	<ul style="list-style-type: none"> • Reproduction sexuée avec des spores endogènes (ascospores). • Mycélium septé (cloisonné), septomycètes. • Spores non flagellées. 	(CANARD et SENEQUIER-CROZET, 2016)
Bazidiomycota	<ul style="list-style-type: none"> • Reproduction sexuée avec des spores exogènes (basidiospores). • Mycélium septé (cloisonné), septomycètes. • Spores non flagellées. 	

Chytridiomycota	<ul style="list-style-type: none"> • Ancêtre de tous les champignons. • Reproduction sexuée et asexuée • Mycélium siphonné, siphomycètes. • Spores flagellées. 	
Deuteromycota	<ul style="list-style-type: none"> • pas de reproduction sexuée (reste inconnue). • Mycélium cloisonné, septomycètes. • Spores non flagellées. 	KIFFER et MORELET, 1997)
Glomeromycota	<ul style="list-style-type: none"> • Pas de reproduction sexuée. • Mycélium siphonné (non cloisonné). • Spores flagellées 	(BLANDEAU, 2012 ; CANARD et SENEQUIER-CROZET, 2016)
Zygomycota	<ul style="list-style-type: none"> • Selon le mode de reproduction on trouve deux classes : <ul style="list-style-type: none"> - Zygomycètes : reproduction par mitospores (forme asexuée) ; - Trichomycète : reproduction par zygospores (forme sexuée). 	(LENNARTSSON, 2012)

2.3. Champignons phytopathogènes utilisés

2.3.1. *Aspergillus niger*

Selon LAMRANI (2009), la classification d’*Aspergillus niger* est présentée dans le tableau IV.

Tableau IV : La classification de l'espèce *Aspergillus niger*.

Règne	Division	Sous division	Groupe	Genre	Espèce
Fungi	Amastigomycètes	deutéromycètes	Hyphomycètes	<i>Aspergillus</i>	<i>Aspergillus niger</i>

C’est un champignon a reproduction asexuée, il se caractérise par un thalle formé de filaments septés et ramifiés (DENIS, 1996) qui produisent des conidiophores (filaments

dressés, non cloisonnés) qui se terminent par des phialides portés par des mitules ou stigmates (tête conidienne bisériée) (Figure.1) (LAMRANI, 2009).

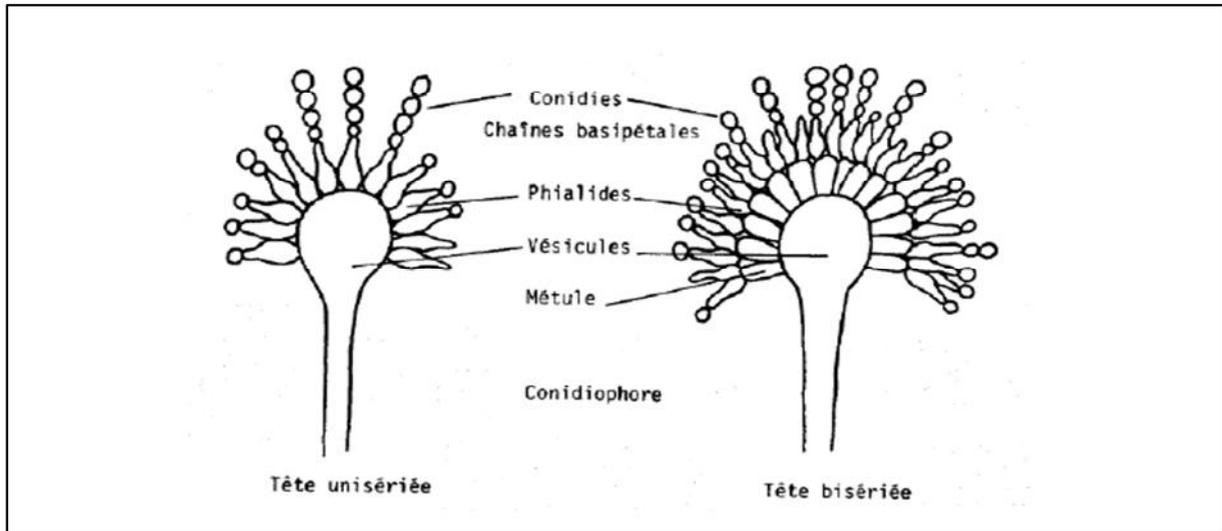


Figure 1:Caractères morphologiques des structures asexuées (TABUC, 2007).

A une température qui variée entre 25°C et 40°C, *Aspergillus nigers* se développe sur les milieux de culture (Saboraud) sous forme de colonies granuleuses, blanche puis jaunes et noire après maturité.

Selon TABUC (2007) *Aspergillus niger* est considéré comme un champignon phytopathogène vue sa capacité de parasité divers espèces de plantes, tel que les céréales retrouvées dans les régions a climat chaud (il est retrouvé à un pourcentage de 18% dans 88 échantillons de riz en Corée), l'oignon, les choux et le café.

2.3.2. *Botrytis cinerea*

Selon ALILOU (2012), la classification de *Botrytis cinerea* est présentée dans le tableau V.

Tableau V : La classification de l'espèce *Botrytis cinerea*.

Règne	Division	Classe	Ordre	Famille	Espèce
Fungi	Ascomycota	Leotiomycètes	Helotiales	Sclerotiniaceae	<i>Botrytis cinerea</i>

Botrytis cinerea est un champignon polyphagique, a reproduction asexuée (anamorphe ou forme imparfaite), il se caractérise par un thalle cloisonnée avec une formation de

conidiophores (Figure 2) gris au stade de fructification, suivie d'une formation de conidies (AJOUZ, 2009).



Figure 2 : Caractères morphologiques de *Botrytis cinerea* (AJOUZ, 2009).

A une température optimale comprise entre 20°C et 30°C, *B. cinerea* peut atteindre un degré de sporulation et de germination maximal, avec une exigence d'un taux d'humidité élevée.

B. cinerea saprophyte, ubiquiste et phytopathogène responsable de la pourriture grise ou dite pourriture noble, capable d'attaquer plus de 230 espèces de plantes, ce qui engendre de grave dommage en agriculture, en affectant plusieurs productions légumières (tomate, courgette, la laitue,...etc.), fruitières (la fraise, la pomme, le kiwi,...etc.) et les plantes ornementales (la rose et le gerbera) (AJOUZ, 2009).

2.3.3. *Penicillium*

Selon LAMRANI (2009), la classification de *Penicillium* est dans le tableau VI

Tableau VI : La classification du genre *Penicillium*.

Règne	Division	Sous division	Groupe	Genre
Fungi	Amastigomycètes	Deutéromycètes	hyphomycètes	<i>Penicillium</i>

Selon TABUC (2007), C'est un champignon à reproduction asexuée, il se caractérise par un thalle septé avec des conidiophores simples ou ramifiés qui se terminent par un pénicille, portant sur leurs extrémités des phialides qui peuvent être déposées directement (P. monoverticillé), ou portées par une rangée de métules (P. biverticillé) ou deux rangées de métules successives (P. triverticillé) (figure 03).

A une température comprise entre 20°C et 25°C , le *penicillium* se développe sur les milieux de cultures (Sabouraud) sous forme de colonies plates à sporulation teintée en jaune, vert ou bleu après trois à quatre jours d'incubation (TABUC, 2007).

Penicillium en tant que champignon phytopathogène, il est responsable de plusieurs contaminations retrouvées sur diverses plantes dans les champs, tel que les céréales (maïs, riz, blé, orge et seigle), l'oignon, les choux, le café et la carotte (TABUC, 2007).

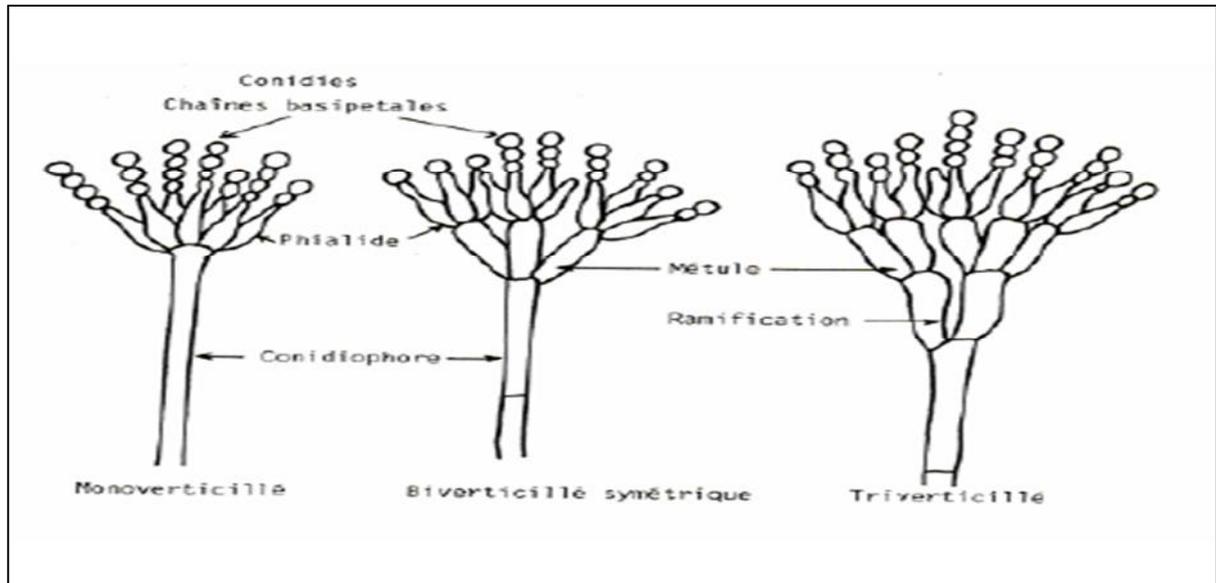


Figure 3 : Caractères morphologiques des structures asexuées du genre *Penicillium* (LAMRANI, 2009).

3. Pathologies liées aux champignons phytopathogènes

La pathologie végétale (phytopathologie) est la science qui étudie les maladies des plantes (DANDURAND, 2013). Apparaitre en 18^{ème} siècle (RAPILLY, 2001). C'est une science qui étudie la biologie des plantes ainsi que leur agents pathogènes, c'est un mécanisme dans lequel les phytopathologistes cherchent en collaborations avec des agriculteurs de trouver des moyens de contrôler les maladies des plantes afin de réduire la perte de récolte dues à des agents phytopathogènes (DANDURAND, 2013).

Une maladie de plante peut être induite par des agents pathogènes (microorganismes), comme peut être due à des maladies physiologiques, dans les conditions du milieu environnementale sont défavorables pour la plante (DANDURAND, 2013).

La présence d'une maladie chez la plante s'exprime par, des symptômes, la réaction de l'hôte (le chancre, la tache des feuilles et les flétrissements) par rapport à l'aspect normale de la plante étudiée. Sur ce, les pathologistes végétales comptent souvent sur des symptômes pour l'identification d'un problème d'une maladie. Nous distinguons deux grands types de maladies phytopathogènes : Les maladies des agents pathogènes et les maladies physiologiques (DANDURAND, 2013).

3.1. Les maladies physiologiques : Où les conditions environnementales ne sont pas favorables pour la plante (manque des substances nutritives, l'inondation, trop de soleil,...etc.).

3.2. Les maladies des organismes pathogènes (parasitaires) : sont dues à l'action des microorganismes pathogènes qui sont présents en grande quantité dans l'environnement (les champignons, les virus, les nématodes et les bactéries).

3.2.1. Fonte des semis et la pourriture des racines

C'est une maladie provoquée par plusieurs microorganismes phytopathogènes : *Phythium* (oomycètes), *Botrytis*, *Fusarium* et *Phoma* (champignons) dont les principaux symptômes sont : La pourriture de la semence, un pourrissement des jeunes pousses en cours de germination ainsi la pourriture des racines des plantes matures (Figure 4 et Figure 5) (DANDURAND, 2013).



Figure 4 : Fonte des semis de pin (DANDURAND, 2013).



Figure 5: Pois chiche avec la pourriture des racines (DANDURAND, 2013).

3.2.2. L'oïdium ou le blanc

Les plantes hôtes de l'oïdium sont la tomate, le piment et la fraise (Figure 6), dont sa prolifération est plus facile par temps chaud associée à une forte humidité ambiante. Les

plantes faibles qui se développent mal sont particulièrement sensibles à cette maladie (MOUGOU HAMDANE, 2015).



Figure 6 : Piment et fraise infecté par la pathologie du blanc (MOUGOU HAMDANE, 2015).

3.2.3. Maladie des raies noires des bananiers (cercosporiose noir)

La cercosporiose noire est une maladie foliaire du bananier (Figure 7) causée par un champignon ascomycète (*Mycosphaerella fijiensis*) (ANDANSON, 2010).

Le pathogène se reproduit de façon sexuée et asexuée. Les conidies (spores asexuées) sont principalement transportées par l'eau sur de courtes distances et les ascospores (les spores sexuées) sont principalement transportées par le vent vers les lieux les plus éloignés.

Lorsque les spores de *M. fijiensis* se disposent sur une feuille de bananier sensible, elles germent dans trois heures si un film d'eau est présent ou l'humidité est très élevée.

Les plantes ayant leurs feuilles endommagées par la maladie peuvent avoir un rendement atteignant 50 % au moins de fruits (DANDURAND, 2013).



Figure 7 : Cercosporiose noire du bananier (DANDURAND, 2013).

3.2.4. Le mildiou

Le mildiou est une maladie cryptogamique causée par un oomycète *Phytophthora* infestant répondue dans le monde entier (DANDURAND, 2013) qui exige la pluie, humidité élevée et une température qui comprise entre (12°C et 25°C) comme facteurs favorable pour son évolution (MOUGOU HAMDANE, 2015), elle affecte les cultures de tomate comme cellule hôte (Figure 8), elle est considérée comme un principale ennemi des cultures de pommes de terre (Figure 9) (DANDURAND, 2013 ; MOUGOU HAMDANE, 2015).

L'agent pathogène attaque d'abord les feuilles ou y'aura observation des petites taches jaunes, ensuite il attaque les tiges ou y'aura apparition des grandes taches brunes irrégulières (DANDURAND, 2013).



Figure 8 : Mildiou de la tomate (MOUGOU HAMDANE, 2015).



Figure 9 : Pomme de terre atteinte par le mildiou (DANDURAND, 2013)

3.2.5 Pourriture grise

Le champignon phytopathogène *Botrytis cinerea* responsable de la pourriture grise, est un microorganisme polyphagique qui cause d'énormes dégâts en agriculture, des risques d'attaque par ce champignon sont importantes sur : la tomate (Figure 10), le poivron et la fraise...etc. avec une destruction partielle ou totale de la plante hôte.

Il peut s'attaquer à différentes stades de développement de la vigne et l'infection par les conidies peut se produire durant toute la saison de croissance. Par ailleurs la pourriture grise est à l'origine de conséquence grave sur la qualité des vins. Il peut provoquer une altération de leurs qualité organoleptiques tel que : la couleur et le gout (AJOUZ, 2009).



Figure 10 : Pourriture grise des tomates (MOUGOU HAMDANE, 2015)

3.2.6 La rouille du café

C'est la maladie du café, elle est économiquement la plus importante dans le monde, le caféier sert comme l'hôte obligatoire de la rouille du café : *Coffea arabica* (café arabica) et *Coffea canephora* (café robusta), l'anomalie est causée par un champignon basidiomycète *Hemileia vastatrix* qui vive actuellement dans presque toutes les régions productrices de café du monde, limité à l'Afrique centrale et occidentale en particulier les régions les plus élevées et les plus froides. *Hemileia* attaque principalement les feuilles (Figure 11) et n'est que rarement trouvé sur les jeunes tiges et les fruits (DANDURAND, 2013).



Figure 11 : Les symptômes de la rouille du café causés par *Hemileia vastatrix* sur le feuillage (DANDURAND, 2013).

1. Lutte chimique

La lutte chimique contre les maladies des plantes a commencé en 1865 avec l'utilisation de la bordelaise (fongicide à base de cuivre) contre l'Oïdium et le mildiou de la vigne. L'emploi d'insecticides (l'acide benzoïque, le parathion) et d'herbicide (2.4.D : Dichloro-2,4 phénoxyacétique acide, MCPA : Chloro-4 méthyle -2 phénoxyacétique) n'a eu lieu qu'à la fin de la seconde guerre mondiale. Avec ces produits débute une autre nouvelle celle des produits de l'agrochimie, phytosanitaire ou encore appelés pesticides, c'est l'ère de la phytopharmacie (RICHARD *et al.*, 1985).

1.1. Les fongicides

Bien que le terme fongicide dérive de ; **fongique (champignon) et cid (tuer ou détruire)** ; néanmoins actuellement, sur pouvoir fongicide ou fongistatique (inhiber la germination ou la sporulation) désigne tout composé ayant le pouvoir de détruire (action fongicide) et d'inhiber la germination ou la sporulation (action fongistatique) des champignons (BENAD, 2010). Plusieurs stratégies chimiques permettent de lutter contre l'invasion d'une plante par un champignon, de façon directe ou indirecte. En effet, certains fongicides agissent sur le système énergétique des cellules fongique en inhibant les processus respiratoires (ROCHER, 2004).

Malgré tout ce qui se dit de nos jours sur les fongicides, ils constituent néanmoins de outils indispensables à l'agriculture (BACON, 2002).

1.1.1 Particularités des fongicides

1.1.1.1 Préventive : Inhibe la croissance des tubes germinatifs du champignon qui ne peut plus pénétrer dans la feuille. (BOUGHDID *et al.*, 2015). C'est-à-dire ils empêchent la pénétration du parasite dans l'hôte, en agissant sur le métabolisme énergétique et sur la biosynthèse des glucides, des protéines, des lipides et des acides gras (BACON, 2002).

1.1.1.2 Curative : Est l'encapsulation des haustoria par la plante elle-même. Les haustoria perdent leur fonction de nutrition du champignon à la surface de la feuille (BOUGHDID *et al.*, 2015).

1.1.2 Classification des fongicides

Selon DELCOURT et DEYSON (1980) et ROCHER (2004), les fongicides sont classés sous deux classes :

1.1.2.1 fongicides non systémique : ou dite de contact ou inhibiteurs : Ce sont des fongicides qui ne pénètrent pas dans l'hôte, ils détruisent les champignons externes avant que ceux-ci ne pénètrent dans l'hôte, ils sont dits donc de surface.

1.1.2.2 fongicides systémiques : Ce sont des fongicides qui pénètrent dans l'hôte pour tuer ou inhiber les champignons, ils diffusent de la semence (zone d'application) vers le sol environnant puis sont absorbés par les racines au moment de la germination pour migrer vers les parties aérienne.

1.2 Les stimulateurs de défense naturelle 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).

2. Lutte biologique

La remise en cause des méthodes de lutte génétique (par sélection de variétés résistantes) et chimique (par l'apparition de souches ou de races nouvelle et résistantes des pathogènes et par pollution) et le développement de l'écologie des champignons phytopathogènes a donné un élan aux études sur le contrôle biologique (MAHDI, 2012) qui est considéré comme une voie alternative à l'utilisation des produits chimiques qui constituent un danger sur l'environnement et sur l'homme (COOK, 1993 ; BENBROOK *et al.*, 1996).

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).

2.1. Définition

C'est une méthode alternative à la lutte chimique (MILLOT et TROTIN-CAUDAL, 1993), qui consiste à utiliser les capacités biologique d'un organisme vivant en vue de limiter, arrêter ou bien inhiber le développement d'un autre organisme vivant sans avoir recours aux pesticides. Plusieurs être vivant, bactéries et champignons, ont fait l'objet d'étude où ont été utilisées dans des applications de lutte biologiques sous le nom : Biopesticides (DERAVEL *et al.*, 2013).

Les biopesticides, « organismes vivants ou produits issus de ces organismes ayant la particularité de supprimer ou limiter les ennemis des cultures » (THAKO, 2006), sont utilisées depuis des siècles par les fermiers et paysans. Ils peuvent être aussi bien utilisés en agriculture conventionnelle qu'en agriculture biologique, certains permettent aux plantes de résister à des stress abiotiques et d'une manière générale, ils sont moins toxiques que leurs homologues chimiques (DERAVEL *et al.*, 2013).

Les produits considérés comme des biopesticides par les agences de réglementation européennes et mondiales sont d'origines diverses. Ils peuvent être classés en trois grandes catégories, selon leur nature : les biopesticides microbiens, les biopesticides végétaux et les biopesticides animaux (CHANDLER *et al.*, 2011 ; LENG *et al.*, 2011).

2.2. Les différentes catégories de biopesticides

2.2.1. Biopesticides microbiens

Cette catégorie comprend : les bactéries, les champignons, oomycètes, virus et protozoaires. L'efficacité d'un nombre importants d'entre eux repose sur des substances actives dérivées des micro-organismes. Ce sont, en principe, ces substances actives qui agissent contre le bio-agresseur plutôt que le micro-organisme lui-même (DERAVEL *et al.*, 2013).

2.2.1.1. Les bactéries

Les biopesticides à base de *Bacillus thuringiensis* sont les plus commercialisés, ils ont une action insecticides (DERAVEL *et al.*, 2013).

Des espèces bactériennes du genre *Bacillus* utilisant des mécanismes d'action peuvent également protéger les plantes. Il y'a parmi ces espèces *Bacillus amyloliquefaciens* et *Bacillus Subtillis*, 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 dernières peuvent soit activer les défenses des plantes, soit avoir un effet antibactérien ou antifongique direct (PEREZ-GARCIA *et al.*, 2011).

Des bactéries appartenant à d'autres genres que le genre *Bacillus* ont également été développées en tant que biopesticides. Ainsi, la souche *Pseudomonas chlororaphis* MA342 est utilisée dans la prévention et le traitement de certains champignons des graines de céréales comme *Drechslerateres*, agent de l'helminthosporiose de l'orge (TOMBOLINI *et al.*, 1999).

2.2.1.2. Les virus

Les *Baculoviridae* sont des virus à double brins d'ADN circulaire, ayant un génome compris entre 100 et 180 kb, protégés par une paroi protéique. Ils infectent les arthropodes insectes, ou larves. Ils représentent un faible risque sanitaire car aucun virus similaire n'a à l'heure actuelle, été répertoriée dans l'infection des vertébrés ou des plantes. Cette propriété les rend particulièrement intéressants pour une utilisation en qualité de bio-insecticide, d'autant plus qu'ils peuvent tuer leur hôte en quelques jours (CHEN *et al.*, 2002).

2.2.1.3. Les champignons

Plusieurs souches de champignons filamenteux du genre *Trichoderma* spp sont utilisées pour la protection biologique des plantes. Elles ont généralement une activité antifongique contre plusieurs pathogènes du sol ou contre des pathogènes foliaires (DODD *et al.*, 2003). *Trichoderma atroviride* est notamment utilisée pour la protection biologique de la vigne (LONGA *et al.*, 2009).

2.2.2. Biopesticides végétaux

Les plantes produisent des substances actives ayant des propriétés insecticides, aseptiques ou encore régulatrices de la croissance des plantes et des insectes (SCHMUTTERER, 1990). Dans ce cas de figure on trouve les huiles végétales, qui comportent des molécules identifiées comme biologiquement active (SRIVASTAVA *et al.*, 2007 ; CORREIA *et al.*, 2013).

2.2.3. Biopesticides animaux

Ces biopesticides sont des animaux comme les prédateurs ou les parasites, ou des molécules dérivées d'animaux, souvent d'invertébrés comme les venins d'araignées, de scorpions, des hormones d'insectes et des phéromones (GOETTEL *et al.*, 2001 ; SAIDEMBERGET *et al.*, 2009 ; AQUILONI *et al.*, 2010).

L'exemple le plus connu, l'insecte *Coccinelle Rodolia cardinalis* qui a été introduite dès le 19^{ème} siècle en Californie pour enrayer la destruction des agrumes (CALDERON ALVAREZ *et al.*, 2012).

Comme les coccinelles, les acariens utilisent la prédation pour se nourrir de certains insectes ravageurs des plantes, et aussi les nématodes sont utilisés pour la lutte contre les limaces et les gastéropodes en générale (GREWAL *et al.*, 2003).

Les biopesticides d'origine animale qui sont des signaux chimiques produits par un organisme et qui changent le comportement d'un individu de la même espèce ou d'espèces différentes sont également répertoriés sous l'appellation «semio-chimique». En effet ils ne vont pas provoquer la mort des bio agresseurs, mais plutôt créer une confusion chez ces derniers pour les empêchera de se propager dans la zone traitée (DERAVEL *et al.*, 2013).

2.3. Mode d'action des agents de protection biologique

Les modes d'action impliqués dans la protection biologique de la plante contre les agents phytopathogènes sont nombreux. Plusieurs mécanismes ont été définis selon ELAD (1996) et JACOBSEN (2006).

2.3.1. Antibiose

L'antibiose est le mode d'action le plus étudié chez les agents de protection biologique (JACOBSEN, 2006). C'est le mécanisme où l'organisme antagoniste produit des métabolites secondaires toxiques contre les agents pathogènes cible, qui peuvent inhiber la germination, la croissance mycélienne et/ou la sporulation de ces agents (MONTESINOS *et al.*, 2009).

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* et *Pseudomonas fluorescens*) (RAAIJMAKER *et al.*, 2002 ; DUFFY *et al.*, 2003). Une substance peut être citée à titre d'exemple, qui est la pyrrolnitrine.

- La pyrrolnitrine (3-chloro-4-(2'-nitro-3'-chlorophenyl)-pyrrole) est un antibiotique à large spectre d'action isolé chez plusieurs espèces de bactéries, incluant *Pseudomonas pyrocinia* (ARIMA *et al.*, 1964 ; ARIMA *et al.*, 1965), *Myxococcus fluvus*, *Enterobacter agglomerans* et *Serratia* sp., ainsi que plusieurs espèces de *Pseudomonas* et *Burkholderia* (HAMMER *et al.*, 1997 ; EL-BANNA et WINKELMANN, 1998; MEZIANE *et al.*, 2006). Cet antibiotique inhibe la croissance des champignons en bloquant le système respiratoire (JANISIEWICZ *et al.*, 1991). Cette substance s'avère efficace pour lutter contre *B. cinerea* (HAMMER *et al.*, 1993).

2.3.2. Hyperparasitisme

Dans le cas de l'hyperparasitisme, l'antagoniste est un parasite il reconnaît spécifiquement sa cible, pénètre dans ces cellules et entraîne sa destruction via la colonisation de ses organes. *Coniothyrium minitans* est par exemple un champignon hyperparasite de

Sclerotinia sclerotiorum, capable de produire des enzymes dégradant les parois cellulaires de l'agent pathogène, telles que des chitinases ou des β -1-3 glucanases (GERLAGH et WHIPPS, 1992). Malgré l'utilisation de ce mécanisme, l'usage en protection biologique d'hyperparasites a des contraintes comme la nécessité d'un contact direct avec l'agent pathogène et la lenteur possible de la destruction de ce dernier (FRAVEL, 2005).

2.3.3. Compétition nutritive

Divers microorganismes (bactéries, levures, champignons filamenteux) ont la capacité d'inhiber la germination des conidies d'un agent pathogène (champignons) via la compétition pour des éléments nutritifs comme l'azote, le carbone, ou des macro- ou micro- éléments présents dans le milieu (BLAKEMAN et FOKKEMA, 1982; FILONOW, 1998 ; ELAD et STEWART, 2004). La réduction de la concentration en nutriments dans le milieu conduit généralement à un taux réduit de spores germées de l'agent pathogène et un ralentissement de la croissance mycélienne, réduisant ainsi le nombre d'infections et l'expansion des lésions (BLAKEMAN et FOKKEMA, 1982 ; BLAKEMAN, 1993).

2.3.4. Interférence avec le pouvoir pathogène

Les agents de protection biologique peuvent interférer avec les facteurs du pouvoir pathogène des champignons en inhibant ou dégradant certaines enzymes hydrolytiques (cutinases, pectinases, etc.) (DUFFY *et al.*, 2003). L'interférence avec le pouvoir pathogène a été signalée, par exemple, chez *T. harzianum* T39 qui est capable de réduire l'activité de différentes enzymes (polygalacturonase, pectine méthyle estérase et pectate lyase, chitinase, β -1,3-glucanase et cutinase) produites par *B. cinerea* (KAPAT *et al.*, 1998 ; ZIMAND *et al.*, 1996). En conséquence, le taux de pénétration de *B. cinerea* dans les tissus de l'hôte et l'impact de la maladie sont significativement réduits. Sur les feuilles de différentes plantes, *Trichoderma harzianum* T39 est également capable de sécréter une protéase entraînant une réduction de la germination des spores de *B. cinerea*, ce qui altère ainsi son pouvoir pathogène (ELAD et KAPAT, 1999).

2.3.5. Stimulation des défenses de la plante

La résistance induite chez la plante est un mode d'action de certains agents de protection biologique (SEQUEIRA, 1983). La résistance peut être induite localement ou elle peut être systémique (ELAD et STEWART, 2004). La résistance systémique induite, causée par divers agents de protection biologique, peut protéger la plante contre certains agents pathogènes du sol et aériens (MATTA et PAULITZ, 2000). Cette résistance chez la plante peut être

déclenchée par des microorganismes non pathogènes tels que les saprophytes, ou des souches non virulentes des agents pathogènes. Cette résistance peut s'établir de différentes façons chez la plante: épaissement des structures pariétales renforçant leur rôle de barrière physique, stimulation de voies métaboliques secondaires permettant la synthèse de substances antimicrobiennes (comme les phytoalexines) ou de composés impliqués dans la signalisation de l'agression vers d'autres cellules, voire à l'ensemble de la plante par systémie (acide salicylique, éthylène, acide jasmonique, etc.), enfin, accumulation de protéines de défense (ou protéines PR pour "Pathogenesis Related"). Ces protéines, associées à la réponse des plantes aux attaques des agents pathogènes, inhibent certaines enzymes impliquées dans le pouvoir pathogène des microorganismes (protéases, polygalacturonases), voire dégradent certaines de leurs structures vitales (structures pariétales et membranes plasmiques) (FRITIG et KLARZYNSKII, 2001). Cette résistance induite entraîne, dans certains cas chez la plante, une protection contre une attaque multiple de plusieurs agents pathogènes (ELAD et STEWART, 2004).

3. la lutte physique

Il faut empêcher la conservation des agents phytopathogènes dans l'environnement, les débris de plantes malades, sont susceptibles de produire un inoculum capable d'attaquer les plantes cultivées saines placées dans un substrat sain. En vue de limiter ces sources, plusieurs méthodes préventives peuvent être utilisées notamment la destruction par le feu des débris végétaux infectés ou leur enfouissement dans le sol (ACIL et MECHARA, 1999).

4. La lutte génétique

Les premiers travaux dans ce domaine remontent au début des années 90 chez la pomme de terre et la tomate. Les gènes utilisés sont des gènes qui codent pour des enzymes impliqués dans la dégradation des parois cellulaires des champignons : la chitinase et la glucanase (RIOUX et VOLDENG, 1999).

Etant donné que la majorité des résistances génétiques des plantes ne dépend que de quelques gènes. Bien que la transgénèse semble tout indiquée pour développer des plantes résistantes aux maladies, toute fois, ce n'est qu'avec une meilleure compréhension des différents mécanismes impliqués en pathogènes et l'isolement de gènes de résistances des plantes que nous pouvons réaliser de réelles progrès dans le développement de plantes résistantes aux maladies que ce soit à l'aide de la transgénèse ou autre méthodes (RIOUX et VOLDENG, 1999).

Tableau VII : Quelques agents et produits commercialisés dans le monde, pour la lutte biologique contre les agents phytopathogènes (DERAVEL *et al.*, 2013).

Catégories		Types	Organismes	Produits commercialisés	Cibles
Microbiens	Bactéries	Fongicide	<i>Bacillus subtilis</i>	HiStick®	<i>Fusarium</i> , <i>Aspergillus</i>
		Insecticide	<i>Bacillus thuringiensis</i>	Rona Eco®	Chenille, larves de lépidoptères
	Virus	Insecticide	<i>Cydia pomonella</i> <i>granulosis virus</i>	Carpovirusine®	Carpocapse (<i>Cydia pomonella</i>)
		Larvicide	<i>Helicoverpa zea</i> HzSNPV	Gemstar®	<i>Heliothis</i> et <i>Helicoverpa</i> larvæ
	Champignons	Fongicide	<i>Coniothyrium constans</i>	Constans® WG	<i>Sclerotinia</i> spp.
		Nématicide	<i>Paecilomyces lilacinus</i>	BioAct® WG	<i>Meloidgyne</i> spp. <i>Rodopholus similis</i> .
Végétaux	Extraits végétaux	Insecticide	<i>Quassia amara</i>	Quassam®	<i>Hoplocampa testudinea</i>
			<i>Brassica napus</i>	VegOil®	Pucerons et acariens
Animaux	Insectes	Insecticide	Coccinelle	Adalineb®	Pucerons
	Nématodes	Anti limace	Nématothodes entomopathogènes	Bioslug®	<i>Deroceca reticulatum</i>



***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 février au mois de Juin de l'année 2016.

1. Matériel

1.1. Les souches fongiques

Les souches fongiques utilisées dans cette étude appartiennent à trois espèces de moisissures : *Aspergillus niger*, *Botrytis cinerea* et *Penicillium* sp. Le champignon *Botrytis cinerea* nous a été offert par notre promoteur Monsieur OUELHADJ, *Aspergillus niger* et *Penicillium* sp. ont été offerts par l'ingénieure de laboratoire pédagogique de microbiologie.

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 Triple-Sugar-Iron (TSI) : CondaPronadisa. Espagne
- Bouillon nitraté : Institut Pasteur. Algérie
- Bouillon nutritif : Institut Pasteur. Algérie

1.3 Solutions et réactifs

- Alcool : Sigma Aldrich. Allemagne
- Disque d'oxydase : BiochemChemopharma. Québec
- Disque d'ONPG : BiochemChemopharma. Québec
- 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
- Réactif NR1 : Sigma Aldrich. Allemagne Réactif
- NR2 : Sigma Aldrich. Allemagne
- Solution chlorure de sodium NaCl
- Poudre de Zinc
- Eau distillée
- Eau oxygénée (H₂O₂)

1.4 Appareillage

- Microscope optique : Hondwetzlar. Allemagne
- Etuve : BINDER. Allemagne
- Balance de précision : KERN 770. Allemagne
- Autoclave : WEBECO. Allemagne
- Bain Marie : MEMMERT. Allemagne
- Réfrigérateur : ENIEM. Algérie
- Agitateur à barreau magnétique non chauffant : GERHARDT. Allemagne
- Agitateur magnétique avec plaque chauffante : GERHARDT. Allemagne
- Spectrophotomètre: Vis-7220G. Biotech Engineering. Management CO.LTD (UK)
- Compteur de colonies bactériennes

2. Méthode

2.1 Echantillonnage

Des échantillons de sable utilisés, durant l'expérimentation, ont été prélevés à partir d'une plage sablonneuse (**la grande plage**) de la région de TIGZIRT située à 40 Km au nord de TIZI OUZOU (figure 12). Des prélèvements ont été réalisés, dans divers endroits de la zone, où des échantillons de sable humide et sec ont été prélevés à une profondeur de 10 cm de la surface. Puis ces échantillons ont été mis dans des récipients stériles (figure 13).

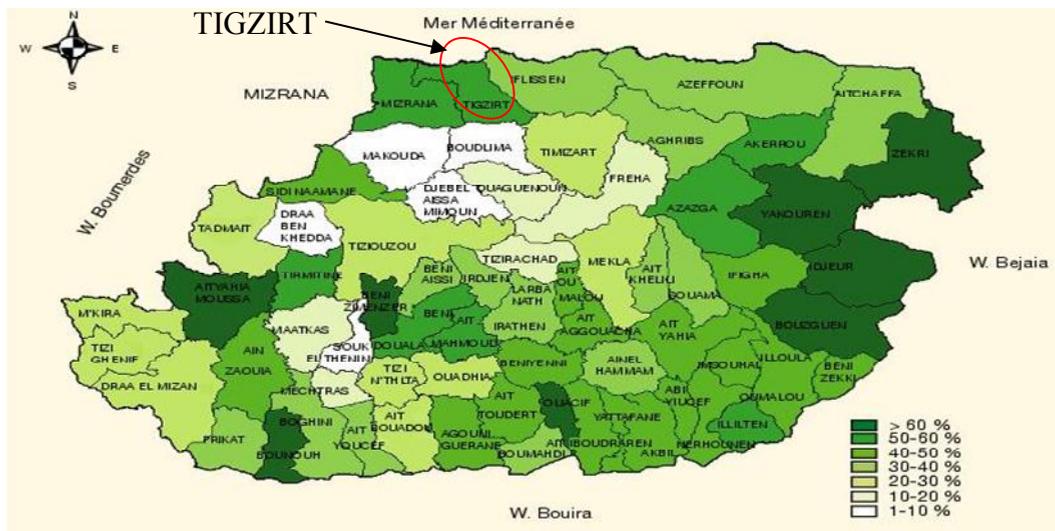


Figure 12 : Localisation géographique du site de prélèvement de sable (Google maps).



Figure 13 : Zone de prélèvement des échantillons de sable et les échantillons prélevés

2.2. Suspension et dilution

Après avoir mélangé tous les échantillons de sable, sec et humide, dans un béccher stérile, 5g de sable est dilué dans 20 ml d'eau distillée stérile.

La suspension est ensuite homogénéisée avec un agitateur magnétique pendant 15 min, puis filtrée à l'aide d'une gaze stérile afin d'obtenir une solution mère comprise dans le filtrat.

Après cette filtration, 0,5 ml de la solution mère obtenue sont mis dans 5 ml de bouillon nutritif (BN) (réaliser quatre répétitions, donc avoir quatre tubes). Ensuite les quatre tubes ont été incubés à 30°C pendant 24heures.

Des dilutions décimales dans 9 ml d'eau physiologique ont été réalisées pour chacun des quatre tubes, après la fin d'incubation.

2.3. Isolement et purification des souches bactériennes

Les souches bactériennes ont été isolées et purifiées sur milieu gélose nutritive (GN).

2.3.1 Ensemencement

Un ensemencement en surface est réalisé sur GN dans des boîtes de pétri, à l'aide d'une anse à boucle (méthode des stries), pour chaque dilution.

Les boîtes sont ensuite incubées à 30°C pendant 48h.

2.3.2. Purification des souches bactériennes

Après avoir ensemencé et incubé, plusieurs colonies à différents aspects ont été obtenues. Chaque colonie d'aspect différent est ensemencée à part puis incubée à 30°C pendant 24h.

Des repiquages successifs des colonies sont réalisées par la technique des trois quadrants sur (GN) jusqu'à l'obtention des colonies homogènes et identiques sur toute la surface de la boîte.

2.3.3 Conservation des souches bactériennes

Après purification, les jeunes colonies bactériennes sont aseptiquement transférées et ensemencées dans des tubes à essai contenant de la gélose nutritive inclinée ensuite, incubés à 30°C pendant 24h puis conservés au réfrigérateur à 4°C.

2.4. Identification des souches bactériennes

L'identification comporte une série d'étape, se succédant le plus souvent dans un ordre déterminé, en se basant sur la détermination des caractères morphologiques et biochimiques.

2.4.1. Critères morphologiques

2.4.1.1. Observation macroscopique

L'aspect macroscopique des colonies est observé directement sur la gélose après purification sur une culture de 24h incubée à 30°C. Il permet de connaître la forme, le contour, le relief, la surface, la couleur et l'opacité.

2.4.1.2 Observation microscopique

L'étude microscopique, par l'intermédiaire de la coloration de Gram, permet d'examiner la forme, le mode d'association et le résultat de la coloration de Gram des bactéries, qui permet de distinguer deux grands groupes bactériens: les bactéries à Gram négatif se colorent en rose et les bactéries à Gram positif apparaissent violettes.

Une colonie bactérienne jeune prélevée de façon stérile avec une anse à boucle, été déposée sur une lame propre, porte objet de manière stérile, la lame est ensuite fixées à la chaleur. Le frottis préparé a été recouvert par le violet de Gentiane et laissé pendant une minute. L'eau a été ajoutée pour éliminer l'excès de colorant veillant à ne pas détacher le frottis. Puis ce dernier été recouvert de quelques gouttes de Lugol pendant 1 min, et rincé à l'eau. L'alcool 70% a été ajouté au frottis pendant 30 secondes. L'ajout de la safranine (fuchsine) a été effectué, après lavage, puis laissé pendant 1 minute. Enfin, un lavage à l'eau suivi d'un séchage à la chaleur (bec benzène) a été réalisé.

Après avoir recouvert le frottis d'huile à immersion, la lame a été mise sur une platine d'un microscope optique, puis l'objectif X100 choisi pour effectuer les observations (MADANI, 2003).

2.4.2. Critères biochimiques

Les tests biochimiques constituent une approche classique pour l'identification des bactéries, et la détermination de certaines espèces, ainsi que de la mise en évidence de certaines caractéristiques du métabolisme des bactéries isolées (GOSZCZYNSKA *et al.*, 2000).

2.4.2.1. Étude de la voie d'attaque des glucides (MEVAG) et l'étude du type respiratoire sur milieu MEVAG

Selon MENDACI et MIHOUBI (2015), Le milieu MEVAG permet de déterminer la voie d'attaque des glucides, qui peut être catalysées par voie respiratoire ou par voie fermentaire. La dégradation d'un glucide s'accompagne généralement d'une acidification du milieu.

Cette technique de détermination consiste à ensemencer 2 tubes contenant le milieu MEVAG à l'aide d'une anse a fil droit par une simple piqure centrale, à partir d'une culture bactérienne de 24 h , l'un des tubes sera recouvert d'une couche d'huile de vaseline d'environ 1 à 1,5 cm d'épaisseur et sera bien fermé ; et l'autre tube sera moins fermer on relâchant le

couvercle (sans huile de vaseline) , la lecture se fait après 24h d'incubation à 37°C. A partir de cette lecture on peut distinguer :

- La Voie d'Attaque des Glucides :

-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.

-bactéries à métabolisme à la fois oxydatif et fermentatif : virage au jaune des deux tubes (avec et sans huile de vaseline).

- Le type respiratoire

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

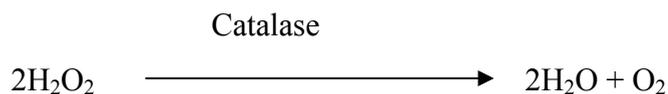
-Anaérobie stricte : développement des bactéries dans les tubes avec l'huile de vaseline.

-Aéro-anaérobie facultatif : développement bactérien dans les deux tubes (avec ou sans huile de vaseline).

2.4.2.2. Etude des enzymes respiratoires

➤ La réaction de la catalase selon DENIS et GARNIER (2007)

La catalase est une enzyme utilisée par les micro-organismes aérobies pour se protéger de peroxyde d'hydrogène. C'est une enzyme qui dégrade l'eau oxygénée (peroxyde d'hydrogène) en eau et en oxygène moléculaire selon la réaction suivante :



Une réaction positive de la présence du catalase se manifeste par la production des bulles d'oxygène (gaz), après mélange d'une colonie bactérienne jeune de 24h avec quelques gouttes d'eau oxygénée à 10 volumes.

Si y a absence de catalase, y'aura pas production du gaz, donc la réaction est négative.

➤ Recherche de l'oxydase

Ce test permet la détection de la phénylène-diamine-oxydase ou le cytochrome oxydase ; enzyme entrant dans divers couples d'oxydoréduction. Agissant sur un substrat incolore, cet

enzyme entraîne la formation d'une semi-quinone (anneau) rouge. Cette dernière, très instable, s'oxyde rapidement pour donner un composé noirâtre.

Pour réaliser ce test, un disque d'oxydase contenant de l'oxalate N-diméthylparanitrophénylène-diamine, qui aura été préalablement imbibé d'une goutte d'eau distillée stérile est déposé sur une lame et mis en contact avec une colonie bactérienne fraîchement cultivée. L'apparition d'une coloration violette immédiatement indique que le test est positif (SINGLETON, 1999). Le disque demeure incolore au bout de quelques secondes la bactérie est alors oxydase négative (KOVACS, 1956).

➤ **Recherche du nitrate réductase (TORTORA *et al.*, 2003)**

L'étude de la réduction des nitrates se fait par la mise en évidence des nitrites formés. Ces derniers en milieu acétique ou sulfurique, donnent une coloration rose. L'enzyme nitrate réductase B catalyse la réduction des nitrates en nitrites (réduction assimilatrice). Les nitrates peuvent aller également jusqu'au stade azote (N₂).

A une culture de 24h d'incubation à 37°C en bouillon nitraté, quatre gouttes de réactif NR1 et quatre gouttes de réactif NR2 sont ajoutés. Après agitation, la lecture est immédiate. Plusieurs cas de figures peuvent se présenter:

- Lorsque la coloration est rose ou rouge ; les nitrates sont réduits en nitrites, on parle de nitrate réductase positive (NR+).
- Lorsque le milieu reste incolore ; de la poudre de zinc est ajouté (réducteurs des nitrates) ; après cinq minutes les tubes sont de nouveau observés :
- Si le milieu devient rose ou rouge, il reste des nitrates, donc ces derniers n'ont pas été réduits par la bactérie: nitrate réductase négative (NR-).
- Si le milieu reste incolore, il ne reste plus de nitrates, les bactéries les ont réduit au-delà du stade nitrites: nitrate réductase positive (NR+).

2.4.2.3. Le test de Citrate de SIMMONS :

On ensemence ce milieu (gélose inclinée), sur la pente par strie longitudinale, à partir d'une colonie bactérienne de 24h prélevée sur milieu gélosé (SOLBI, 2013).

Le but de ce test est de savoir si la bactérie utilise le citrate comme source de carbone. La transformation du triacide (acide citrique) en diacide par décarboxylation oxydative donne

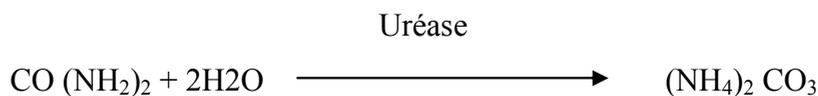
élévation du pH (alcalinisation) qui se traduit par un virage de couleur, de verre au bleu (BOUAMER et GUERBATI, 2007).

2.4.2.4. Etudes des réactions cataboliques

➤ Métabolisme des protéides

➤ Recherche de l'uréase (BOUAMER et GUERBATI, 2007)

Ce test consiste à inoculer dans le milieu urée indole (UI) des colonies bactériennes identiques, suite à une incubation de 18 heures à 37°C, la révélation de la présence de l'uréase se traduit par une alcalinisation du milieu qui est due à la transformation de l'urée en carbonate d'ammonium, selon la réaction c'est après, d'où une coloration rose rouge est apparue.



➤ Recherche d'indole (JOFFIN et LEYRAL, 2006)

Certaines dégradent le tryptophane bactéries en indole grâce à une enzyme «tryptophanase». Dans une eau peptonée exempte d'indole (riche en tryptophane) des colonies bactériennes sont inoculées puis incubé 24 heures à 37°C.

Après 24h, l'addition de 5 gouttes de réactif de Kovacs montre une apparition, soit d'un anneau rouge en surface du milieu si y a production d'indole, ou bien d'un anneau brunâtre si y a pas production d'indole.

➤ Recherche du tryptophane désaminase (TDA) (MENDACI et MIHOUBI, 2015)

La désaminase agit sur le L-tryptophane en donnant l'acide pyruvique. Ce dernier donne avec le perchlorure de fer (FeCl₃) une coloration brune.

A partir d'une culture bactérienne de 24h, un ensemencement d'une colonie sur milieu urée-indo a été effectué, puis incubé pendant 24h à 37°C.

Après 24h, 2 à 3 gouttes de perchlorure de fer ont été ajoutés dans le milieu.

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

- Résultat TDA- : coloration jaune orangé.

➤ **Métabolisme des glucides**

➤ **Etude de la fermentation des glucides**

La voie d'utilisation des sucres permet de mettre en évidence d'une part, la fermentation du glucose (avec ou sans dégagement de gaz), du lactose, du saccharose et d'autre part, la production de Sulfure d'Hydrogène (H₂S) (MARCHAL et BOURDON, 1982).

Une colonie bactérienne de 24 h a été ensemencée à l'aide d'une anse sur le milieu Triple Sugar Iron (TSI) (gélose inclinée) par des stries sur la pente et par une piqure centrale au culot. l'incubation a été fait à 37°C pendant 24 h.

Les résultats peuvent être selon AMARA et KHALDI (2015) et TAAL (2016), comme suit :

- 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 :

La présence d'une ou plusieurs poches de gaz qui fait décoller la gélose au fond du tube.

- Formation d'hydrogène sulfureux (H₂S)

Un noircissement au milieu du tube (entre la pente et le culot), signifie une production de sulfure d'hydrogène (H₂S).

➤ **Etude de la fermentation du mannitol (TAALE, 2016)**

Le milieu "Mannitol Mobility Test" se présente sous forme de gélose molle contenant du mannitol, du rouge de phénol et des nitrates. Le milieu a été ensemencé par piqure centrale unique, ce qui permet d'apprécier en plus de l'utilisation du mannitol, la mobilité du germe.

-Si le milieu prend une coloration jaune : la bactérie utilise le mannitol.

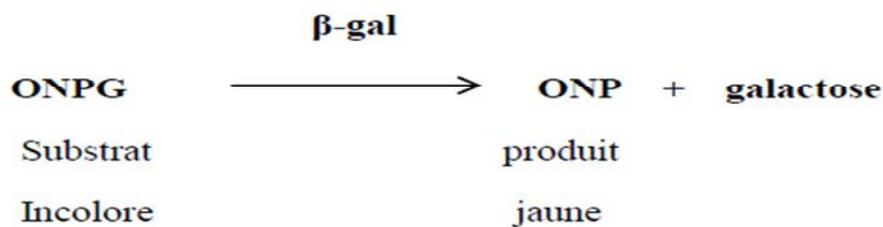
-Si le milieu reste rouge : la bactérie ne métabolisme pas le mannitol.

-Si les bactéries sont mobiles, elles se dispersent à partir de la piqure d'ensemencement créant un trouble dans le milieu, dans le cas contraire la bactérie est alors immobile.

➤ **Recherche de la β -galactosidase (DELARRAS, 2007)**

Le test est pratiqué en réalisant une suspension dense de la bactérie testée dans de l'eau physiologique stérile, puis à l'aide d'une pince flambée et refroidie un disque imprégné d'ONPG ajouté. Incuber à 37°C pendant 24 h. La lecture se fait après 15 min, 30 min, 1 heure, 6 heures, 24 heures.

La présence d'une bêta-galactosidase se traduit par la libération de l'orthophényle soluble de couleur jaune qui apparaît après la durée d'incubation selon la réaction suivante :



2.5. Confrontation du champignon et de la bactérie en boîte de Pétri

2.5.1. Préparation de l'inoculum

A partir des cultures jeunes de bactéries datées de 18h à 24h, et de champignons incubées pendant 4 à 5 jours, le test antifongique a été réalisé.

Ensemencer les souches bactériennes dans des boîtes de Petri contenant de la gélose nutritive et les incuber pendant 24h à 30°C, et les champignons dans des boîtes contenant le milieu sabouraud puis les incuber à 30°C pendant 4 à 5 jours.

2.5.2. Préparation de la suspension bactérienne

A partir des cultures jeunes de bactéries et de champignon, un prélèvement de quelques colonies a été réalisé, ensuite elles ont été inoculées dans des tubes contenant de l'eau physiologique stérile, suivi d'une petite agitation.

Les suspensions obtenues sont ensuite standardisées à 10^6 UFC/ml, et cela été à l'aide d'un spectrophotomètre à une longueur d'onde de 620 nm pour les bactéries, et à l'aide d'une cellule de MALASEZ observée sous microscope photonique pour les champignons. (Une DO comprise entre 0,08 et 0,1 correspond à une concentration de 10^7 à 10^8 germes/ml.).

2.5.3. Test d'activité antifongique (confrontation direct *in vitro*)

Ce test consiste à mettre en contact les souches bactériennes extraites à partir du sable avec les champignons phytopathogènes, et cela par la méthode de disques de gélose.

Cette méthodes est faite dans des boites de Petri contenant le milieu sabouraud, sur lequel un disque fongique de 7 mm de diamètre, provenant d'une culture de 4 à 5 jours, a été déposé dans le centre de la boite, qui sera entouré ensuite avec trois disques bactériens, prévenants d'une culture de 24h, à une distance de 2 cm.

En même temps, des témoins sont été préparés, afin de comparer les résultats :

-un témoin positif qui contient un disque fongique au centre d'une boite de Petri contenant le milieu sabouraud additionné d'un anti fongique (l'amfotricine B). (Absence de disques bactériens).

-un témoin négatif qui contient un seul disque fongique au centre d'une boite de sabouraud.

Cette préparation a été incubée à 30°C pendant 7 jours, le temps de développement maximal des champignons (témoin négative bien développé). Des lectures successives chaque deux jour ont été faites pendant tous les 7 jours d'incubation.

A la fin de l'incubation la lecture finale a été portée sur l'estimation d'existence ou d'absence d'une zone d'inhibition de la croissance mycélienne. Et cette estimation est basée sur une mesure du diamètre moyen de la colonie fongique entourée des disques bactériens, qui sera comparer ensuite au diamètre du témoin négatif, selon l'équation suivante :

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

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

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

De (mm) : diamètre de la croissance fongique dans la boite

2.6. Recherche d'une substance inhibitrice volatile

Afin de déterminer l'existence d'une ou plusieurs substances inhibitrices de la croissance mycélienne volatiles, ce test a été réalisé par une méthode qui consiste à ensemencher la souche bactérienne sur le couvercle de la boite contenant le milieu MH, et déposer un disque fongique au centre du fond de la boite qui contient le milieu Sabouraud,

ensuite les témoins positif et négatif sont préparés, avec la même méthode utilisé pour le test d'activités antifongiques.

2.7. Test d'antagonisme *in vivo*

Afin de mettre en évidence les résultats des tests antifongiques et le test de la Recherche d'une substance inhibitrice volatile effectuées *in vitro*, et dans le but de confirmer les résultats obtenus, ces tests ont été refaits sur un fruit susceptible d'être attaqué par les champignons phytopathogènes, qui est la courgette.

2.7.1. Préparation des fruits de courgette

Seize courgettes de même taille, de même forme, et de même poids, ont été achetées au marché local de Tizi-Ouzou. Un essuyage avec un sopalin pour éliminer les saprophytes, puis les courgettes ont été mises dans des récipients propres.



Figure 14 : Photo de courgettes utilisées après essuyage

2.7.2. Les étapes suivies pour les tests

- **Préparation des témoins**

- Témoins négatifs : quatre courgettes préalablement blessées à l'aide d'un bistouri sont placées dans deux récipients à raison de deux courgettes par récipient.
- Témoin positif : quatre autres courgettes ont été incisées et contaminées par *Botrytis cinerea* provenant d'une culture de cinq jours, placées dans deux récipients à raison de deux courgettes par récipients

- **tests antifongiques (direct)**

Quatre nouvelles courgettes incisées et contaminées par *Botrytis cinerea*, sont pulvérisées, à l'aide d'une seringue, avec 5 ml de la suspension bactérienne standardisée



Figure 15 : préparation des courgettes pour le test antifongique in vivo. A : témoins négatifs ; B : Courgette contaminée par *Botrytis cinerea* ; C : Courgette contaminée par *Botrytis cinerea* puis pulvérisée par la suspension bactérienne.

- **Recherche d'une substance inhibitrice volatile**

Quatre autres courgettes ont été contaminées par *Botrytis cinerea*, ensuite chaque deux courgette sont placées dans un récipient contenant des disques de la bactérie provenant d'une culture, standardisée, de 24h.

Les huit récipients contenant seize courgettes ont été bien fermés et laissés à température ambiante. Les observations ont portées sur, la comparaison des différentes courgettes, sur la présence ou l'absence de la croissance mycélienne, au niveau des courgettes pulvérisées, celles qui ont été contaminées avec *Botrytis cinerea*, et les témoins négatifs, pendant 21 jours.



Figure 16 : Courgettes mises dans des récipients propres.



Figure 17 : Courgettes contaminées par *botrytis cinerea*, placées dans un récipient en présence de disques bactériens.

2.8. Croissance des bactéries isolées à différentes concentrations de NaCl

La croissance d'une souche bactérienne isolée à partir du sable, en présence de concentrations croissante en chlorure de sodium a été évaluée sur milieu MH additionné de 5g/l, 10g/let 25 g/l d'NaCl puis incubée à 30°C pendant 48h.

Le dénombrement des colonies bactériennes apparues a été effectué après la fin de l'incubation.

3. Analyse statistique

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 ils présentent des différences significatives. S'il existe une différence significative, le test complémentaire de Newman-Keuls sera réalisé afin d'établir les différents groupes homogènes. Le niveau de signification était de 5 %



***Résultats
et discussion***

1. Isolement et identification des souches bactériennes

Quatre (4) souches bactérienne pures sont obtenues, proviennent du sable de plage, Celles-ci ont été sélectionnées en tenant compte de leurs caractéristiques macroscopiques.

1.1. Critères morphologiques

1.1.1. Examen macroscopique

L'observation de cultures bactériennes sur boîtes de pétri (Figure 18) à l'œil nu a été effectué, pour déterminer la forme, la couleur, l'opacité, le contour, le relief ainsi que la surface des colonies (Tableau VIII).

Tableau VIII : Résultats de l'observation macroscopique des souches bactériennes isolées à partir du sable sur milieu GN à 30°C pendant 24h.

Bactéries	Forme	Contour	Relief	Surface	Couleur	Opacité
Souche 1	Ronde	Régulier	Convexe	Lisse	Crémeuse	Opaque
Souche 2	Ronde	Régulier	Plate	Lisse	Orange	Opaque
Souche 3	Ronde	Irrégulier	Plate	Rugueuse	Blanche	Translucide
Souche 4	Ronde	Régulier	Convexe	lisse	Transparente à reflet crème	Translucide

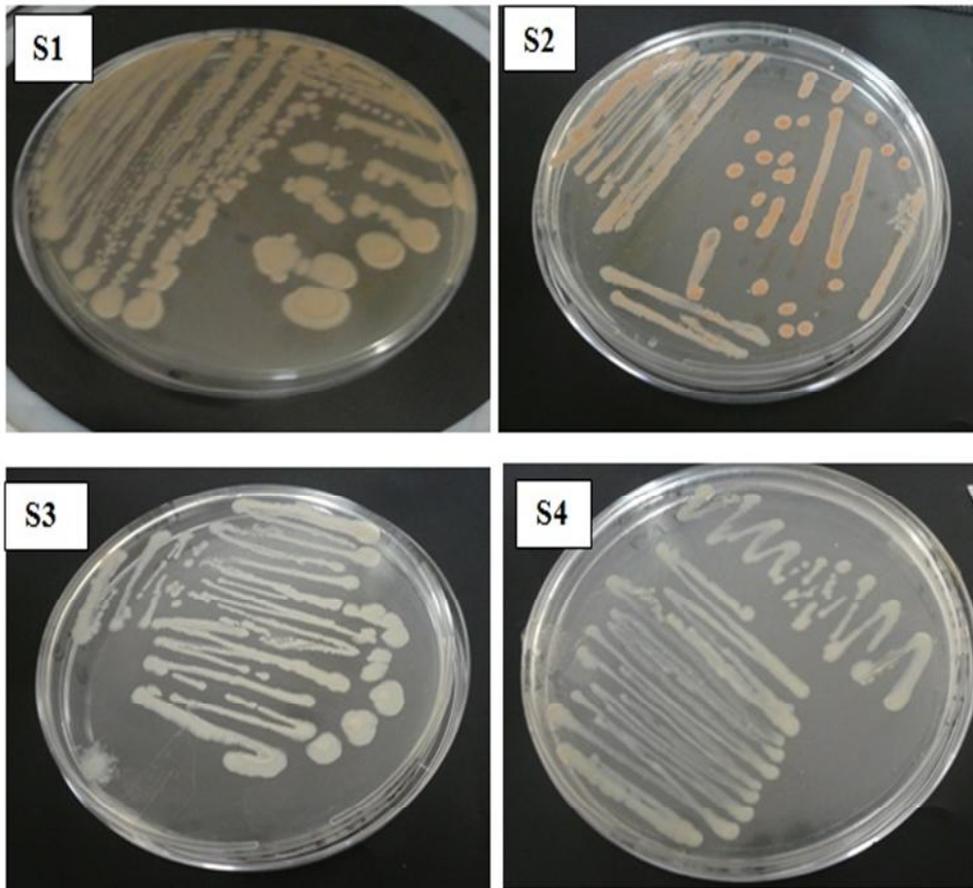
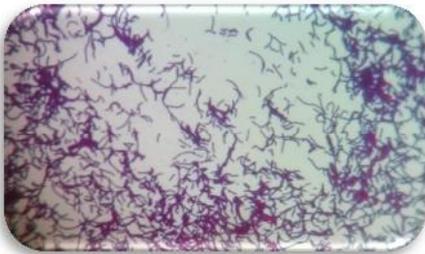
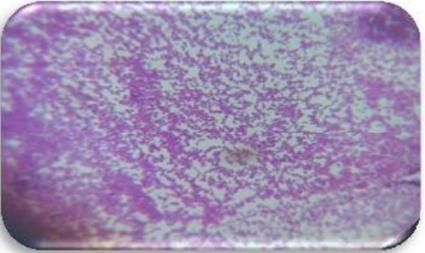
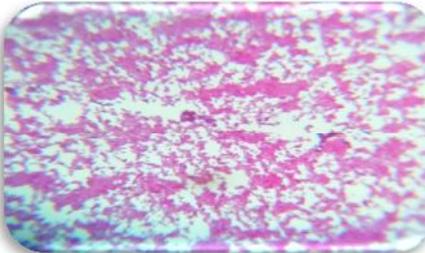


Figure 18 : Aspect de souches bactériennes pures sur milieu GN.

1.1.2. Examen microscopique

La coloration de Gram a révélé des bactéries Gram négatifs et des bactéries Gram positif apparaissent sous différentes formes avec différentes mode d'associations. L'observation a montré que les souches isolées sont des cocci, coccobacilles, et des bacilles, dont 3 souches bactériennes sont à Gram positive et la quatrième souche bactérienne est à Gram négative. Les résultats obtenus sont présentées dans le tableau IX.

Tableau IX : Résultats de l'examen microscopiques des souches bactériennes isolées à partir du sable de mer.

Souches	Coloration de Gram			
	Forme	Gram	Agencement	Aspect microscopique
Souche 1	Bacille	Positif	En chainettes	
Souche 2	Cocci	Positif	En chainettes ; En amas ; En grappes	
Souche 3	Bacille	Positif	En chainettes	
Souche 4	Coccobacille	Négatif	En amas ; Isolées ; En chainette	

1.2. Critères biochimiques

L'identification présomptive des bactéries a été effectuée en comparant nos résultats avec ceux relevés sur des références de systématiques bactériennes et le résumé des résultats obtenus sont mentionné dans le tableau X.

D'après ces résultats, l'identification a révélé 3 genres bactériens, extrais à partir de sable de la plage de TIGZIRT.

La souche S1 et la souche S3 appartenant toutes les deux au genre *Bacillus* selon les clefs d'identification décrite par LEYRA *et al.* (1998), dont les espèces restent indéterminée (*Bacillus* sp1 et *Bacillus* sp.2). Leurs caractères biochimique sont presque les même, sauf que la souche *Bacillus* sp1 a donné une réaction positive avec le test de TDA. Cela s'explique par la présence de l'enzyme tryptophane-désaminase. Par contre la souche *Bacillus* sp2 a donné une réaction négative avec ce test et cela veut dire que cette souche ne possède pas la tryptophane-désaminase. En plus de cette différence, la souche *Bacillus* sp2 fermente les sucre avec production de gaz alors que *Bacillus* sp1 ne le produit pas.

Revenant à la souche S2, les résultats obtenus après la galerie effectuée montrent selon BAKHOUM (2004) que la souche appartient au genre *Staphylococcus* qui se caractérise par sa capacité de réduire le nitrate en nitrite sous l'action du nitrate réductase produites par ce genre bactérien. C'est une souche qui est aéro-anaérobie facultative capable de fermenter le glucose ainsi que les autres sucres en présence de l'enzyme β galactosidase et elle possède aussi l'enzyme TDA qui la rend capable de dégrader le L-tryptophane.

Parmi ces quatre souches isolées à partir du sable la souche S4 appartient à la famille des Enterobacteriaceae, du genre *Pantoea* identifiée par LEYRA *et al.* (1998) et CHERIF (2014). C'est une souche a catalase+, oxydase-, capable de réduire le nitrate en nitrite (NR+), anaérobie facultative, fermente le glucose sans production de gaz, métabolisant les sucre par voie oxydative et fermentative, et incapable de synthétiser la TDA.

Tableau X : Identification biochimiques des souches isolées

Souches		Souche 1	Souche 2	Souche 3	Souche 4
Tests					
Gram		G ⁺	G ⁺	G ⁺	G ⁻
Oxydase		-	-	-	-
Catalase		+	+	+	+
ONPG		-	+	-	-
Mannitol mobilité		+	+	+	+
Citrate		-	-	-	-
Uréase		-	-	-	-
INDOL		-	-	-	-
TDA		+	+	-	-
NR		+	+	+	+
H ₂ S		-	-	-	-
Production de Gaz		-	-	+	-
Type respiratoire		AS	AAF	AS	AF
Métabolisme des glucides		OF	F	OF	OF
Fermentation des sucres	Glucose	+	+	+	-
	Saccharose	+	+	+	+
	Lactose	+	+	+	+
Identification		<i>Bacillus</i> sp.1	<i>Staphylococcus</i>	<i>Bacillus</i> sp.2	<i>Pantoea</i>

AS: Aérobie

AF: Anaérobie facultatif

AAF: aéro-anaérobie facultatif

O: Oxydatif

F : Fermentatif

OF : Oxydatif et fermentatif

2. Confrontation du champignon et de la bactérie en boîte de Pétri

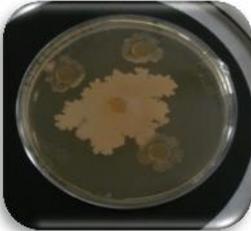
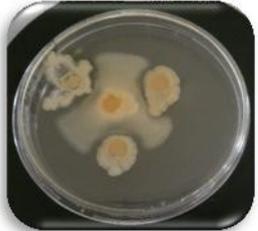
Ce test consiste à mettre en évidence le pouvoir antagoniste des quatre souches bactériennes extraites à partir de sable de mère (donc espèces halophiles) vis-à-vis des champignons phytopathogènes après 7 jours d'incubation.

Après avoir effectué le test, les résultats ont montré que toutes les quatre souches isolées présentes un effet antagoniste vis-à-vis *Aspergillus niger*, *Botrytis cinerea* et *Penicillium* sp. (Tableau XII) et cela avec un taux d'inhibition qui varie entre 20,00% et 75,00%, dont le taux le plus élevé est observé chez la souche *Bacillus* sp.2 vis-à-vis *Penicillium* sp. et chez la même souche bactérienne on a observé le taux d'inhibition le plus faible et cela vis-à-vis un autre champignon qui est *Aspergillus niger*.

Le genre *Penicillium* sp. et *Botrytis cinerea* peut être inhibé, par les quatre souches isolées, avec des taux d'inhibition très élevées qui dépassent les 50,00%, où on trouve que *Bacillus* sp.1 et *Staphylococcus* inhibent, avec un taux très élevé qui est de 51,17% avec *Bacillus* sp.1 et 64,70% avec *staphylococcus*, la croissance de *Botrytis cinerea* en comparant les résultats à celles trouvées vis-à-vis *Penicillium* sp. (49,41% avec *Bacillus* sp.1 et 50,00 % avec *Staphylococcus*).

En analysant les résultats obtenus vis-à-vis *Aspergillus niger* on peut déduire que ce champignon est le plus résistant par rapport aux deux autres souches fongiques, car les pourcentages d'inhibitions obtenus sont moins importants avec la plupart des souches bactériennes. Et dans ce cas de figure on voit que les deux souches appartenant au genre *Bacillus* présentent l'effet antagoniste le moins important vis-à-vis *Aspergillus niger*, on les compare aux deux autres souches bactériennes.

Tableau XI : Résultats de développement mycélien des champignons, après le test de confrontation direct avec les bactéries sur boîtes de pétri, à 30°C pendant 7 jours d'incubation.

Champignons Bactéries	<i>Penicilium</i> sp.	<i>Botrytis cinerea</i>	<i>Aspergillus niger</i>
Témoin positif			
Témoin négatif			
<i>Bacillus</i> sp.1			
<i>Staphylococcus</i>			
<i>Bacillus</i> sp.2			
<i>Pantoea</i>			

D'après les résultats obtenus on dit que toutes les souches extraites à partir de sable de mer présente un effet antagoniste vis-à-vis des champignons phytopathogènes différents.

On peut voir aussi, D'après le tableau XI, l'inhibition de la croissance mycélienne des trois champignons étudiés, où on observe les zones d'inhibitions entre les disques bactériens et cela grâce à la présence d'un effet antagoniste des souches extraites à partir du sable.

Les zones d'inhibition les plus importantes sont observées chez le champignon *Penicillium sp.* où la croissance mycélienne est faible surtout avec la souche *Bacillus sp.2.* et on observe aussi que le développement mycélien d'*Aspergillus niger* est plus important, en le comparant aux autres souches fongiques.

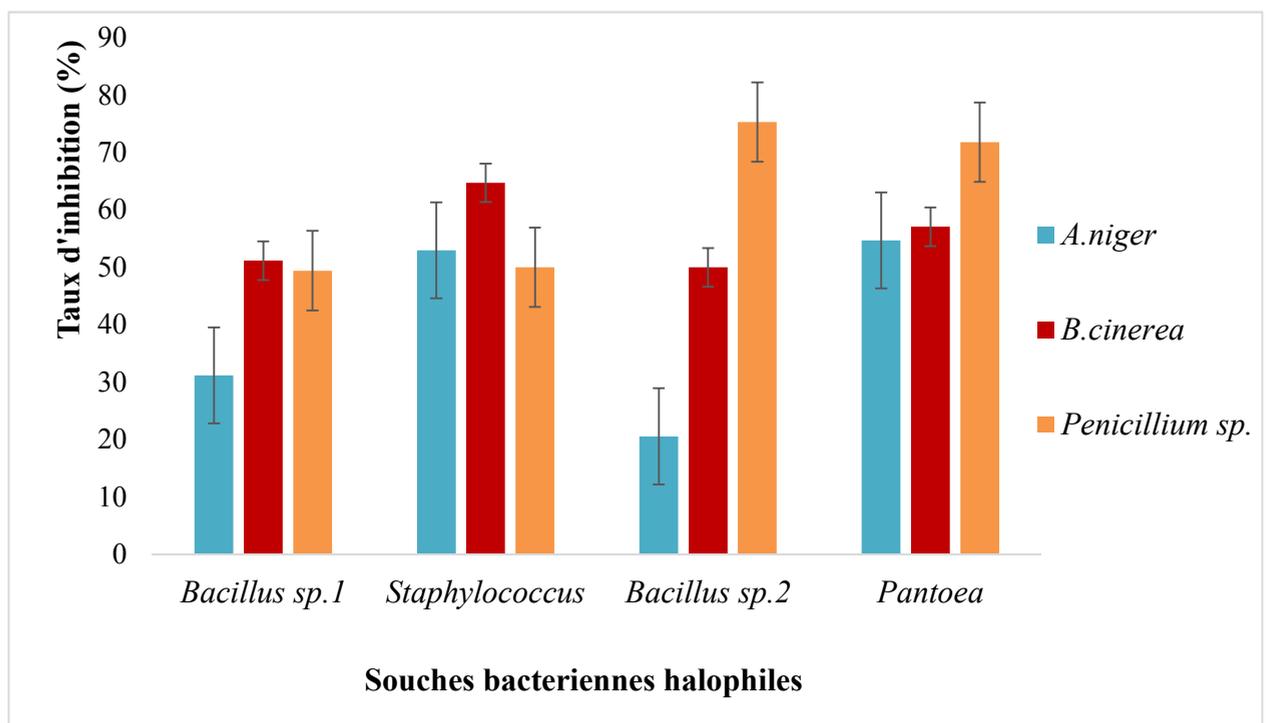


Figure 19 : Histogramme représentatif des taux d'inhibition de la croissance mycélienne en confrontation directe entre les souches fongiques et les souches bactériennes.

D'après cet histogramme, on peut bien déterminer la différence entre les niveaux d'inhibition de la croissance fongique par les différentes souches halophiles extraites.

Les résultats de test statistique ANOVA nous révèlent que l'effet antagoniste des souches bactériennes désolées envers les trois champignons, ne présente pas une différence significative, où on trouve P value > 0,05 (Annexe 2, Tableau 1).

Après les résultats obtenus sur les deux souches appartenant au genres *Bacillus*, on peut dire que ce genre bactérien présente un effet antagoniste vis-à-vis les trois champignons phytopathogènes traités qui sont *Aspergillus niger*, *Botrytis cinerea* et *Penicillium* sp..

Plusieurs autres travaux ont rapportés que les espèces du genre *Bacillus* ont un effet antagoniste contre les champignons phytopathogènes par antibiose, compétition ou parasitisme direct. De plus, l'activité antagoniste se manifesterait par la dégradation de la paroi cellulaire du champignon pathogène par l'utilisation d'enzymes extracellulaires lytiques (BERRADA, 2012). On trouve aussi d'autres études montrant que des bactéries de ce genre ont été signalées pour leur efficacité dans le contrôle de *B. cinerea* (AJOUZ, 2009), où l'antibiotique gramicidine S secrété par l'agent de protection biologique *Brevibacillus brevis* inhibe par exemple la germination et la croissance mycélienne de ce champignon selon HAGGAG (2008).

Ainsi que BARRADA (2012) a pu identifier des espèces de genre *Bacillus* et *staphylococcus* halophiles, il a étudié l'activité antifongique de *Bacillus* vis-à-vis *Botrytis cinerea*, et les résultats obtenus montre l'existence d'un taux d'inhibition supérieur à 50,00%. En outre des études ont montrées que des espèces du genre *Bacillus* isolées du sol salé avait une activité antifongique contre *Botrytis cinerea* (ZAO *et al.*, 2003 ; SADFI-ZOUAOUI *et al.*, 2008), et c'est les mêmes résultats que notre test de confrontation *in vitro*.

BARRADA (2012) a pu isoler Trois souches de *Bacillus* (B655, B579 et B597 identifiés comme *Bacillus oceanisediminis*, *Bacillus niabensis* et *Bacillus aquimaris* respectivement) qui sont incapable de dégrader la chitine et le glucane mais ils présentent une activité antifongique diffusible contre le *Botrytis cinerea* (avec une inhibition partielle de plus de 80%). Par contre L'isolat B656 identifié comme *Bacillus aquimaris* a pu être déterminé comme une souche, capable de dégrader la chitine colloïdale et le β -1,3-glucane et présente une activité antifongique diffusible *in vitro* contre *Botrytis cinerea*.

En plus de ces études, SOBIA *et al.* (2010) ont rapporté que la souche *Bacillus faragiris* joue un rôle important dans le biocontrôle de la croissance d'*Aspergillus niger* où elle inhibe le développement mycélien de ce dernier avec un pourcentage de 77,00%, en plus de ça, elle est capable d'inhiber la croissance de plusieurs souches fongiques appartenant au genre *Penicillium* avec un taux d'inhibition de 76,00%. En comparant ces résultats aux résultats obtenus lors de notre expérimentation, on trouve que la souche *Bacillus* sp.2 a la même efficacité, que la souche *B. faragiris*, vis-à-vis *Penicilium* sp.. Par contre la souche *Bacillus* sp.1 semble moins efficace vis-à-vis *Aspergillus niger* et *Penicillium* sp..

En ce qui concerne le genre *Panteoa*, KOTAN *et al.* (2009) ont signalé que la souche *P. agglomerans* a la capacité d'inhiber la croissance de plusieurs espèces fongiques tel que *Botrytis cinerea*, *Penicillium expansum* et *Rhizopus stolonifer*, et cela par la production d'antibiotiques tel que pyrrolnitrine et l'herbicolin, qui confirme les résultats obtenu dans notre test de confrontation où on a obtenu un taux d'inhibition de 57,05% avec le genre *Panteoa* vis-à-vis *Botrytis cinerea*.

Ainsi, de nombreux antagonistes microbiens incluant les espèces bactériennes du genre *Bacillus*, *Pseudomonas* et *Enterobacter*, les actinomycètes tel que *Streptomyces* ont montré une activité de « biocontrôle » contre des agents phytopathogènes (LANGE *et al.*, 1993 ; EMMERT et HANDELSMAN, 1999), en outre les travaux de YANG *et al.* (2006) ont pu mettre en évidence l'effet de *Bacillus subtilis* sur le champignon *Alternaria alternata* qui est un champignon phytopathogène pouvant causer des problèmes respiratoires chez l'humain.

Contrairement aux résultats obtenus au cours de notre test effectué sur *Bacillus*, qui a révélé une activité un peu plus faible, les résultats de CHERIF (2014) ont montrés que *Aspergillus niger* est inhibé par 12 souches de *Bacillus* avec un des taux plus élevés.

3. Activité antifongique des bactéries par les composés volatils

Ce test a été effectué pour mettre en évidence l'existence de substances volatiles secrétées par les souches halophiles isolées, et les résultats de ce test ont montré les taux d'inhibition des trois champignons par ces souches bactériennes.

D'après ces résultats, on dit que toutes les quatre souches identifiées présentent des substances volatiles inhibitrices des champignons phytopathogènes, et cela en vue les pourcentages obtenus, qui sont presque supérieurs à 80,00%, sauf que les deux souches *Bacillus* sp.1 et *Staphylococcus* inhibent la croissance de *Penicillium* sp. avec des pourcentage de 62.35% et 55.88% respectivement, mais malgré cette diminution de pourcentage d'inhibition, ça reste que ce sont des résultats importants.

On distingue que l'inhibition des trois champignons phytopathogènes est plus importante avec les composés volatils secrétés par les souches bactériennes isolées. Est cela a été démontré par le développement mycélien observé sur les boites de pétri (Tableau XIII).

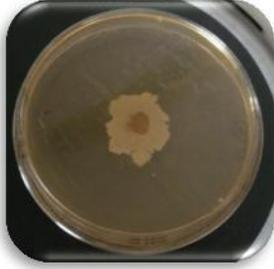
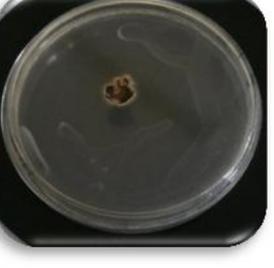
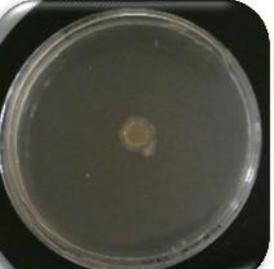
D'après les cultures obtenues, on peut observer que les zones de développement mycélien sont très réduites en présence de souches bactériennes en les comparants aux boites témoin où les souches bactériennes ne sont pasensemencées.

On voit aussi que le développement mycélien est présent juste au tour des disques fongiques, déposés sur les fonds des boites de pétri.

Dans le cas d'*Aspergillus niger* qui est incubé avec la souche appartenant au genre *staphylococcus*, on peut observer la zone d'inhibition la plus importante qui correspond au taux le plus élevé qui est de 88,20%.

Les niveaux d'inhibition fongiques sont vraiment importants et proches.

Tableau XIII: Résultats de l'effet inhibiteur des composés volatils des bactéries vis-à-vis des champignons testés.

Champignons Bactéries	<i>Penicilium</i> sp	<i>Botrytis cinerea</i>	<i>Aspergillus niger</i>
Témoin négatif			
<i>Bacillus</i> sp.1			
<i>Staphylococcus</i>			
<i>Bacillus</i> sp.2			
<i>Pantoea</i>			

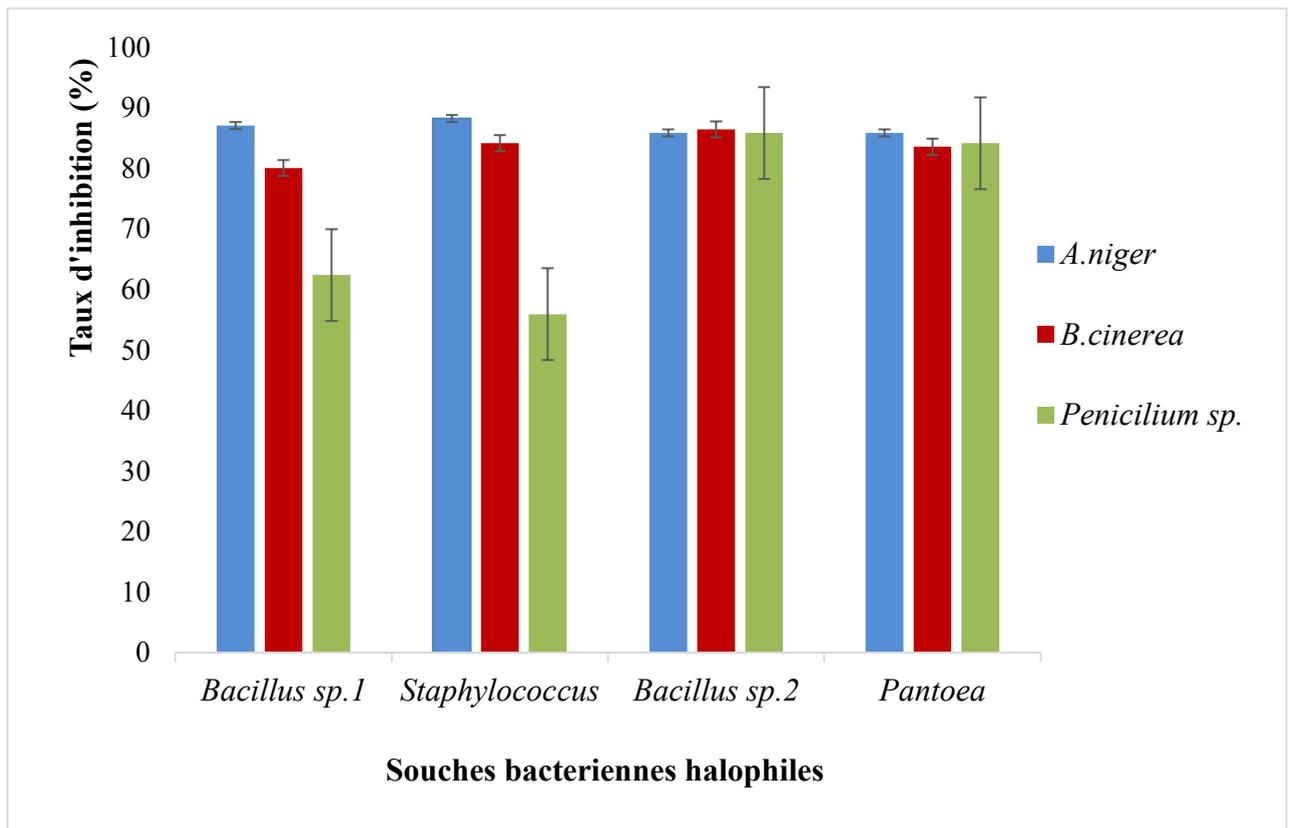


Figure 20 : Histogramme représentatif des taux d’inhibition de la croissance mycélienne des champignons par les composés volatils des bactéries testées.

Les résultats de test statistique ANOVA nous révèlent que l’effet des substances volatiles produites par les quatre souches testées ont le même effet sur les trois champignons phytopathogènes, et cela a été déduit à partir de la valeur de P value qui est supérieur à 0,05 ($P > 0,05$) (Annexe 2, Tableau 2).

L’inhibition de la croissance mycélienne a été classée selon l’échelle de KORSTEN et al. (1995), où il a défini cinq classes selon les taux d’inhibition obtenus :

Classe 0 —————> Pas d’inhibition de croissance

Classe 1 = 1% -25%
 Classe 2 = 26% -50%
 Classe 3 = 51% -76%
 Classe 4 = 76% - 100%

} inhibition de croissance

D'après la classification de KORSTEN *et al.* (1995) on trouve que l'inhibition de *Penicillium* sp. par les deux souches *Bacillus* sp.1 et *Staphylococcus* (62,35% et 55,88% respectivement) appartient à la classe 3.

Ainsi l'inhibition d'*Aspergillus niger* et *Botrytis cinerea* par chacune des quatre souches bactériennes (*Bacillus* sp.1, *Staphylococcus*, *Bacillus* sp.2 et *Pantoea*) et l'inhibition de *Penicillium* sp. par les deux souches *Bacillus* sp.1 et *Pantoea*, appartiennent à la classe 4 où on trouve l'inhibition maximale.

Une espèce halophile appartenant au genre *Bacillus*, identifiée comme *Bacillus safensis*, capable de dégrader la chitine colloïdales et le β -1.3-glucane, a été caractérisée comme antagoniste de *Botrytis cinerea*, *Alternaria alternata* et *Fusarium oxysporum* par l'intervention des substances volatils (BARRADA, 2012). Ce résultat concorde avec notre résultat obtenu avec les deux souches du genre *Bacillus* qui inhibent la croissance de *Botrytis cinerea* avec un taux de 80,00%.

Conformant à nos résultats, AJOUZ (2009) a aussi démontré que *Pantoea agglomerans* et *Bacillus* sp. présente une activité antifongique vis-à-vis plusieurs espèces de champignons, grâce à leur aptitude de sécrétion des sidérophores et de composés volatils tel que l'acide cyanhydrique (HCN) et l'ammoniac (BRIMECOMB *et al.*, 2001).

Des souches bactériennes ont été décrites par SADFI-ZOUAOUI *et al.*, 2007 et 2008 comme étant de bonnes candidates pour contrôler l'activité des champignons phytopathogènes et même recherchées pour leur production de substances antifongiques pouvant être aussi bien volatiles que diffusibles .

Certains *Bacillus* (B582 et B584) ont montré une activité antifongique *in vitro* par la production de composés volatils. A ce sujet, il a été reporté que les composés antifongiques volatils inhiberaient la germination des spores et agiraient sur la morphologie du mycélium (ARREBOLA *et al.*, 2010).

Nos résultats concernant les deux souches *Bacillus* (sp.1 et sp.2) corroborent avec ceux obtenus par ARREBOLA *et al.* (2010) dont les isolats B582, B584 et B659 appartenant au genre *Bacillus* ont montré une inhibition partielle (plus de 50%) vis-à-vis *B. cinerea* après 5 jours incubation.

4. Evaluation de l'activité antifongique *in vivo*

Après les tests effectués *in vitro*, un test sur *in vivo* a été réalisé afin de mettre en évidence le pouvoir antagoniste de *Staphylococcus*, par confrontation direct (Figure21) et par sécrétion des substances inhibitrices volatiles (Figure22), qui permet de lutter contre la pourriture grise causée par *Botrytis cinerea* qui est capable d'attaquer la courgette.

Les résultats de ce test semblent être positif, est cela a été confirmait par les observations effectuer au cours de l'incubation, qui a duré 21 jours, à température ambiante.

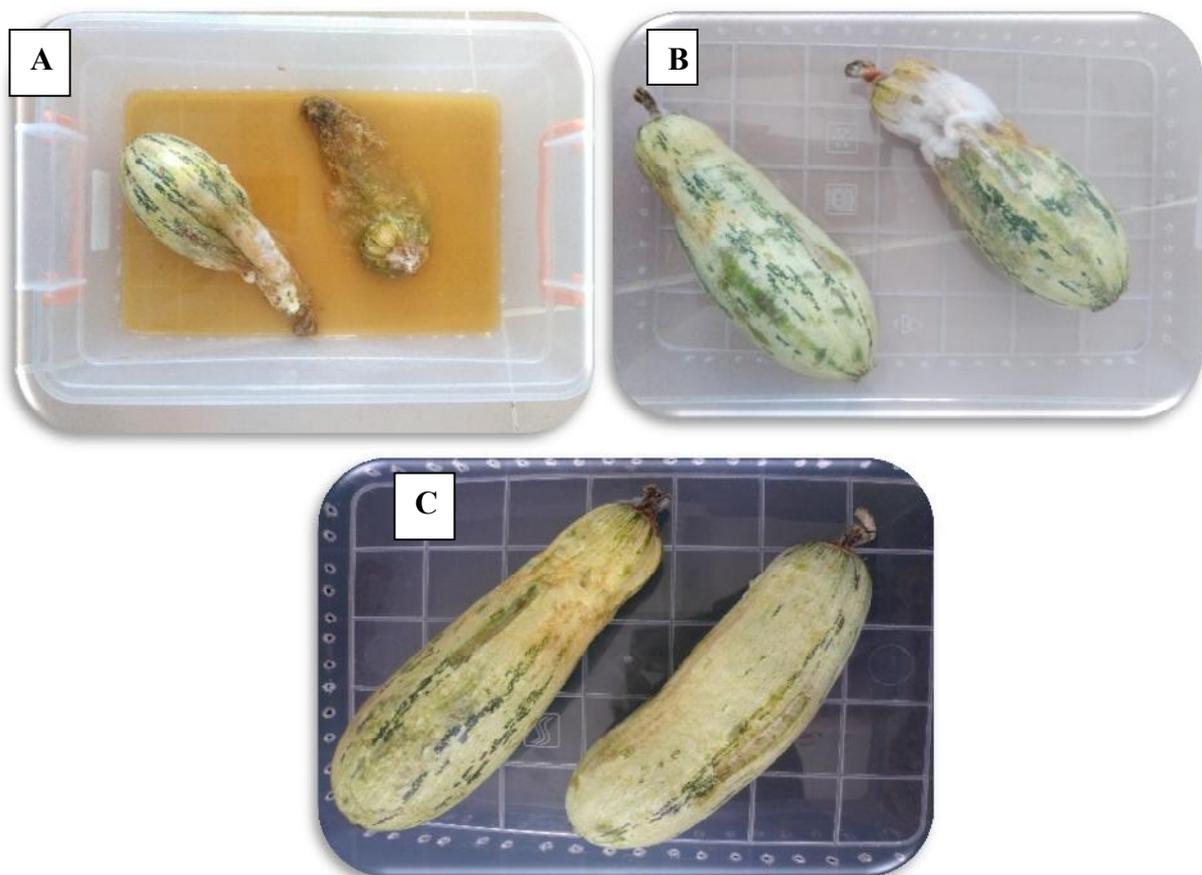


Figure 21: Résultats de test de confrontation direct effectué *in vivo* sur courgettes contaminées par *Botrytis cinerea* (A), et d'autres contaminées et pulvérisées par la suspension bactérienne de *Staphylococcus* (B), comparées aux témoins négatifs (C).

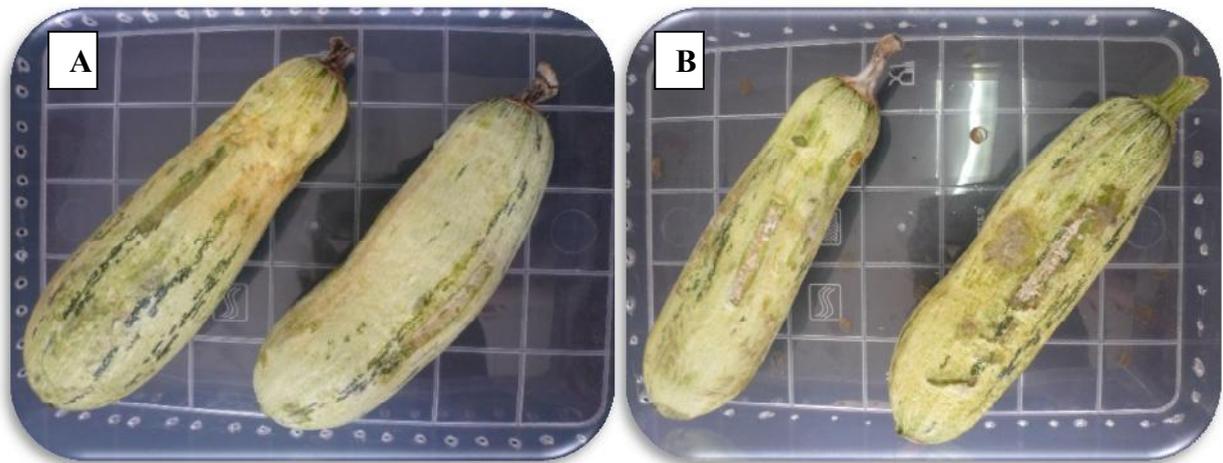


Figure 22 : Résultats de test de la recherche de substances volatiles *in vivo*. A : Témoin négatif ; B : courgettes contaminées par *Botrytis cinerea*, en présence de disques bactériens (de la souche *Staphylococcus*)

Dans ce travail ; nous avons montré que la souche bactérienne isolée à partir du sable de mer identifiée comme *Staphylococcus*, présente une activité antifongique remarquable *in vivo*, sur la courgette. Où on remarque que le niveau de sévérité de la maladie a diminué. Et cela grâce aux différents mécanismes développés par la bactérie, soit par une sécrétion de substances volatiles capable d'inhiber la contamination de fruit causé par l'agent pathogène *Botrytis cinerea*, ou bien son inhibition par contact directe entre la bactérie et le champignon qui a permis à la souche bactérienne de minimiser, et même dans certains cas d'éliminer la maladie par divers mécanismes d'action effectués pour ralentir l'activité du champignon causal de la maladie phytopathogène.

SADFI *et al.*, 2002 ont montré que des *Bacillus* isolés des sols salins ont été en mesure de protéger les tubercules de pommes de terre contre *Fusarium* dans des essais de stockage traditionnels et froids, pendant 6 et 8 mois.

MARI *et al.* (1996) ont pu déduire, après une comparaison entre les bactéries gram positif et gram négatif, que les bactéries à gram positif halophiles présentent une activité antifongique importante vis-à-vis *Botrytis cinerea* sur les différentes qualités de la tomate.

Les travaux de ZHAO et KONG (2003) ont démontré la capacité de certaines souches de *Bacillus* halophiles, dans le biocontrôle de *Botrytis cinerea*, par une production des endospores qui permet une conservation des fruits et légumes à long terme.

Bacillus, *Staphylococcus* et *Planococcus*, utilisés dans l'étude de SADFI *et al.*, 2002 ont montré que divers genres de bactéries halophiles modérées, peuvent être utilisés pour le biocontrôle du champignon phytopathogène *B. cinerea*. Leur potentiel en tant qu'agents de contrôle biologique du moule est intéressant et d'autres recherches sont nécessaires pour vérifier l'efficacité de ces antagonistes dans des conditions de stockage à long terme et si elles peuvent persister longtemps sur une plante de tomate.

5. Croissance à différentes concentrations d'NaCl

La bactérie halophile isolé et identifié comme *Staphylococcus* présente une particularité, elle est capable de tolérer des conditions extrêmes de croissance (Tableau XIV).

Tableau XIV : Résultats de la tolérance de *Staphylococcus* aux différentes concentrations en NaCl.

concentration en NaCl (g/l)	MH 0g/l	5g/l	10g/l	25g/l
Nombre de colonie (colonies)	45	67	92	101

La croissance de cette bactérie a été testée sur milieu MH additionné de trois concentrations du NaCl différente, et les résultats obtenus démontrent que la souche appartenant au genre *Staphylococcus* résiste à des concentrations élevées en NaCl où elle se développe à une concentration de 25g/l (Figure 23).

On voit aussi qu'à chaque augmentation de degré de salinité du milieu le développement la souche bactérienne augmente (le nombre de colonies bactériennes augmente en augmentant la concentration en (NaCl)).

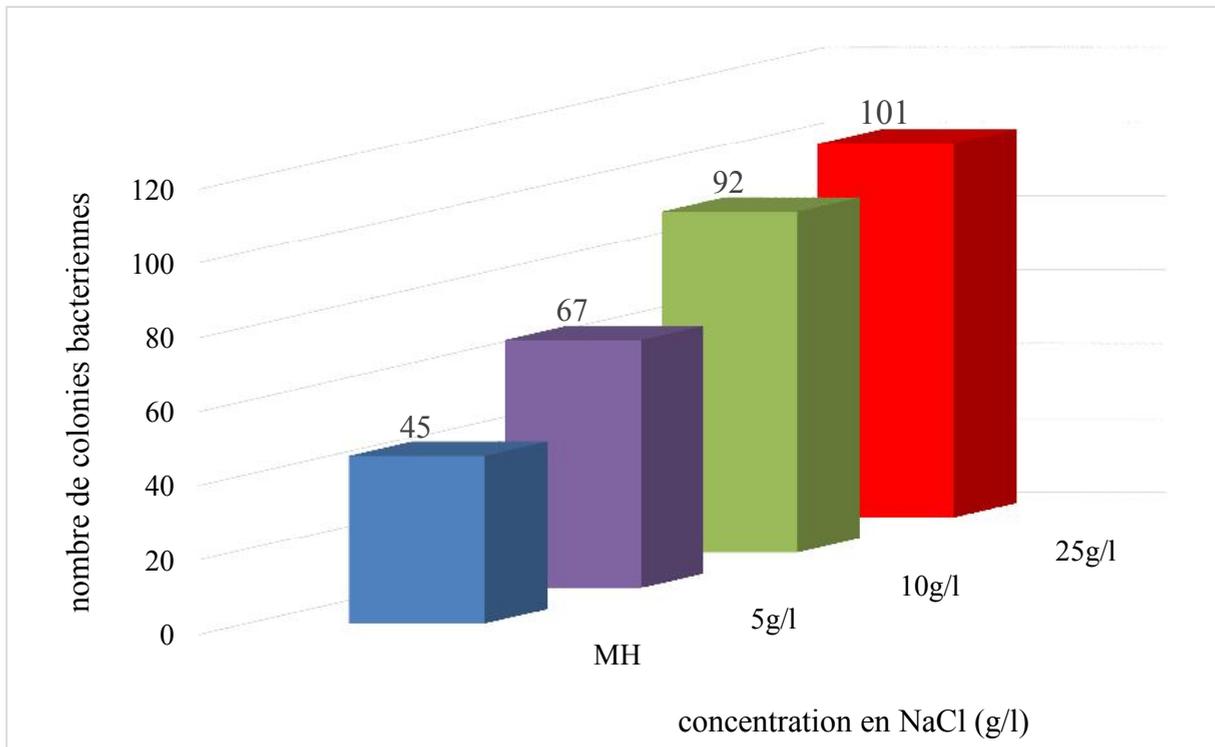


Figure 23 : Histogramme représentatif de la tolérance de la bactérie *Staphylococcus* à différentes concentration de NaCl.

D'après nos résultats on dit que *Staphylococcus* halophile du sable est un genre bactérien qui résiste à la forte salinité du sable de mer, et cela a été déjà démontré par BERRADA, 2013.

Contrairement aux résultats obtenus par BERRADA, 2013 dont il a trouvé que la croissance de toutes les souches isolées, à partir d'un milieu hyper salin, est inhibée par une concentration de 25 g/l, où le genre *Staphylococcus* est présent, notre isolat de *Staphylococcus* tolère à une concentration en NaCl de 25g/l.



Conclusion

Notre travail nous a permis l'isolement et l'identification des souches bactériennes halophiles à partir du sable de mer de la plage de TIGZIRT. Il nous a permis d'explorer et de valoriser la flore microbienne du sol salin de cette zone.

L'identification au cours de notre expérimentation, nous a permis de mettre en évidence la biodiversité des bactéries halophiles de ce milieu, quatre souches bactériennes appartenant à trois genres différents, ont été purifiées et identifiées par des tests micro et macroscopiques suivis de tests biochimiques, dont deux souches appartiennent au genre *Bacillus*, et les deux autres appartenant aux genres *Staphylococcus* et *Pantoea*, où on a trouvé que la souche appartenant au genre *Staphylococcus* tolère de hautes concentrations en NaCl, qui peut atteindre les 25 g/l dans le milieu.

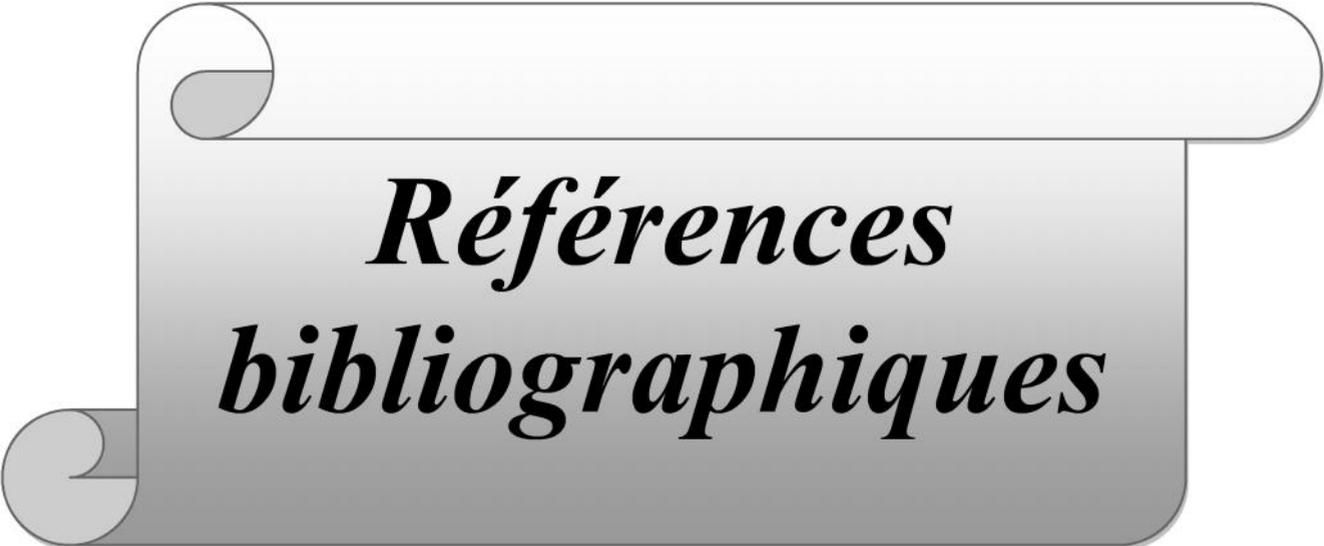
Après les tests d'antagonisme anti fongique effectués, on a pu démontrer l'existence d'une activité antagoniste importante vis-à-vis des trois champignons phytopathogènes, *Aspergillus niger*, *Botrytis cinerea* et *Penicillium* sp., dont on a vu que la souche *Bacillus* sp.2 présente une activité antifongique la plus importante vis-à-vis *Penicillium* sp., avec la confrontation directe. Ainsi que la recherche des substances inhibitrices volatiles, nous a donné des résultats plus satisfaisants en les comparant aux résultats obtenus dans le test précédent, dont on voit que la souche *Staphylococcus* inhibe la croissance d'*Aspergillus niger* avec un pourcentage de 88,20%.

En outre, le test *in vivo* a révélé le pouvoir antagoniste du *Staphylococcus* vis-à-vis *Botrytis cinerea*, par confrontation directe sur courgette et même par sécrétion des substances inhibitrices volatiles, qui a retardé l'altération du fruit contaminé, pendant 21 jours.

Au terme de notre travail, nous nous proposons de poursuivre l'étude et l'exploitation de la biodiversité bactérienne halophile des sables de mer du littoral Algérien :

- Identification des bactéries halophiles non élucidées par l'utilisation d'autres techniques comme le séquençage des gènes et/ ou l'hybridation d'ADN/ADN
- Extraction des substances volatiles secrétées par les bactéries halophiles afin de les mieux utiliser dans la protection par les agents de biocontrôle.
- L'étude des bactéries halophiles provenant d'autres zones du littoral Algérien.
- La quantification des enzymes hydrolytiques de nos bactéries tout en étudiant leur production dans des conditions extrêmes.

- Continuer le travail de l'antagonisme bactérien in vitro par rapport à d'autres champignons tout en identifiant les substances antifongiques, et in vivo en travaillant sur la plante.



***Références
bibliographiques***

- **ABDELKADER F. (2012).** Etude comparative de l'infection des sols par quelques champignons pathogènes en conditions de semis direct et de travail conventionnel. Diplôme de Magister, Université FERHAT ABBAS, Sétif, Algérie.
- **AGRIOS G.N. (2005).** Plant Pathology. 5thed. Elsevier Academic Press, USA UK.
- **AJOUZ S. (2009).** Estimation du potentiel de résistance de *Botrytis cinerea* à des biofongicides. Thèse de doctorat, Université d'Avignon, France.
- **ALILOU H. (2012).** Etude phytochimique et antifongique de deux plantes du Sud du Maroc : *Asteriscus graveolens* sub sp. *odorus* (Schousb.) Greuter et *Asteriscus imbricatus* (Cav.) DC. Thèse de Doctorat, Université d'Agadir, Maroc.
- **AMARA I. et KHALDI Z. (2015).** Isolement, identification et étude de l'antibiorésistance des souches bactériennes isolées à partir de services de réanimation et d'hémodialyse de CHU Ouargla. Thèse de Master académique, Université Kasdi Merbah, Ouargla, Algérie.
- **AMNA A., IBATSAM K., IRUM M. et SOBIA M., (2010).** Antagonistic Potential of Soil Bacteria against Food Borne Fungi. World Applied. Sciences Journal, 11 (8), 966-969.
- **ANDANSON A. (2010).** Evolution de l'agressivité des champignons phytopathogènes, couplage des approches théorique et empirique. Thèse de doctorat, Université de Nancy I - Henri Poincaré, France.
- **ANTOUN H., BOUDABBOUS A., CHERIF M., FLISS I. et SADFI N. (2001).** Evaluation of *Bacillus* isolates from salty soils and *Bacillus thuringiensis* strains for the biocontrol of *Fusarium* dry rot of potato tubers. J. *Plant Pathology*, 83, 101-118.
- **ARREBOLA E., SIVAKUMAR D. et KORSTEN L. (2010).** Effect of volatile compounds produced by *Bacillus* strains on postharvest decay in citrus. *Biological Control*, 53, 122-128.
- **BAKHOUM L. et MRIA NDEYE S. (2004).** Control de qualité et validation de différentes micro méthodes d'identification bactérienne. Thèse de doctorat, Université de CHEIKH ANTA DIOP de DAKAR, Sénégal.

Références bibliographiques

- **BAKKER P.A.H.M., DE BOER M., VAN DER SLUIS I. et VAN LOON L.C. (1999).** Combining fluorescent *Pseudomonas* spp. strains to enhance suppression of *Fusarium* wilt of radish. *European Journal of Plant Pathology*, 105, 201–210
- **BELANGER R.R., BENHAMOU N., PAULITZ T.C. et PIGA P.M. (1997).** Increased resistance to *Fusarium oxysporum* f. sp. *radicis* % *lycopesci* into matoplants treated with the endophytic bacterium *Pseudomonas fluorescens* strain 6328. *Physiological and Molecular Plant Pathology*, 50, 301–320.
- **BELMESSIKH A. (2011).** Optimisation de la production de la protéase neutre par *Aspergillusoryzae* sur milieu à base de déchets de tomates. Comparaison entre milieu solide et milieu liquide. Diplôme de Magister, Université de Mentouri, Constantine, Algérie.
- **BENHAMOU N. et NICOLE M. (1999).** Cell biology of plant immunization against microbial infection : the potential of induced resistance in controlling plant diseases. *Plant Physiology and Biochemistry*, 37, 703–719.
- **BENHAMOU N., BOUDABOUS A., CHERIF M., HAJLAOUI M.R., SADFI N. et TIRILLY I. (2002).** Ultra structural and cytochemical aspects of the interaction of the antagonistic bacteria *Bacillus cereus* X16 and *Bacillus thuringiensis* 55T with *Fusarium roseum* var *sambucinum* *in vitro*. *Journal of Plant Pathology*, (In press).
- **BERREGUI F. et BIRECHE Y. (2014).** Effets de la salinité sur l'activité des bactéries hydrocarbonoclastes. Thèse de Master Académique, Université de Ouargla, Algérie.
- **BLANDEAU E. (2012).** Etat des lieux du potentiel anticancéreux de neuf champignons macroscopiques. Thèse de doctorat, Université de Angers. France.
- **BONGOUA DEVISME A.J. (2009).** Implications des communautés bactériennes ferri-réductrices et des paramètres environnementaux dans le fonctionnement et la qualité des sols de rizières (Thaïlande et Côte d'Ivoire).Thèse de Doctorat, Université de Cocody, Abidjan.
- **BONIN P., BOUANANE A., CAMBAR J., DUBOURG K., FARDEAU M.L., GREGOIRE P., GUASCO S., MICHOTEY V. et OLLIVIER B. (2009).** Les micro-organismes de l'extrême. La Presse thermale et climatique, 146, 49-61.

Références bibliographiques

- **BOSTAN H., DIKBAS N. et KOTAN R. (2009)** .Biological control of post harvest disease caused by *Aspergillus flavus* on stored lemon fruits. *African Journal of Biotechnology*, 8 (2), 209-214
- **BOUAMER H. et GUERBATI M. (2007)**. Fréquence de l'otite moyenne causée par *Pseudomonas aeruginosa* dans la région d'Ouargla (Isolement, identification, antibiogramme). Thèse d'obtention du Diplôme d'Etude Supérieur, Université de Ouargla, Algérie.
- **BOUDABOUS A., CAYAOL J.L., ESSGHAIER B., FARDEAU M.L., HAJLAOUI M.R., OLLIVIER B. et SADFI-ZOUAOUI N. (2008)**. Ability of moderately halophilic bacteria to control grey mold disease on tomato fruits. *Journal of Phytopathology*, 156, 42-52.
- **BOUDABOUS A., ESSGHAIER B., HAJLAOUI M.R., HANNACHI I., et SADFI-ZOUAOUI N. (2007)**. First report on the use of moderately halophilic bacteria against stem canker of greenhouse tomatoes caused by *Botrytis cinerea*. *Annals of Microbiology*, 57(3), 337-339.
- **BOURDON J. L. et MARCHAL N. (1982)**. Les milieux de cultures pour l'isolement et l'identification biochimique des bactéries. Edition Doin, Paris.
- **BOUVIER J., GUTIERRE C., et ROMEO Y. (2001)**. La réponse au stress osmotique des bactéries lactiques *Lactococcus lactis* et *Lactobacillus plantarum*. *Osmorégulation des bactéries lactiques*, 81, 49-55.
- **BRANDT M. et WARNOCKD. (2011)**. Taxonomy and classification of fungi. 1747-1748.
- **BRANGER A., RICHER M.M. et ROUSTEL S. (2007)**. Microbiochimie et alimentation. Edition Laurence Audenet-Verrier, Paris.
- **BRIMECOMBE M. J., DE LIEJ F.A. et LYNCH J. M. (2001)**. The effect of root exudates on rhizosphere microbial populations. Edition the rhizosphere, New York.
- **CANARD B. et SENEQUIER-CROZET A. (2016)**. Les champignons endophytes : impact sur les écosystèmes et production de molécules d'intérêt thérapeutiques. Thèse de doctorat, Université de Grenoble Alpes. France.

Références bibliographiques

- **CANNON P.F., DAVID J.C., EGHAM U.K., KIRK P.M. et STOPHES J.A. (2001).** Ainsworth and Bysby's Dictionary of fungi, 9^{ème} édition. CABI. Bioscience, UK.
- **CARRER-FILHO R., MIZUBUTI E.S.G., MOUNTEER A., PEREIRA J.L.A., ROMEIRO R.S. et SILVA H.S.A. (2004).** Induction of systemic resistance by *Bacillus cereus* against tomato foliar diseases under field conditions. *Journal of Phytopatology*, 152 : 371–375.
- **CASE C.L., FUNKE B.R. et TORTORA G.J. (2003).** Introduction à la microbiologie. Edition Renouveau pédagogique Inc., 157- 355.
- **CHERIF H. (2014).** Amélioration de la croissance du blé dur en milieu salin par inoculation avec *Bacillus* sp. et *Pantoea agglomerans* isolées de sols arides. Thèse de doctorat. Université de FERHAT ABBES, Sétif, Algérie.
- **CSONKA L.N. (1989).** Physiological and genetic responses of bacteria to osmotic stress. *Microbiology Reviews*, 53, 121-147.
- **DANDURAND L. M. (2013).** Phytopathologie: Étude de la Santé des Plantes. 1^{ère} édition, Mosco, Etats Unis.
- **DE JAGER E.S., DE VILLIERS E.E., KORSTEN L., KOTZE J. M., LOURENS A. et WAHNER F. (1995).** Evaluation of bacterial epiphytes isolated from avocado leaf and fruit surfaces for biocontrol of avocado post-harvest diseases. *Plant Disease journal*, 97,1149-1156.
- **DELARRAS C. (2007).** Microbiologie pratique pour le laboratoire d'Analyse ou de contrôle sanitaire. Edition Lavoisier, Paris.
- **DENDOUGA W. (2006).** Isolement et identification de moisissures productrices de protéases à partir de milieux extrêmes. Extraction et étude des propriétés de la protéase produite. Diplôme de Magister, Université de Mentouri, Constantine, Algérie
- **DENIS S. (1996).** Dégradation de la caféine par *Aspergillus* sp. et *Penicillium* sp. : Etude physiologique et biochimique. Thèse de doctorat, Université Montpellier II, France.
- **EMMERT E.A.B. et HANDELSMAN J. (1999).** Biocontrol of plant disease: a (Gram-) positive perspective. *FEMS Microbiology Letters*, 171, 1–9.
- **FRANCOISE B., JOFFIN J.N. et LEYRAL G. (1998).** Microbiologie technique. Documentation technique, 2^{ème} édition, Bordeaux, France.

Références bibliographiques

- **FRAVEL D.R. et LARKIN R.P. (1998).** Efficacy of various fungal and bacterial biocontrol organisms for control of *Fusarium* wilt of tomato. *Plant Dis.*, 82 : 1022–1028.
- **GARNIER F. et DENIS F. (2007).** Bactériologie médicale : Techniques usuelles : Cocci à Gram positif. Masson, 29, 251-254
- **GOSZCZYNSKA T., SAFRINET T., SERFONTEIN J.J. et SERFONTEIN S. (2000).** Introduction to practical phytopathology: A manual for phytobacteriology. Ultra litho (Pty) Ltd, Heriotdale, Johannesburg.
- **GRANT W.D. (2004).** Life at low water activity. *Phil Trans R Soc Lond B*, 359, 1249-1267.
- **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.
- **JOFFIN J.N. et LEYRAL G. (2006).** Microbiologie technique, Tome1 : Dictionnaire des techniques, Edition CRDP d'aquitaine, France.
- **KIFFER E. et MORELET M. (1997).** Les Deuteromycètes : classification et clés d'identification générique. Edition Quae, France.
- **KONG F., LI J. et ZAO J. (2003).** Biocontrol activity against *Botrytis cinerea* by *Bacillus subtilis* 728 isolated from marine. *Annals of microbiology*, 53, 29-35.
- **KOVACS N. (1956).** Identification of *Pseudomonas pyocyanea* by the oxidase reaction. *Letters to Nature*, 178-703.
- **LAMRANI K. (2009).** Etude de la biodiversité des moisissures nuisibles et utiles isolées à partir des Maâsra du Maroc. Thèse de doctorat, Université de MOHAMED V-AGDAL. Rabat, Maroc.
- **LANGE L., BREINHOLT J., RASMUSSEN F.W. et NIELSEN R.I. (1993).** Microbial fungicides-the natural choice. *Pesticide Science*, 39, 155–160.
- **LENNARTSSON R.P. (2012).** Zygomycètes and cellulose residuals : hydrolysis, cultivation and applications. Thèse de doctorat, Université de Borås, Suède.
- **LEPOIVRE P. (2003).** Les bactéries phytopathogènes. Edition De Boeck, Bruxelles.

Références bibliographiques

- **LOZACH E. (2001).** Le sel et les microorganismes. Thèse de Doctorat, Université de Créteil, France.
- **MADANI K. (2003).** Dr. Hans Christian Joachim Gram: inventor of the Gram stain. *Primary Care Update for OB/GYNS*, 10(5), 235-237.
- **MARGESIN R. et SCHINNER F. (2001).** Potential of halotolerant and halophilic microorganismes for biotechnology. *Extremophiles*, 5: 73–83.
- **MARI M., GUIZZARDI M., BRUNELLI M. et FOLCHI A. (1996).** Postharvest biological control of grey mould (*Botrytis cinerea* Pers : Fr.) on fresh-market tomatoes with *Bacillus amyloliquefaciens*. *Crop Protection*, 15, 699–705.
- **MELLADO E. et VENTOSA A. (2003).** Biotechnological potential of moderately and extremely halophilic microorganisms. In: **BARREDO J.L.** (edition) Microorganisms for Health Care, Food and Enzyme Production. Research Signpost, Kerala, 233–256.
- **MENDACI A. et MIHOUBI S. (2015).** Profil de sensibilité aux antibiotiques des Entérobactéries uropathogènes (*Escherichia coli*, *Proteus mirabilis*, *Klebsiella pneumoniae*). Thèse de Master, Université frères MENTOURI, Constantine, Algérie.
- **MESSAOUI N. (2011).** Etude bactériologique du sable de quatre plages (Beau Séjour, Eden, les Andalouses et Madagh) du littoral ouest Algérien. Diplôme de Magister, Université d’Oran, Algérie.
- **MEZAACHE S. (2012).** Localisation des déterminants de la suppression de quelques souches de *Pseudomonas* isolées de la rhizosphère de la pomme de terre. Thèse de Doctorat, Université FERHAT ABBAS Sétif, Algérie.
- **MOUGOU HAMDANE A. (2015).** Les principales maladies des cultures maraichères protégées. Edition AVFA, Algeria.
- **MURATAN C. et PAPAGEORGION G. (1995).** Unusual strong stabilization effects of glycine betaine on the structure and function of the oxygen-evolving photosystem II complex. *Photosynthesis Research.*, 44 ,243-252.
- **NIETO J.J., OREN A. et VENTOSA A. (1998).** Biology of Moderately Halophilic Aerobic Bacteria. *Microbiology and Molecular Biology Review*, 62(2): 504–544.

Références bibliographiques

- **OREN A. (2001).** The bioenergetics basis for the decrease in metabolic diversity at increasing salt concentrations: implications for the functioning of salt lake ecosystems. *Hydrobiologia*, 46(6) , 61-72.
- **OREN A. (2002).** Intracellular ion and organic solute concentrations of the extremely halophilic bacterium *Salinibacter ruber*. *Extremophiles*, 6, 491-498.
- **RABHI N.E. (2011).** Isolement de *Pseudomonas spp.* fluorescents d'un sol salé. Effet d'osmoprotecteurs naturels. Diplôme de Magister, Université FERHAT ABBAS Sétif, Algérie.
- **RAPILLY F. (2001).** Champignons des plantes : les premiers agents pathogènes reconnus dans l'histoire des sciences. *Science de la vie*, 324, 893-898.
- **SADFI N., CHERIF M., HAJLAOUI M.R. et BOUDABOUS A. (2002).** Biological control of the potato tubers dry rot caused by *Fusarium roseum var. sambucinum* under greenhouse, field and storage conditions using *Bacillus spp.* isolates. *Journal of Phytopathology*, 150, 640–648
- **SINGLETON P. (1999).** Bactériologie. Edition Duodod, Paris.
- **SOLBI S. (2013).** Effet du repiquage de *Pseudomonas aeruginosa* sur les caractères morphologiques, biochimiques et sensibilité aux antibiotiques. Thèse de doctorat, Université de Rabat, Maroc.
- **TAALE E. (2016).** Recherche de molécules bioactives d'origine microbienne : caractérisation biochimique et moléculaire des souches de bactéries isolées du Soumbala, du Bikalga et de certains yaourts consommés au Burkina Faso, productrices de bactériocines. Thèse de doctorat, Université de Ouaga I professeur Joseph Ki-Zerbo, Burkina Faso.
- **TABUC C. (2007).** Flore fongique de différents substrats et conditions optimales de production des mycotoxines. Thèse de doctorat, Université de Toulouse, France
- **TOMAS L.K. (2009).** Diversité et fonctions écologiques des champignons en écosystème hydrothermal marin profond. Thèse de doctorat. Université de Rennes 1, France.
- **VANDER PULTEN W.H. (2003).** Plant defense belowground and spatiotemporal processes in natural vegetation: ecology, 84, 2269-2280.

Références bibliographiques

- **YANG D.M., Bi Y., CHEN X.R., GE Y.H. et ZHAO J. (2006).** Biological control of postharvest diseases with *Bacillus subtilis* (B1 strain) on muskmelons (*Cucumis melo* L. cv. Yindi). *Acta Horticulturae*, 712 (2), 735–739.
- **ZAHRAN H.H. (1997).** Diversity, adaptation and activity of the bacterial flora in saline environments. *Biology and Fertility of Soils*, 25, 211-223.
- **ZHAO J. et KONG F. (2003).** Biocontrol activity against *Botrytis cinerea* By *Bacillus subtilis* 728 isolated from marine environment. *Annals of Microbiology*, 53, 29–35.



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	

- **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	1000 ml

pH = 7,0

- **Bouillon nutritif**

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

pH= 7

Annexe 2 : Résultats des tests statistiques

Tableau 1 : Table de l'ANOVA pour les résultats de l'antagonisme bactérien par confrontation directe

Effet	Tests Univariés de Significativité pour Var3 pourcentage (state direct) Paramétrisation sigma-restreinte Décomposition efficace de l'hypothèse					
	SC	Degr. de Liberté	MC	F	p	
ord. origine	1764411	1	1764411	1,538763	0,229158	
Var2 bac	3482228	3	1160743	1,012297	0,407986	
Erreur	22932851	20	1146643			

Tableau 2 : tables de l'ANOVA pour les résultats de pourcentage d'inhibition par production de substances volatiles

Effet	Tests Univariés de Significativité pour Var3 pourcentage (state indirect) Paramétrisation sigma-restreinte Décomposition efficace de l'hypothèse					
	SC	Degr. de Liberté	MC	F	p	
ord. origine	158169,5	1	158169,5	1622,170	0,000000	
Var2 bac	448,5	3	149,5	1,533	0,236697	
Erreur	1950,1	20	97,5			

Annexe 3 : les pourcentages d'inhibition de la croissance mycélienne des champignons phytopathogènes, par les quatre souches bactériennes isolées.

Tableau 1 : Pourcentages d'inhibition de la croissance mycélienne des champignons en confrontation directe avec les bactéries isolées.

Bactéries Champignons	<i>Bacillus</i> sp.1	<i>Staphylococcus</i>	<i>Bacillus</i> sp.2	<i>Pantoea</i>
<i>Aspergillus niger</i>	31,17%	52,94%	20,58%	54,70%
<i>Botrytis cinerea</i>	51,17%	64,70%	50,00%	57,05%
<i>Penicillium</i> sp.	49,41%	50,00%	75,29%	71,76%

Tableau 2 : Pourcentage d'inhibition de la croissance mycélienne par les composés volatils.

Bactéries Champignons	<i>Bacillus</i> sp.1	<i>Staphylococcus</i>	<i>Bacillus</i> sp.2	<i>Pantoea</i>
<i>Aspergillus niger</i>	87,05	88,20	85,80	85,80
<i>Botrytis cinerea</i>	80,00	84,11	86,40	83,52
<i>Penicillium</i> sp.	62,35	55,88	85,80	84,11