

*République Algérienne Démocratique et Populaire*  
*Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique*  
**Université A. MIRA - Bejaia**

**Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie**  
**Département de Microbiologie**  
**Filière : Sciences Biologiques**  
**Spécialité: Microbiologie de l'Environnement**



**Mémoire de Fin de Cycle**  
**En vue de l'obtention du diplôme**

## **MASTER**

### *Thème*

**Evaluation de l'activité antagoniste de quelques  
bactéries rhizosphériques à l'égard de trois  
champignons phytopathogènes**

Présenté par :

**Gherrou Lydia & Salhioui Fouad**

Soutenu le : **13 Juin 2016**

Devant le jury composé de :

**Mr. Belhadi D.**

**Mr. Nabti El-H.**

**Mr. Adjebli A.**

**Mme. Tabli N.**

**MAA**

**Professeur**

**MCB**

**MAA**

**Président**

**Encadreur**

**Examineur**

**Co-Encadreur**

**Année universitaire : 2015 / 2016**

# *Remerciements*

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

*Nous tenons à remercier très profondément Mr. NABTI El-Hafid de nous avoir encadré, conseillé et encouragé et de nous avoir permis de travailler dans un cadre très agréable, nous vous somme infiniment reconnaissantes.*

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

*Nous remercions tous les membres du jury d'avoir évalué notre travail.*

*Nous remercions également, toute l'équipe de laboratoire LMER Lilla, Abdelwahab, Kamel et yousra.*

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

*Fouad & lydia*

# *DEDICACE*

Je dédie ce travail a :

Mes très chers parents, pour leurs sacrifices et leurs encouragements.

A ma mère pour son soutien tout au long de mes études et je remercie *DIEU* de l'avoir protégé, et je pris pour que *DIEU* la garde pour moi ;

Et une spéciale dédicace a la mémoire de mon très cher et regretté père FEU Abdenour qui me manque énormément, que *DIEU* te Garde dans son vaste paradis et que tu repose en paix ;

A mes très chères frères Sofiane, Mehdi ET Hakim que j'aime énormément ;

A mes très chères belles sœurs Mina et Farida et mes deux nièces Elena et Valentine ;

A mes très chers grand parent que je remercie énormément pour leurs soutien et a leurs présences dans ma vie.

A toutes la famille : oncles et tentes, cousins et cousines et surtout, Kahina, CHERifa, Halima, Nawel, Dida, Wazna, Nabil, Sihem et mon binôme Fouad ;

A Lila et Abdlouahab pour leurs grands soutiens ;

A l'ensemble de la promotion environnement en souvenir de très bon moment passé ensemble.

M<sup>elle</sup> Gherrou Lydia

# *Dédicace*

Je dédie cet humble travail

À mes chers parents

Aucun mot, aucune dédicace ne saurait exprimer mon respect, ma considération et l'amour éternel pour les sacrifices que vous avez déployés pour mon instruction et mon bien être dans les meilleures conditions, votre générosité et votre bonté ont toujours été un exemple pour moi. Trouvez en ce travail le fruit de votre dévouement et l'expression de ma gratitude et mon profond amour.

À ma chère Sœur **Linda**, son mari **Rafik** et leur petit ange **Sami**, en témoignage de la fraternité, avec mes souhaits de bonheur de santé et de succès. À tous mes cousins et cousines, toute la famille **Salhioui** et **Belaout** ; À ma chère binôme **Lydia**  
À mes chères amies **Issam**, **Houssam**, **Jigou**, **Redouane** et **Chaban**. À tous mes amis de la promotion EM, à mes professeurs ; Tous ceux qui m'ont aidé et soutenu.

**Mr Salhioui Fouad**

## *Liste des tableaux*

---

### Liste des tableaux

<b>N°</b>	<b>Titre</b>	<b>Page</b>
<b>I</b>	Exemple de champignons phytopathogènes	3
<b>II</b>	Les résultats des tests physico-chimiques	22
<b>III</b>	Taux d'inhibition des champignons phytopathogènes	23
<b>IV</b>	Effet inhibiteur des composés volatiles	27
<b>V</b>	Résultats des différents tests d'activités enzymatiques	31
<b>VI</b>	Pourcentages d'inhibition des 9 isolats sur les 3 champignons sur pomme	37

## Liste des figures

---

### Liste des figures

<b>N°</b>	<b>Titre</b>	<b>Page</b>
<b>1</b>	Symptômes de l'agent phytopathogène <i>Botrytis cinerea</i> sur différentes plantes	<b>4</b>
<b>2</b>	Quelques symptômes de l'agent <i>Aspergillus (niger et flavus)</i>	<b>5</b>
<b>3</b>	Mécanismes d'action des PGPR	<b>11</b>
<b>4</b>	Endroit du prélèvement des échantillons	<b>12</b>
<b>5</b>	Une culture jeune de <i>Botrytis cinerea</i>	<b>13</b>
<b>6</b>	Culture jeune d' <i>A. niger</i> (à gauche) et d' <i>A. flavus</i> (à droite)	<b>13</b>
<b>7</b>	Les principales étapes du test <i>in vivo</i> sur pomme	<b>21</b>
<b>8</b>	Pourcentage d'inhibition de la croissance mycélienne des champignons phytopathogènes par les 24 isolats	<b>24</b>
<b>9</b>	Résultats des tests d'antagonisme des différents isolats vis-à-vis des trois champignons phytopathogènes	<b>26</b>
<b>10</b>	Taux d'inhibition de la croissance des trois champignons phytopathogènes par les composés volatiles	<b>28</b>
<b>11</b>	Quelques résultats de l'effet antagoniste par production de molécules volatiles	<b>29</b>
<b>12</b>	Production d'HCN par les 24 isolats	<b>30</b>
<b>13</b>	Images des résultats des tests d'activités enzymatiques obtenus	<b>31</b>
<b>14</b>	Quelques résultats positifs de la production d'AIA	<b>35</b>
<b>15</b>	Quantités d'AIA produites par les différents isolats	<b>36</b>
<b>16</b>	Diamètre de la zone pourrie par <i>Botrytis cinerea</i>	<b>37</b>
<b>17</b>	Diamètre de la zone pourrie par <i>Aspergillus niger</i>	<b>38</b>
<b>18</b>	Diamètre de la zone pourrie par <i>Aspergillus flavus</i>	<b>38</b>
<b>19</b>	Quelques résultats du test <i>in vivo</i> sur pomme	<b>39</b>

**Liste des abréviations**

<b>ACC</b>	1-AminoCyclopropane-1-Carboxylate
<b>AIA</b>	Acide Indole Acétique
<b>CMC</b>	Carboxy Methyl Cellulose
<b>GA</b>	Gibbérelline Acid
<b>GN</b>	Gélose Nutritive
<b>HCN</b>	Cyanhydrique d'hydrogène
<b>PBS</b>	Phosphate Buffer Solution
<b>PCA</b>	Plat Count Agar
<b>PDA</b>	Potato Dextrose Agar
<b>PGI</b>	Percentage Growth Inhibition
<b>PGPB</b>	Plant Growth Promoting Bacteria
<b>PGPR</b>	Plant Growth Promoting Rhizobacteria
<b>PSB</b>	Phosphate Solubilizing Bacteria
<b>RSA</b>	Résistance Systémique Acquisée
<b>RSI</b>	Résistance Systémique Induite

Liste des tableaux  
Liste des figures  
Liste des abréviations

# ***SOMMAIRE***

**Introduction** ..... 1

## ***Synthèse bibliographique***

### **Chapitre I : *La phytopathologie***

1. Problèmes liés à l'agriculture ..... 2  
1.1. Problèmes abiotiques..... 2  
1.2. Problèmes biotique ..... 2  
1.2.1. Les champignons phytopathogènes..... 3  
2. Exemple de champignons ..... 3  
2.1. *Botrytis cinerea* ..... 3  
2.2. Le genre *Aspergillus* ..... 4  
2.2.1. *Aspergillus flavus* ..... 4  
2.2.2. *Aspergillus niger* ..... 5  
3. Les solutions ..... 5

### **Chapitre II : *Lutte biologique***

1. Définition de la lutte biologique ..... 6  
2. Principaux organismes utilisés dans la lutte biologique ..... 6



2.1. Les Champignons .....	6
2.2. Les Nématodes .....	6
2.3. Les Insectes .....	7
2.4. Les Bactéries .....	7
2.4.1. Les PGPB par définition .....	7
2.4.2. Mécanismes d'action des PGPB .....	7
2.4.2.1. Mécanismes directes .....	8
2.4.2.2. Mécanisme indirecte .....	10

## ***Partie pratique***

### ***Chapitre I : Matériel et méthodes***

1.1 Echantillonnages .....	12
1.2. Les souches fongiques phytopathogènes .....	13
1.3 Tests physicochimiques .....	13
1.3.1. pH.....	13
1.3.1.1. pH eau (acidité effective) .....	14
1.3.1.2 L'acidité titrable ou de réserve (pHKCl) .....	14
1.3.2. Humidité.....	14
1.3.3. Conductivité électrique.....	14
1.4. Mise en évidence de l'activité antifongique.....	15
1.4.1. Effet des isolats bactériens sur la croissance mycélienne des champignons .....	15
1.4.2. Recherche de production de substances volatiles .....	15
1.5. Exemple de métabolites volatiles à effet antifongique.....	16
1.5.1. Production de l'acide cyanhydrique (HCN).....	16
1.5.2. Production d'ammoniac (NH <sub>3</sub> ).....	16
1.6. Les enzymes d'intérêt agricole .....	16
1.6.1. Activité chitinasique .....	17

1.6.2. Activité cellulasique.....	17
1.6.3. Activité estérasique .....	18
1.6.4. Activité lipolytique.....	18
1.6.5. Activité protéasique .....	18
1.6.6. Activité amylasique .....	18
1.6.7. Activité phosphatasique .....	19
1.6.8. Activité uréasique .....	19
1.6.9. Synthèse d'AIA (Acide Indole Acétique : auxines) .....	19
1.7. Test <i>in vivo</i> sur pommes contre les trois champignons.....	19
1.8. Analyse statistique.....	21

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

1. Test physico-chimiques .....	22
2. Mise en évidence de l'activité antifongique .....	23
3. Production de métabolite volatile.....	26
4. Production de métabolites a intérêt agricole .....	29
4.1. Production d'acide cyanhydrique (HCN) .....	29
4.2. Production d'ammoniac .....	30
5. Activités enzymatiques .....	30
5.1. Activité phosphatasique .....	32
5.2. Activité lipasique et estérasique .....	32
5.3. Activité protéasique .....	32
5.4. Activité chitinolytique.....	33
5.5. Activité cellulasique .....	33
5.6. Activité amylasique .....	34
5.7. Activité uréasique .....	34

6. Production de phytohormone (AIA) .....	35
7. Test in vivo sur pomme .....	36
<b>Conclusion et perspectives</b> .....	40
<b>Références bibliographique</b> .....	41
<b>Annexes</b>	

## 1. Introduction générale

Aujourd'hui, le maintien d'une production agricole apte à satisfaire les besoins mondiaux, en croissance continue, nécessite, entre autres, une lutte efficace contre les bio-agresseurs des cultures agricoles (champignons, insectes, nématodes, bactéries...). Les champignons phytopathogènes constituent la première barrière biotique pouvant affecter le rendement agricole. Ils sont capables de s'adapter très rapidement à des modifications de leur environnement comme par exemple développer des résistances à la plupart des pesticides récents (Choudhary et Virma, 2016 ; Ashraf et *al.*, 2012)

L'utilisation des pesticides chimiques offre généralement une protection efficace contre les maladies fongiques des cultures, leur efficacité est relativement peu durable à cause de l'adaptation rapide de ces populations pathogènes, la pollution et la contamination des aliments et de l'environnement qui soulève une grave préoccupation. Pour cela, la lutte biologique semble être une alternative fiable qui peut fournir une sécurité écologique et une protection à long terme à la culture. Le contrôle biologique consiste à exploiter des micro-organismes bénéfiques qui inhibent les microorganismes pathogènes et améliorent la santé de la plante (Kumar et *al.*, 2016 ; Patil et *al.*, 2016).

Parmi les microorganismes à effets bénéfiques, il existe des bactéries dont l'effet global favorise la croissance des plantes qui sont connues sous le terme PGPB (plant growth promoting bacteria) (Gobelak et *al.*, 2014). Elles peuvent favoriser la croissance des plantes et leur développement par des moyens directs ou indirects, les premiers en facilitant la croissance végétale des plantes sous des conditions de stress biotique ou abiotique, produisant des phytohormones et synthétisant d'autres composés comme les enzymes. Les seconds par le biocontrôle, par lequel les bactéries évitent les effets nuisibles des phytopathogènes (chapitre II) (Patil et *al.*, 2016 ; Singh et *al.*, 2016 ; Zaim et *al.*, 2016)

L'objectif de ce travail est d'apporter un plus à propos de la lutte biologique par la recherche et l'isolement de bactéries bénéfiques pour les plantes. En évaluant leurs contributions dans la croissance et la santé des plantes.

La stratégie d'étude de ce travail consiste à :

- 1- Isoler des bactéries à partir de la rhizosphère de la tomate, l'eau de puit et l'eau de barrage.
- 2- Rechercher les principaux métabolites synthétisés par ces bactéries, qui auraient un impact bénéfique sur les plantes.
- 3- Explorer les capacités antagonistes des isolats bénéfiques.
- 4- Et enfin les tester *in vivo*.

## 1. Problèmes liés à l'agriculture

À l'heure actuelle, l'agriculture fait face à des problèmes biotiques et abiotiques trop sérieux. Certains de ces problèmes sont la conséquence directe de la dégradation de l'environnement (sécheresse, salinité, stress oxydatif, métaux lourds et les éléments nutritifs indisponibles ...) (Farooq et *al.*, 2012 ;Newell et *al.*, 2013 ;Krishnamurthy et Rathinasabapathi, 2013.Bacilio et *al.*, 2004), des maladies et des agents pathogènes (bactéries, champignons, nématodes, insectes ...), la perte de la biodiversité, et les changements climatiques. Aujourd'hui, la plus grande partie des pertes agricoles sont liées à des facteurs abiotiques. Par exemple, le rendement moyen du blé était environ 1.500 kg / ha, alors que les dommages aux cultures étaient 2.000 et 14.500 kg / ha en raison des contraintes biotiques et abiotiques respectivement (Ashraf et *al.*, 2012).

### 1.1. Problèmes abiotiques

Le stress abiotique est un terme collectif qui se réfère aux plusieurs facteurs environnementaux affectant sévèrement la croissance et par conséquent le rendement des plantes cultivées. Ce dernier est confronté à plusieurs contraintes qui comprennent la sécheresse, la salinité, et les températures extrêmes (Choudhary et Virma, 2016).

### 1.2. Problèmes biotiques

Le stress biotique affectant les plantes cultivées comprend les maladies causées par les pathogènes des plantes, les blessures causées par les insectes nuisibles, et les mauvaises herbes. Toutes les plantes cultivées sont soumises à des maladies aussi bien avant et après la récolte ; les principaux agents pathogènes étant ; les virus, les champignons, les bactéries, les nématodes et les plantes parasites.

Ces agents pathogènes peuvent parfois devenir une menace sérieuse pour la sécurité alimentaire, tel que le cas de famine Irlandaise causée par le champignon *Phytophthora infestans* et la famine du Bengale causée par le champignon *Helminthosporium oryzae*. Les champignons causent la majorité des maladies des plantes dans le domaine agricole. Les principaux genres fongiques souvent rencontrés dans le sol sont *Rhizoctonia*, *Fusarium*, *Verticillium*, *Phytophthora* et *Sclerotium*. Les membres de ces genres affectent un nombre important de cultures, comme le riz, le blé, le maïs, le coton, les légumes et les fruits tempérés (Choudhary et Virma, 2016).

### 1.2.1. Les champignons phytopathogènes

La majorité des champignons appartiennent aux basidiomycètes, ascomycètes, chytridiomycètes, et zygomycètes (Gonzalez-Fernandez et *al.*, 2010). Ils arrivent à provoquer jusqu'à 70% de pathologies végétales. Environ dix à quinze mille espèces d'organismes capables d'infecter les plantes sont citées dans le tableau I (Fernandez-Acero et *al.*, 2007 ; Déclert, 1990).

**Tableau I** : Exemples de champignons phytopathogènes

Champignons	Maladies	Plantes
<i>Ustilagomaydis</i>	charbon du maïs	maïs
<i>Colletotrichum</i> spp	anthracoses	arbres fruitiers, plantes maraîchères et ornementales),
<i>Mycosphaerellagraminicola</i>	septoriose	blé
<i>Blumeriagraminis</i>	l'oïdium	céréales
<i>Fusariumoxysporum</i>	fusariose	plantes cultivées
<i>Fusariumgraminearum</i>	fusariose	maïs, gale du blé
<i>Puccinia</i> spp	rouilles	céréales
<i>Botrytis cinerea</i>	pourriture grise	tomate, fraise
<i>Melampsoralini</i>	rouille du lin	lins
<i>Magnaportheoryzae</i>	la pyriculariose	riz
<i>Aspergillus niger</i>	moisissure des bulbes d'oignon	oignons
<i>Colletotrichurnnigrum</i>	Anthracnose	feuille de tomate
<i>Cladosporiumfulvum</i>	Cladosporiose	tomates
<i>Phytophthora infestens</i>	mildiou	tomates, pommes de terre

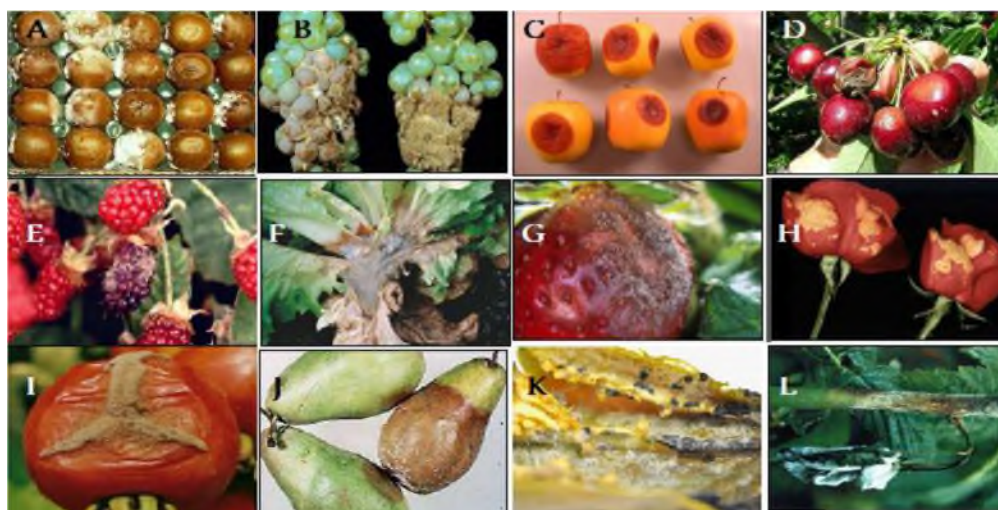
## 2. Exemple de champignons

### 2.1. *Botrytis cinerea*

Un champignon phytopathogène capable de pourrir un nombre considérable de plantes hôtes (polyphagie), il est à l'origine de la pourriture grise, il est connu par l'importance de dégâts économiques qu'il cause, par sa polyphagie, sa variabilité génétique et le développement rapide de souches résistantes. Cette dernière entraîne des pertes importantes de rendement et peut ainsi être à l'origine des contraintes économiques et sociales.

Le contrôle de la pourriture grise, est principalement basé sur l'utilisation des fongicides chimiques. Les épidémies causées par *B. cinerea* sont initiées en grande partie par les conidies produites localement à l'intérieur de la culture. Le champignon infecte ainsi les différentes parties de la plante y compris les fruits. Pour cela, l'application de certains agents antagonistes, utilisés commemojen de lutte biologique, a permis de réduire

le potentiel d'infection et de sporulation de ce pathogène sur plusieurs plantes hôtes. Un exemple de cette large gamme d'hôtes est présenté et illustré dans la figure 01 (Ajouz, 2009).



**Figure 01** :Symptômes de l'agent phytopathogène *Botrytis cinerea* sur différentes plantes. (A) Kiwi. (B) Grappe du raisin. (C-D) Pommes. (E) Framboises. (F) Laitue. (G) Fraise. (H) Fleurs du rosier. (I) Tomate. (J) Poires. (K) Poivre. (L) Tige de tomate.

## 2.2. Le genre *Aspergillus*

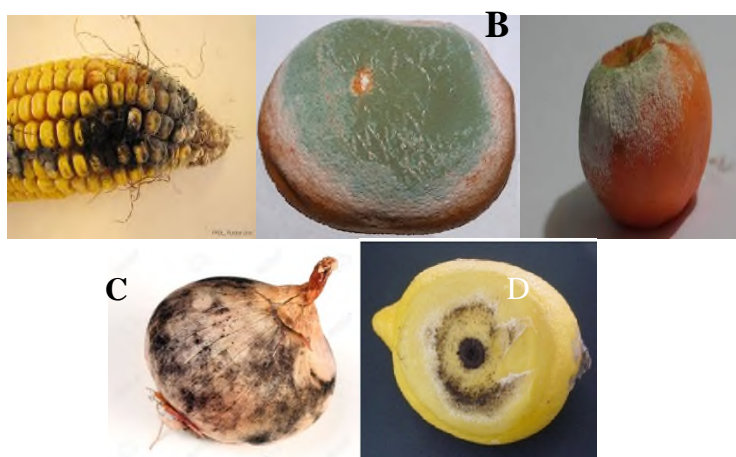
La majorité des pourritures des semences et des plantes sont causées par *Aspergillus niger* et *Aspergillus flavus*. Ces champignons sont courants dans la plupart des sols agricoles et des semences de nombreuses cultures. Les plantes infectées se transforment en masses noires pourries et se couvrent du mycélium fongique ou des spores. Ces maladies causent la mortalité et réduisent les rendements de 25 à 50% (Pal et al., 2014), on constate deux principales espèces :

### 2.2.1. *Aspergillus flavus*

L'organisme pathogène attaque les plantes et il les bousille en masses sèches couvertes de spores jaunes ou verdâtres. De nombreuses souches de ce champignon sont capables de produire les aflatoxines qui rendent les semences inacceptables en raison de leurs fortes toxicités pour la consommation humaine ou animale. Les plantes infectées en général deviennent faibles. Le champignon est capable d'envahir quelques graines comme les arachides (cacahuètes, pistaches) avant la récolte, pendant le séchage, après la récolte et pendant le stockage. Pour réduire au minimum l'effet de ce champignon, il faut suivre certaines pratiques ;récolter les cultures à un stade de maturité approprié, dans le cas des arachides il faut sécher les goussesimmédiatement après la récolte (6 à 8% d'humidité), et éliminer celles qui sont infectées (Palet al., 2014).

### 2.2.2. *Aspergillus niger*

Les maladies causées par ce champignon sont les plus répandues dans les zones tropicales et subtropicales la moisissure noire peut causer la plupart des pertes qui se produisent durant le stockage dû au mauvais conditionnement. L'agent pathogène est brun foncé à noir dans la culture, il produit des conidiospores facilement reconnus. Les conidies sont sèches et facilement dispersées dans l'air. Pour réduire l'effet de ce champignon, il faut certaines pratiques comme: l'application des fongicides foliaires à la fin de la récolte ; faire la récolte des cultures dans des conditions sèches ; maintenir la température et l'humidité relative à des niveaux appropriés pendant le stockage et surveiller les conditions lors de l'utilisation des températures élevées pour le séchage (Koike et *al.*, 2007). Quelques exemples d'hôtes sont présentés dans la figure 02.



**Figure 02 :** Symptômes de l'agent *Aspergillus (niger et flavus)* (A) maïs. (B) orange. (C) oignon. (D) citron.

### 3. Les solutions

Les plantes cultivées subissent de nombreux types de stress biotique et abiotique dans le domaine agricole. Pour surmonter ces problèmes, divers moyens sont déployés pour une éventuelle agriculture durable. Pour le stress biotique, les maladies des plantes peuvent être gérées par la modification des pratiques culturales, l'utilisation de produits chimiques contre l'agent pathogène particulier, l'application des agents de lutte biologique, comme les PGPB (Plant Growth Promoting Bacteria) (Choudhary et Virma, 2016).



Chaque année, des pertes considérables de rendement des cultures agricoles sont enregistrées avant et après récolte à cause des agents ravageurs. Pour lutter contre ces derniers, le moyen le plus puissant est d'employer des pesticides de synthèse, mais ces substances ont des conséquences nuisibles qui atteignent l'homme et son environnement, comme l'accumulation de résidus, la pollution des sols et le déséquilibre écologique (Reyes-Ramírez et al., 2004 ; Alwindia et Natsuaki, 2009).

En vue de ces risques, il est essentiel de trouver des solutions alternatives qui permettront de continuer à lutter contre ces phytopathogènes tout en baissant l'emploi de produits chimiques. La pratique la plus fiable est la lutte biologique car elle permet une protection à long terme de la culture (Fernando et al., 2005).

## 1. Définition de la lutte biologique

La notion de lutte biologique contre les ravageurs est connue pratiquement depuis plus d'un siècle. Pour développer cette méthode, des efforts considérables ont été réalisés pendant cette période. La lutte biologique est donc l'emploi d'organismes vivants à fin de diminuer l'ampleur de plusieurs ennemis des cultures agricoles (rongeurs, insectes, nématodes et mauvaises herbes) (Dib, 2010).

## 2. Principaux organismes utilisés dans la lutte biologique

Plusieurs groupes d'organismes sont utilisés en lutte biologique, les plus importants sont les micro-organismes, les nématodes, les insectes et les arachnides. Les organismes bénéfiques utilisés en lutte biologique doivent avoir un bon taux de reproduction, être spécifiques, avoir une bonne capacité d'adaptation et leur cycle de vie doit être synchronisé à celui du ravageur (Weeden et al., 2007).

### 2.1. Les Champignons

Certains champignons présentent des activités contre les bio-agresseurs et sont exploités en tant que biopesticides. *Coniothyrium minitans* est connu pour parasiter les champignons du genre *Sclerotinia* spp (Deravel et al., 2013).

### 2.2. Les Nématodes

Les nématodes sont des vecteurs qui jouent un rôle important dans la colonisation de la rhizosphère par les PGPR (Antoun et Prévost, 2005).

### 2.3. Les Insectes

Les insectes sont des prédateurs qui s'attaquent directement au ravageur en le consommant et en lui causant une mort sur le champ (Cloutier et Cloutier, 1992).

### 2.4. Les bactéries

Parmi les biopesticides microbiens, les produits à base de bactéries représentent 74%, car elles sont capables d'envahir efficacement les systèmes racinaires et influencent de manière bénéfique la plante en stimulant sa croissance et/ou en la protégeant contre des infections par des agents phytopathogènes. Elles sont connues sous le terme PGPB (Plant Growth-Promoting Bacteria) (Trotel-Aziz et al., 2007). La plupart des souches bactériennes exploitées comme biopesticides appartiennent aux genres *Agrobacterium*, *Bacillus* et *Pseudomonas* (Adam, 2008).

#### 2.4.1. Les PGPB par définition

Les PGPB peuvent favoriser et faciliter la croissance des plantes sous des conditions de stress biotique ou abiotique par des moyens directs ou indirects. Ce sont des microorganismes bénéfiques aux plantes, elles sont de plus en plus utilisées en agriculture, dans le but d'augmenter le rendement des cultures en augmentant la disponibilité des nutriments, en améliorant la croissance des plantes et en les protégeant contre les maladies et les ravageurs (Grobela et al., 2014). Les PGPB englobent toutes les bactéries qui favorisent la croissance des plantes. Cependant, parmi les PGPB, les PGPR (Plant Growth Promoting Rhizobacteria) sont les plus étudiées en raison de leur capacité à coloniser les racines des plantes (Kang et al., 2014).

#### 2.4.2. Mécanismes d'action des PGPB

Selon leurs activités elles sont classées comme : biofertilisants (augmentant la disponibilité des éléments nutritifs aux plantes), phytostimulateurs (améliorant la croissance des plantes, habituellement par la production de phytohormones), et agents de biocontrol (lutte contre les maladies, principalement par la production de métabolites antibiotiques et antifongiques) (Pérez-Montano et al., 2013). Elles agissent selon deux mécanismes.

### 2.4.2.1 Mécanismes directs

#### ➤ Biofertilisation

- **Fixation d'azote**

Dans le milieu naturel il existe des bactéries qui ont la capacité de transformer les nitrates en azote moléculaire  $N_2$ . L'azote est un élément essentiel bien connu pour la croissance et l'évolution des plantes (Gupta et *al.*, 2015).

- **Solubilisation du phosphate**

La fertilisation du sol est l'une des méthodes les plus communes pour accentuer la production agricole. Le phosphore (P) est un macronutriment important pour la croissance et le développement des plantes mais aussi un important élément nutritif limitant cette croissance. Contrairement à l'azote, il n'existe pas de source biologiquement disponible. Même dans les sols riches, une grande quantité se trouve sous forme insoluble donc non disponible pour la plante. Les bactéries solubilisant le phosphate, PSB (Phosphate Solubilizing Bacteria) sont constamment dans la rhizosphère et peuvent être employés pour régler ce problème (Ahemad, 2015).

#### ➤ Phytostimulation

- **Production d'hormones de croissance**

Les hormones végétales sont des messagers chimiques qui aident la plante à se défendre dans son environnement. De manière générale elles jouent un rôle important dans la réponse de la plante aux stress biotiques et abiotiques (Gupta et *al.*, 2015). Parmi les phytohormones :

- **Acide indole acétique (AIA)**

L'AIA est la phytohormone la plus importante du groupe des auxines qui stimulent la croissance et le développement de la plante. En présence de substrats riches libérés par les racines des plantes, elle est produite sous forme de métabolite secondaire par les microorganismes. L'AIA est produit à partir du tryptophane qui est le précurseur principal. Cette phytohormone stimule la croissance des plantes par la stimulation de la division cellulaire, l'amélioration de l'absorption des minéraux et des éléments nutritifs du sol, le

développement des racines et elle stimule la plante à résister aux plusieurs conditions de stress (Gupta et al., 2015).

- **Cytokinines et gibbérellines**

Les cytokinines sont un groupe de composés naturels qui régulent un grand nombre de processus physiologiques tels que la division cellulaire des plantes, l'interruption de la quiescence des bourgeons dormants, l'activation de la germination des graines, la promotion de la ramification, la croissance des racines, l'accumulation de la chlorophylle, l'expansion des feuilles et le retard de la sénescence (Gupta et al., 2015). Les gibbérellines (GA) sont des hormones végétales omniprésentes qui assurent plusieurs fonctions métaboliques pendant la croissance des plantes, comme la germination des graines, l'allongement des tiges, l'expression sexuelle, la floraison, la formation de fruits. Les (GA) permettent également d'améliorer la croissance des plantes (Kang et al., 2012).

- **L'éthylène**

L'éthylène est un gaz impliqué dans beaucoup de processus physiologiques, comme la germination de la graine, la différenciation de tissus, la formation et l'élongation de la racine, le développement latéral des bourgeons, le fleurissement, l'ouverture de la fleur, la sénescence d'organes, la maturation de fruit et l'abscission de la feuille et du fruit (Gupta et al., 2015). A des concentrations modérées, l'éthylène agit comme stimulateur de la croissance des plantes mais au-delà de cette concentration, il devient inhibiteur de l'élongation racinaire (Glick et al., 2007).

- ❖ **Aminocyclopropane-1-carboxylate (ACC) désaminase**

L'ACC désaminase est une enzyme qui clive l'acide -1-aminocyclopropane-1-carboxilique, qui est le précurseur immédiat de la biosynthèse de l'éthylène chez les plantes. L'activité de l'ACC désaminase réduit l'activité de l'éthylène et contribue ainsi à l'allongement des racines (Gupta et al., 2015).

### 2.4.2.2 Mécanismes indirectes

#### ➤ Biocontrôle

- **Compétition pour l'espace et les nutriments**

Les PGPB à développement rapide peuvent éliminer les phytopathogènes par la compétition pour le carbone et les sources d'énergie. Dans le cas des PGPR, leur nombre sur les racines doit être suffisant pour avoir un effet bénéfique sur les plantes et pour être capable d'établir une compétition pour les nutriments dans la rhizosphère (Gupta et *al.*, 2000).

- **Compétition pour le fer et la production de sidérophores**

Le fer est un micronutriment essentiel pour la majorité des organismes de la biosphère. Dans les sols, le fer est disponible souvent sous forme insoluble (ion ferrique ou  $Fe^{+3}$ ). Les micro-organismes ont développé des mécanismes pour l'assimilation du fer, y compris la production des molécules appelées sidérophores, ces derniers fixent le fer ferrique ( $Fe^{+3}$ ) et le transforment en sa forme soluble qui est le fer ferreux ( $Fe^{+2}$ ). Les sidérophores sont impliquées à la fois par voie directe (la plante utilise le fer comme nutriment) et par voie indirecte (par compétition) (Gupta et *al.*, 2015).

- **Antibiose**

La production d'antibiotiques est considérée comme un des mécanismes de lutte biologique les plus puissants contre les phytopathogènes les plus étudiés chez les plantes. Certaines souches sont capables de produire un antibiotique de nature volatile connu sous le nom de cyanhydrique d'hydrogène (HCN) ainsi que des enzymes telle que les chitinases, les glucanases, les protéases, et les lipases pour protéger les plantes du stress biotiques par suppression des pathogènes (Gupta et *al.*, 2015).

- **Résistance Systémique**

Les défenses mises en œuvre par les plantes ne se limitent pas aux seules réponses locales. Les végétaux sont également capables de déployer des défenses systémiques, c'est-à-dire généralisées à l'ensemble de leurs tissus.

### ○ La résistance systémique acquise

Cette résistance est induite à la suite d'une infection ou agression par un agent pathogène (bactérie, virus, champignon...). Dans un environnement sain, les plantes ne déclenchent pas leurs défenses, c'est l'arrivée d'un stimulus qui va enclencher des mécanismes de défenses (Annapurna et al., 2013).

### ○ La résistance systémique induite

Cette résistance est stimulée par certaines rhizobactéries non-pathogènes (PGPR).

Ces rhizobactéries sont capables de réduire une maladie à travers la stimulation de mécanismes de défense inductibles chez la plante. L'ISR est donc phénotypiquement similaire à la SAR. Cependant, il semble que les voies d'inductions de la SAR et l'ISR soient différentes, même si toutes les deux se basent sur la transmission d'un signal conduisant à l'activation d'un ensemble de mécanismes de défense. Les mécanismes développés par les plantes permettent de se protéger contre un large spectre de pathogènes pas seulement fongiques, bactériens et viraux, mais aussi vis-à-vis de maladies causées par certains insectes et nématodes (Annapurna et al., 2013). La figure suivante nous montre les principaux mécanismes directs et indirects des PGPR.

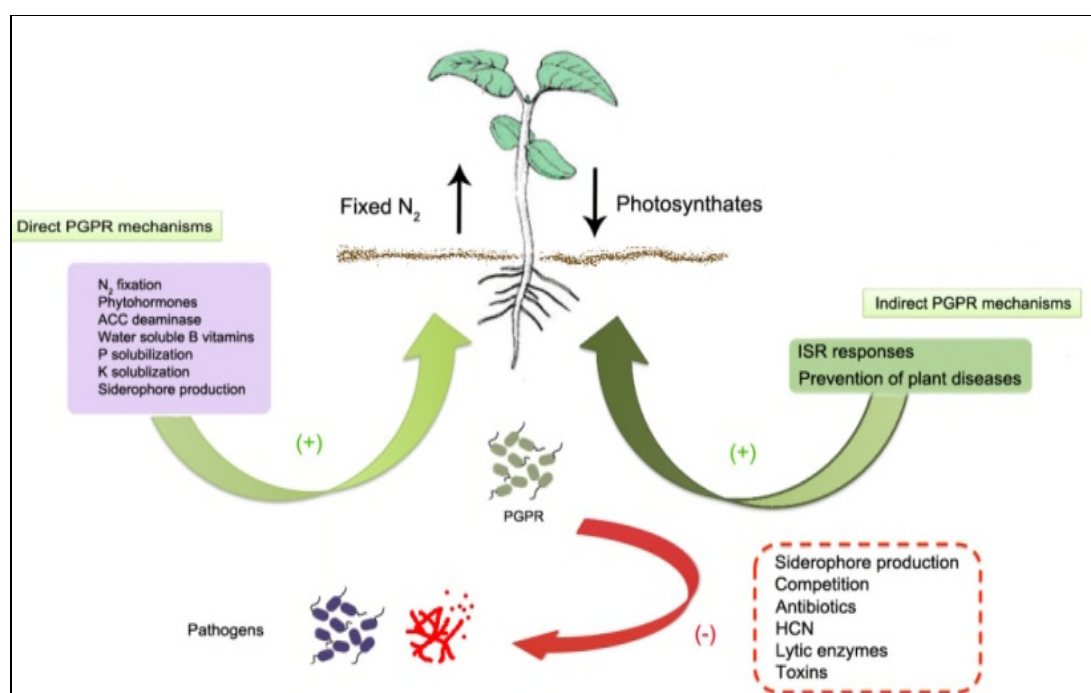


Figure 03 : Mécanismes d'action des PGPR

## 1. Matériel et Méthodes

Ce travail a été réalisé au laboratoire de maîtrise des énergies renouvelables-équipe biomasse et environnement durant une période de 4 mois (Janvier-Mai). Le travail avait pour objectifs :

- Isolement et sélection de bactéries à pouvoir anti-phytopathogène, particulièrement contre les champignons (*B. cinerea*, *A.flavus* et *A.niger*).
- Etude de l'effet des isolats sélectionnés sur une variété de pomme attaquée par les champignons phytopathogènes.

### 1.1. Echantillonnages

Dans le but de rechercher des bactéries utiles dans la lutte biologique, différents prélèvements du sol et de l'eau ont été effectués pendant le mois de Janvier dans deux sites de la wilaya de Bejaïa (Seddouk et Kherrata). Ces prélèvements ont été effectués en toute asepsie ; Seddouk (latitude : 36,5472, longitude : 4,68611), (figure 04), et les prélèvements de l'eau de barrage son effectués à Kherrata (latitude : 36,4927, longitude : 5,27759). Les échantillons d'eau sont collectés à l'aide de flacons stérilisés préalablement au four Pasteur (180C°/30min), alors que l'échantillonnage du sol a été réalisé dans des carottes métalliques préalablement stérilisées de la même manière.

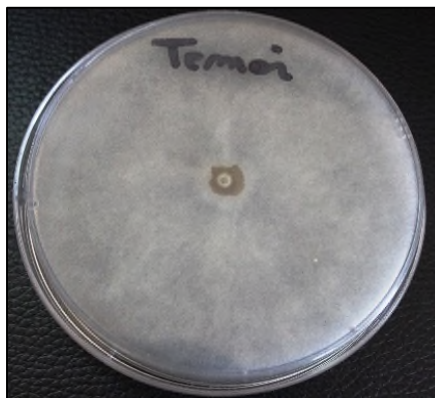


Figure 04 :Site du prélèvement des échantillons.

Des dilutions décimales de ( $10^{-1}$ ,  $10^{-2}$ ,  $10^{-3}$ ,  $10^{-4}$  et  $10^{-5}$ ) sont effectuées. Ces dernières sont ensemencées sur milieu PCA (annexe II) par la méthode d'inondation dans le but d'obtenir différentes colonies, chaque colonie apparaissant différente phénotypiquement est purifiée en la repiquant sur boîte PCA neuve.

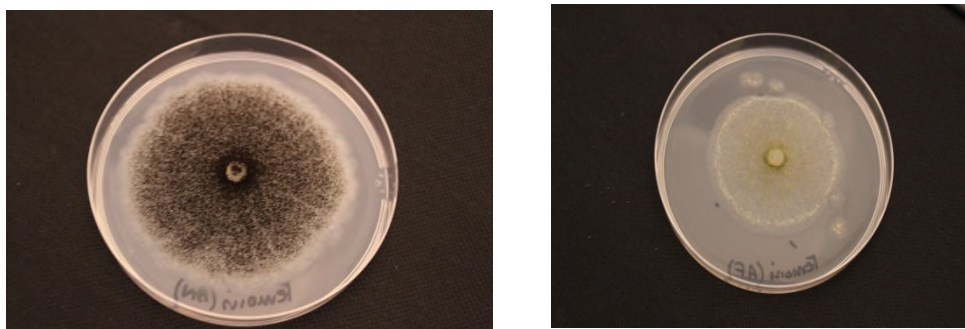
## 1.2. Les souches fongiques phytopathogènes

La souche fongique *B. cinerea* a été aimablement fournie par le laboratoire de Mycologie de l'université de Béjaïa. Elle a été originalement isolée en France dans des plantes de tomate par l'institut national de recherche agronomique (INRA).



**Figure 05 :** Une culture jeune de *B. cinerea*.

Les deux souches *A. niger* et *A. flavus* ont été fournies par le laboratoire de microbiologie industrielle à l'université de Béjaïa. Les souches ont été revivifiées sur le milieu PDA avant utilisation dans cette étude.



**Figure 06 :** Cultures jeune d'*A. niger* (à gauche) et d'*A. flavus* (à droite).

## 1.3. Tests physicochimiques

### 1.3.1. pH

La mesure du pH a été réalisée suivant le protocole de Mathieu et Pieltain (2003). L'acidité d'un sol est définie par la concentration en ions  $H^+$ . Les deux valeurs du pH du sol sont déterminées



### **1.3.1.1.pH eau (acidité effective)**

Dans ce cas, 10g du sol tamisé sont pesés et additionnés de 25ml d'eau distillée, puis agités pendant une minute et laissés au repos pendant 2h, la mesure est effectuée par trempage de l'électrode du pH mettre dans le surnageant.

### **1.3.1.2. L'acidité titrable ou de réserve (pHKCl)**

Elle est mesurée par échange avec une solution saline deKCl. Ainsi on échange une partie d'ions H<sup>+</sup> absorbés par du potassium.On répète donc le même test juste en remplaçant le solvant qui est l'eau déminéralisée par une solution de KCl 1N.

### **1.3.2.Humidité**

C'est la perte au séchage d'un produit frais (sol) à haute température jusqu'à stabilité du poids (Mathieu et Pieltain, 2003).

2g de chaque échantillon du sol sont soumis à la dessiccation à 105°C jusqu'à l'obtention d'un poids constant. Les résultats des taux d'humidité sont déterminés selon l'équation suivante :

$$\text{L'humidité (\%)} = \frac{(P1-P2) \times 100}{(P1-P3)}$$

P1 : Poids initial de l'échantillon et du creuset ;

P2 : Poids final de l'échantillon et du creuset après séchage ;

P3 : Poids du creuset vide.

### **1.3.3. Conductivité électrique**

La conductivité électrique traduit la capacité d'une solution aqueuse à conduire le courant électrique. La conductivité est directement proportionnelle à la quantité de solides (les sels minéraux) dissous dans l'eau. Ainsi, plus la concentration en solides dissouts sera importante, plus la conductivité sera élevée. Elle est mesurée selon le protocole de Doyle et Hardie (2012) comme suit :

- Peser 10g du sol séché à l'air libre dans un flacon et ajouter 50ml d'eau distillée.
- Secouer mécaniquement à 25°C dans un système fermé pendant 3 min pour dissoudre les sels solubles

- Laisser décanter pendant 15 minutes
- Tremper la cellule du conductimètre dans le surnageant en le déplaçant vers le haut et vers le bas légèrement sans déstabiliser le sol décanté.
- Faire la lecture à l'arrêt de la cellule lorsque le système se stabilise.
- Rincer la cellule avec de l'eau déminéralisée entre les échantillons afin d'éviter les fausses lectures.

## **1.4. Mise en évidence de l'activité antifongique**

### **1.4.1. Effet des isolats bactériens sur la croissance mycélienne des champignons**

Le protocole suivi (Sagahón et al. 2011) consiste à déposer un disque de champignon de 7mm de diamètre au centre d'une boîte contenant le milieu PDA, et déposer trois disques du même isolat bactérien à une distance de 2,5 cm du champignon. En parallèle des témoins sont préparés (des boîtes de Pétri contenant que le disque du champignon). Les boîtes sont incubées à 23°C/5-7 Jours. Deux répétitions sont faites pour chaque isolat.

Par la suite, un suivi quotidien de l'apparition de zone d'inhibition en comparant au témoin. Le pourcentage d'inhibition (PGI%) de la croissance est calculé selon la formule suivante :

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

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

Au début de notre isolement, on a obtenu 125 isolats de l'ensemble de nos prélèvements (sol, eau de puits et eau de barrage), (annexe I) sur lesquelles, le test d'antagonisme contre *B.cinerea* a été réalisé. Ça nous a permis de sélectionner 24 isolats meilleurs, qui ont fait l'objet du reste des tests qui suivent.

### **1.4.2. Recherche de production de substances volatiles**

L'activité antifongique des composés volatils des 24 isolats à l'égard de *B.cinerea*, *A.niger* et *A.flavusa* a été évaluée par l'inoculation des boîtes de Pétri contenant le milieu PDA avec un disque de 7 mm de diamètre de *B.cinerea*, *A.niger* et *A.flavus* respectivement.

Ces boîtes seront superposées sur une seconde boîte de Pétri contenant le milieu PCA ensemencé, chacune, avec un isolat bactérien différent par la méthode des stries. Les couvercles sont enlevés et les deux boîtes sont superposées, l'une face à l'autre, puis fermées avec du parafilm et incubées à 23°C pendant 5 à 7 jours. Le test a été réalisé en duplicata pour chaque isolat bactérien. Le pourcentage d'inhibition est calculé en utilisant la formule suivante (Fiddaman, 1993) :

$$n = [(a-b)/a] \times 100$$

n : Pourcentage d'inhibition des champignons testés (%).

a : Diamètre moyen de mycélium dans la boîte du témoin (cm).

b : Diamètre moyen de mycélium dans les boîtes inoculées par les bactéries (cm).

## **1.5. Exemples de métabolites volatiles à effet antifongique**

### **1.5.1. Production de l'acide cyanhydrique (HCN)**

La production de l'HCN a été évaluée selon la méthode de Lorck (1948). Elle consiste à rajouter de la glycine (4,4g/l) à la gélose PCA en surfusion, puis ensemencer la culture bactérienne par stries serrées sur la gélose en boîtes de Pétri. Imbiber d'une solution de picrate de sodium (5% d'acide picrique et de 2% de carbonate de sodium anhydre) un disque du papier Whatman N°42 de 9 cm de diamètre, et le déposer au fond du couvercle de la boîte. La boîte est fermée et scellée avec du parafilm et incubée à 30°C/96 h. Le résultat positif se traduit par le virage du papier Whatman du jaune vers une couleur orange à marron indiquant la production de HCN.

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

Ce test est réalisé selon la méthode de Capuccino et Sherman (1992). Le protocole consiste à ajouter 100µl d'une suspension bactérienne jeune dans 10ml d'eau peptonée. Après incubation à 30°C /96 h, 500µl du réactif de Nessler sont ajoutés dans chaque tube d'eau peptonée. L'apparition d'une couleur jaune ou orange indique la production de NH<sub>3</sub>.

## **1.6. Les enzymes d'intérêt agricole**

Afin de déterminer l'utilité des isolats dans le biocontrôle, certaines enzymes sont recherchées en dépit de leur grand intérêt dans la lutte biologique. La recherche d'enzymes hydrolytiques a été réalisée par la méthode des disques d'agar. Ce type d'enzymes est

généralement impliqué dans la dégradation de la paroi cellulaire des champignons phytopathogènes (cellulase, lipase, protéase, chitinase). Leur importance réside également dans leur capacité à solubiliser une grande partie de nutriments organiques en les rendant assimilables par les plantes (phosphatase, amylase, uréase, estérase).

### **1.6.1. Activité chitinasique**

Pour la révélation de l'activité chitinasique des isolats, le milieu de culture décrit par Kopečný et *al.* (1996) et contenant en g/L d'eau distillée : La chitine colloïdale (0.8 à 0.6) ; K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> (2.7) ; KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (0.3) ; MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O (0.7) ; NaCl (0.5) ; KCl (0.5) ; Extrait de levure (0.13) ; Agar (15) ; 7.2 ± 0.02 pH.

Le milieu estensemencé par la méthode des cylindres d'agar, les boîtes sont incubées jusqu'à une semaine à 30°C. La présence de la chitinase extracellulaire dans le milieu se manifeste par l'apparition d'un halo clair autour du disque.

La chitine colloïdale est préparée en suspendant 1g de chitine dans 9 ml de HCl concentré. La solution est laissée sous agitation pendant 2 heures jusqu'à dissolution (apparition d'une couleur brune). Par la suite, la solution est transférée dans une fiole de 250 ml en complétant le volume avec de l'eau distillée.

Après un temps de repos (une nuit), le culot est suspendu dans de l'eau distillée après écartement du surnageant. La procédure de lavage et de décantation est répétée trois fois avec de l'eau de robinet et trois fois avec l'eau distillée. Enfin, le surnageant est éliminé et la chitine décantée est filtrée à l'aide d'un tamis métallique de 0,5 mm. L'effluent est stocké dans une bouteille opaque à 4°C.

### **1.6.2. Activité cellulasique**

Pour révéler leur activité cellulasique, les isolats ont été déposés sur milieu de Carder, contenant en g/l : Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> (6) ; KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (3) ; NaCl (0,5) ; NH<sub>4</sub>Cl (1) ; Extrait de levure (3) ; CMC (carboxyle méthyle cellulose) (7) ; Agar (15) pendant 48h/30°C, dans le but d'avoir des cultures jeunes. Les boîtes sontensemencées par la méthode des cylindres d'agar, puis incubées pendant 8 jours à 30°C (Carrim et *al.*, 2006). Après incubation, une solution de rouge de Congo (1%) est ajoutée à la surface des colonies. Après 20 minutes, la surface est inondée avec 1M de NaCl puis laissée au repos une nuit. La présence d'une cellulase extracellulaire se manifeste par l'apparition d'un halo clair autour des cylindres.

### **1.6.3. Activité estérasique**

Le milieu de culture utilisé est celui utilisé par Sierra (1957) (Carrim et *al*, 2006). Il contient en g/l : peptone (10) ; NaCl (5,0) ; CaCl<sub>2</sub> 2H<sub>2</sub>O (0,1) ; Tween 80 (1%, v/v) et agar (18). Le pH est ajusté à 7,4. Le milieu est ensemencé et incubé à 30°C/48h. La présence d'une activité estérasique s'exprime par un halo opaque autour des disques.

### **1.6.4. Activité lipolytique**

La détermination de l'activité lipolytique est réalisée de la même manière que l'activité estérasique. Cependant, le tween 80 est remplacé par le tween 20, et le résultat positif se traduit par la présence d'un halo clair autour des colonies (Carrim et *al*. 2006).

### **1.6.5. Activité protéasique**

Le milieu de culture contient en g/l : caséine pancréatique (5) ; Extrait de levure (2,5) ; glucose (1), et agar (15). Le milieu est ajusté à pH 7 et autoclavé 20 minutes à 120°C. Simultanément, 100 ml d'une solution du lait écrémé à 10% autoclavés (120°C/10 min) sont préparés et ajoutés au milieu. Ce dernier est ensuite ensemencé par la méthode des disques. L'activité protéasique se traduit par l'apparition d'un halo clair autour des disques (Bach et Munch, 2000).

### **1.6.6. Activité amylasique**

Le test qui indique l'activité amylasique est réalisé sur gélose à base d'amidon. Le milieu contient en (g/l) : KNO<sub>3</sub> (0,5), K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> (1,0), MgSO<sub>4</sub> (0,2), CaCl<sub>2</sub> (,1), FeCl<sub>3</sub> (0,001), amidon soluble (10,0), agar (15,0), eau distillée 1000 ml. Le pH est ajusté à 7,2 puis autoclavé à 121°C/30mn. En même temps préparation d'une solution de lugol (révélateur). Ensemencer le milieu par la méthode des disques de 5 mm de chaque souche à la surface, après incubation à 30°C/48-72h, la solution de lugol préalablement préparée sera dispersée sur toute la surface du milieu. Après quelques minutes de contact, l'excès sera éliminé et les boîtes seront lavées à l'eau distillée. La lecture s'effectue de la manière suivante :

La présence de l'amidon dans le milieu donnera une couleur bleue noirâtre, ceci implique une absence d'activité amylasique. En revanche, si l'amidon est hydrolysé, une

zone claire apparaîtrait autour des disques d'agar. Ce qui traduit une présence d'activité amylasique chez les isolats (Vinoth Raj et al. 2009).

### **1.6.7. Activité phosphatasique**

Le milieu de culture contient en g/l : extrait de levure (5) ; glucose (5) ; agar (7,5) et 11 d'eau distillée. Le milieu est autoclavé 120°C/20min, ensuite, 20 ml d'une solution de phosphate tricalcique (10%) autoclavés sont rajoutés. Les bactéries à activité phosphatasique montrent un halo transparent autour de leurs colonies (Peix et al., 2001).

### **1.6.8. Activité uréasique**

Pour préparer le milieu ; ajouter en g/950ml d'H<sub>2</sub>O (CSP): Peptone (1), Glucose (1), NaCl(5), Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> (1,2), KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (0,8), Rouge de phénol (0,012), Agar (15). Le milieu est ajusté à pH 6,8 et autoclavé 20 minutes à 120 °C. Après autoclavage, ajouter 50ml d'une solution d'urée à 40% préalablement filtrée. Enfin verser le milieu en boîtes de Pétri. Les bactéries qui sont uréase positive montrent un halo rose autour de leurs colonies (Christensen, 1946).

### **1.6.9. Synthèse d'AIA (Acide Indole Acétique : auxines)**

Ce test permet de déterminer la capacité de la bactérie à produire la phytohormone (auxine) *in vitro*, à partir de l'indole produit par désamination et hydrolyse de tryptophane du milieu (Guiraud et Galzy, 1980). Le milieu minimal NF-b liquide (voir Annexe II) additionné de NH<sub>4</sub>Cl (0,1 g /l) et du tryptophane (0,5 mg /l) est utilisé. Des tubes à essai contenant 5 ml de milieu sont ensemencés par chacun des isolats bactériens puis misent à l'incubation à 30°C/4 jours. Les cultures sont par la suite centrifugées à 13000tr/min/3min. 1,2 ml de surnageant sont récupérés et additionnés de 4,8 ml de réactif de Salkowski (150 ml H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 98% + 250 ml H<sub>2</sub>O + 7,5 ml FeCl<sub>3</sub> 0,5M). La solution est agitée au vortex et gardée à température ambiante pendant 20 minutes. L'absorbance de la coloration rose apparue est mesurée au spectrophotomètre à 535 nm. La concentration de l'AIA est déterminée par établissement d'une courbe d'étalonnage de la DO à 535 nm en fonction de la concentration de l'AIA (Sigma) pur en µg/ml (annexe III)

## **1.7. Test *in vivo* sur pommes contre les trois champignons**

La variété de pomme utilisée dans ce test est la variété « Golden Delicious » qui est un fruit très populaire dans le monde entier, et très consommé chez nous. Son succès vient de sa capacité à répondre au goût des consommateurs, aux exigences de la production et du commerce moderne.

Pour réaliser le test, neuf isolats (E<sub>3</sub>, E<sub>9</sub>, E<sub>23</sub>, E<sub>31</sub>, E<sub>32</sub>, E<sub>34</sub>, S<sub>19</sub>, B<sub>3</sub> et B<sub>4</sub>) ont été sélectionnés. Ces isolats ont montré un meilleur effet sur *B.cinerea* (E<sub>9</sub>, E<sub>23</sub>, E<sub>32</sub>, E<sub>34</sub> et S<sub>19</sub>), sur *A.niger* et *A.flavus* (E<sub>3</sub>, E<sub>31</sub>, B<sub>3</sub> et B<sub>4</sub>) dans le test d'antagonisme.

- Des pommes saines du même calibre ont été choisies puis désinfectées avec de l'eau distillée additionnée de l'eau de javel à 2%,
- sécher les pommes à l'air ambiant pendant deux heures.
- Trouer les pommes dans la zone équatoriale (trois ou quatre trous de 3mm largeur x 3mm profondeur selon la taille du fruit),
- Ajouter 30µl de la suspension bactérienne (antagoniste) dans les blessures, (de l'eau distillée pour le témoin)
- après 2h, ajouter 15µl de la suspension du pathogène (champignon).
- Les pommes sont déposées dans des boîtes préalablement tapissées avec du papier absorbant imbibé d'eau distillée stérile (humidification)
- Après incubation (20 à 25°C pendant 4 à 6jr), le diamètre des zones pourries est comparé à celui du témoin.

Le test a été réalisé en triplicata. Un témoin non inoculé est également préparé. Chaque répétition est constituée de 5 pommes dans une boîte fermée.

## **NB**

### **Préparation de la suspension sporale**

1. Récupérer le maximum de spores du champignon.
2. Utiliser la cellule de mallasses pour compter le nombre de spores nécessaire ( $2 \times 10^5$  spores/ml), la formule utilisée c'est :

$$C = \frac{N}{2} \times 10$$

↓                      ↓

Nombre de spores      nombre de rectangles  
(Cellule vide)

### Pour la suspension bactérienne

Une culture jeune des neuf isolats sélectionnés dans le test d'antagonisme a été utilisée, les ensemencer dans un tube contenant de l'eau distillée stérile, et appliquer un volume de 30µl pour chaque blessure.

### 1.8. Analyses statistique

Pour interpréter les résultats obtenus, une analyse de la variance (ANOVA) et un test Tukey de comparaisons multiples sont réalisés à l'aide du logiciel GraphPadPrism® version 6.01. Lorsqu'il n'y avait que deux traitements, un test t (test de Student) est effectué.

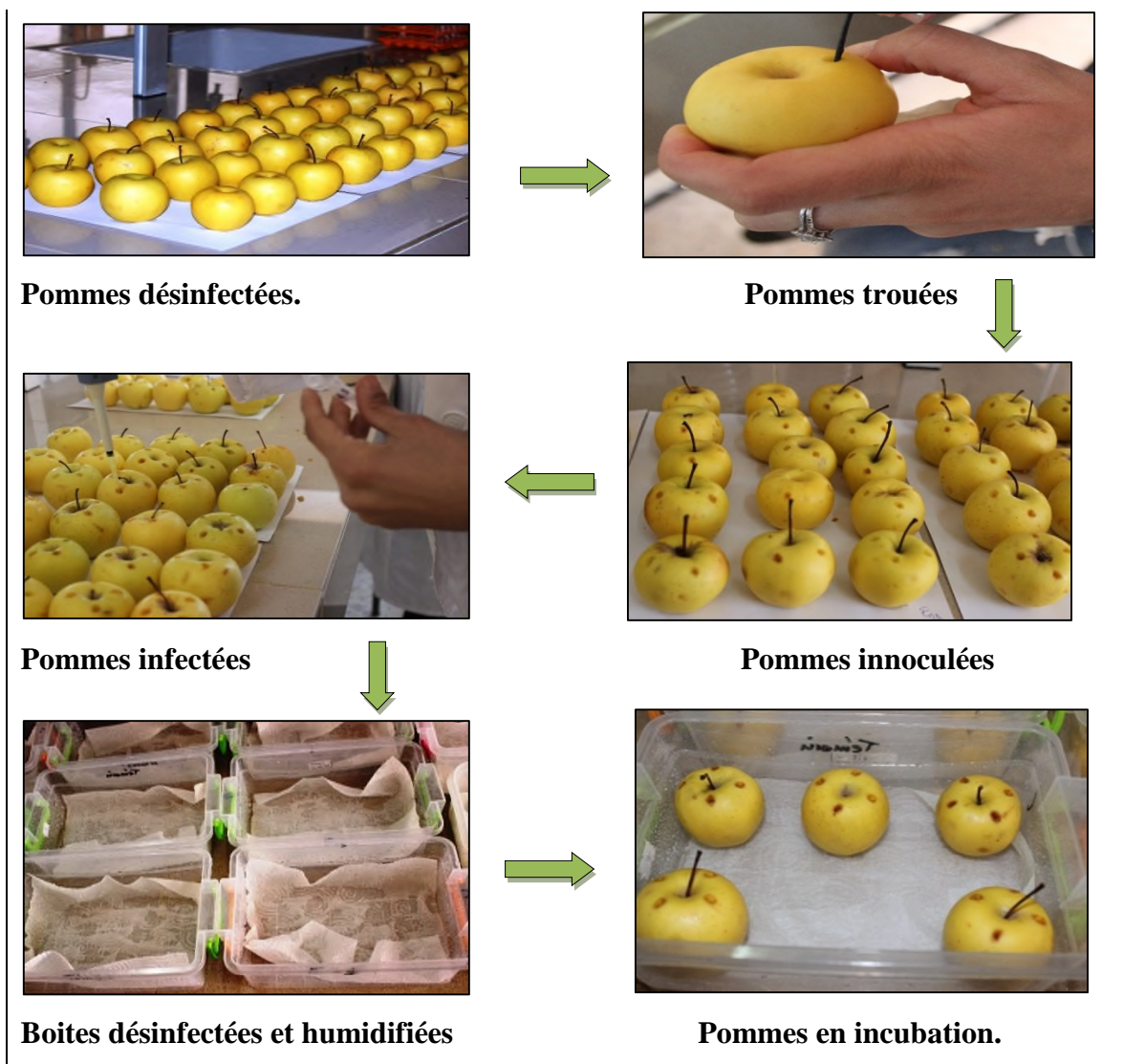


Figure 07 : Les principales étapes du test *in vivo* sur pomme



## 1. Tests physico-chimiques

**Tableau II** : les résultats des tests physico-chimiques.

	Eau de puit					Eau de barrage					Sol	
pH	7,44	7,49	7,66	7,72	7,68	7,81	7,85	7,87	7,86	7,87	Eau	7,63
											KCl	7,11
Humidité (%)	/					/					2,01	
Conductivité électrique $\mu\text{s/cm}$	1219					1479					91,8	

La teneur en humidité superficielle d'un sol représente le stockage temporaire de l'eau des précipitations à l'intérieur d'une couche superficielle de la surface terrestre. Elle est généralement limitée à la zone d'aération (Juglea, 2011). Notre échantillon du sol présente un taux d'humidité bas de 2%. D'après Mathieu et Pieltain (2003), les échantillons représentant une humidité de 1% sont des sols sableux et alors que celle qui représentent 7% d'humidité sont des sols argileux et organiques.

Les valeurs des pH-eau sont supérieures aux valeurs des pH-KCl pour l'échantillon du sol, ce qui est dû au captage des protons  $\text{H}^+$  accessible dans la solution. Aucune différence significative n'a été notée entre les valeurs des pH de l'eau de puit et celles de l'eau de barrage. D'autres études menées sur le barrage de Kherrata ont montré que le barrage se caractérise par des valeurs du pH neutres à légèrement alcalins (Guergazi et *al.*, 2014).

La valeur de la conductivité de l'eau de barrage ( $1479\mu\text{s/cm}$ ) est supérieure à celle de l'eau de puit ( $1219\mu\text{s/cm}$ ) ceci indique que les eaux sont faiblement minéralisées. Une telle valeur de la conductivité indique l'équilibre en concentration des ions. D'autres études ont trouvé que l'eau de barrage de Kherrata présente une conductivité de l'ordre de ( $828\mu\text{s/cm}$ ) qui est inférieur à la valeur trouvée dans notre étude. Cette dissemblance peut être due à la variabilité en teneurs en minéraux avec le temps ou sous l'effet de la pluviométrie (Guergazi et *al.*, 2014).

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

La recherche de nouveaux agents de lutte biologique pour inhiber le développement des phytopathogènes est devenue une priorité majeure en raison des préoccupations environnementales. Dans les trois dernières décennies, nous avons assisté à un développement de ce domaine (Islam et Hossain, 2013). Les antagonistes bactériens ont reçu beaucoup d'attention en raison de leur capacité à contrôler les différentes classes d'agents pathogènes des plantes à travers plusieurs modes d'action, et la possibilité d'une utilisation combinée avec d'autres méthodes de contrôle (Vitullo et *al.*, 2012).

Les 24 isolats sélectionnés ont été confrontés à trois champignons phytopathogènes (*B. cinerea*, *A. niger* et *A. flavus*). Après 7 jours d'incubation, les pourcentages d'inhibition de la croissance mycélienne (PGI %) sont calculés. Les résultats obtenus sont présentés dans les figures 08,09 et le tableau III.

**Tableau III** : Taux d'inhibition des champignons phytopathogènes.

	<i>B. cinerea</i>	<i>A. niger</i>	<i>A. flavus</i>
E32	60,83%	30,78%	42,85%
E31	46,66%	33,42%	62,85%
E15	44%	44,73%	40%
E35	35,83%	38,15%	47,14%
S27	36,66%	50%	25,71%
E26	38%	39,47%	50%
E9	63,33%	33,42%	54,28%
E52	50,83%	31,57%	37,14 <sup>2</sup> %
E10	48,33%	35,52%	47,14%
E3	47,50%	42,10%	51,42%
E34	63%	30,26%	40%
E46	46,66%	34,21%	32,85%
B4	50%	42,10%	64,28%
E30	48,33%	39,47%	47,14%
E23	64,16%	26,31%	38,57%
E47	41,66%	34,21%	47,14%
S30	23,33%	46,05%	38,57%
E48	49,16%	48,68%	38,57%
S19	63,33%	44,73%	37,14%
B8	48,33%	38,15%	31,42%
B3	47,50%	52,63%	65,71%
E37	47,50%	36,84%	31,42%
E38	41,66%	34,21%	35,71%
B1	50%	35,52%	47,14%

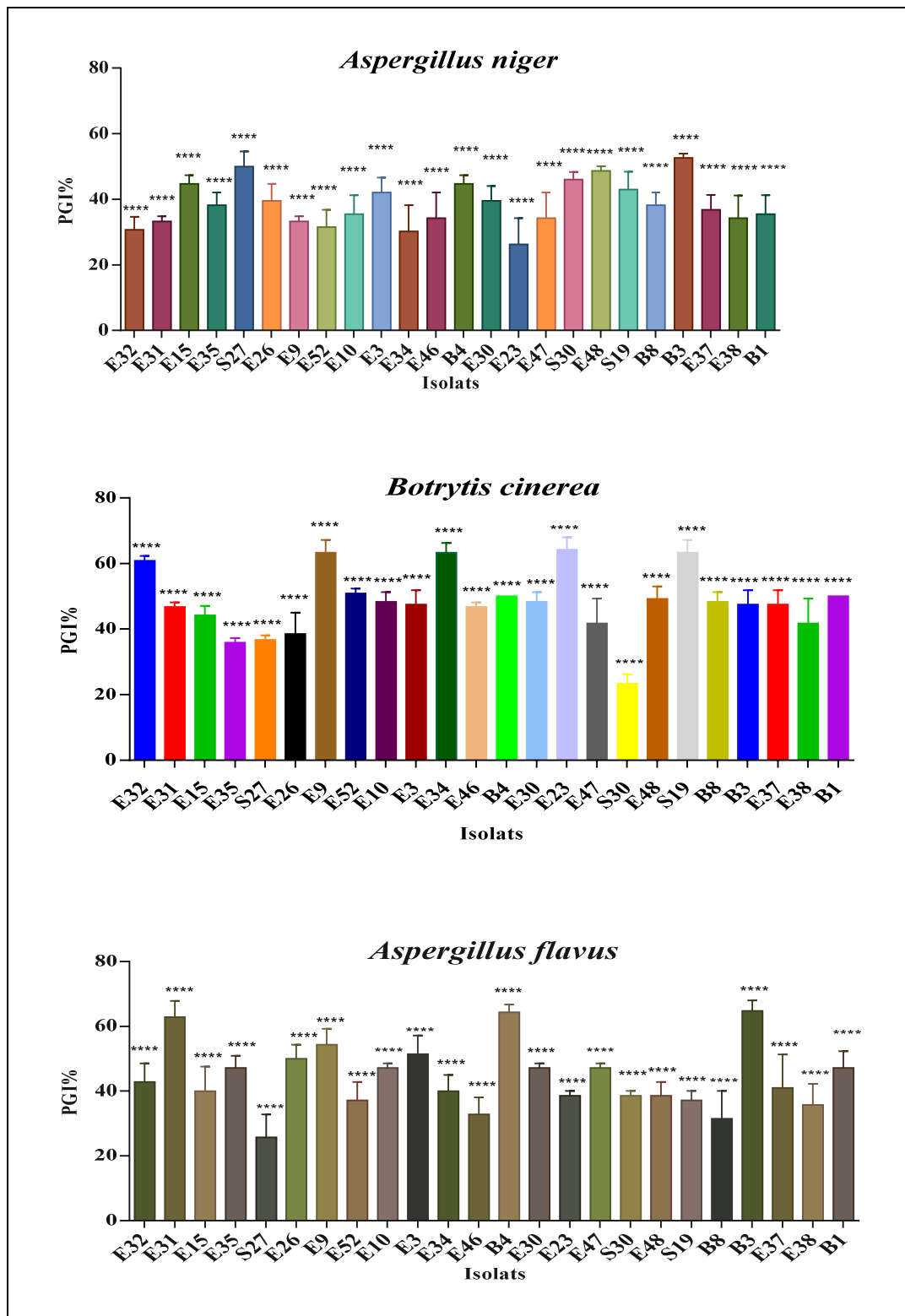


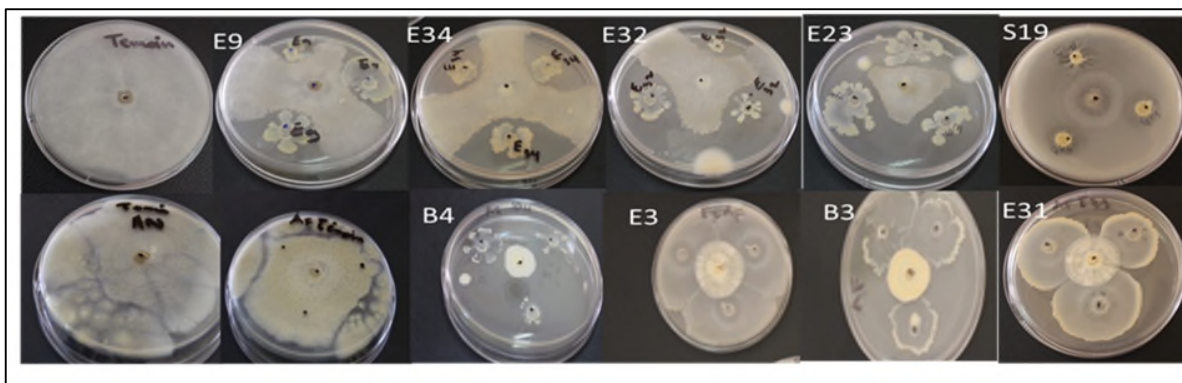
Figure 08 : Pourcentage d'inhibition de la croissance mycélienne des champignons phytopathogènes par les 24 isolats. \*\*\*\* : significatif (p<0,0001).

Tous les isolats ont montré un spectre d'action important vis-à-vis de *Botrytis cinerea*, *Aspergillus niger* et *Aspergillus flavus* avec des PGI% variant de 23.33 à 65.71%. Les isolats E<sub>23</sub>, E<sub>32</sub>, E<sub>34</sub>, E<sub>9</sub> et S<sub>19</sub> présentent les taux d'inhibition les plus importants contre *B. cinerea* avec des PGI% dépassant les 60%, et des PGI% important sur *A. flavus* et *A. niger* avec des valeurs allant de 26 à 54%. Les isolats E<sub>31</sub>, E<sub>3</sub>, B<sub>3</sub>, B<sub>4</sub> montrent de très grands taux d'inhibition vis-à-vis de *A. niger* et *A. flavus* allant jusqu'à 65%. Seuls les isolats E<sub>9</sub>, B<sub>3</sub> et B<sub>4</sub> montrent un large spectre d'action et présentent un grand taux d'inhibition contre les trois champignons phytopathogènes.

Les isolats obtenus à partir du sol (S<sub>27</sub>, S<sub>19</sub>, S<sub>30</sub>) montrent un effet antifongique vis-à-vis des trois champignons phytopathogènes. Cependant, cette différence ne diffère pas significativement des résultats obtenus avec les souches isolées à partir de l'eau de puit ou de l'eau de barrage. Dans un travail similaire, Trotel-Aziz et al. (2008) ont montré que 34.6% des isolats ont présenté une activité antifongique contre *Botrytis cinerea*. Kotan et al. (2009) ont trouvé 10 isolats sur 24 qui présentent un résultat positif contre *Aspergillus flavus*. Thakur et al., (2007) ont trouvé 42.72% des isolats présentant des résultats positifs contre (*A. niger*, *C. albicans*, *S. cerevisiae*, *F. oxysporum* et *F. moniliforme*). Une étude menée par Petatán-Sagahón et al. (2011) révèle que 10 isolats sur 160 ont montré un effet antifongique contre *Stenocarpella maydis* et *Stenocarpella macrospora*. Les résultats montrent que la sensibilité des champignons diffère selon l'isolat antagoniste.

Les zones d'inhibition observées entre les bactéries et l'agent pathogène, peuvent être dues à l'effet de substances inhibitrices diffusibles produites par les bactéries provoquant l'inhibition de la croissance mycélienne de l'agent pathogène. La production de métabolites antifongiques, en particulier les antibiotiques, joue un rôle important dans la suppression des champignons. Une autre possibilité est que les isolats bactériens appauvrissent le milieu de culture et inhibent ainsi la croissance du champignon (Jamalizadeh, 2008). En effet, Islam et Hossain (2013) disent que la compétition entre les bactéries et les phytopathogènes a longtemps été considéré comme un moyen important pour éliminer les maladies des plantes. Selon O'sullivan et O'gara (1992), la production de sidérophores par les bactéries rend le fer non disponible pour les champignons pathogènes. La production d'enzymes lytiques extracellulaires peut aussi inhiber la croissance du champignon. Ainsi, l'exposition des

phytopathogènes à des enzymes lytiques peut provoquer la dégradation des composés complexes tels que la chitine, les protéines, la cellulose, l'hémicellulose, et les glucanes. Ces composés sont des constituants importants des parois cellulaires de l'agent pathogène, mais aussi des sources de nutrition (Islam et Hossain, 2013).



**Figure 09 :** Résultats des tests d'antagonisme pour quelques isolats vis-à-vis des trois champignons phytopathogènes.

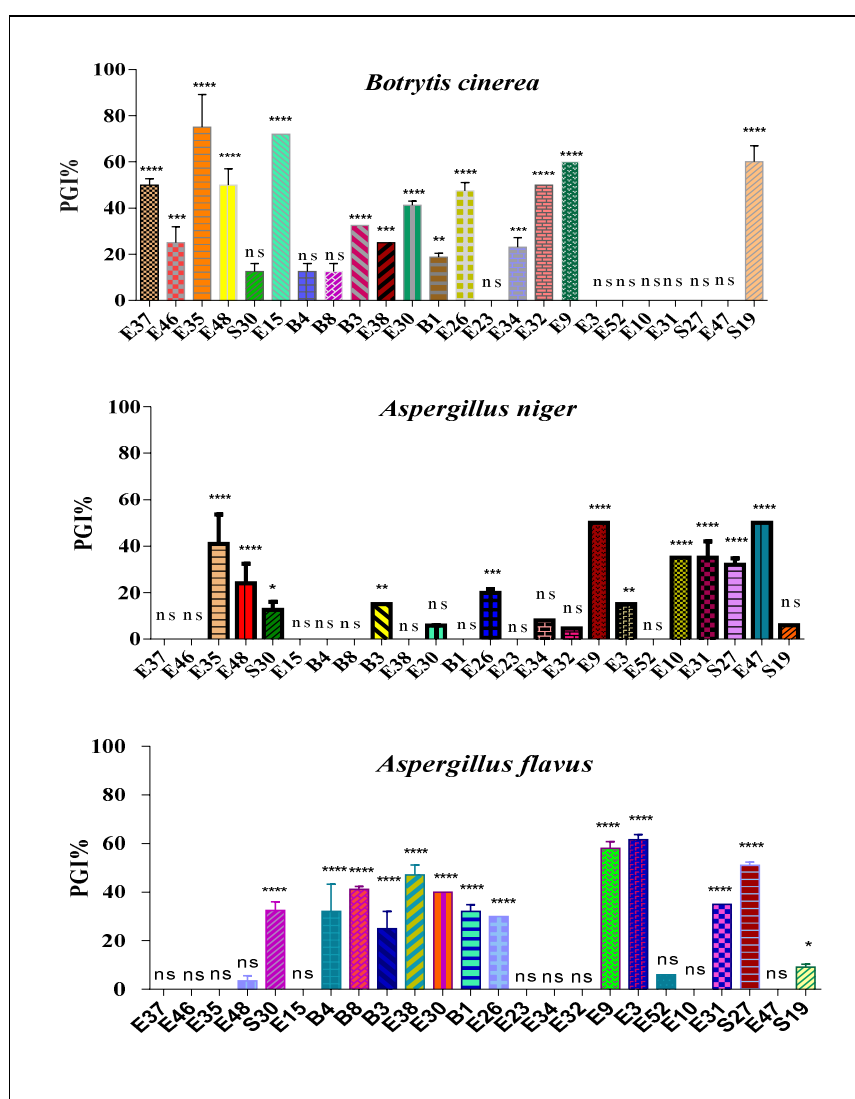
### 3. Production de métabolites volatiles

Les produits volatiles du métabolisme microbien peuvent souvent empêcher la croissance fongique, prévenir les maladies, promouvoir la croissance, ou induire une résistance. Ceux-ci constituent une classe importante de ressources de biocontrôle. Les substances antimicrobiennes volatiles ont plusieurs propriétés qui leur sont spécifiques, y compris la pénétration rapide vers la cible et l'effet à faible dose. Ceci tend à rendre leurs effets préventifs des maladies plus prononcés ainsi qu'à élargir leur champ d'application (You *et al.*, 2015).

La culture des bactéries antagonistes et des champignons phytopathogènes sur deux boîtes séparées évite le contact direct entre les deux, ce qui empêche la diffusion de substances dans le milieu de culture. Seule une substance volatile produite par la bactérie pourra donc provoquer une inhibition de la croissance du champignon. Les résultats obtenus à la suite de cette expérience sont indiqués dans les figures (10, 11) et le Tableau IV.

**Tableau IV** : Effet inhibiteur des composés volatiles.

	<i>B. cinerea</i>	<i>A. flavus</i>	<i>A. niger</i>
S19	60%	9,09%	6%
E37	50%	0%	0%
E46	25%	0%	0%
E35	75%	0%	41%
E48	50%	4%	24%
S30	12,50%	32,50%	12,50%
E15	72,50%	0%	0%
B4	12,50%	32%	0%
B8	12,50%	41,17%	0%
B3	32,50%	20%	25%
E38	25%	47,05%	0%
E30	41,25%	40%	5,88%
B1	18,75%	32%	0%
E26	47,50%	30%	18%
E23	0%	0%	0%
E34	23%	0%	8%
E32	50%	4,54%	0%
E9	65%	50%	58%
E3	0%	61,74%	15%
E52	0%	0%	6%
E10	0%	35%	0%
E31	0%	35%	40%
S27	0%	32%	51%
E47	0%	50%	0%

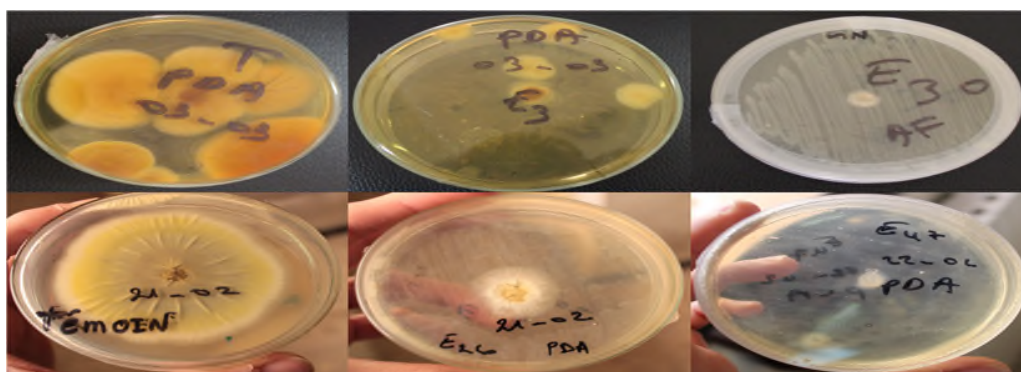


**Figure 10 :** Taux d'inhibition de la croissance des trois champignons phytopathogènes par les composés volatiles. ns : Non significatif ( $p \geq 0,05$ ); \* : significatif ( $0,05 \geq p \geq 0,01$ ); \*\* : Significatif ( $0,01 \geq p \geq 0,005$ ); \*\*\* : significatif ( $0,005 \geq p \geq 0,0001$ ); \*\*\*\* : significatif ( $p < 0,0001$ ).

Malgré l'absence d'un contact direct entre les champignons et les isolats bactériens, ces derniers ont pu exercer une activité inhibitrice sur le développement mycélien. Plusieurs études ont montré que de nombreux microorganismes peuvent produire des substances antimicrobiennes volatiles (Wenke et al. 2012). 95% de nos isolats présentent des résultats positifs et montrent des taux d'inhibition variables d'un champignon à l'autre. Seule la souche E<sub>9</sub> manifeste un spectre d'action plus aux moins important vis-à-vis de *B. cinerea*, *A. niger*, et *A. flavus* (65, 58, 50%), respectivement. Une étude réalisée par Prashar et al., (2013) a montré

que 60% des isolats utilisés dans leur investigation produisent des substances volatiles du même type.

En matière d'antagonisme, la spécificité de l'hôte (effet différent d'une même souche sur deux champignons différents) peut être due au type de composés volatiles libérés par chaque isolat, mais aussi à la structure de chaque champignon pathogène. Selon You et *al.*, (2015), les composés volatiles antifongiques produits par les bactéries peuvent être constitués d'alcools, d'aldéhydes, d'acides, d cétones, d'esters et d'alcane. Le processus d'utilisations des composés des agents de biocontrôle à l'égard des phytopathogènes est connu sous le nom de «mycofumigation » (Narayanasamy, 2013).



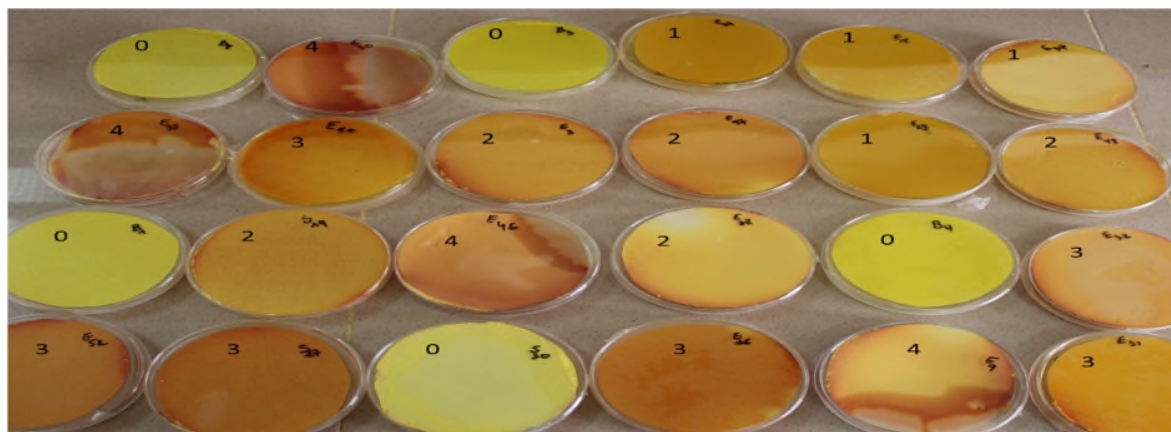
**Figure 11** : Quelques résultats de l'effet antagoniste par production de molécules volatiles.

## 4. Production de métabolites a intérêt agricole

### 4.1. Production d'acide cyanhydrique (HCN)

Le cyanure est un redoutable produit chimique par ses propriétés toxiques. Il est synthétisé, excrété et métabolisé par des centaines d'organismes, y compris les bactéries, les algues, les champignons, les plantes et les insectes. Chez les bactéries d'intérêt agricole, il joue un rôle important comme agent biologique contre les pathogènes (Saharan et Nehra, 2011). Dans cette étude 75 % des isolats sont HCN<sup>+</sup>. Ce même résultat a été rencontré dans le travail d'Avinash et Rai (2014). 50% et 25 % des isolats étaient producteurs de HCN dans des travaux réalisés par Damodaran et *al.* (2013) et Dinesh et *al.* (2015) respectivement.





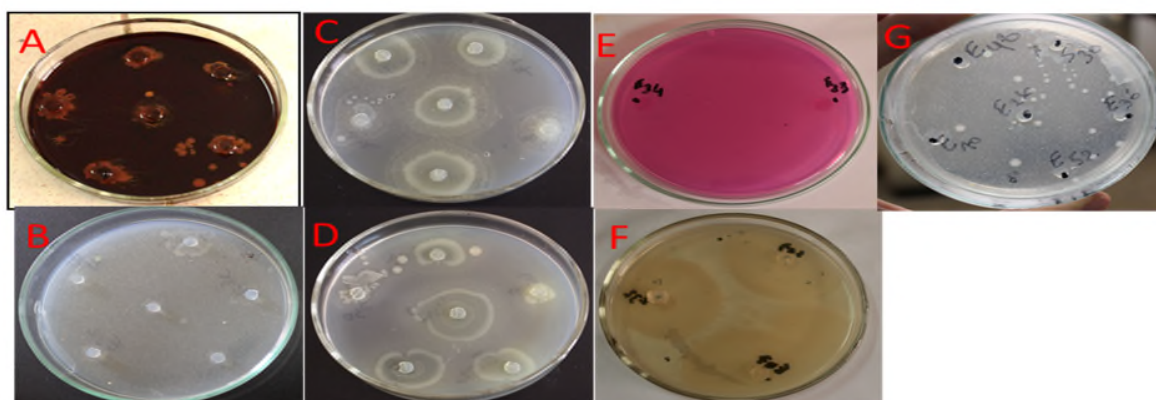
**Figure 12** : Production d’HCN par les 24 isolats. Selon la couleur produite (couleur jaune, crème, marron clair, marron foncé et brun rougeâtre. Pas de production (0) Production faible (1), moyenne (2), haute capacité (3) et production très élevée d’ HCN (4) (classification selon : Ghodsalavi et *al.*, 2013).

#### **4.2. Production d’ammoniac**

La production d’ammoniac est l’un des traits de promotion de la croissance des plantes (Ahmed et *al.* 2008). Selon Kavitha et *al.* (2013), la production d’ammoniac est considérée comme un mécanisme de contrôle des agents pathogènes. Dans notre étude, l’ammoniac est produit par tous les isolats, résultat similaire à celui d’Ahmad et *al.* (2008) et Gontia-Mishra et *al.* (2016). Dans une autre étude menée par Damodaran et *al.* (2015), 9 isolats sur 15 ont montré un résultat positif pour ce test, alors que 88% de résultats positifs sont obtenus par Dinesh et *al.* (2015).

#### **5. Activités enzymatiques**

Les enzymes sont les catalyseurs du monde biologique. Ce sont des macromolécules de haut poids moléculaire présentes dans les cellules de tous les organismes vivants où elles jouent un rôle essentiel dans le métabolisme cellulaire (Drouin, 2005). Les résultats des activités enzymatiques recherchés dans ce travail sont indiqués dans le tableau V et la figure 13.



**Figure 13** : Images des résultats des tests d'activités enzymatiques obtenus. A : Amylase ; B : Chitinase ; C : Estérase ; D : Lipase ; E : Uréase ; F : Protéase ; G : Phosphatase.

**Tableau V** : Résultat des différents tests d'activités enzymatiques.

Isolats	Phos	Est	Lip	Prot	Chit	Amyl	Uré	Cell
E <sub>32</sub>	-	+	+	-	-	-	+	-
E <sub>31</sub>	-	+	+	-	-	-	+	-
E <sub>15</sub>	-	+	+	+	+	-	+	-
E <sub>35</sub>	-	+	+	-	-	-	+	-
S <sub>27</sub>	+	+	+	-	-	+	+	-
E <sub>26</sub>	-	+	+	-	-	-	+	-
E <sub>9</sub>	-	+	+	-	-	+	+	-
E <sub>52</sub>	-	+	+	+	-	-	+	-
E <sub>10</sub>	-	+	+	-	-	-	+	-
E <sub>3</sub>	-	+	+	-	-	-	+	-
E <sub>34</sub>	-	+	+	+	-	+	+	-
E <sub>46</sub>	-	+	+	-	-	-	+	-
B <sub>4</sub>	-	-	+	-	-	+	-	-
E <sub>30</sub>	-	+	+	-	-	-	+	-
E <sub>23</sub>	+	+	+	+	-	+	+	-
E <sub>47</sub>	+	+	+	-	-	-	+	-
S <sub>30</sub>	+	-	+	-	-	-	+	-
E <sub>48</sub>	-	+	+	-	-	-	+	-
S <sub>19</sub>	-	+	+	-	-	-	+	-
B <sub>8</sub>	-	-	-	-	-	-	-	-
B <sub>3</sub>	-	-	+	-	-	+	-	-
B <sub>1</sub>	-	-	+	-	-	+	-	-
E <sub>37</sub>	-	-	+	-	-	-	+	-
E <sub>38</sub>	-	+	+	-	-	-	+	-

(+) : Activité positive ; (-) : Activité négative ; Phos : phosphatase ; Est : estérase ; Lip : lipase ; Prot : protéase ; Chit : chitinase ; Amyl : amylase ; Uré : uréase ; Cell : cellulase.

### 5.1. Activité phosphatasique

Seulement quatre isolats (S<sub>47</sub>, E<sub>23</sub>, E<sub>27</sub> et S<sub>30</sub>) sont phosphatase (+). Le phosphore est un macronutriment majeur essentiel pour la croissance et le développement biologique. Dans le sol, les microorganismes offrent un système de sauvetage biologique capable de solubiliser le phosphore inorganique insoluble et de le rendre disponible pour les plantes. La capacité de certains microorganismes de convertir le phosphore insoluble à une forme accessible constitue un trait important pour la sélection des PGPB. Aussi, une grande proportion de ce type de microorganismes est concentrée dans la rhizosphère (Kavitha *et al.*, 2013). De nombreux travaux discutent le rôle important des bactéries solubilisatrices de phosphate dans la promotion de la croissance des plantes et l'amélioration de leur rendement (Abd El-Azeem *et al.*, 2007 ; Tabli *et al.*, 2013 ; Nabti *et al.*, 2014)

### 5.2. Activité lipasique et estérasique

Dans ce travail, 75 % et 95 % des isolats se sont révélés producteurs d'enzymes estérasique et lipasique respectivement. Les lipases et les estérases constituent deux biocatalyseurs les plus importants recherchés en biotechnologie (Pliego *et al.*, 2015). Elles sont bien produites chez les bactéries Gram + telles que *Bacillus* et *Staphylococcus* que par des bactéries Gram – telles que *Pseudomonas* (Fickers *et al.*, 2008). Ces enzymes agissent dans une large gamme de substrats. Elles sont applicables dans la dégradation des graisses et des huiles à travers les détergents, le blanchiment du papier, le biodiésel, comme biolubrifiants et en industrie alimentaire (Pliego *et al.*, 2015). Dans l'étude réalisée par Tabli *et al.* (2013), 50% des souches apparaissaient positives pour l'activité lipasique et 100% pour l'activité estérasique. De telles enzymes sont recherchées dans d'autres travaux (Ahmad *et al.*, 2013 ; Gontia-Mishra *et al.*, 2016). Selon Senthilkumar R et Selvkumar G (2008), la production de lipase par le micro-organisme dépend largement de l'espèce, des souches et des conditions de culture qui sont responsables de l'hydrolyse des lipides.

### 5.3. Activité Protéasique

Quatre isolats (E<sub>15</sub>, E<sub>52</sub>, E<sub>34</sub>, E<sub>23</sub>) ont manifesté des résultats positifs pour ce test. Les protéases constituent un groupe important d'enzymes jouant un rôle important dans la régulation nutritionnelle et la dégradation de la matière organique. Les protéases sont les enzymes les plus importantes dans le domaine industriel, elles comptent environ 40% des

ventes mondiales. Elles sont généralement utilisées dans les détergents, l'industrie alimentaires, le cuir, le traitement de la fabrication du fromage, la récupération de l'argent et certains traitements médicaux et pharmaceutiques (Muthulakshmi et al., 2011). Dans les études réalisées par Ahmad et al., (2013) et Dinesh et al., (2015), 75% de résultats positifs sont obtenus pour ce test. Alors que dans d'autres études similaires d'Avinash et Rai. (2014) et Gontia-Mishra et al. (2016) 50% et 25% des isolats produisent des protéases, respectivement.

### 5.4. Activité chitinolytique

Seul l'isolat E<sub>15</sub> montre un résultat positif pour cette activité. Chez les bactéries, la chitinase joue un rôle dans la nutrition et le parasitisme alors que chez les champignons, les protozoaires et les invertébrés, elle est impliquée dans la morphogenèse. Elle joue un rôle comme agent de défense des plantes. Comme la cellulose, la chitine est un polymère de chaînes droites de sucre (N-acétyl-glucosamine) (Patil et al., 1999). Etant donné que la chitine est le composant majeur de la plupart des parois des cellules fongiques, la lyse enzymatique des parois cellulaires fongiques par l'intermédiaire des chitinase extracellulaire a été impliquée comme mécanisme de biocontrôle par des agents bactériens. Des études approfondies au cours des deux dernières décennies sur la chitinase ont été faites par un grand nombre de laboratoires, cela est principalement dû à sa propriété antifongique. Dans les études réalisées par Nabti et al. (2014), Tabli et al. (2013), Ahmad et al. (2013), 100%, 75% et 50% des isolats montrent une activité chitinasique respectivement. Ces résultats ne corroborent pas avec les notre. Avinash et Rai (2014) ont trouvé 4 souches sur 11 qui produisent la chitinase. Ces différences peuvent être dues au potentiel enzymatique des isolats et aux différences des lieux de prélèvement.

### 5.5. Activité cellulasique

Aucun de nos isolats n'a montré une activité cellulasique. Les cellulases sont des enzymes synthétisées par un grand nombre de micro-organismes y compris les champignons et les bactéries (*Clostridium*, *Cellulomonas*, *Thermomonospora*, *Trichoderma*, et *Aspergillus*). La cellulase est composée de 3 groupes d'enzymes : endo-(1,4)- $\beta$ -D-glucanase, exo-(1,4)- $\beta$ -D-glucanase et  $\beta$ -glucosidase. Elles sont largement utilisées dans les aliments, la fermentation, l'agriculture, pâtes à papiers et le textiles (Kuhad et al., 2011). Elles jouent un

rôle dans la dégradation des débris de plantes, des parois cellulaires fongiques, L'inhibition de la germination des spores, de l'élongation du tube germinatif et de la croissance fongique, ainsi que dans le biocontrôle des pathogènes et des maladies de plantes (Bhat, 2000).

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

### 5.6. Activité amylasique

Les isolats S<sub>27</sub>, E<sub>9</sub>, E<sub>34</sub>, B<sub>4</sub>, E<sub>23</sub>, B<sub>3</sub> et B<sub>1</sub> sont les seuls isolats à avoir montré un résultat positif pour cette activité. L'amidon est une réserve majeure d'hydrate de carbone de toutes les plantes supérieures. Les enzymes d'origine microbienne ont une importance commerciale majeure. Elles peuvent être divisées en six classes ;  $\alpha$ -amylase,  $\beta$ -amylase, amyloglucosidase, pullulanase,  $\alpha$ -glycosidase et dextrines (Aiyer, 2005). Les amylases sont produites par une large gamme d'organismes vivants allant des bactéries, plantes aux êtres humains. Les bactéries et les champignons sécrètent des amylases à l'extérieur de leurs cellules pour effectuer la digestion extracellulaire. Quand l'amidon est dégradé, les produits finaux solubles tels que (le glucose ou le maltose) sont absorbés par les cellules (Ekunsaumi, 2002).

Les bactéries assurent directement la croissance des plantes en leur solubilisant les nutriments dans le milieu. Nos résultats sont semblables à ceux observés par Dinesh *et al.* (2015), ayant trouvé que 25% des souches ont une activité amylasique. Tandis que Tabli *et al.* (2013), Nabti *et al.* (2014) ont constaté que 100% des souches avaient montrés une activité positive pour ce test. Les résultats obtenus par Gontia-Mishra *et al.* (2016) sont tous négatifs pour ce test. Ces différences peuvent être dues à la différence du site de prélèvement ainsi qu'à la variabilité et la diversité génétique des isolats.

### 5.7. Activité uréasique

Pour cette activité, 85% de nos isolats montrent un résultat positif. L'uréase est une métallo-enzyme qui catalyse l'hydrolyse de l'urée pour former deux molécules d'ammoniac et

une molécule de dioxyde de carbone. De nombreux organismes, y compris les plantes, certaines bactéries, les champignons et les invertébrés synthétisent l'uréase. Les uréases bactériennes jouent un rôle important dans la pathogenèse d'un certain nombre d'espèces bactériennes y compris *Proteus mirabilis*, *Staphylococcus saprophiticus*, *Yersinia enterocolitica*, *Ureaplasma urealiticum* et autres (Sirko et Brodzik, 2000). La production de cette enzyme peut être considéré comme un mécanisme indirect de la stimulation de la croissance des plantes. Nos résultats pour ce test sont semblables à ceux trouvés dans l'étude réalisée par Tabli et al. (2013) où 75% des isolats montrent une activité uréasique. Nabti et al. (2014) et Hasan et al. (2014) ont trouvé que 100% et 50% de leurs isolats étaient uréase + respectivement.

### 6. Production de phytohormone (AIA)

Les microorganismes de la rhizosphère des plantes sont susceptibles de synthétiser et de libérer plus d'auxines sous forme de métabolites secondaires en raison de la richesse du substrat racinaire par rapport aux sols non rhizosphérique. Des organismes tels que les bactéries, sont capables de synthétiser l'AIA et avoir un effet sur la croissance des plantes et leur développement en présence ou en absence du précurseur physiologique comme le tryptophane (Shahab et al., 2009). Pour ce test, 60% de nos résultats sont positifs avec une production d'AIA en quantités variable (Figures 14,15). Les isolats E<sub>52</sub> et E<sub>9</sub> produisent l'auxine à des quantités qui atteignent des valeurs de 45,5 et 43,5µg/ml respectivement. D'autres études réalisées par Tabli et al. (2013), Nabti et al. (2014), Abd EL-Azeem et al. (2007) et Gontia-Mishra et al. (2016) ont également isolé des bactéries productrices d'AIA et discuté son rôle important dans la stimulation de la croissance des plantes.



**Figure 14** : Quelques résultats positifs de la production d'AIA.

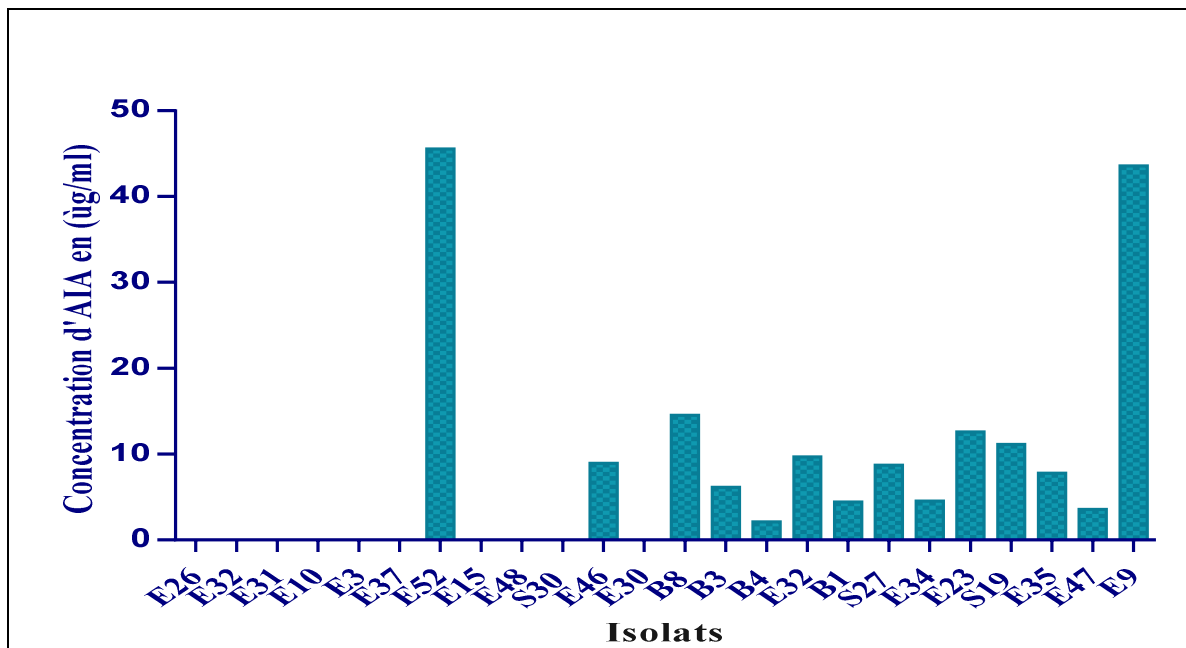


Figure 15 : Quantités d'AIA produites par les différents isolats.

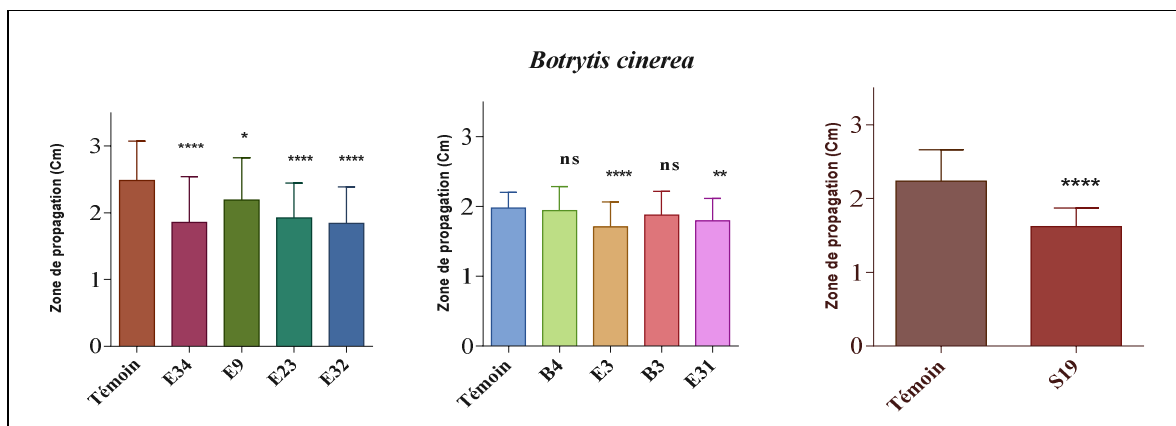
## 7. Test *in vivo* sur pomme

L'incidence croissante des maladies des pommiers a sérieusement affecté la qualité et la production de pommes. La résistance systémique induite par les microorganismes est l'un des mécanismes de contrôle biologique des maladies des plantes, de plus en plus pratiqué en agriculture (Ju *et al.*, 2014).

Dans notre test, la majorité des isolats testés *in vivo* présentent un effet plus au moins important sur les trois champignons phytopathogènes. Les isolats E<sub>23</sub>, E<sub>32</sub>, E<sub>34</sub> et S<sub>19</sub> présentent le plus grand taux d'inhibition contre *Botrytis cinerea* allant de 22 à 27%, avec un taux moins important envers *Aspergillus flavus* et *Aspergillus niger* (4-19%). Les isolats B<sub>3</sub>, B<sub>4</sub>, E<sub>3</sub> et E<sub>31</sub> manifestent le plus grand effet antagoniste vis-à-vis de *A. niger* et *A. flavus* (16 à 40%), avec un meilleur effet sur *A. flavus*, mais avec un taux d'inhibition moins important sur *B. cinerea*. Aussi, l'isolat E<sub>9</sub> montre un faible taux d'inhibition sur les trois champignons (11-12%) (Tableau VI, Figures 16, 17, 18).

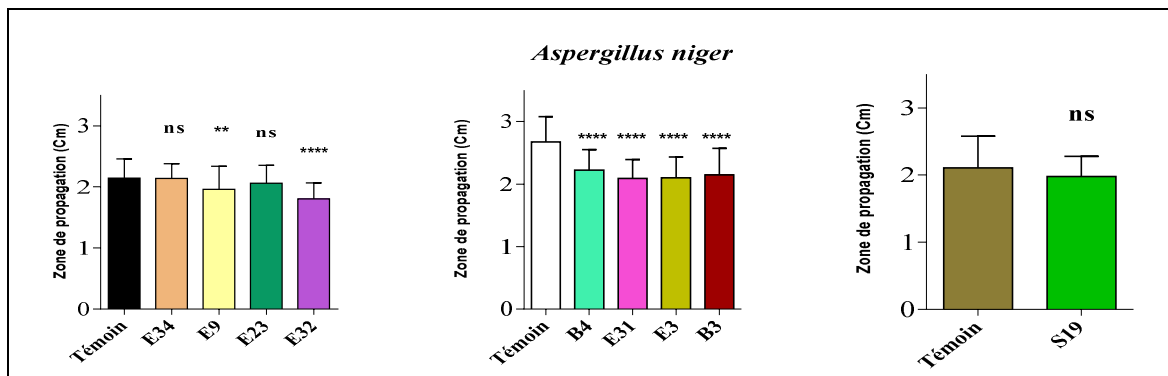
**Tableau VI:** Pourcentages d'inhibition des 9 isolats sur les 3 champignons sur pomme.

	<i>B. cinerea</i>	<i>A. niger</i>	<i>A. flavus</i>
E23	22,71%	6,40%	11,89%
E32	25,80%	19,21%	9,24%
E34	25,29%	4,04%	10,78%
E9	11,88%	12,11%	11,27%
S19	27,54%	6,02%	8,98%
B4	1,90%	16,81%	38,58%
E31	9,22%	21,94%	40,45%
E3	13,56%	21,36%	36,67%
B3	5,05%	19,67%	36,31%

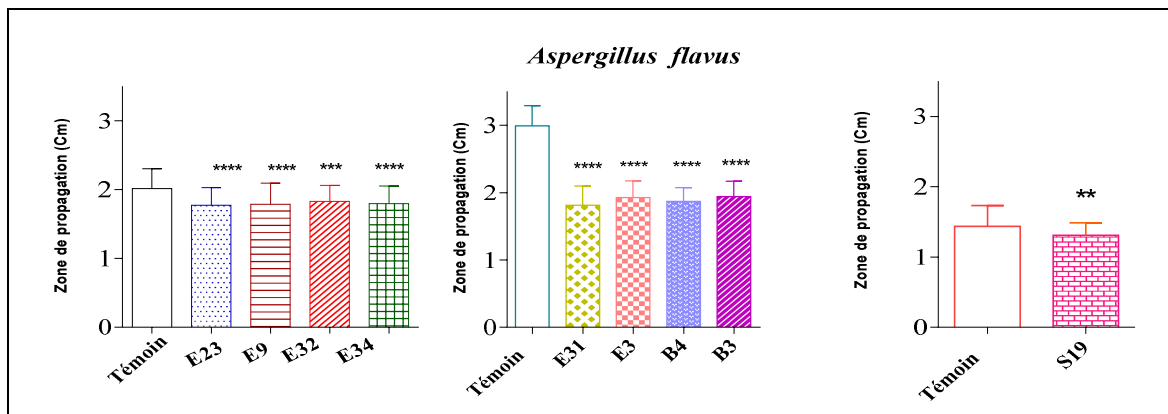


**Figure 16:** Diamètre de la zone pourrie par *Botrytis cinerea*. ns : Non significative ( $p \geq 0,05$ ) ; \* : significatif ( $0,05 \geq p \geq 0,01$ ) ; \*\* : Significatif ( $0,01 \geq p \geq 0,005$ ) ; \*\*\*\* : significatif ( $p < 0,0001$ ).





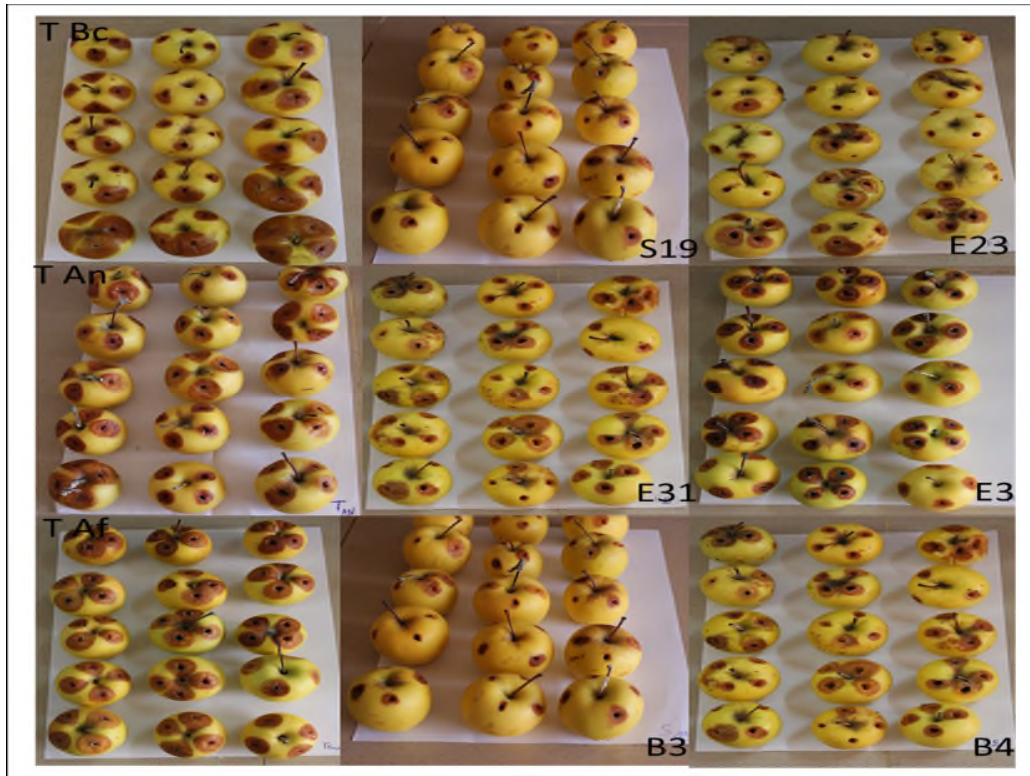
**Figure 17** : Diamètre de la zone pourrie par *Aspergillus niger*. ns : Non significative ( $p \geq 0,05$ ) ; \*\* : Significatif ( $0,01 \geq p \geq 0,005$ ) ; \*\*\*\* : significatif ( $p < 0,0001$ ).



**Figure 18** : Diamètre de la zone pourrie par *Aspergillus flavus*. \*\* : Significatif ( $0,01 \geq p \geq 0,005$ ) ; \*\*\* : significatif ( $0,005 \geq p \geq 0,0001$ ) ; \*\*\*\* : significatif ( $p < 0,0001$ ).

Les résultats obtenus *in vivo* viennent confirmer ceux obtenus dans le test d'antagonisme *in vitro*, ce qui est semblable aux résultats trouvés par (Kotan et al., 2009). Même si Ahmad et al. (2008) rapportent que les bons résultats obtenus *in vitro* ne peuvent pas toujours être reproduits de façon fiable dans des conditions *in vivo*. Dans une autre étude, Calvo et al. (2007) ont montré que la souche bactérienne *Rahnella aquatilis* donne des résultats positifs sur l'inhibition de la croissance de *Botrytis cinerea* sur les fruits de pomme. Bensidhoum et al. (2015) rapportent que la souche *Bacillus* sp. S7LiBe inhibe remarquablement le développement de *Botrytis cinerea* *in vivo*. (Jamalizadeh et al., 2009) rapportent que les souches de *Bacillus pumilus*, *B. cereus* et *B. subtilis* sont efficaces sur la maladie de la pourriture grise de la pomme, alors que Kotan et al. (2009) ont constaté que 10 isolats sur 24 ont exprimé une forte efficacité *in vivo* sur *Aspergillus flavus*.

On peut constater qu'une bactérie n'a aucun effet sur un champignon alors qu'elle est efficace sur un autre, cela montre la spécificité de certaines bactéries vis-à-vis d'un agent pathogène particulier. Ainsi, en inoculant deux ou plusieurs bactéries différentes, on peut espérer cumuler leur effet sur un champignon et améliorer leurs efficacités séparées contre deux ou plusieurs pathogènes (Bezert et al., 1996).



**Figure 19** : Résultats obtenus du test *in vivo* sur pomme.

T An : Témoin *Aspergillus niger*; T Bc : Témoin *Botrytis cinerea* ; T Af : Témoin *Aspergillus flavus*.

## **Conclusion et perspectives**

Dans cette étude, trois échantillons du sol et de l'eau sont prélevés d'une manière aléatoire dans les régions de la wilaya de Bejaïa (Seddouk et Kherrata). Ces échantillons ont fait l'objet d'un isolement de bactéries d'intérêt agricole. Cent vingt-cinq isolats ont été sélectionnés et purifiés sur la base de leurs aspects visuels. Ces isolats ont fait l'objet d'une sélection successive afin de choisir les meilleurs antagonistes contre les champignons ; *B. cinerea*, *A. niger* et *A. flavus*. Les résultats obtenus suggèrent que les bactéries sélectionnées peuvent être utilisées comme moyen de lutte efficace contre une large gamme de champignons phytopathogènes. Cependant, un approfondissement des résultats obtenus ainsi qu'une meilleure compréhension des mécanismes d'action des bactéries élues semblent être nécessaires pour une amélioration et une meilleure exploitation de leur rendement. Ainsi, nous émettons quelques réflexions et recommandations sous forme de perspectives pour l'amélioration de l'utilisation des isolats sélectionnés :

- ✓ Identification génotypique des isolats ;
- ✓ Réalisation des tests de stimulation de la croissance des plantes ;
- ✓ Tester la production d'autres phytohormones comme les gibbérellines et les cytokinines.
- ✓ Réalisation des tests d'antagonisme *in vitro* et *in vivo* avec d'autres champignons ;
- ✓ Détermination de leurs modes d'action dans l'activité antifongique ; essayer d'extraire et d'identifier les molécules impliquées dans la lutte biologique.

### A

- Abd El-Azeem S.A.M, Mehana T.A et Shabayek A.A. (2007).** Some plant growth promoting traits of rhizobacteria isolated from Suez Canal region, Egypt. African Crop Science Conference Proceedings. Vol. **8**, pp. 1517-1525.
- Adam A. (2008).** Elicitation de la résistance systémique induite chez la tomate et le concombre et activation de la voie de la lipoxygénase par des rhizobactéries non-pathogènes. *Thèse de Doctorat*, Université de Liège, Belgique. p7.
- Ahemad M. (2015).** Phosphate- solubilizing bacteria-assisted phytoremediation of metalliferous soils. *3 Biotech*.**5**, 111–121.
- Ahmad F, AhmadI, et Khan M.S. (2008).** Screening of free-living rhizospheric bacteria for their multiple plant growth promoting activities. *Microbiological Research*. **163**, 173-181.
- Ahmad N, Shinwari Z.K, Bashir S et Yasir M. (2013).** Function and Pylogenetic Characterization Of Rhizospheric Bacteria Associated With GM And Non GM Maize. *Pak. J. Bot.* **45**, 1781-1788.
- Aiyer P.V (2005).** Amylases and their applications. *African Journal of Biotechnology* Vol. **4**, pp. 1525-1529.
- Ajouz S. (2009).** Estimation du potentiel de resistance de *Botrytis cinerea* a des biofongicides. thèse de doctorat, université d'avignon. Faculté des Sciences. Vaucluse. P.3-19-22.
- Alvindia D.G, Natsuaki K.T. (2009).** Biocontrolactivities of *Bacillus amylo liquefaciens* DGA14 isolatedfrom banana fruit surface against banana crown rot-causingpathogens. *Crop Protection*. **28**, 236–242.
- Annapurna K, Kumar A, Kumar L.V, Govindasamy V, Bose P et Ramadoss D. (2013).** PGPR-Induced Systemic Resistance (ISR). In: *Plant Disease Management*. D.K. Maheshwari (ed.), *Bacteria in Agrobiolgy: Disease Management*. pp, 405-425.

**Antoun H et Prévost D. (2005).** ecology of plant growth promoting rhizobacteria. In: Z. A. Siddiqui (ed.), PGPR: Biocontrol and Biofertilization. pp, 1–38.

**Ashraf M, Ahmad M.S.A, Öztürk M, et Aksoy A. (2012).** Crop Improvement Through Different Means: Challenges and Prospects. M. Ashraf et al. (eds.), Crop Production for Agricultural Improvement. pp, 1-15.

**Avinash T.S. et Rai R.V. (2014).** Antifungal Activity of Plant Growth Promoting Rhizobacteria against *Fusarium oxysporum* and *Phoma* sp. Of *Cucurbitaceae*. In: R. N. Kharwar et al. (eds.), Microbial Diversity and Biotechnology in Food Security. Mysore, Karnataka. pp. 257-264.

### B

**Bach HJ, Munch JC. (2000).** Identification of bacterial sources of soil peptidases. *Biol Fertil Soils* **31**: 219–224

**Bacilio M, Rodriguez H, Moreno M, Hernandez J.P et Bashan Y. (2004).** Mitigation of salt stress in wheat seedlings by a gfp tagged *Azospirillum lipoferum*. *Biol Fertil Soils*. **40**, 188–193.

**Bensidhoum L., Rai A., Tabli N., Kahouadji N., Khaber M.et Nabti El-H. (2015).** Biological Control of *Botrytis cinerea* by *Bacillus* sp. Strain S7LiBe Under Abiotic Stress. *International Journal of Scientific Research in Science and Technology*. **6**, 07-14.

**Bezert G, Chappe P, Mourey A, Loubinoux B. (1996).** Action de *Bacillus* et d'*Actinomycetes* sur les champignons du bleuissement du bois. *Bulletin des Académie et Société Lorraines des Sciences*. **35**, 177-190.

**Bhat M.K. (2000).** Cellulases and related enzymes in biotechnology. *Biotechnology Advances*. **18**, 355-383.

### C

**Calvo J, Calvente V, Edith D.O.M, Benuzzi D et Isabel M.S.D.T. (2007).** Biological control of postharvest spoilage caused by *Penicillium expansum*

And *Botrytis cinerea* in apple by using the bacterium *Rahnella aquatilis*. International Journal of Food Microbiology. **113**, 251-257.

Choudhary D.K et Varma A. (2016). Microbial-mediated induced systemic resistance in plants.

**Christensen W.B. (1946).** Urea Decomposition as a Means of Differentiating *Proteus* and Paracolon Cultures from Each Other and from *Salmonella* and *Shigella* Types. *Journal of Bacteriology*.

**Cloutier, C. et Cloutier C. (1992).** Les solutions biologiques de lutte pour la répression des insectes et acariens ravageurs des cultures. In : Vincent, C. et Coderre, D. (réd.), La lutte biologique (chap. 2, p. 19-88). Boucherville (Québec), Gaëtan Morin Éditeur.

**Cappucino JC et Sherman N. (1992).** Negative staining. Microbiology: A laboratory Manual. **3**, 125-179.

**Carder, J.H. (1986).** Detection and quantification of cellulase by congo red staining of sunstrates in a cup-plate difussion assay. *Anal. Biochem.*, **153**: 75-79.

**Carrim, A. J. I. Barbosa E.C. and Gonçalves Vieira J.D. (2006).** Enzymatic Activity of Endophytic Bacterial Isolates of *Jacaranda decurrens* Cham. (Carobinha-do-campo). *Brazilian Archives of Biology and Technology*. **49**:353-359.

### D

**Damodaran T, Sah V, Rai R. B, Sharma D.K, Mishra V.K, Jha S.K et Kannan R. (2013).** Isolation of salttolerant endophytic and rhizospheric bacteria by natural selection and screening for promising plant growth-promotingrhizobacteria (PGPR) and growth vigour in tomat oundersodic environment.African Journal of Microbiology Research. Vol. **7**(44), pp. 5082-5089.

**Déclert. C. (1990).** Manuel de phytopathologie maraîchère tropicale. Éditions de l'Institut français de recherche scientifique pour le développement en coopération. Paris. PP 198-217.

**Deravel J, Krier F, Jacques P. (2013).** Les biopesticides, compléments et alternatives aux produits phytosanitaires chimiques. *Biotechnol. Agron. Soc. Environ.***18**, 220-232.

**Dib H.(2010).** Rôle des ennemis naturels dans la lutte biologique contre le puceron cendré, *Dysaphis plantaginea* Passerini (Hemiptera: Aphididae) en vergers de pommiers. Thèse de doctorat en Systèmes Intégrés en Biologie, Agronomie, Géosciences, Hydrosciences, Environnement » Spécialité: Sciences Agronomiques. P 28.

**Dinesh R, Anandaraja M, Kumarb A, Binia Y.K, Subilaa K.P, Aravind R. (2015).** Isolation, characterization, and evaluation of multi-trait plant growth promoting rhizobacteria for their growth promoting and disease suppressing effects. *Microbiological Research.* **173**, 34–43.

**Drouin M. (2005).** Etude de production de protéases alcalines par *Bacillus licheniformis* en utilisant des boues d'épuration municipales comme substrat. Mémoire de Maître des sciences (M.Sc.). Canada.

### **E**

**Ekunsaumi, T.(2002).** Laboratory Production and Assay of Amylase by Fungi and Bacteria. (2002). Issue. <<http://citeseerx.ist.psu.edu/viewdoc/download?doi=10.1.1.543.2223&rep=rep1&type=pdf>> (accessed 15.05.2016)

### **F**

**Farooq M, Hussain M, Wahid A et Siddique K.H.M. (2012).** Drought Stress in Plants. R. Aroca (ed.), *Plant Responses to Drought Stress*. pp. 1-5.

- Fernandoa W.G.D, Ramarathnama R, Krishnamoorthy A.S et Savchuka S.C. (2005).** Identification and use of potential bacterial organic antifungal volatiles in biocontrol. *Soil Biology and Biochemistry* **37**, 955–964.
- Férnandez-Acero FJ, Carbu M.M, Garrido C, Vallejo I et Contoral JM. (2007).** Proteomic Advances In: Phytopathogenic Fungi .*Current Proteomics*. **4**, 79-88.
- Fickers P, Destain J, Thonart P. (2008).** Les lipases sont des hydrolases atypiques : principales caractéristiques et applications. *Biotechnol. Agron. Soc. Environ.* **12**, 119-130.
- Fiddaman PJ et Rossalls S. (1993).** The production of antifungal volatiles by *Bacillus subtilis*. *Journal of Applied Bacteriology*. **74**, 119-126.

### G

- Ghodsalavi B, Ahmadzadeh M, Soleimani M, Madloo P.B et Taghizad-Farid R. (2013).** Isolation and characterization of rhizobacteria and their effects on root extracts of *Valeriana officinalis*. *AJCS*. **7**, 338-344.
- Glick BR , Cheng Z et Czarny J. (2007).** Promotion of plant growth by ACC deaminase-producing soil bacteria. *Eur. J. Plant Pathol.* **119**, 329-339.
- Gonita-Mishra I, Sapre S, Sharam A et Tiwari S. (2016).** Alleviation of Mercury Toxicity in Wheat by the Interaction of Mercury-Tolerant Plant Growth Promoting Rhizobacteria. *J Plant Growth Regul* . DOI 10.1007/s00344-016-9598-x.
- Gonzalez-Fernandez R, Prats E et Jorrin-Novo J.V. (2010).** Proteomics of Plant Pathogenic Fungi. *Journal of Biomedicine and Biotechnology*. Volume **2010**, Article ID 932527, P, 36.
- Grobelak A, Napora A et Kacprzak M. (2014).** The impact of plant growth promoting bacteria (PGPB) on the development of phytopathogenic fungi. *Folia Biologica et Oecologic*. **10**, 107–112.



**Guergazi S, Yahiaoui K, Amimeur D et Achour S. (2014).** Impact du procédé de la chloration sur la qualité des eaux de surface algériennes. *Mater. Environ. Sci.* **5**, 2028-2508.

**Gupta A, Gopal M, Tilak KVB R. (2000).** Mechanism of plant growth promotion by rhizobacterie. *Indian Journal of Experimental Biology*. Vol **38**, pp 856-862.

**Gupta G, Singh Parihar S, Kumar Ahirwar N, Kumar Snehi S et Singh V. (2015).** Plant Growth Promoting Rhizobacteria (PGPR): Current and Future Prospects for Development of Sustainable Agriculture. *J Microb Biochem Technol*. Volume **7**(2), 96-102.

**Guiraud J. P, Galzy P. (1980).** L'analyse microbiologique dans les industries alimentaires. Edi Usine.Paris.239p

### H

**Haran S, Shickler H et Chet I. (1996).** Molecular mechanisms of lytic enzymes involved in the biocontrol activity of *Trichoderma harzianum*. *Microbiology*. **142**, 2321-2331.

**Hardie M et Doyle R. (2012).** Measuring Soil Salinity. Shabala S et Ann Cuin T. (eds.), *Plant Salt Tolerance: Methods and Protocols, Methods in Molecular Biology*, pp. 415-425.

**Hasan M, Bano A, Hassan S.G, Iqbal J, Awan U, Rong-ji D et Khan K.A. (2014).** Enhancement of Rice Growth and Production of Growth-Promoting Phytohormones by Inoculation with Rhizobium and Other Rhizobacteria. *World Applied Sciences Journal*. **31**, 1734-1743.

### I

**Islam M.T et Hossain M.M. (2013).** Biological Control of Perono sporomycete Phytopathogen by Bacterial Antagonist. Maheshwari D.K. (eds.), *Bacteria in Agrobiolgy: Disease Management*, pp. 176-218

**J**

**Jamalizadeh M, Etebarien HR, Alizadeh A et Aminian H. (2008).** Biological control of gray mould on apple fruits by *Bacillus licheniformis* (EN 74-1). *phytoparasitica*. **36**, 23-29.

**Jamalizadeh M, Etebarian H.R, Aminian H et Alizadeh A. (2010).** Biological control of *Botrytis mali* on apple fruit by use of *Bacillus* bacteria, isolated from the rhizosphere of wheat. *Archives of Phytopathology and Plant Protection*. **43**, 1836–1845.

**Ju R, Zhao Y, Li J, Jiang H, Liu P, Yang T, Bao Z, Zhou B, Zhou X et Liu X. (2014).** Identification and evaluation of a potential biocontrol agent, *Bacillus subtilis*, against *Fusarium* sp. in apple seedlings. *Ann Microbiol*. **64**, 377–383.

**Juglea S. (2011).** Simulation de l'humidité du sol/ température de brillance à partir des données in situ dans le cadre de la validation des produits SMOS - site test Valencia Anchor Station. Thèse de Doctorat de la Sciences de la terre et des planètes solides. Université Toulouse 3 Paul Sabatier, Sciences de l'univers, de l'environnement et de l'espace. 151p.

**Kang S-M, Khan A.L, Hamayun M, Hussain J, Joo G-J, You Y-H, Kim J-G et Lee I-G. (2012).** Gibberellin-Producing *Promicromonospora* sp. SE188 Improves *Solanum lycopersicum* Plant Growth and Influences Endogenous Plant Hormone. *The Journal of Microbiology*. Vol. **50**, No. 6, pp. 902–909.

**Kang S-M, Waqas M, Khan A.L et Lee I-J. (2014).** Plant-Growth-Promoting Rhizobacteria: Potential Candidates for Gibberellines Production and Crop Growth Promotion. In: M. Miransari (ed.), *Use of Microbes for the Alleviation of Soil Stresses*, Volume **1**, and New York. Pp. 1-19.

**Kavitha T, Nelson R, et Josephin Jesi S. (2013).** Screening of rhizobacteria for plant growth promoting traits and antifungal activity against charcoal rot pathogen *Macrophomina Phaseolina*. *Int J Pharm Bio Sci*. **4**, 177 – 186.

**Koike S.T, Gladders P et Paulus A.O. (2007).** Vegetable Diseases. Copyright © 2007  
Manson Publishing Ltd. Grafos SA, Spain. P. 58.

**Kopečný J, Hodrová B et Stewart CS. (1996).** The isolation and characterization of a rumen chitinolytic bacterium. Lett. Appl. Microbiol. **23**, 195-198. Kumar GP, Mir Hassan Ahmed SK, Suseelendra Desai S , Leo Daniel Amalraj E et Rasul A. (2014). *In Vitro* Screening for Abiotic Stress Tolerance in Potent Biocontrol and Plant Growth Promoting Strains of *Pseudomonas* and *Bacillus* spp. International Journal of Bacteriology. 1-6.

**Kotan R, Dikbas N et Bostan H. (2009).** Biological control of post harvest disease caused by *Aspergillus flavus* on storedlemon fruits. African Journal of Biotechnology. **8**, 209-214.

**Krishnamurthy A et Rathinasabapathi B. (2013).** Oxidative stress tolerance in plants. Plant Signaling&Behavior, 8:10, e25761, DOI: 10.4161/psb.25761.

**Kuhad R.C, Gupta R et Singh A. (2011).** Microbial Cellulases and Their Industrial Applications. Enzyme Research. Volume 2011, Article ID 280696, P, 10.

### L

**Lorck H. (1948).** Production of hydrocyanic acid by bacteria. Physiol. Plant. **1**, 142-146.  
Lugtenberg B et Kamilova F. (2009). Plant-Growth-Promoting Rhizobacteria Annu. Rev. Microbiol.**63**, 541-556.

### M

**Mathieu C et Pieltain F. (2003).** Prélèvement et préparation des échantillons de terre, In Analyse chimique des sols « méthodes choisies » Edition TEC&DOC. p1-22.

**Muthulakshmi C, Gomathi D, Kumar D.G, Ravikumar G, Kalaiselvi M et Uma C. (2011).** Purification and Characterization of Protease by *Aspergillus flavus* under Solid State Fermentation. Journal of Biological Sciences Production. Volume 4, Number **3**, 137 – 148.

**M. Miransari (ed).** Use of Microbes for the Alleviation of Soil Stresses. Volume 1. DOI: 10.1007/978-1-4614-9466-9\_1 \_ Springer Science+Business Media New York 2014.

**N**

**Nabti EH, Bensidhoum L, Tabli N, Dahel D, Weiss A, Rothballer M, Schmid M, Hartmann A. (2014).** Growth stimulation of barley and biocontrol effect on plant pathogenic fungi by a Cellulose microbium sp. Strain isolated from salt-affected rhizosphere soil in north western Algeria European Journal of Soil Biology. **61**, 20-26.

**Narayanasamy P. (2013).** Mechanisms of Action of Fungal Biological Control Agents. Biological Management of Diseases of Crops, pp. 99-200.

**Newell N. (2013).** Review: Effects of Soil Salinity on Plant Growth. Plant Physiology.

**O**

**O'sullivan D.J et O'gara F. (1992).** Traits of Fluorescent *Pseudomonas spp.* Involved in Suppression of Plant Root Pathogens. Microbiological Reviews, p.662-676.

**P**

**Pal. K. K, Dey R, et Tilak K. V. B. R. (2014).** Fungal Diseases of Groundnut: Control and Future Challenges. In: Goyal A et Manoharachary. C (eds), Future Challenges in Crop Protection Against Fungal Pathogens. p, 12-16.

**Patil R.S, Ghormade V, Deshpande M.V. (1999).** Chitinolytic enzymes: an exploration. Enzyme and Microbial Technology. **26**, 473-483.

**Pérez-Montano F, Alías-Villegas C, Bellogín R.A, Cerro P.A, Espuny M.R, Jiménez-Guerrero I, López-Baena F.J, Ollero F.J et Cubo T. (2013).** Plant growth promotion in cereal and leguminous agricultural important plants: From microbial organism capacities to crop production. Microbiological Research. **169**, 325-336.

**Peix A., Rivas-Boyer A.A, Mateos P., Rodríguez-Barrueco C., Martínez-Molina E. and Velázquez E. (2001).** Growth promotion of chickpea and barley by a phosphate

solubilizing strain of *Mesorhizobium mediterraneum* under growth chamber conditions. *Soil Biol. Biochem.* **33**: 103–110.

**Pliego J, Mateos J.C, Rodriguez J, Valero F, Baeza M, Femat R, Camacho R, Sandoval G et Herrera-López E.J. (2015).** Monitoring Lipase/Esterase Activity by Stopped Flow in a Sequential Injection Analysis System Using p-Nitrophenyl Butyrate. *Sensors.* **15**, 2798-2811.

**Prashar P, Kapoor N et Sachdeva S. (2013).** Isolation and Characterization of *Bacillus sp* with In-vitro Antagonistic Activity against *Fusarium oxysporum* from Rhizosphere of Tomato. *J. Agr. Sci. Tech.* **15**, 1501-1512.

**Petatán-Sagahón I, Anducho-Reyes M.A, Silva-Rojas H.V, Arana-Cuenca A, Tellez-Jurado A, Cárdenas-Álvarez I.O et Mercado-Flores Y. (2011).** Isolation of Bacteria with Antifungal Activity against the Phytopathogenic Fungi *Stenocarpella maydis* and *Stenocarpella macrospora*. *Int. J. Mol. Sci.* **12**, 5522-5537.

### R

**Reyes-Ramirez A, Escudero-Abarca B.I, Aguilar-Uscanga G, Hayward-Jones P.M et Barboza Corona J.E. (2004).** Antifungal Activity of *Bacillus thuringiensis* Chitinase and Its Potential for the Biocontrol of Phytopathogenic Fungi in Soybean Seeds. *Journal of Food Science* **69**, nr. 5.

### S

**Saharan B.S. et Nehra V. (2011).** Plant Growth Promoting Rhizobacteria. A Critical Review. *Life Sciences and Medicine Research*, Volume 2011: LSMR-21.

**Schwarz W. H. (2001).** The cellulosome and cellulose degradation by anaerobic bacteria. *Appl Microbiol Biotechnol.* **56**, 634-649.

**Senthilkumar R. et Selvakumar G. (2008).** Isolation and Characterization of an Extracellular Lipase Producing *Bacillus sp.* SS-1 from Slaughterhouse Soil. *Advanced Biotech.* p. 24-25

**Sagahón IP, Anducho-Reyes MA, Silva-Rojas HV, Arana-Cuenca A, Alejandro Tellez-Jurado A, Cárdenas-Álvarez IO et Mercado-Flores Y. (2011).** Isolation of Bacteria with Antifungal Activity against the Phytopathogenic Fungi *Stenocarpella maydis* and *Stenocarpella macrospora*. *International Journal of Molecular Sciences*. **12**, 5522-5537.

**Shahab S, Ahmed N et Khan N.S. (2009).** Indole acetic acid production and enhanced plant growth promotion by indigenous PSBs. *African Journal of Agricultural Research*. Vol. **4**, pp. 1312-1316.

**Sirko A et Brodzik R. (2000).** Plant ureases: Roles and regulation. *Institute of Biochemistry and Biophysics, Polish Academy of Sciences*. Vol. **47** No. 4/2000, 1189–1195.

## T

**Tabli N, Nabti EH, Dahel D, Mokrane N, Manyani H, Dary M, et Megias M G. (2013).** Impact of diazotrophic bacteria on germination and growth of tomato, with bio-control effect, isolated from Algerian soil. *J. Eco. Heal. Env.* Vol. **1**, No. 1, 19-25.

**Thakur D, Yadav A, Gogoi B.K et Bora T.C. (2007).** Isolement et criblage de streptomycètes du sol des forêts protégées des états d'Assam et de Tripura pour des métabolites antimicrobiens. *Journal de Mycologie Médicale*. **17**, 242-249.

**Trotel-Aziz P, Couderchet M, Biagianti S et Aziz A. (2008).** Characterization of new bacterial biocontrol agents *Acinetobacter*, *Bacillus*, *Pantoea* and *Pseudomonas spp.* Mediating grape vine resistance against *Botrytis cinerea*. *Environmental and Experimental Botany*. **64**, 23-32.

## V

**Vinoth Raj S., Kanikkai Raja A., Babu Vimalanathan A., Manoj G. Tyagi, Naman Hirenkumar Shah, Johnson Amala Justin N.A., Infant Santhos B. and Sathiyaseelan K. (2009).** Study of starch degrading bacteria from kitchen waste soil in the production of amylase by using paddy straw. *Recent Research in Science and Technology* **1(1)**: 008–013.

**Vitullo D, Di Pietro A, Romano A, Lanzotti V et Lima G. (2012).** Role of new bacterial surfactins in the antifungal interaction between *Bacillus amyloliquefaciens* and *Fusarium oxysporum*. *Plant Pathology*. **61**, 689-699.

### W

**Weeden C.R, Shelton, A.M. et Hoffman, M.P. (2007).** *Biological Control: A Guide to Natural Enemies in North America*, [Enligne]. <http://www.nysaes.cornell.edu/ent/biocontrol/info/needstatus.html> (Page consultée le 30/05/2016).

**Wenke K, Wanke D, Kilian J, Berendzen K, Harter K et Piechulla B. (2012).** Volatiles of two growth-inhibiting rhizobacteria commonly engage AtWRKY18 function. *The Plant Journal*. **70**, 445-459.

### Y

**You C, Zhang C, Feng C, Wang J et Kong F. (2015).** *Myroideso doratimimus*, a biocontrol agent from the rhizosphere of tobacco with potential to control *Alternaria alternata*. *Bio Control*. **60**, 555- 564.

**Annexe I : Tableau : Sélection des 24 isolats après le test contre *B.cinerea***

Isolats	PGI%	Isolats	PGI%	Isolats	PGI%	Isolats	PGI%
S <sub>1</sub>	-	S <sub>37</sub>	-	E <sub>12</sub>	-	E <sub>48</sub>	49,16
S <sub>2</sub>	-	S <sub>38</sub>	-	E <sub>13</sub>	-	E <sub>49</sub>	-
S <sub>3</sub>	-	S <sub>39</sub>	-	E <sub>14</sub>	-	E <sub>50</sub>	-
S <sub>4</sub>	-	S <sub>40</sub>	-	E <sub>15</sub>	44	E <sub>51</sub>	-
S <sub>5</sub>	-	S <sub>41</sub>	-	E <sub>16</sub>	-	E <sub>52</sub>	50,83
S <sub>6</sub>	-	S <sub>42</sub>	-	E <sub>17</sub>	-	B <sub>1</sub>	50
S <sub>7</sub>	-	S <sub>43</sub>	-	E <sub>18</sub>	-	B <sub>2</sub>	-
S <sub>8</sub>	-	S <sub>44</sub>	-	E <sub>19</sub>	-	B <sub>3</sub>	47,50
S <sub>9</sub>	-	S <sub>45</sub>	-	E <sub>20</sub>	-	B <sub>4</sub>	50
S <sub>10</sub>	-	S <sub>46</sub>	-	E <sub>21</sub>	-	B <sub>5</sub>	-
S <sub>11</sub>	-	S <sub>47</sub>	-	E <sub>22</sub>	-	B <sub>6</sub>	-
S <sub>12</sub>	-	S <sub>48</sub>	-	E <sub>23</sub>	64,16	B <sub>7</sub>	-
S <sub>13</sub>	-	S <sub>49</sub>	-	E <sub>24</sub>	-	B <sub>8</sub>	48,33
S <sub>14</sub>	-	S <sub>50</sub>	-	E <sub>25</sub>	-	B <sub>9</sub>	-
S <sub>15</sub>	-	S <sub>51</sub>	-	E <sub>26</sub>	38	B <sub>10</sub>	-
S <sub>16</sub>	-	S <sub>52</sub>	-	E <sub>27</sub>	-	B <sub>11</sub>	-
S <sub>17</sub>	-	S <sub>53</sub>	-	E <sub>28</sub>	-	B <sub>12</sub>	-
S <sub>18</sub>	-	S <sub>54</sub>	-	E <sub>29</sub>	-		
S <sub>19</sub>	63,33	S <sub>55</sub>	-	E <sub>30</sub>	48,33		
S <sub>20</sub>	-	S <sub>56</sub>	-	E <sub>31</sub>	46,66		
S <sub>21</sub>	-	S <sub>57</sub>	-	E <sub>32</sub>	60,83		
S <sub>22</sub>	-	S <sub>58</sub>	-	E <sub>33</sub>	-		
S <sub>23</sub>	-	S <sub>59</sub>	-	E <sub>34</sub>	63		
S <sub>24</sub>	-	S <sub>60</sub>	-	E <sub>35</sub>	35,83		
S <sub>25</sub>	-	S <sub>61</sub>	-	E <sub>36</sub>	-		
S <sub>26</sub>	-	E <sub>1</sub>	-	E <sub>37</sub>	47,50		
S <sub>27</sub>	36,66	E <sub>2</sub>	-	E <sub>38</sub>	41,66		
S <sub>28</sub>	-	E <sub>3</sub>	47,50	E <sub>39</sub>	-		
S <sub>29</sub>	-	E <sub>4</sub>	-	E <sub>40</sub>	-		
S <sub>30</sub>	23,33	E <sub>5</sub>	-	E <sub>41</sub>	-		
S <sub>31</sub>	-	E <sub>6</sub>	-	E <sub>42</sub>	-		
S <sub>32</sub>	-	E <sub>7</sub>	-	E <sub>43</sub>	-		
S <sub>33</sub>	-	E <sub>8</sub>	-	E <sub>44</sub>	-		
S <sub>34</sub>	-	E <sub>9</sub>	63,33	E <sub>45</sub>	-		
S <sub>35</sub>	-	E <sub>10</sub>	48,33	E <sub>46</sub>	46,66		
S <sub>36</sub>	-	E <sub>11</sub>	-	E <sub>47</sub>	41,66		



## Annexe II. Composition des milieux de culture utilisés (pour un litre du milieu)

### Gélose nutritive (GN)

Peptone .....	5g
Extrait de levure .....	2g
Extrait de viande .....	1g
NaCl .....	5g
pH.....	7,5
Agar.....	18g

### Milieu NF-b

K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> .....	6g
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> .....	4g
MgSO <sub>4</sub> ,7H <sub>2</sub> O.....	0.2g
NaCl .....	0.1g
CaCl <sub>2</sub> .....	0.02g
FeCl <sub>3</sub> .....	0.01g
Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> .....	0.002g
Acide malique anhydre.....	5g
Extrait de levure.....	0.05g
pH .....	7,1

### Bouillon PBS

Nacl.....	18, 0 g
Kcl.....	0,2g
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> .....	1,44g
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> .....	0,24g
pH.....	7

### Bouillon Nutritif :

Peptone.....	10g
Extrait de viande.....	5g

Chlorure de sodium.....5g  
pH.....7,2

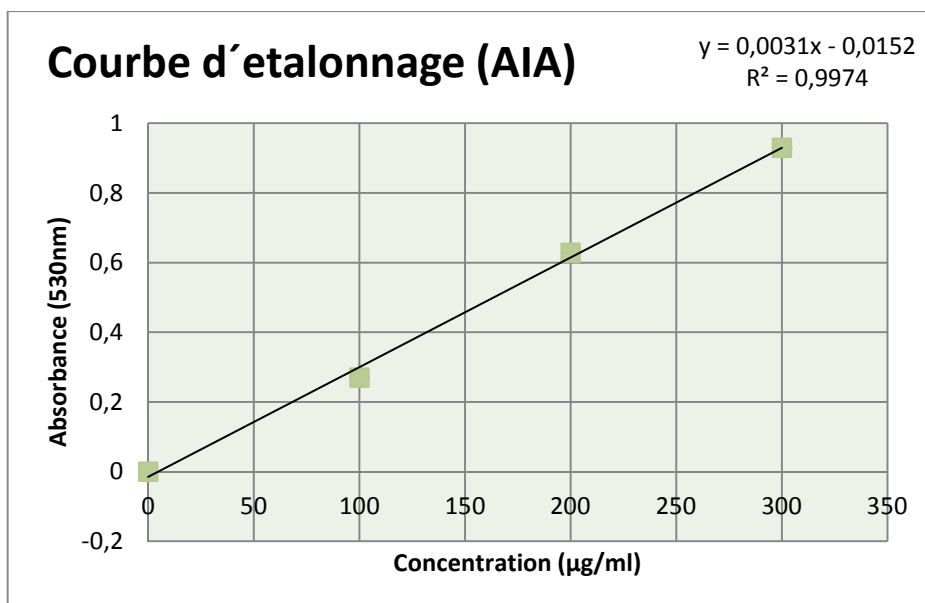
### Milieu PDA : Potato Dextrose Agar

Extrait de pomme de terre.....4g  
D-glucose .....20g  
Agar bactériologique.....15g  
Eau distillée.....1000ml  
pH.....6,7

### Milieu PCA (Plat Count Agar)

Caseine.....5g  
Extrait de levure.....2,5g  
Glucose.....1g  
Agar.....15g  
pH.....7

### Annexe III: Courbe d'étalonnage d'acide indole acétique (AIA) à 530nm



## Résumé :

Les champignons phytopathogènes causent des problèmes énormes en agriculture, dont la gravité peut être atténuée par les agents de biocontrôle. A partir d'un total de 125 bactéries, 24 isolats ont été sélectionnés à partir du sol, de l'eau de puit (Seddouk) et de l'eau de barrage (Kherrata). Elles ont fait l'objet d'une sélection sur la base de leurs activités antifongiques contre les trois champignons *Botrytis cinerea*, *Aspergillus niger* et *Aspergillus flavus*. Pour ceci, des tests d'antagonismes directs et de productions de substances antifongiques volatiles ont été effectués. Les activités enzymatiques (cellulase, protéase, amylase, phosphatase, chitinase, uréase, estérase et lipase), la production d'AIA, d'ammoniac et d'acide cyanhydrique ont également été recherchées. Les 9 meilleurs isolats (E<sub>32</sub>, E<sub>34</sub>, E<sub>23</sub>, E<sub>9</sub>, B<sub>3</sub>, B<sub>4</sub>, E<sub>3</sub>, S<sub>19</sub> et E<sub>31</sub>), ayant montrés une bonne activité antifongique *in vitro*, ont été testés contre les trois champignons sur pommes. Les résultats obtenus montrent que les isolats sélectionnés inhibent considérablement la croissance mycélienne dans le test d'antagonisme directe, avec des PGI% qui varient entre (23.33 à 65.71%) et dans le test de production de substances volatiles, avec des PGI% allant jusqu'à 65%. La plupart des isolats étudiés produisent la majorité des enzymes recherchées. La production d'HCN est observée chez 80% des isolats, particulièrement par les souches E<sub>9</sub>, E<sub>30</sub>, E<sub>35</sub> et E<sub>46</sub>. Tous les isolats produisent de l'ammoniac. Tandis que 60% d'entre eux produisent de l'AIA (E<sub>52</sub>: 45.5 ;E<sub>9</sub>:43.5 µg/ml). Les résultats de l'activité antifongique sur pommes montrent que les 9 isolats réduisent les zones de lésions de 2 à 40% selon le champignon. Les résultats obtenus ouvrent des perspectives importantes, particulièrement en matière de possibilité d'utilisation des isolats actifs sur champ, ainsi que la détermination de leurs mécanismes d'action.

Mots clés : biocontrôle, champignons phytopathogènes, antagonisme, PGPR, pomme.

## Abstract:

The plant pathogenic fungi cause huge problems in agriculture; the severity can be mitigated by biocontrol agents. From a total of 125, 24 isolates were from soil, well water (Seddouk) and from dam water (Kherrata). They were the subject of an election on the basis of their antifungal activity against three fungi *Botrytis cinerea*, *Aspergillus flavus* and *Aspergillus niger*. For this, the test of direct antagonism and volatile antifungal substances productions were made. The enzyme activities (cellulase, protease, amylase, phosphatase, chitinase, urease, esterase and lipase), the production of IAA, ammonia and hydrocyanic acid were also investigated. The 9 best isolates (E<sub>32</sub>, E<sub>34</sub>, E<sub>23</sub>, E<sub>9</sub>, B<sub>3</sub>, B<sub>4</sub>, E<sub>3</sub>, S<sub>19</sub> and E<sub>31</sub>), having shown good antifungal activity *in vitro*, were tested against three fungi on apples fruits. The results obtained show that the selected isolates significantly inhibit mycelial growth in the direct antagonism test, with PGI% ranging from (23.33 to 65.71%) and in the production test of volatile substances with PGI% of up to 65%. Most isolates studied produce the majority of enzymes sought. The production of HCN is observed in 80% of the isolates, especially by strains E<sub>9</sub>, E<sub>30</sub>, E<sub>35</sub> and E<sub>46</sub>. All the isolates produce ammonia. While 60% of them produce AIA (E<sub>52</sub>: 45.5; E<sub>9</sub>: 43.5 µg/ml). The results of the antifungal activity on apples show that 9 isolates reduce the areas of lesions of 2 to 40% depending on the fungus. The results offer excellent prospects, particularly in terms of ability to use assets on field isolates, and the determination of their mechanisms of action.

Keywords: biocontrol, plant pathogenic fungi, antagonism, PGPR, apple.



# Introduction

# Synthèse bibliographique

# CHAPITRE I

## La phytopathologie

# Chapitre II

## Lutte biologique



Matériel  
et  
Méthodes

Résultats  
et  
Discussion

Conclusion  
et  
Perspective

# Références bibliographique

# Annexes

# Partie pratique