

République Algérienne Démocratique et Populaire
Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique
Université de Saad Dahleb Blida 1
Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie
Département de Biologie et Physiologie Cellulaire



Mémoire de fin d'études

En vue de l'obtention du master académique en science de la nature et de la vie

Option : Microbiologie Appliquée

Thème

Caractérisation des Bactéries endophytes isolées du palmier dattier

Présenté par :

M^{elle} Elahcene Ahlam

Soutenu devant le jury :

M^{me} LOUNACI L.	MCB	Université de Blida '1'	Présidente
M^{me} BOUDJEMA N.	MCA	Université de Blida '1'	Examinatrice
M^{me} TAFIFET L.	MCB	Université de Blida '1'	Promotrice

Année universitaire 2021/2022

Remerciements:

Avant tout nous remercions 'Allah' le tout puissant et miséricordieux de nous avoir donné la force et le courage afin de pouvoir accomplir ce modeste travail.

J'adresse mes remerciements les plus sincères à mon encadrante 'Madame TAFIFET Lamia' qui a guidé et surveillé le déroulement du travail de ce mémoire, pour tous ses précieux conseils, pour son écoute active et sa disponibilité, à qui je dois exprimer mon respect et ma reconnaissance.

Je tiens également à remercier les honorables membres du jury pour l'honneur qu'ils nous accordent, en acceptant d'évaluer notre travail.

Mes sincères remerciements à 'Madame Lounaci Lamia' enseignante à l'université de Saad Dahleb Blida '1' d'avoir accepté de présider le jury de ce mémoire ainsi qu'à 'Madame Boudjema Nouara' pour avoir accepté d'examiner ce modeste travail.

Mes plus authentiques remerciements à 'Madame Selma' responsable du laboratoire de Phytobacteriologie de l'université de Saad Dahleb Blida '1' pour son aide et son encouragement.

Nos sentiments de reconnaissance ainsi à tous les enseignants de l'université durant tout mon cursus universitaire pour tout le savoir et l'aide apporté.

Dédicaces

Je dédie ce modeste travail : A la femme qui m'a soutenu et qui a toujours cru en moi, ma mère. Je ne saurais jamais la remercier pour tout ce qu'elle a fait pour moi, elle a été présente dans les meilleurs et les pires moments, elle m'a donnée la force, et le courage pour y arriver. Il n'y a pas assez de mots pour lui décrire tout l'amour que j'ai pour elle.

A mon cher père qui m'a soutenu, qui a formulé des prières à mon égard, il a toujours essayé de nous donner le meilleur, il m'a appris à ne jamais laisser tomber et de toujours avancer sans jamais se retourner en arrière.

A ma sœur Meriem ma seul et unique sœur qui m'a toujours épaulé et donner des conseils pour atteindre mes objectifs, elle restera ma meilleur amie, rien ne puisse d'écrire l'amour d'une sœur.

A mes amies qui ont toujours été là tous le long de mes études, on a passé des moments inoubliables de stress de colère mais surtout de rire et de joie.

Ahlem

Liste des abréviations

FISH : Hybridation in situ par fluorescence.

ABA : Acide abscissique.

GA : Gibbérellines.

CK : Cytokines.

ET : Ethylène.

AIA : Acide indole-3-acétique.

ISR : Résistance systémique induite.

Résumé

Notre étude a pour objectif principal la caractérisation des bactéries endophytes isolées des racines du palmier.

L'isolement des bactéries endophytes a été réalisé durant l'année 2021 à partir de palmier dattier du Sud Algérien dans deux régions 'Taghit' et 'Kenadsa' situées dans la Wilaya de Béchar. La caractérisation macroscopique des souches bactériennes a permis d'obtenir différents aspects des colonies montrant une diversité des populations. Parmi la collection, les souches non fluorescentes ont été sélectionnées pour l'identification préliminaire. Un total de vingt-huit isolats a été retenu par le test de fluorescence sur le milieu de culture King B ne présentant aucune fluorescence sous lumière ultra-violet.

L'étude des caractères biochimiques et enzymatiques des isolats endophytes a été réalisée par une série de tests d'oxydase, catalase, indole, liquéfaction de gélatine ainsi que la détermination de l'activité amylolytique, lipolytique et la tolérance à la température, la salinité et l'osmolarité. Les résultats biochimiques ont permis de mettre en évidence les genres : *Bacillus* pour 11 isolats testés (39%), *Enterobacter* pour 12 isolats (42%) , *Pseudomonas* non fluorescents pour 2 isolats (7%) , *Acinetobacter* pour un seul isolat (3%) , *Rhizobium* pour un isolat (3%) , un seul isolat n'a pas été identifié (3%) . Les tests enzymatiques et de tolérance aux stress abiotiques ont montré des résultats intéressants et une efficacité importante et a permis de mieux s'orienter aux genres d'endophytes performants.

D'autre part, les souches bactériennes endophytes étudiées ont été testées pour leur activité antagoniste selon la méthode des stries croisées vis-à-vis de deux bactéries pathogènes ; une souche pathogène à l'homme causant l'infection urinaire '*Escherichia coli*' et l'autre phytopathogène, l'agent de tumeur du collet des arbres fruitiers '*Agrobacterium tunefaciens* C58'.

Les résultats de test de l'antagonisme ont montré que 93% des souches endophytes ont eu un effet antagoniste avec des diamètres de zones d'inhibition de taille variables entre 6 mm et 15 mm.

Les trois souches ; PF43, TCR51 appartenant au genre *Bacillus* et KFR9 appartenant au genre *Enterobacter* ont montré une forte activité antagoniste à l'égard des deux bactéries pathogènes avec des zones d'inhibition qui atteignent 15mm est sont considérées comme endophytes performants. En revanche, les deux souches XJ3 appartenant au genre *Rhizobium* et KMR4 appartenant au genre *Bacillus* n'ont enregistré aucun effet antagoniste.

Mots clés : Palmier dattier, bactéries, endophytes, caractérisation, antagonisme.

Abstract

The main objective of our study is the characterization of endophytic bacteria isolated from palm tree roots.

The isolation of endophyte bacteria was carried out during the year 2021 from date palms in southern Algeria in two regions 'Taghit' and 'Kenadsa' located in the Wilaya of Béchar. The macroscopic characterization of the bacterial strains made it possible to obtain different aspects of the colonies showing a diversity of populations. Among the collection, non-fluorescent strains were selected for preliminary identification. A total of twenty-eight isolates were retained by the fluorescence test on King B culture medium showing no fluorescence under ultraviolet light.

The study of the biochemical and enzymatic characters of the endophyte isolates was carried out by a series of tests of oxidase, catalase, indole, liquefaction of gelatin as well as the determination of the amylolytic, lipolytic activity and the tolerance to temperature, salinity and osmolarity. The biochemical results made it possible to highlight the genera: *Bacillus* for 11 isolates tested (39%) , *Enterobacter* for 12 isolates (42%) , non-fluorescent *Pseudomonas* for 2 isolates (7%) , *Acinetobacter* for a single isolate (3%) , *Rhizobium* for one isolate (3%) , a single isolate was not identified .Enzymatic and abiotic stress tolerance tests have shown interesting results and significant efficiency and have made it possible to better orient ourselves to the types of high-performance endophytes.

On the other hand, the endophytic bacterial strains studied were tested for their antagonistic activity using the cross-streak method against two pathogenic bacteria; one strain pathogenic to humans causing urinary tract infection '*Escherichia coli*' and the other phytopathogen, the agent of crown gall of fruit trees '*Agrobacterium tunefaciens C58*'.

The results of the antagonism test showed that 93% of the endophyte strains had an antagonistic effect with diameters of zones of inhibition varying in size between 6 mm and 15 mm.

The three strains; PF43, TCR51 belonging to the genus *Bacillus* and KFR9 belonging to the genus *Enterobacter* showed strong antagonistic activity against the two pathogenic bacteria with zones of inhibition that reach 15mm and are considered as efficient endophytes. On the other hand, the two strains XJ3 belonging to the genus *Rhizobium* and KMR4 belonging to the genus *Bacillus* did not record any antagonistic effect.

Keywords: Date palm, bacteria, endophytes, Characterization, antagonism.

ملخص

الهدف الرئيسي من دراستنا هو توصيف بكتيريا نباتية داخلية معزولة من جذور شجرة النخيل.

تم إجراء عزل بكتيريا endophyte خلال عام 2021 من نخيل التمر من جنوب الجزائر في منطقتي تاغيت وكنادسة بولاية بشار. أتاح التوصيف العياني للسلاسل البكتيرية الحصول على جوانب مختلفة من المستعمرات تظهر تنوعًا في السكان. من بين المجموعة، تم اختيار سلالات غير مشعة لتحديد الهوية الأولية. تم الاحتفاظ بإجمالي ثمانية وعشرين عزلة عن طريق اختبار التآلق على وسط مزرعة King B الذي لا يظهر أي تآلق تحت الضوء فوق البنفسجي.

تم إجراء دراسة الصفات البيو كيميائية والإنزيمية لعزلات الطور الداخلي من خلال سلسلة من الاختبارات على أوكسيديز، كاتلاز، إندول، تسهيل الجيلاتين بالإضافة إلى تحديد نشاط التحلل النشواني والمحلل للدهون والتسامح مع درجة الحرارة والملوحة والأسمولية. مكنت النتائج البيو كيميائية من إبراز الأجناس: *Bacillus* لـ 11 عزلة تم اختبارها (39%) ، *Enterobacter* لـ 12 عزلة (42%) ، *Pseudomonas* غير مشعة لعزلتين (7%) ، *Acinetobacter* لعزلة واحدة (3%) ، *Rhizobium* لعزلة واحدة (3%) ، لم يتم تحديد عزلة واحدة. أظهرت اختبارات تحمل الإجهاد الإنزيمي والأحيائي نتائج مثيرة للاهتمام وكفاءة كبيرة وجعلت من الممكن توجيه أنفسنا بشكل أفضل لأنواع النباتات الداخلية عالية الأداء.

من ناحية أخرى، تم اختبار السلالات البكتيرية الداخلية التي تمت دراستها للتأكد من كفاءتها في المكافحة الحيوية في المختبر باستخدام طريقة الخط العرضي ضد نوعين من البكتيريا الممرضة؛ سلالة واحدة من مسببات الأمراض للإنسان تسبب عدوى المسالك البولية "*Escherichia coli*" والأخرى ممرضة للنبات، وهي عامل مرارة تاجية لأشجار الفاكهة "*Agrobacterium tunefaciens C58*".

أظهرت نتائج اختبار التناقض أن 93% من سلالات النباتات الداخلية لها تأثير معاكس بأقطار مناطق التثبيت متفاوتة الحجم بين 6 مم و 15 مم.

أظهر السلالات الثلاث PF43 و TCR51 المنتمين إلى جنس *Bacillus* و KFR9 المنتمين إلى جنس *Enterobacter* نشاطًا مضادًا قويًا ضد البكتيريا الممرضة مع مناطق تثبيط تصل إلى 15 ملم وتعتبر من النباتات الداخلية الفعالة. من ناحية أخرى، لم تسجل السلالتان XJ3 المنتميتان إلى جنس *Rhizobium* و KMR4 المنتمين إلى جنس *Bacillus* أي تأثير عدائي.

الكلمات المفتاحية: نخيل التمر، البكتيريا، النباتات الداخلية، التوصيف، عداوة.

Table des matières

Remerciements

Dédicaces

Liste des figures

Liste des tableaux

Liste des abréviations

Résumé

Abstract

الملخص

Introduction.....1

Chapitre I : *Synthèse bibliographique*

1. Palmier dattier	
1.1 Origine de la culture du palmier dattier	3
1.2 Taxonomie du palmier dattier	3
1.3 Description morphologique du palmier dattier	3
1.3.1 Le système racinaire.....	4
1.3.2 Organe végétatif.....	4
1.3.3 Organe de reproduction	5
1.4 Exigence climatique du palmier dattier	5
1.4.1 Température et humidité.....	5
1.4.2 Lumière.....	6
1.4.3 Sol.....	6
1.5 Répartition géographique du palmier dattier	6
1.5.1 Dans le monde.....	6
1.5.2 En Algérie.....	7
1.6 Principales variétés de dattes en Algérie.....	8
2. Les micro-organismes endophytes.....	8
2.1 Diversités des micro-organismes endophytes	9
2.1.1 Endophytes fongiques	9
2.1.2 Endophytes bactériens	9
2.2 Colonisation des bactéries endophytes.....	10
2.3 Isolement et identification des bactéries endophytes	11
2.4 Interaction plante-endophytes.....	12

2.4.1	La compétition des nutriments	12
2.4.1.1	Apport de l'azote	13
2.4.1.2	Apport de phosphore.....	14
2.4.1.3	Apport de fer	14
2.4.2	Production de sidérophores	14
2.4.3	Antibioses	15
2.4.3.1	Production de biofilm.....	15
2.4.3.2	Phytohormones.....	15
2.4.3.3	Effets sur les Stress biotiques.....	16
2.4.3.4	Effets sur les stress abiotiques.....	17
2.4.4	Résistance systémique induite.....	17
2.5	Importance des bactéries endophytes	18
2.5.1	Importance des endophytes dans le domaine médicale et pharmaceutique.....	18
2.5.2	Dans le secteur industriel.....	19
2.5.3	Dans le secteur agricole.....	20
2.5.3.1	Phytoremédiation	20
2.5.3.2	Bactéries endophytes antagoniste contre les maladies des plantes et ravageurs....	21
2.5.3.3	Biostimulant / biofertilisant.....	21

Chapitre II : *Matériel et méthodes*

I.	Matériel	
	Objectif de l'étude	22
1.	Souches testés	22
II.	Méthode	
2.	Présentation de la zone d'étude.....	22
3.	Purification des bactéries endophytes.....	22
4.	Identification des bactéries endophytes	23
4.1	Caractères macroscopiques des bactéries endophytes	23
4.2	Tests Biochimiques	23
4.2.1	La coloration de Gram	23
4.2.2	Test KoH.....	23
4.2.3	Test Catalase	24
4.2.4	Test Oxydase	24
4.2.5	Test Indole.....	25
4.2.6	Test de liquéfaction de la gélatine.....	25
4.2.7	Test Citrate de Simmons	26
4.2.8	Test Levane sucrase.....	26
4.2.9	Test Oxydation/Fermentation	26
4.2.10	Test Mannitol Mobilité Nitraté	27
4.3	Test Enzymatiques.....	28
4.3.1	Détermination de l'activité amylolytique	28
4.3.2	Détermination de l'activité Lipolytique	28
4.3.3	Test de tolérance a la température	28

4.3.4	Test de tolérance a la salinité	29
4.3.5	Test d'osmolarité	29
4.4	Mise en évidence de l'activité antagoniste	29
4.4.1	Méthode de strie croisée	29

Chapitre III : *Résultat et discussion*

1. Résultats

1.1	Les caractères macroscopiques des isolats sur le milieu Luria Bertani	31
1.2	Résultats des tests biochimiques	32
1.2.1	Résultats de la coloration de Gram et test KoH.....	32
1.2.2	Résultats de l'activité Catalase	33
1.2.3	Résultats de l'activité Oxydase	33
1.2.4	Résultats de test Indole	34
1.2.5	Résultats du test de liquéfaction de la gélatine	35
1.2.6	Résultats de test Citrate de Simmons	35
1.2.7	Résultats du test Oxydation/ fermentation	36
1.2.8	Résultats du test Levane sucrase	37
1.2.9	Résultats du test Mannitol mobilité nitraté	37
1.3	Résultats tests enzymes	38
1.3.1	Détermination de l'activité amylolytique	38
1.3.2	Détermination de l'activité Lipolytique	40
1.4	Identification de souches testées.....	41
1.5	Résultats de tolérance aux stress abiotiques.....	41
1.5.1	Résultats de test de tolérance à la température	42
1.5.2	Résultats de test de tolérance à la salinité	43
	Résultats du test d'osmolarité	44
1.6	Mise en évidence de l'activité antagoniste par méthode de strie croisée	4

5

2.	Discussion	51
-----------	-------------------------	-----------

	Conclusion et perspectives.....	55
--	---------------------------------	----

	Références bibliographiques	57
--	-----------------------------------	----

	Annexes.....	65
--	--------------	----

Introduction

Introduction

Le palmier dattier (*Phoenix dactylifera* L) est traditionnellement considéré comme un signe de richesse, il possède une importance culturelle unique au sein de son environnement. Le dattier est l'une des espèces cultivées les plus anciennes de la région du Moyen-Orient et de l'Afrique du Nord. Il est également aujourd'hui cultivé dans de nombreuses régions arides et semi-arides du monde entier (COAG, 2021).

L'Algérie est considérée parmi les principaux pays producteurs de dattes dans le monde, elle est classée le deuxième pays producteur de dattes dans la zone arabe après l'Égypte (FAOSTAT, 2021). Le palmier dattier est le pilier de l'agriculture saharienne de l'Algérie, Il est estimé à 20 millions de pieds cultivés sur une surface de 170 000 hectares répartis sur l'ensemble du territoire national avec une production de 1136025 tonnes de dattes en 2019 (Ghemmar, 2018 ; FAO, 2021).

Le palmier dattier est certes la plante clé de l'écosystème oasien, dont il peut établir une relation avec ses membres pour améliorer leur croissance et le développement dans les milieux naturels, ainsi que le maintien d'une niche écologique pour microorganismes prospères (Battesti, 2013). De nombreux types de micro-organismes, bactériens et fongiques-abrités dans les compartiments végétaux ont été isolés et identifiés et sont désignés comme endophytes. (Mohsin, 2021).

Les endophytes colonisent les espaces intercellulaires et intracellulaires de tous les compartiments végétaux sans provoquer d'impacts négatifs sur le fonctionnement des plantes et sont principalement connus pour leur rôle bénéfique sur leur plante-hôte (Hemant, 2021).

Le palmier dattier est une niche riche en bactéries endophytes pouvant immuniser la plante et améliorer sa nutrition minérale et peut agir comme agents de lutte biologique contre les différentes maladies et ravageurs des cultures.

Les bactéries endophytes peuvent également être bénéfiques à leur hôte en produisant une gamme de produits naturels qui pourraient être exploités pour utilisation potentielle en médecine, en agriculture ou en industrie. (Dhaked et al, 2017; Pradhan et al, 2017 ; Kakembo et Lee, 2019). Ils appartiennent à différents genres, tels que *Pseudomonas*, *Azospirillum*, *Azotobacter*, *Bacillus*, *Burkholderia*, *Curtobacterium*, *Rhizobium* (Benizri, 2018).

Dans ce texte, ce travail a pour but de caractériser les bactéries endophytes qui ont été isolées de palmier dattier (*Phoenix dactylifera* L.) dans une étude antérieure en 2021 réalisée à Béchar.

Cette étude se repose sur :

- ✓ Identification préliminaire des bactéries endophytes par utilisation des tests biochimiques et physiologiques.
- ✓ Caractérisation enzymatique des endophytes.
- ✓ Mise en évidence de l'activité antagoniste des bactéries endophytes à l'égard d'une bactérie pathogène à l'homme causant des infections urinaires '*Escherichia coli*' et une bactérie phytopathogène causant la tumeur du collet des arbres fruitiers '*Agrobacterium tumefaciens*' souche de référence 'C58'.

Chapitre I

Synthèse bibliographique

1. Palmier dattier

1.1 Origine de la culture du palmier dattier

Le palmier dattier (*Phoenix dactylifera L*) est cultivé depuis la plus haute antiquité, sa culture remonterait en effet au début du Néolithique, au moyen orient et dans le nord de l'Afrique (Zohary et al. 2012).

Le palmier dattier est une plante arborescente, monocotylédone, vivace et ligneuse d'importance économique pour les populations des régions arides et semi-arides du monde (Rhouma et al, 2014, Sharifi, 2015).

1.2 Taxonomie du palmier dattier

Le genre *Phoenix* comprend 14 espèces réparties dans les régions tropicales et subtropicales (Gros-Balthazard, 2013).

La position systématique du dattier est comme suit (Bouaine, 2018) :

Règne	Plantae
Classe	Monocotylédones
Ordre	Arecales
Famille	Arecaceae
Sous famille	Coryphoideae
Tribu	Phoeniceae
Genre	<i>Phoenix</i>
Espèce	<i>Phoenix dactylifera L</i>

1.3 Description morphologique du palmier dattier

Le palmier dattier est un grand palmier mesurant entre 15 à 30 m de hauteur, il possède trois parties : le système racinaire, l'organe végétatif et l'organe reproducteur (Jourjon, 2013).

1.3.1 Le système racinaire

Le système racinaire du palmier est dense de type fasciculé, formé de plusieurs types de racines dont le diamètre ne dépasse pas 1,5 cm et qui émergent partiellement au-dessus du niveau du sol à une hauteur allant jusqu'à 50 cm de la base du tronc, ces racines se développent avec des fonctions différentes selon leur emplacement et profondeur (Emna, 2022).

1.3.2 Organe végétatif

A/ Stipe ou tronc

Le stipe est cylindrique généralement non ramifié, lignifié et de couleur marron-brun. Sa hauteur peut atteindre plus de 30 m (Amirou, 2021).

B/ Couronne

La couronne est l'ensemble des palmes vertes entre (50 à 200) qui forment la couronne du palmier dattier. Les palmes vivent de trois à sept ans, selon les variétés et le mode de culture. (Amirou, 2012).

C/ Palmes

Les palmes sont des feuilles composées, pennées. Les folioles sont régulièrement disposées en position oblique le long du rachis. Les segments inférieurs sont transformés en épines (Babahani, 2011) (Figure 1).

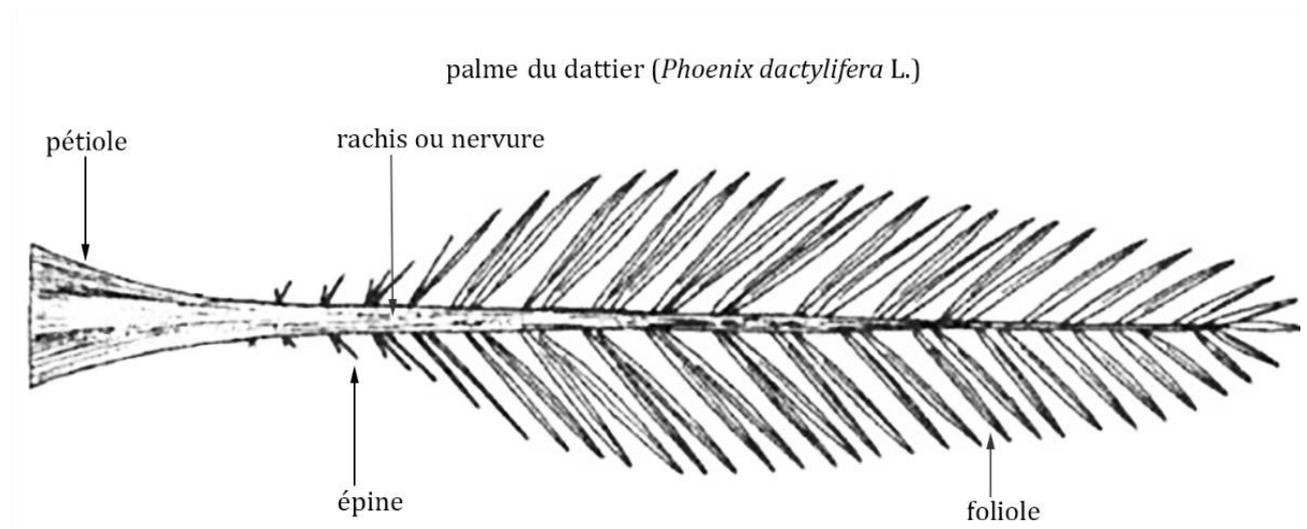


Figure (1) : Schéma du palme du palmier dattier (Battesti, 2018).

1.3.3 Organe de reproduction

A/ Fleur

Le palmier dattier étant dioïque, les fleurs mâles et femelles sont portées par des individus différents, il est nécessaire d'attendre 6 à 8 ans l'induction des premières floraisons pour connaître le sexe des plantes (Aberlenc-bertossi, 2012) (Figure 2).

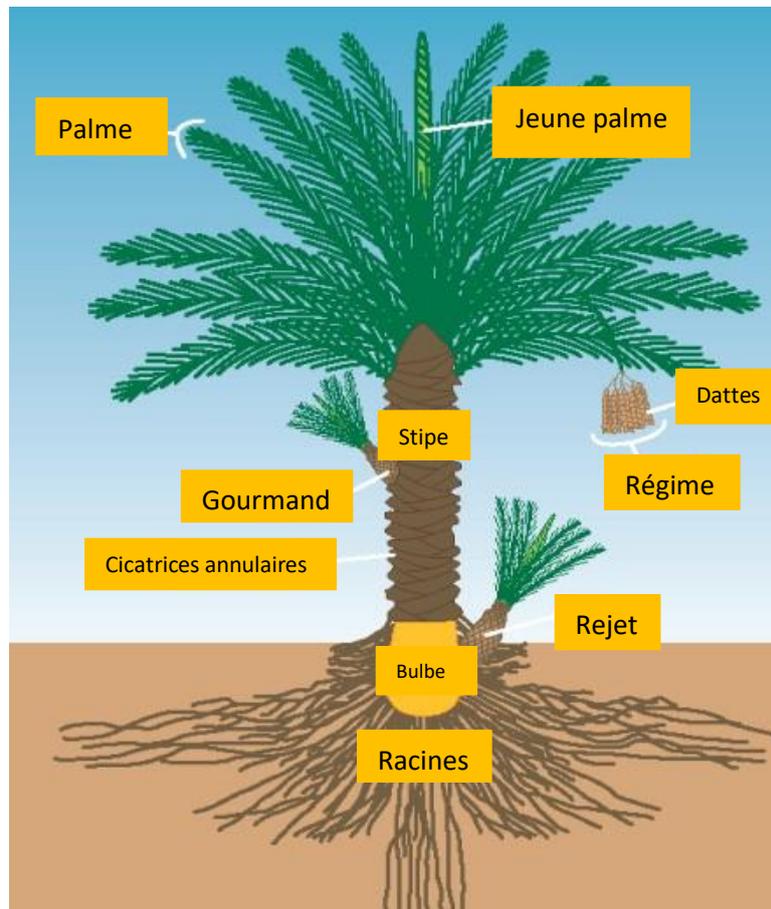


Figure (2) : Figuration schématique du palmier dattier.

Relais-sciences.org, 2012

1.4 Exigences climatiques du palmier dattier

1.4.1 Température et humidité

Le palmier dattier est une espèce thermophile, son activité végétative se manifeste à partir d'une température située entre 7°C et 10 °C; selon les individus, les cultivars et les conditions climatiques locales. Cette activité atteint son maximum entre 30°C et 38°C. (Babahani, 2012). Le Palmier dattier exige des étés chauds sans pluie ni humidité élevée pour 5 à 7 mois (Sedra, 2003).

1.4.2 Lumière

Le palmier dattier est cultivé dans les régions à forte luminosité. L'action de la lumière favorise la photosynthèse et la maturation des dattes (Allam, 2008).

1.4.3 Sol

Le palmier dattier diffère selon le type de sol. Il préfère les sols légers avec une salinité inférieure à 10 %, où il croît plus rapidement, entre en production plus précocement, de meilleure qualité qu'en sol lourd (Achoura, 2013).

1.5 Répartition géographique du palmier dattier

1.5.1 Dans le monde

Le palmier dattier est répandu dans toutes les zones chaudes d'Afrique du Nord, du Sahara, depuis l'atlantique jusqu'à la mer Rouge, ainsi qu'au Moyen-Orient. (Jourjon, 2013).

Le palmier dattier est introduit ensuite au Mexique, en Argentine et en Australie où il est cultivé à plus faible échelle. On le rencontre aussi un peu partout à travers le monde sous forme de pieds isolés ou en petits peuplements pour l'ornementation des villes, comme c'est le cas à Sanremo en Italie (Zango et al, 2013). (Figure 3)

Les plus gros producteurs de dattes sont : Irak, République Arabie Unie (R.A.U), Iran, Arabie, Algérie, Maroc, Etat Unis d'Amérique (USA).

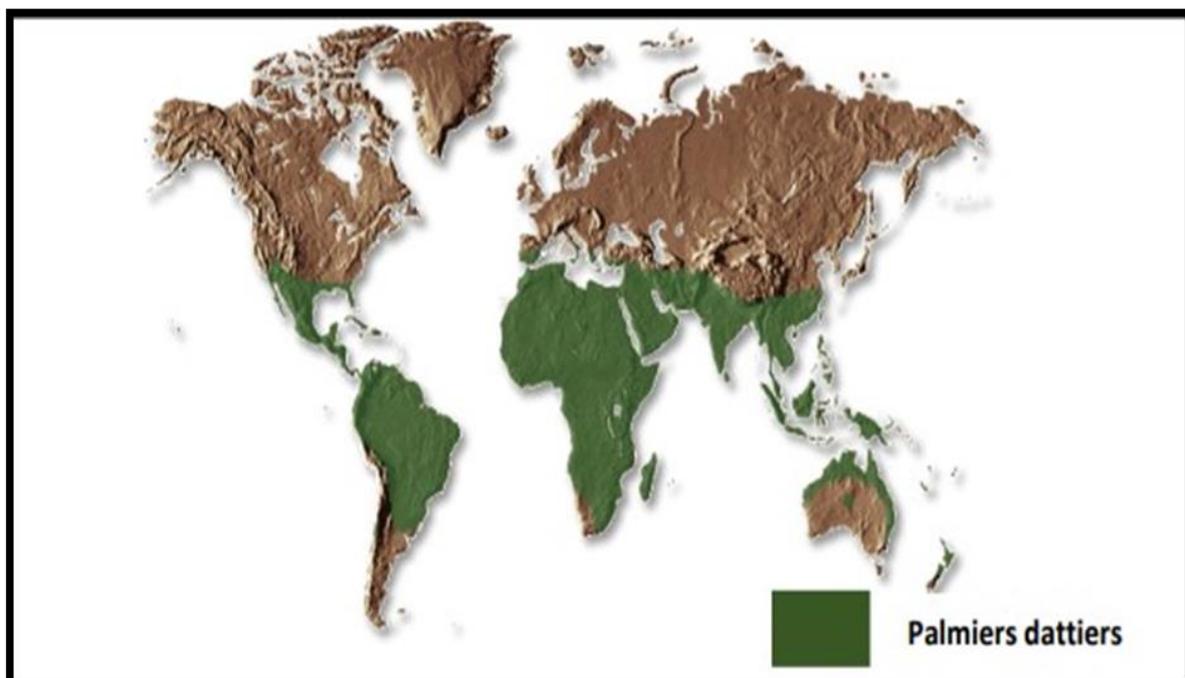


Figure (3) : Répartition géographique de palmier dattier dans le monde (Ouamane ,2019).

1.5.2 En Algérie

Le palmier dattier est cultivé dans les régions sahariennes du pays : Ziban (Biskra), Le Souf (El-Oued), Oued-Righ (M'Ghaïr, Touggourt...), Ouargla, M'Zab (Ghardaïa), Touat(Adrar), Gourrara (Timimoun), Tidikelt (In-Salah), Saoura (Béchar), Hoggar-Tassili (Tamanrasset, Djanet). On trouve également de petites palmeraies dans le sud des Wilayas steppiques (Tébessa, Khenchella, Batna, Djelfa, Laghouat, M'Sila, Naâma, El-Bayedh). (Belguedj, 2014). (Figure 4).

Le palmier dattier est traditionnellement considéré comme un signe de richesse. En Algérie, des communautés endophytes isolés des racines de palmier dattier provenant des d'unes d'Alicante et des palmeraies d'Adrar ont été étudiées, caractérisées et testées leurs capacités en tant qu'agents antagonistes et agents résistants (Mohamed Mahmoud, 2017).

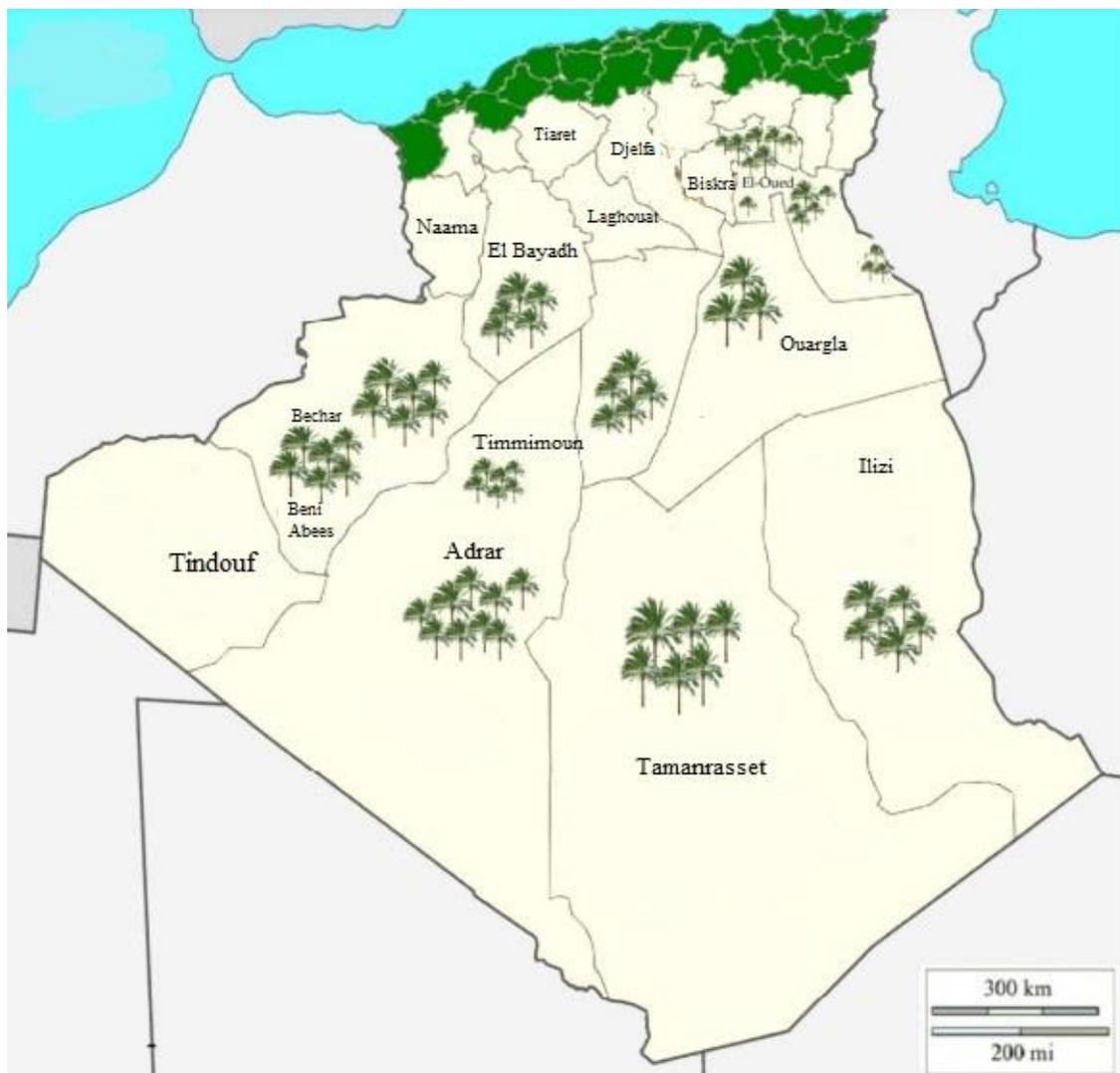


Figure (4): Carte de la répartition des zones d'observation et de suivi des stades phénologiques du palmier dattier en Algérie (El Barnaoui, 2016).

1.6 Principales variétés de dattes en Algérie

En Algérie existe plus de 17 millions de palmiers et plus de 800 variétés, ainsi ce pays occupe une place importante parmi les états producteurs et exportateurs de dattes dans le monde et se classe en première place en termes de qualité.

Les principales variétés des dattes sont Deglet Nour, Ghars, Mech Degla, Tafezouine, Degla Beida (Benziouche, 2012).

Le palmier dattier est la clé de l'écosystème oasien, les microorganismes qui hébergent le dattier a attiré l'attention des chercheurs, principalement les endophytes vivant à l'intérieur avec des multiples propriétés bénéfiques pour le palmier et les autres plantes (Battesti, 2013, Benchobba et al, 2013).

Tableau 1 : Principales variétés de dattes en Algérie et leur localisation (Bessas, 2007).

Variété	Localisation
Deglet Nour	Oued Righ, Zibenes, Oued souf, Ouargla, M'Zab, El golia.
Ghars	Oued Righ, Zibenes, Oued souf, Ouargla, M'Zab, El golia.
Mech Degla	Oued Righ, Zibenes, Oued souf.
Tafezouine	M'Zab, Oued souf, Oued Righ.
Degla Beida	Oued Righ, Zibens, Oued souf.
Tilemson	Touat, El Boléa, Gourara, Tidikelt.

2. Les micro-organismes Endophytes

Les endophytes sont des micro-organismes fongiques ou bactériens colonisant les tissus végétaux sains sans provoquer de symptômes apparents de maladie. Ils sont omniprésents, colonisent toutes les plantes. Leur association peut être obligatoire ou facultative et ne cause aucun dommage à l'hôte végétal (Nair et Padmavathy, 2014).

Les endophytes ont été classés comme vrais endophytes ou endophytes transitoires selon leur diversité, leur nature biologique, leur classification et mode de transmission (Sharma, 2021).

Les endophytes peuvent être transmis par voie horizontale depuis l'environnement ou via un vecteur comme un insecte, ou verticale en étant associés à la graine (Compant, ,2020).

2.1. Diversité des micro-organismes endophytes

Les endophytes ont été trouvés dans toutes les espèces végétales étudiées. Ainsi, une plante sans endophytes est une rare exception dans l'environnement naturel (Partida-Martinez et Heil, 2011).

La plante hôte, les stades de croissance et les facteurs environnementaux peuvent fortement influencer la diversité endophytique d'une plante particulière. La situation géographique de la plante, l'âge et le génotype de la plante peuvent déterminer le type de bactéries endophytes qu'ils abritent (Hallmann et Berg, 2006). Les conditions climatiques sont aussi des facteurs qui influencent la diversité endophytique, leurs changements modifient l'abondance et la composition de bactéries endophytes dans les tissus foliaires (Penuelas et al, 2012, Shi et al. 2014).

2.1.1 Endophytes fongiques

Les endophytes fongiques appartiennent principalement aux phylums *Glomeromycota* (40%), *Ascomycota* (31%), *Basidiomycota* (20%), phylums non identifiés (8%) et *Zygomycota* de 0,1 % (Hardoim et al, 2015).

Tableau 2 : Diversité des endophytes fongiques (Barthélemy, 2019).

Phylums	Classe	Genre	Espèce
<i>Glomeromycota</i>	Glomeromycètes	- <i>Glomus</i> - <i>Rhizophagus</i>	- <i>Glomus tenue</i> - <i>Rhizophagus irregularis</i>
<i>Ascomycota</i>	-Dothideomycètes -Sordariomycètes	- <i>Alternaria</i> - <i>Xylaria</i>	- <i>Alternaria solani</i> - <i>Xylaria longipes</i>
<i>Basidiomycota</i>	Agaricomycètes	- <i>Hymenogaster</i> - <i>Rhizopogon</i>	- <i>Hymenogaster arenarius</i> - <i>Rhizopogon aestivus</i>

2.1.2 Endophytes bactériens

Des endophytes bactériens recensés sur la base des séquences ARNr 16S ; sont répartis entre quatre embranchements bactériens (54 % de Protéobactéries, 20 % Actinobactéries, 16 %

Firmicutes et 6 % Bacteroidetes). Ces bactéries sont considérées comme étant dominants dans l'environnement végétal (Hardoim, 2015).

Une présente étude a porté sur la diversité des bactéries endophytes cultivables et non cultivables dans les tissus internes (racines et feuilles) des palmiers (*Phoenix dactylifera L.*). Afin d'évaluer leur potentiel antagoniste vis-à-vis des pathogènes du palmier dattier (Siala et al, 2016).

Tableau 3 : diversité des endophytes bactériens (Barthélemy, 2019).

Phylums	Classe	Genre	Rôle
<i>Proteobacteria</i>	Gammaprotéobactéries	- <i>Pseudomonas</i> - <i>Enterobacter</i> - <i>Pantoea</i> - <i>Stenotrophomonas</i>	Propriétés insecticides
<i>Actinobacteria</i>	Actinobactéries	<i>Streptomyces</i>	Synthétise composé antibiotiques
Firmicutes	Bacilli	- <i>Bacillus</i> - <i>Paenibacillus</i> - <i>Staphylococcus</i>	Propriétés insecticides

2.2 Colonisation des bactéries endophytes :

Les bactéries endophytes constituent un sous-ensemble des bactéries rhizosphériques, ces espèces ont la capacité de coloniser les plantes (Marquez-Santacruz, 2010).

Le processus de colonisation implique une communication complexe entre les deux partenaires. Ce processus commence par les racines par une interaction entre les endophytes et les exsudats racinaires (Martinez-Romero, 2006). Les exsudats racinaires sont des petites molécules solubles comme les sucres simples, les acides aminés, les acides organiques, les enzymes, les phénols ou encore les vitamines qui sont rapidement assimilés par les microorganismes de la rhizosphère (Solon, 2014).

Les bactéries endophytes sont localisées dans toutes les parties de la plante. Ces espèces pénètrent et colonisant l'intérieur de la racine et les tissus conducteurs peuvent ensuite se déplacer vers les tiges et les feuilles entraînées par la transpiration des plantes (Compant et al, 2010, Liu et al, 2017).

Les bactéries endophytes ont été aussi détectées dans des organes reproducteurs de la plante, comme les fleurs, les fruits et les graines, mais en petits chiffres (Truyens et al, 2015).

Les bactéries endophytes des racines des palmiers dattiers ont été isolées et caractérisées ce sont des souches apparentées aux genres *Bacillus*, *Chryseobacterium*, *Paenibacillus*, *Rhodococcus*, *Achromobacter*, *Acinetobacter*, *Escherichia*, *Enterobacter* et *Klebsiella* (Yaich et al, 2015).

2.3 Isolement et identification des bactéries endophytes

Les endophytes sont isolés des différentes parties de la plante, racines, feuilles et tige par désinfection de surface initiale suivie d'une mise en culture à partir d'extraits de tissus broyé ou par culture directe de tissus végétaux sur des milieux adaptés aux bactéries (Nair et Padmavathy, 2014) (Figure 5).

Les bactéries cultivables sont ensuite identifiées à l'aide d'analyses morphologiques, physiologiques, biochimiques, et d'approches moléculaires, les plus couramment utilisés sont : les marqueurs moléculaires ARNr 16S (Ma et al, 2011).

Il existe des techniques permettant d'étudier les bactéries endophytes directement dans leurs milieux naturels, comme l'hybridation *in situ* par fluorescence (FISH). (Piccolo et al, 2010).

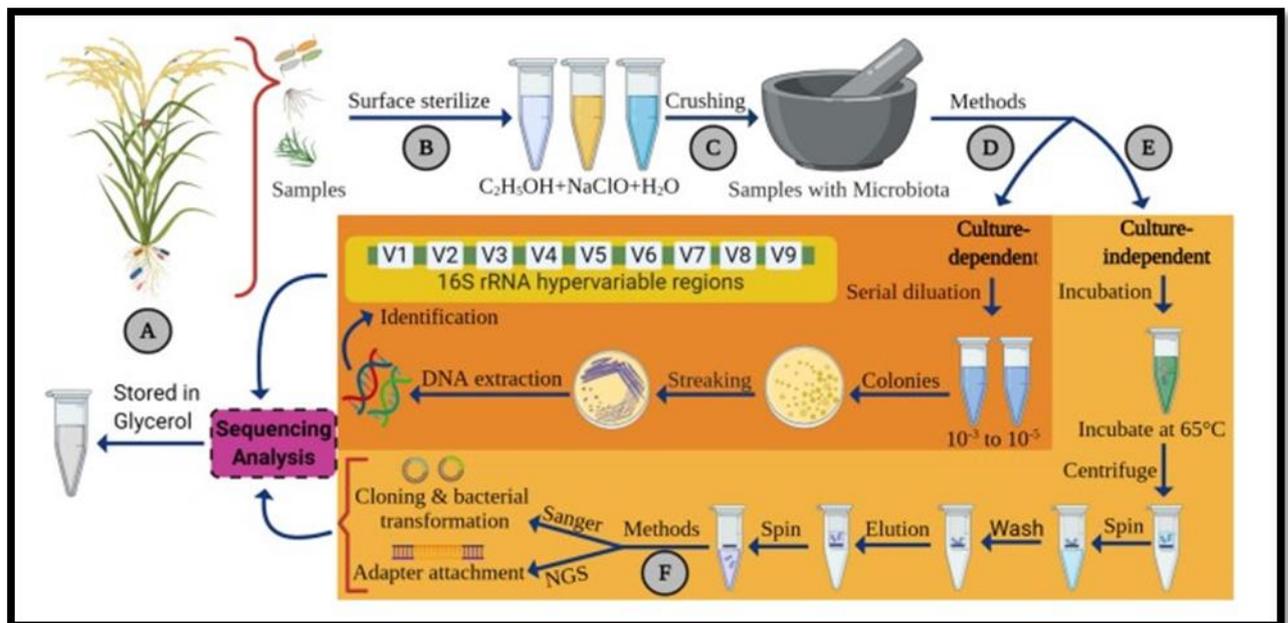


Figure (5) : Méthodes d'isolement et d'identification des communautés bactériennes endophytes d'une plante (Mohsin, 2021).

2.4 Interactions plantes-endophytes

Les endophytes présentent des interactions complexes impliquant le mutualisme et l'antagonisme et forment des relations symbiotiques très diverses avec leur plante-hôte (Nair et Padmavathy, 2014). Les bactéries endophytes transmettent des effets sur leur plante hôte. Ils peuvent améliorer la disponibilité de nutriments en facilitant l'absorption de l'azote, phosphate et le fer qui augmentent la croissance et le développement des plantes (Ma et al, 2015).

Les bactéries endophytes présentent un grand potentiel de biocontrôle contre les agents pathogènes. Le mécanisme de biocontrôle des agents phytopathogènes comprend une interaction multifactorielle pour inhiber les agents pathogènes par ces endophytes, tels que la production des sidérophores, la production d'antibiotiques et la résistance induite (Malfanova et al, 2011) (Figure 6).

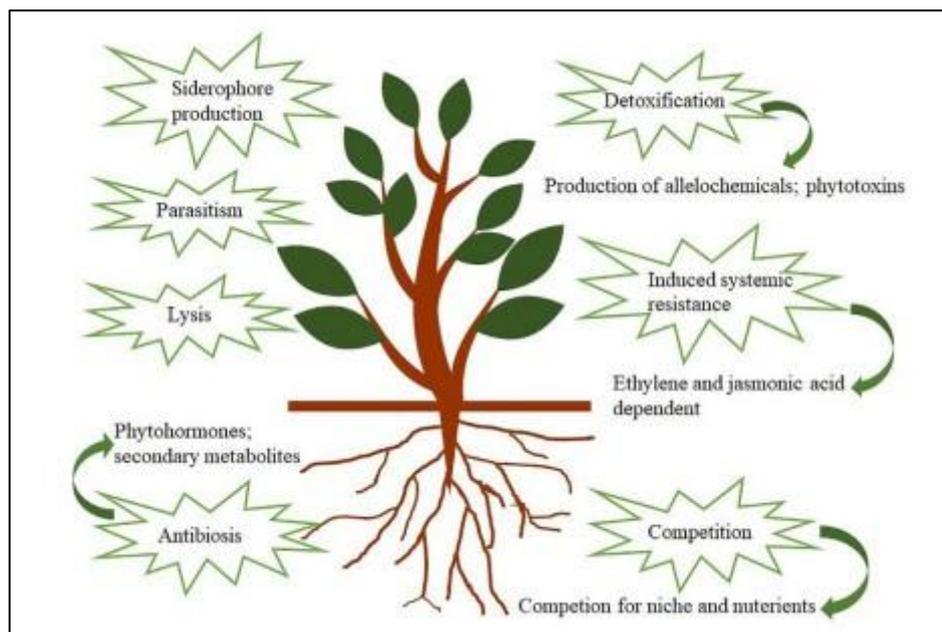


Figure (6) : mécanismes adoptés par les agents de biocontrôle (Dey et Raghuwanshi, 2022).

2.4.1 La compétition des nutriments

Les endophytes bactériens contrôlent les agents phytopathogènes par la compétition et la disponibilité des nutriments tels que l'azote, le phosphore et le fer. Les endophytes offrent un large défi à la croissance du pathogène. Les bactéries endophytes peuvent coloniser l'environnement du sol en créant un système de régulation très efficace qui améliore la

phytoimmunité des plantes. Ces endophytes bactériens associent souvent le mécanisme d'antibiose qui donne un résultat plus efficace (Malefanova et al, 2013).

2.4.1.1 Apport de l'azote

Les bactéries endophytes colonisent toutes les parties de la plante. Les endophytes ont la capacité de fixer l'azote atmosphérique par une activité nitrogénase (Kandel et al, 2017). Toutes ces bactéries possèdent le gène conservé *nif H* codant pour la protéine nitrogénase permettant la réduction enzymatique du N_2 en ammoniac NH_3 . L'ammoniac peut ensuite être oxydé sous forme de nitrate suivant le processus biologique de nitrification conduit par des bactéries. Cette minéralisation rend l'azote assimilable pour la plante (Eskin et al, 2014),

Les bactéries endophytes favorisent la croissance des plantes et les protègent contre les attaques d'agents pathogènes (Kandel et al, 2017) (Figure 7).

De nombreux endophytes bactériens ont montrés une capacité à fixer l'azote, comme les genres *Azoarcus*, *Azotobacter*, *Clostridium* ou *Rhizobium* ou la bactérie endophytique *Gluconacetobacter diazotrophicus*, retrouvée en symbiose avec différents types de plantes, montrant un fort taux de fixation de l'azote. (Barthélémy, 2019).

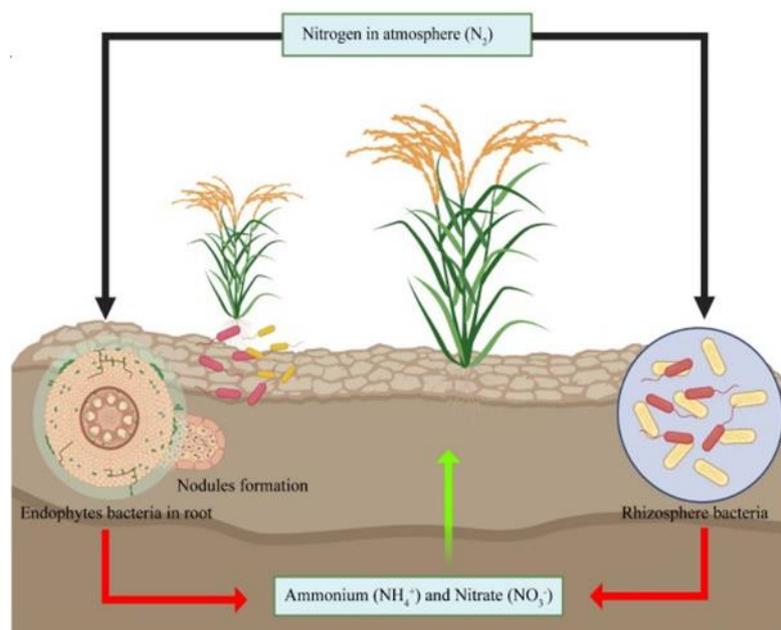


Figure (7): Processus de fixation biologique de l'azote à partir de l'atmosphère par des bactéries bénéfiques. (Mohsin et al, 2021).

2.4.1.2 Apport de phosphore

Les bactéries endophytes peuvent augmenter la disponibilité du phosphore pour les plantes en solubilisant les précipités phosphates, en utilisant des mécanismes tels que l'acidification, la chélation, l'ex-transformation et production d'acides organiques (Mohsin et al, 2021). Ces microorganismes peuvent également augmenter la disponibilité du phosphore (Van Der Heijden et al, 2008).

De plus, les bactéries endophytes peuvent empêcher le phosphate adsorption et fixation dans des conditions limitant le phosphate par assimilation du phosphore solubilisé (Khan et Joergensen, 2009).

Des bactéries endophytes comme *Burkholderia* sp. Améliorent la croissance et le rendement de riz (Khan et al, 2017). L'endophyte bactérien *Colletotrichum tofieldiae* contribue au développement de la plante-hôte par solubilisation du phosphore. (Hiruma et al, 2016).

2.4.1.3 Apport de fer

Le fer est requis par la plupart des organismes, il est considéré comme un élément vital et indispensable pour la plupart des plantes, généralement le fer se présente sous la forme ferrique insoluble (Fe_3). L'assimilation de ce fer par les végétaux est améliorée lors de la production microbienne d'agents chélatants appelés sidérophores. Ces sidérophores présentent une grande affinité avec les ions Fe_3^+ et Fe_2^+ (Ma et al, 2016).

Des bactéries endophytes ont montré la capacité à acquérir du fer comme *Arthrobacter sulfonivorans* et *Enterococcus hirae* conduisant à l'amélioration de la concentration en micronutriments dans les grains des plantes (Devendra et al, 2018).

2.4.2 Production de sidérophores

La croissance des plantes dépend fortement de la biodisponibilité du fer. C'est un élément essentiel élément pour les organismes vivants. La rareté du fer entraîne une forte concurrence dans le sol. Dans de telles conditions, les endophytes bactériens produisent des sidérophores qui sont des composés de faible poids moléculaire permettant d'acquérir des ions ferriques de manière compétitive (Whipps, 2001).

Les sidérophores sont impliqués dans la protection de la plante dans le sol en sécrétant de l'acide phosphatase capable de minéraliser le phosphore organique lors d'un stress abiotiques (Ma et al, 2016).

2.4.3 Antibioses

Une forte interaction de colonisation entre les bactéries et les tissus végétaux induit la production d'antibiotiques (Mohsin, 2021).

Les antibiotiques comme l'acide D-gluconique, le 2-hexyl-5-propyl résorcinol produits par les endophytes bactériens sont responsables de l'antibiose (Haas et Defago, 2005 ; Dandurishvili et al. 2011).

L'antibiose est un processus de mécanisme de lutte biologique réalisée par la production des phytohormones et des métabolites secondaires tels que les alcaloïdes, les stéroïdes, les flavonoides, les terpénoïdes et les quinones. Ces métabolites antimicrobiens bio-synthétisés par les microorganismes endophytes ont la capacité de défense face aux agressions et permettent de protéger la plantes contre les stress biotiques et abiotiques (Zhang et al, 2006).

2.4.3.1 Production de biofilm

Les bactéries présentent des caractéristiques uniques, telles que les biofilms, qui jouent un rôle important dans le quorum sensing. Ces endophytes contenant le biofilm jouent un rôle vital dans la plante protection contre les attaques d'agents pathogènes en formant une couverture autour des racines des plantes et libérant des composés antimicrobiens qui abandonnent l'infestation par des agents pathogènes (Mohsin et al, 2021).

2.4.3.2 Phytohormones

Les phytohormones sont des composés importants dans la construction des interactions plante-bactérie. Ils existent cinq types : l'acide abscissique (ABA), les gibbérellines (GA), les cytokines (CK), l'éthylène (ET) et l'acide indole-3-acétique (AIA) ou auxine (Phetcharat et al, 2012).

A/ Auxine (AIA)

Les auxines sont responsables de la division cellulaire, l'élargissement, la différenciation des tissus, l'allongement des racines primaires, permettant la croissance active des plantes (Glick, 2012).

Les bactéries endophytes *Sphingomonas* spp. Améliorent la croissance de la tomate par la production des phytohormones auxines (AIA) et les gibbérellines (GA) (Khan et al, 2014).

De nombreuses communautés bactériennes endophytes comme *Arthrobacter*, *Pseudomonas*, *Clostridium* stimule la croissance de la plante (Mohsin et al, 2021).

B/ Cytokines

Les cytokines (CK) sont des phytohormones qui favorisent la croissance des plantes en activant la division cellulaire dans les racines des plantes (Ortiz-castro, 2009).

Les endophytes *Bacillus* et *Pseudomonas* sont isolés de diverses variétés de plantes, tels que le palmier, le soja produisant ces composés qui agissent comme des régulateurs de croissance (Dalal et Kulkarni, 2014).

2.4.3.3 Effets sur les stress biotiques

Les plantes colonisées par les endophytes ont une meilleure résistance aux microorganismes phytopathogènes et aux insectes ravageurs.

A / Protection contre les microorganismes phytopathogènes

Les endophytes possèdent une activité antagoniste contre les agents phytopathogènes pouvant infecter les plantes-hôtes. Les endophytes dans les tissus végétaux empêchent bioagresseurs de s'intégrer dans ces niches. La production des métabolites secondaires permet également de lutter contre une agression microbienne. (Silva-Hughes et al, 2015).

Les bactéries endophytes du groupe des Actinobacteria sont les plus étudiées pour leur production de métabolites antimicrobiens, de nombreux composés bioactifs nommés munumbicines A, B, C et D ont été isolés à partir de *Streptomyces*, *Kennedia nigriscans* ont montré une activité contre de nombreux phytopathogènes (Castillo et al, 2002).

Selon une étude *in planta* menée par Tafifet et al. (2020), des souches bactériennes endophytes de *Pseudomonas* spp. Ont montré une efficacité de plus de 90% contre la maladie du feu bactérien sur les poires causée par *Erwinia amylovora*. D'autre part, les bactéries endophytes tuent les pathogènes fongiques en perturbant la paroi cellulaire par la sécrétion d'enzymes (Mohsin et al, 2021).

B/ Ravageurs

Les bactéries endophytes produisent des métabolites secondaires qui éliminent les ravageurs (Zhang et al, 2006).

Des microorganismes comme *Beauveria bassiana* ont été isolés en tant qu'endophytes dans plusieurs études. Ces endophytes induisent une mortalité importante de leur principal ravageur dans les plantes du maïs (Vidal et al, 2015).

Le second avantage des endophytes au sein des plantes est l'augmentation de la résistance aux stress abiotiques.

2.4.3.4 Effets sur les stress abiotiques

Les plantes peuvent affronter différents types de stress abiotiques et s'y adapter au manque d'eau, la présence de métaux lourds, la sécheresse, un pH acide, une salinité élevée (Calatayud et al, 2013). Ces stress impactent le développement et la physiologie de la plante en altérant la régulation génétique des voies cellulaires.

Au-delà d'être un outil intervenant dans la régulation des procédés de développement des plantes, Les phytohormones comme l'acide abscissique cytokinines gibbérellines jouent un rôle critique dans la tolérance des plantes aux stress abiotiques y compris la salinité, la chaleur, la sécheresse et la toxicité des métaux (Liu et al, 2013 ; Barthélémy, 2019). La souche bactérienne colonisant les racines *Bacillus licheniformis* a pu atténuer les dommages induits par le stress salin et stimuler la croissance du blé grâce à la production d'AIA dans des conditions de sol salin (Singh et Jha, 2016).

Des bactéries endophytes du palmier dattier ont la capacité d'améliorer la résistance des plantes à la sécheresse et à favoriser leur croissance (Cherif et al, 2015).

La production l'acide abscissique (ABA) par *Bacillus licheniformis* et *Pseudomonas fluorescens* ont stimulé la croissance des plantes de la vigne sous stress hydrique en induisant la synthèse d'ABA (Salomon et al, 2014).

2.4.4 Résistance systémique induite

Les endophytes associés aux plantes déclenchent une résistance systémique induite (ISR) dans le système immunitaire des plantes contre de nombreux agents pathogènes (Alvin et al, 2014).

Les endophytes déclenchent l'ISR en produisant du sidérophores, acide salicylique (Perez-García et al, 2011).

Les endophytes bactériens responsables de l'élicitation de l'ISR sont *Bacillus amyloliquefaciens*, *Bacillus pumilus*, *Bacillus subtilis*, *Pseudomonas fluorescens* et *Pseudomonas syringae* (Kloepper et Ryu, 2006).

2.5 Importance des bactéries endophytes

Les microorganismes endophytes peuvent être bénéfiques à leurs hôtes en produisant une gamme de produits naturels qui pourraient être exploités pour l'utilisation potentielle en médecine ou agriculture et en industrie. (Hemant et al, 2021). (Figure 8).

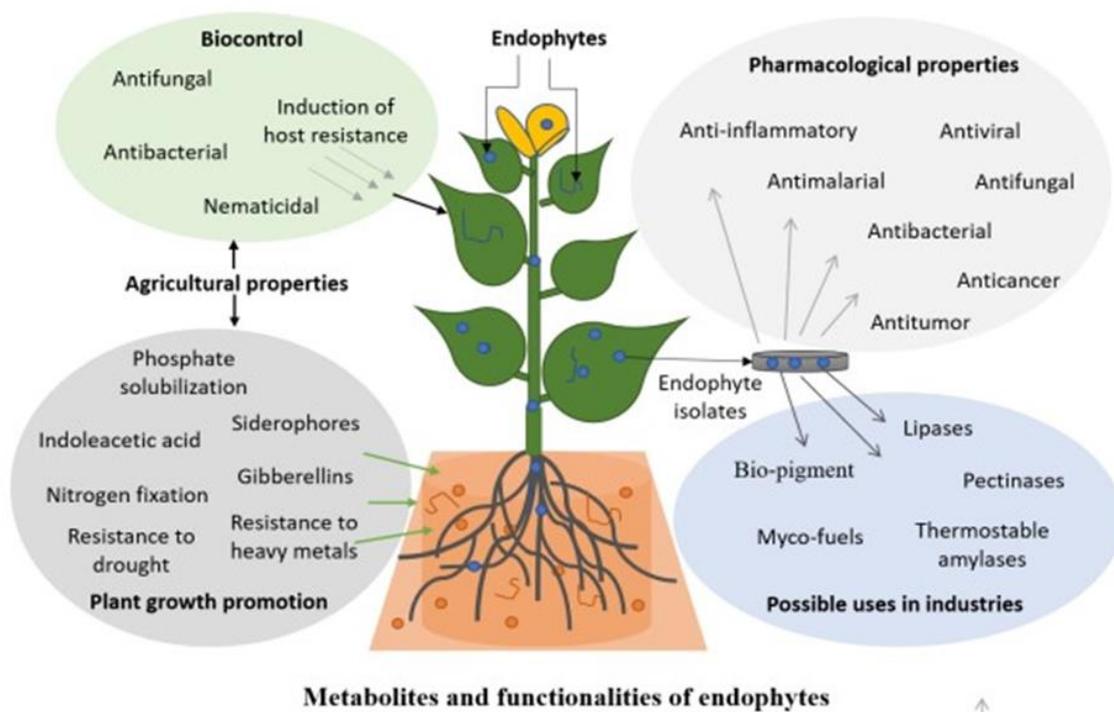


Figure (8): Applications de métabolites et fonctionnalités des endophytes dans différents secteurs (Hemant et al, 2021).

2.5.1 Importance des endophytes dans le domaine médicale et pharmaceutique

Les micro-organismes de différents biotypes constituent une source constante de métabolites secondaires avec des propriétés nouvelles et uniques, ces métabolites secondaires tels qu'alcaloïdes, des terpénoïdes, des flavonoïdes et stéroïdes ont trouvé une place majeure dans le secteur médical (Romano et al, 2017).

Les endophytes microbiens sont connus pour leur capacité à produire une large gamme de composés importants identifiés comme agents antiviraux, antifongiques, antitumoraux, anticancéreux et antimicrobien. (Hemant et al ,2021).

Les endophytes sont utilisés aussi pour les traitements des maladies neurologiques tels que les AVC (Accident Vasculaire Cérébrale), la maladie d'Alzheimer, les céphalées et la maladie du sommeil.

Les endophytes sont également des options thérapeutiques dans la gestion du stress et l'obésité (Adekunle Raimi, 2021).

Tableau 4 : Exemples des bactéries endophytes utilisés dans le secteur médical

Bactéries endophytes	Propriétés	Plante hôte	Références
<i>Streptomyce</i> sp.	Antiviral	<i>Bruguiera gymnorrhiza</i> (L.) Savigny	(Ding et al, 2010)
<i>Bacillus pumilus</i>	Antimicrobien, Laxative, sédative, digestive, etc.	<i>Aquilaria species</i>	(Hemant et al, 2021)
<i>Taxomyces andreanae</i>	Anticancéreuse /Antitumorales	<i>Taxus brevifolia Nutt</i>	(Hemant et al, 2021)
<i>Streptomyces toxytricini</i>	Traitement contre Obésité	Plante, sol	(Gupta et al, 2010)

2.5.2 Dans le secteur industriel

Les micro-organismes et leurs dérivés jouent un rôle important dans la transformation du substrat en plusieurs produits destinés aux secteurs industriels.

Les endophytes isolés de différentes espèces végétales produisent des enzymes comme l'amylase, la pectinase et les lipases qui sont connus pour hydrolyser l'amidon, la pectine et les lipides respectivement. D'autres enzymes comprennent les cellulases, les xylanases, l'amylase, la laccase et les protéases, qui ont une application dans divers secteurs industriels (Zaferanloo et al, 2013).

L'endophyte bactérien *Nocardiopsis* sp. Isolé de *Pachyrhizus erosus* L., secrète une α -amylase thermostable, qui est utile pour la dégradation de l'amidon (Defranceschi et al, 2012).

La bactérie endophyte *Bacillus halotolerans* strain CT2 isolée de la pomme de terre produit la protéase (Dorra et al, 2018).

Les endophytes produisent aussi des molécules adaptées à la production de biocarburants et dégradent des substances organiques et inorganiques complexes avec une utilisation appropriée (Hemant et al ,2021).

Les endophytes sont connus pour produire des pigments utilisables dans l'industrie alimentaire (Russell et al, 2011 ; Mugeshe et al, 2014).

2.5.3 Dans le secteur agricole

Les isolats endophytes cultivables présentent un potentiel important pour des applications futures dans l'inoculation des palmiers dattiers à des fins de lutte biologique. Les isolats ont montré une activité enzymatique extracellulaire comprenant la cellulase (76, 92%), la protéase (69, 23%) et l'amylase (38, 46%). Cette étude démontre ainsi pour la première fois que la diversité des bactéries endophytes est abondante chez les palmiers dattiers et pourrait présenter des applications biotechnologiques variées notamment le contrôle des maladies et la phytoremédiation. (Siala et al ,2016).

2.5.3.1 Phytoremédiation

Les endophytes sont utilisés dans la phytoremédiation en améliorant la croissance des plantes, diminuant la phytotoxicité des métaux et en affectant la translocation et l'accumulation des métaux (Weyens, 2009).

Les endobactéries facilitent la photoextraction des métaux lourds. (Rajkumar et al, 2009). Ces espèces sont également utiles dans la dégradation d'hydrocarbures aromatiques polycycliques (HAP) qui sont des constituants naturels du charbon et du pétrole, ou qui proviennent de la combustion incomplète de matières organiques telles que les carburants, le bois, le tabac (Berard, 2022).

Les plantes dégradent d'hydrocarbures aromatiques polycycliques (HAP) en augmentant la densité microbienne dans la rhizosphère et l'endosphère pour améliorer la catalyse de l'oxygène atmosphérique en aliphatiques ou aromatiques hydrocarbures, produisant les alcools correspondants. (Radwan, 2009).

Les Plantes comme *Halonemum strobilaceum*, vivant dans les régions côtières du Golfe arabique possèdent des hydrocarbures stockées par la microflore ce qui permet réduire la charge pétrolière sur la zone côtière. (Al-Mailem, 2010).

2.5.3.2 Bactéries endophytes antagoniste contre les maladies des plantes et ravageurs

Le biocontrôle fait référence à la manière écologique de réduire les agents phytopathogènes qui peuvent causer des dommages aux cultures agricoles par des antagonistes naturels (Rybakova, 2015).

Les endophytes possèdent une gamme de mécanisme de biocontrôle de lutte contre les agents pathogènes des plantes et les insectes. Comme mesure de défense, la plante sécrète des molécules de signalisation contre les pathogènes dans l'endosphère (Hayet, 2010).

Les endophytes protègent les plantes des racines pathogènes en préparant un biofilm autour des racines. D'autre part, l'expérience sur la plante *Festuca arundinacea* montre que l'endophyte augmente la production de composé volatil, monoterpène β -ocimène contre les agents phytopathogènes (Rybakova, 2015).

2.5.3.3 Biostimulant / biofertilisant

Les micro-organismes biostimulants lorsqu'ils sont appliqués aux plantes ou à la rhizosphère stimulent les processus naturels pour améliorer/bénéficier l'absorption des nutriments, l'efficacité des nutriments, tolérance aux stress abiotiques et la qualité des cultures. Les biostimulants peuvent soit interagir directement avec les cascades de signalisation des plantes, ou agir par stimulation des bactéries endophytes et non endophytes, des levures et des champignons pour produire des molécules assimilables par la plante. (Brown et Saa, 2015).

Chapitre II
Matériels et méthodes

Objectifs de l'étude

Notre étude expérimentale porte sur la caractérisation des bactéries endophytes isolées des racines du palmier dattier, ces échantillons racinaires ont été prélevés de deux régions différentes du Sud Algérien. Ce travail a été réalisé au niveau du laboratoire de Phytobactériologie de l'Université de Saad Dahleb Blida '1'.

I. Matériel

1. les souches testées

Les souches testées dans cette étude sont des bactéries endophytes provenant des racines de 8 cultivars de palmier dattier prélevées de deux régions sahariennes dans la wilaya de Béchar : 'Taghit' et 'Kenadsa'. Ces souches endophytes ont été isolées en Mai 2021 par la méthode classique d'extraction par macération des racines dans l'eau distillée stérile pendant 20min, les macérats ont étéensemencés sur le milieu LB et King B et incubés à 27°C pendant 3 jours. Les isolats obtenus ont été purifiés puis conservés à 4°C dans des tubes inclinés au laboratoire de Phytobactériologie (université Blida 1). Une totalité de vingt-huit souches ont été étudiées, dix-sept souches proviennent de la région de 'Taghit' et onze souches proviennent de la région de 'Kenadsa'.

II. Méthode

2. Présentation de la zone d'étude

Les échantillons sont prélevés de la région de 'Taghit' qui s'articule autour d'une palmeraie longue de plus de 20 km. Elle se situe entre le Djebel Baroun et les dunes du Grand Erg Occidental et de la région de 'Kenadsa' qui est située à la limite nord-ouest de la wilaya de Béchar.

3. Purification des bactéries endophytes

La purification est une étape indispensable et délicate afin de s'assurer de la pureté des souches. Les isolats endophytes étudiés ont subi plusieurs séries de purifications sur le milieu de culture 'King B' (King et al, 1954). jusqu'à l'obtention des colonies de souches pures. La réalisation de la purification s'effectue par la préparation du milieu de culture 'King B', le milieu 'King B' a été préparé et stérilisé à l'autoclave pendant 20min à 110°C, puis coulé sur des boîtes de Pétri stérile de 9cm sous forme de couche légèrement épaisse dans des conditions aseptiques.

L'étape de purification est répétée à plusieurs reprises par repiquages des souches sur le milieu 'King B' et incubation à l'étuve de 24 à 48 h à 28°C jusqu'à obtention de souches pures.

Le choix du milieu KB permet la présentation, la visualisation des isolats fluorescents qui sont éliminés pour garder uniquement les non fluorescents.

A la suite de cette étape, les bactéries non fluorescents ont fait objet de caractérisation macro, micro et différents tests biochimiques et physiologiques afin d'identifier les isolats.

4. Identification des bactéries endophytes

4.1 Caractères macroscopiques des bactéries endophytes

Les isolats endophytes ont été cultivés sur milieu Luria Bertani (LB) et incubés dans une étuve à 28°C pendant 24 à 48 heures. Le milieu LB est un milieu non sélectif qui permet de pousser et observer mieux les bactéries que le milieu King B.

Les bactéries obtenues après incubation ont été caractérisées selon leurs caractéristiques macroscopiques : couleur, aspect, forme (Bertani, 1953).

4.2 Tests biochimiques

4.2.1 La coloration de Gram

Cette méthode met en évidence des différences de structure, de composition chimiques des parois bactériennes et leur réactivité vis-à-vis de colorant de Gram.

La fixation de la culture bactérienne à identifier se réalise à la chaleur et en présence d'une goutte d'eau distillée stérile. Elle consiste en la préparation du frottis par étalement d'une culture bactérienne âgée de 24h sur une lame. Le frottis fixés sont d'abord coloré au violet de gentiane, l'opération est suivie par l'application d'une solution de lugol. La décoloration est ensuite effectuée par un lavage des lames à l'alcool 95°. Après un lavage abondant avec un jet d'eau distillée stérile, le frottis subi une deuxième coloration à l'aide d'une solution de fuchsine basique. L'observation des frottis colorés se fait au microscope optique grossissement 1000X en utilisant l'huile à immersion. Les isolats ayant une coloration violette sont Gram positive tandis que ceux présentant une coloration rose sont Gram négatifs (Hildebrand et al, 1988).

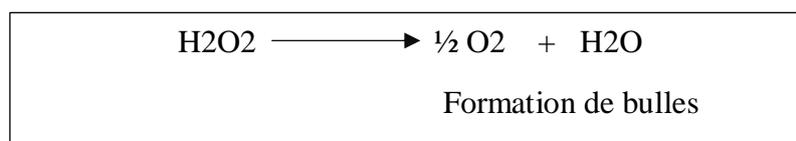
4.2.2 Test KOH

Le test KOH est un test complémentaire de la coloration de Gram dont le but est de distinguer entre les bactéries Gram + et bactéries Gram - .

Sur une lame de verre propre, une goutte du réactif KOH est mélangé avec une colonie bactérienne jeune âgée de 24 à 48h à l'aide d'une cure dent. Après homogénéisation de la colonie avec le KOH à 3% pendant au moins 15 secondes, le cure dent est retiré lentement du liquide en soulevant légèrement vers le haut, la formation de filaments visqueux clairement visibles indique des bactéries à Gram-négatif. Pour les bactéries à Gram positif, aucun filament n'est observé (Bourgault et lamothe, 1988). Le KOH provoque la lyse et la destruction de couche mince de peptidoglycane des bactéries Gram - et à cause de pH élevé de KOH, l'ADN devient épais et gluant et le mélange devient visqueux ce qui permet la formation d'un filament. Par contre dans le cas des bactéries Gram + la couche de peptidoglycane épaisse prévient sa lyse par le KOH ce qui fait l'absence de changement au niveau de sa composition et donc l'absence de filament. (Suslow et al, 1982).

4.2.3 Test Catalase

La catalase est un test fondamental pour l'identification des bactéries. L'enzyme catalase sert à neutraliser les effets bactéricides de peroxyde d'hydrogène. La catalase accélère la décomposition de l'hydrogène (H₂O₂) en eau et dioxygène visible par la formation des bulles.



Les jeunes colonies bactériennes sont prélevées à l'aide de pipette Pasteur stérile et déposées sur une lame de verre propre. En y ajoutant une goutte de peroxyde d'hydrogène (H₂O₂) 10V, des bulles apparaissent immédiatement en raison de la libération d'oxygène, révélant la présence de catalase dites catalase positif, les bactéries qui ne possèdent pas la catalase sont dites catalase négative (Vezina et Lacroix, 2000).

4.2.4 Test Oxydase

Le test d'oxydase est une réaction biochimique qui teste la présence de cytochrome oxydase, une enzyme appelée indophénol oxydase utilisée pour identifier les bactéries à Gram négatif. En présence d'un organisme contenant le cytochrome enzyme oxydase, le réactif incolore réduit devient un oxydé produit coloré. A l'aide d'une pince, un papier wathman stérile est placée sur une lame porte objet en verre, puis une colonie bactérienne est prélevée et déposée à l'aide d'une pipette Pasteur boutonnée sur le papier wathman. La colonie est imprégnée par le réactif N diméthyl paraphénylène diamine 1%. L'observation des résultats a un délai de 30 secondes, un résultat positif indique une apparition de couleur violet sur le papier wathman, un résultat négatif sur le papier reste incolore (Vezina et Lacroix, 2000).

4.2.5 Test indole

Le test d'indole détermine la capacité d'un organisme à produire de l'indole à partir de la dégradation de l'acide aminé tryptophane. Le tryptophane est un acide aminé qui peut subir une désamination et hydrolyse par des bactéries qui expriment l'enzyme tryptophane (Tryptophane + eau = indole + acide pyruvique + ammoniac).

La détection de l'indole repose sur la réaction chimique entre l'indole et le réactif de Kovacs (alcool isoamylique, para-Diméthylaminobenzaldéhyde, acide chlorhydrique concentré) dans des conditions acides : Le para-Diméthylaminobenzaldéhyde réagit avec l'indole présent dans le milieu pour former un colorant rouge rosindole. L'alcool isoamylique forme un complexe avec le colorant "rosindole", ce qui provoque sa précipitation. L'alcool restant et le précipité remontent alors à la surface du milieu.

Une culture bactérienne âgée de 24h estensemencée sur le bouillon Indole. Les tubes sont agités au vortex et incubés à l'étuve pendant 48 à 72h. Pour tester la production d'indole, 5 gouttes de réactif de Kovacs sont ajouté aux tubes.

Un test d'indole positif est indiqué par la formation d'une couleur rose à rouge (anneau rouge cerise) dans la couche de réactif au-dessus du milieu quelques secondes après l'ajout du réactif. Si une culture est indole négative, la couche de réactif restera jaune ou sera légèrement nuageux. (Kovacs, 1995).

4.2.6 Test de liquéfaction de la gélatine

Le test liquéfaction de la gélatine est utilisé pour déterminer la capacité d'un organisme à produire des enzymes protéolytiques extracellulaires (gélatinase) qui liquéfient la gélatine, un composant du tissu conjonctif des vertébrés.

Les isolats sont ensemencés sur un milieu à base de gélatine par pique centrale. Les isolats sont incubés pendant une semaine. Après 7 jours d'incubation dans l'étuve à 27C°, les tubes sont placés à 4C° pendant 30min. Un résultat positif est indiqué par l'hydrolyse de la gélatine et le milieu devient liquide, le milieu reste solide si la réaction est négative (Marchal et Bourdon, 1973).

4.2.7 Test citrate de Simmons

Les bactéries qui peuvent utiliser le citrate de sodium comme seule source de carbone peuvent se développer sur ce milieu. L'augmentation ultérieure du pH du milieu est démontrée par changement de couleur d'un indicateur de pH. La fermentation du citrate de sodium provoque alors une acidification qui vire au bleu du milieu en présence de bleu de bromothymol.

La pente du milieu incliné est ensemencée par une strie longitudinale, réalisé à l'anse à partir d'une culture bactérienne jeune sans visser le bouchon à fond, afin de permettre les échanges gazeux. Le virage de l'indicateur du pH au bleu indique une alcalinisation du milieu et la souche de citrate (+). Si le milieu ne change pas de couleur indique une alcalinisation et le milieu ne présente pas de culture, la souche est citrate (-) (Carbonnelle et al, 1988).

4.2.8 Test levane sucrase

Les levanes sont des polysaccharides extracellulaires produits par l'enzyme bactérienne levane sucrase (Côté et Ahlgren, 1993). Les oligosaccharides peuvent être obtenus par hydrolyse partielle du polysaccharide, ou par des réactions d'acceptation de l'enzyme. Les oligosaccharides produits par hydrolyse acide partielle du levane pourraient être utilisés par plusieurs espèces bactériennes (Marx et al, 2000).

Une culture bactérienne jeune sur le milieu levane est ensemencée par strie sur milieu solide. Après 48 d'incubation dans l'étuve, le développement de culture bactérienne muqueuse abondante, bombée et brillante riche en polysaccharides indique un résultat positif. En absence de ces caractéristiques le test est négatif (Lelliott et Stead, 1987).

4.2.9 Test milieu fermentation/oxydation

Pour étudier la voie de dégradation d'un glucide, des milieux contenant un seul glucide et un indicateur de pH sont utilisés.

Une culture bactérienne âgée de 24 h estensemencée sur le milieu Hugh and Leifson. Pour la fermentation une couche de vaseline stérile d'environ 1cm est ajoutée à la surface du tube à l'aide d'une micropipette stérile. Pour l'oxydation, les tubesensemencés sont légèrement desserrés afin de maintenir les bactéries en aérobie. Les tubes sont incubés pendant 48h à 72h à l'étuve. La présence d'une couleur jaunâtre indique la fermentation du glucose par la bactérie, une réaction négative ne cause aucun changement de couleur et le milieu reste bleu (Hugh et Leifson, 1953).

4.2.10 Test mannitol mobilité nitraté

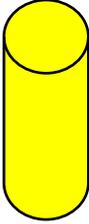
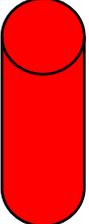
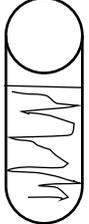
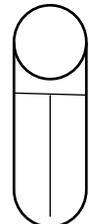
Le milieu Mannitol Mobilité Nitraté est utilisé pour l'identification présomptive des bactéries basée sur la fermentation du mannitol, la mobilité et sur la réduction des nitrates en nitrites .

Le milieu semi solide estensemencé à l'aide d'un fil de platine pique centrale au fond du tube, Incubé pendant 24 à 48 h. Grâce à l'indicateur de pH le rouge de phénol, l'utilisation du mannitol peut être lue. L'utilisation du mannitol acidifie le milieu qui peut ainsi être révèlé par le virage de l'indicateur de pH à sa teinte acide (jaune).

D'autre part, les bactéries mobiles se propagent à partir de la ligne d'ensemencement, provoquant une turbidité dans le milieu, tandis que les bactéries immobiles ne se développent que le long de la strie d'ensemencement.

La réduction des nitrates est mise en évidence par l'addition des réactifs de Griess (nitrite 1 et nitrite 2). (Le Minor, 1993).

Tableau 5 : Lecture de test mannitol mobilité nitraté

Caractère	Observation	Interprétation	Conclusion
Fermentation du mannitol	 <p>Milieu Jaune</p>	Acidification du milieu révélée par un virage de l'indicateur de pH à sa teinte acide	La bactérie fermente le mannitol Bactérie mannitol +
	 <p>Milieu Rouge</p>	Absence d'acidification du milieu	La bactérie ne fermente pas le mannitol Bactérie mannitol -
Mobilité	 <p>Diffusion des bactéries dans la gélose</p>	Déplacement des bactéries dans le milieu (gélose semi-solide)	Les bactéries sont mobiles Mobilité +
	 <p>Culture uniquement au niveau de la pique Centrale</p>	Pas de déplacement des bactéries dans le milieu	Les bactéries sont probablement immobiles
Recherche du nitrate réductase	Même principe que le bouillon nitraté : ajout de réactif de Griess qui réagit avec le nitrite pour former un complexe rouge. En absence de coloration rouge : ajout de zinc qui réduit les nitrates en nitrite		

4.3 Tests enzymatiques

4.3.1 Détermination de l'activité amylolytique

Ce test a été réalisé en cultivant la souche bactérienne sur la gélose nutritive contenant 1% d'amidon. Après l'obtention d'une bonne culture bactérienne, la gélose a été recouverte d'une solution de lugol. L'hydrolyse de l'amidon est ainsi mise en évidence par l'apparition

d'une zone claire autour de la colonie, par contre un résultat négatif se traduit par une couleur brune autour de la culture (De Vos et al, 2009).

4.3.2 Détermination de l'activité Lipolytique

L'étude de l'activité Lipolytique des souches isolées, est effectuée selon la méthode décrite par De Groot et al, (1991). Les sont inoculées sur un milieu de culture gélosé TSA, additionné de 1% d'acide oléique. La production de la lipase se manifeste par l'apparition d'une zone d'hydrolyse autour des coloniesensemencées, incubées à une température de 30C° pendant 5 jours.

4.3.3 Test de tolérance à la température

Le test de tolérance à une gamme de température a été entrepris dans le but de déterminer les types de bactéries thermophiles ou psychrophiles, dans ce cas, chaque souche estensemencée sur le milieu Luria Bertani en boites de Pétri. L'incubation se fait à des températures croissantes, 4C°,30°C, 35C°,42C°,45C° pendant 48 h. après incubation, la lecture est notée à l'œil nu par l'observation de développement ou non de la culture (Kareim et Azaza, 2022).

4.3.4 Test de tolérance à la salinité

Le test de tolérance à la salinité chez les souches étudiées est effectué à différentes concentrations de chlorure de sodium NaCl pour la détection des bactéries les plus tolérantes à la salinité. Une colonie bactérienne âgée de 24 à 48h pour chaque souche estensemencée en strie dans différents milieux Luria Bertani contenant les concentrations croissantes de sel (NaCl) : 0,3 M (17,58g/l) – 0.5 M (29, 3g/l)-0.8M (46,88g/l) et 1M (58,6 g/l). Des témoins sans NaCl sont préparés pour comparer les cultures (Kareim et Azaza, 2022).

4.3.5 Test d'osmolarité

Pour le test de la tolérance au stress hydrique, un bouillon nutritif additionné de différentes concentrations de polyéthylène glycol (PEG) 0%, 20%, 40%,60%, a été utilisé pour étudier l'effet du stress osmotique sur les souches sélectionnées. Un volume de 10 µl des suspensions bactériennes des souches endophytes à une densité optique de 0.3±2 estensemencé en tubes à essai contenant 5 ml de bouillon nutritif à des concentrations de PEG utilisées. Ce test est réalisé en trois répétitions. Le témoin négatif correspond à l'ensemencement de 10 µl d'EDS avec un bouillon nutritif à 0% de PEG.

Les tubes sont mis à l'étuve à 27°C durant 72h. Après incubation, la croissance des souches sur différentes concentration de PEG a été déterminée en mesurant l'absorbance à une longueur d'onde de 620 nm en utilisant un spectrophotomètre. Le milieu sans bactérie a été utilisé comme témoin (blanc) pour l'étalonnage du spectrophotomètre.

4.4 Mise en évidence de l'activité antagoniste *in vitro* des endophytes à l'égard de bactéries pathogènes

4.4.1 Méthode de stries croisées

L'activité antagonistes des isolats a été mise en évidence par la méthode de stries croisées sur le milieu williams, les 28 souches ont été étudiées pour évaluer leur efficacité de biocontrôle *in vitro* à l'égard de 2 bactéries pathogènes à savoir *Escherichia coli* comme souche pathogène à l'homme causant l'infection urinaire et la souche de référence *Agrobacterium tumefaciens* C58, agent causal de la tumeur du collet des arbres fruitiers. Les endophytes ont été ensemencés en un seul trait transversal à la surface du milieu williams puis incubée à 28C° pendant 48h. Une culture jeune des germes cibles pathogènes ont été ensemencés perpendiculairement à la strie longitudinale des isolats à raison de 2 répétitions. Les boites ont été incubées à 32C° pendant 24h à 48h. La lecture des résultats s'effectuée en mesurant la zone d'inhibition claire entre les bordures des isolats et du germe cible à l'aide d'une règle (cm) (Rothrock et Gottlieb, 1981).(Figure 9).

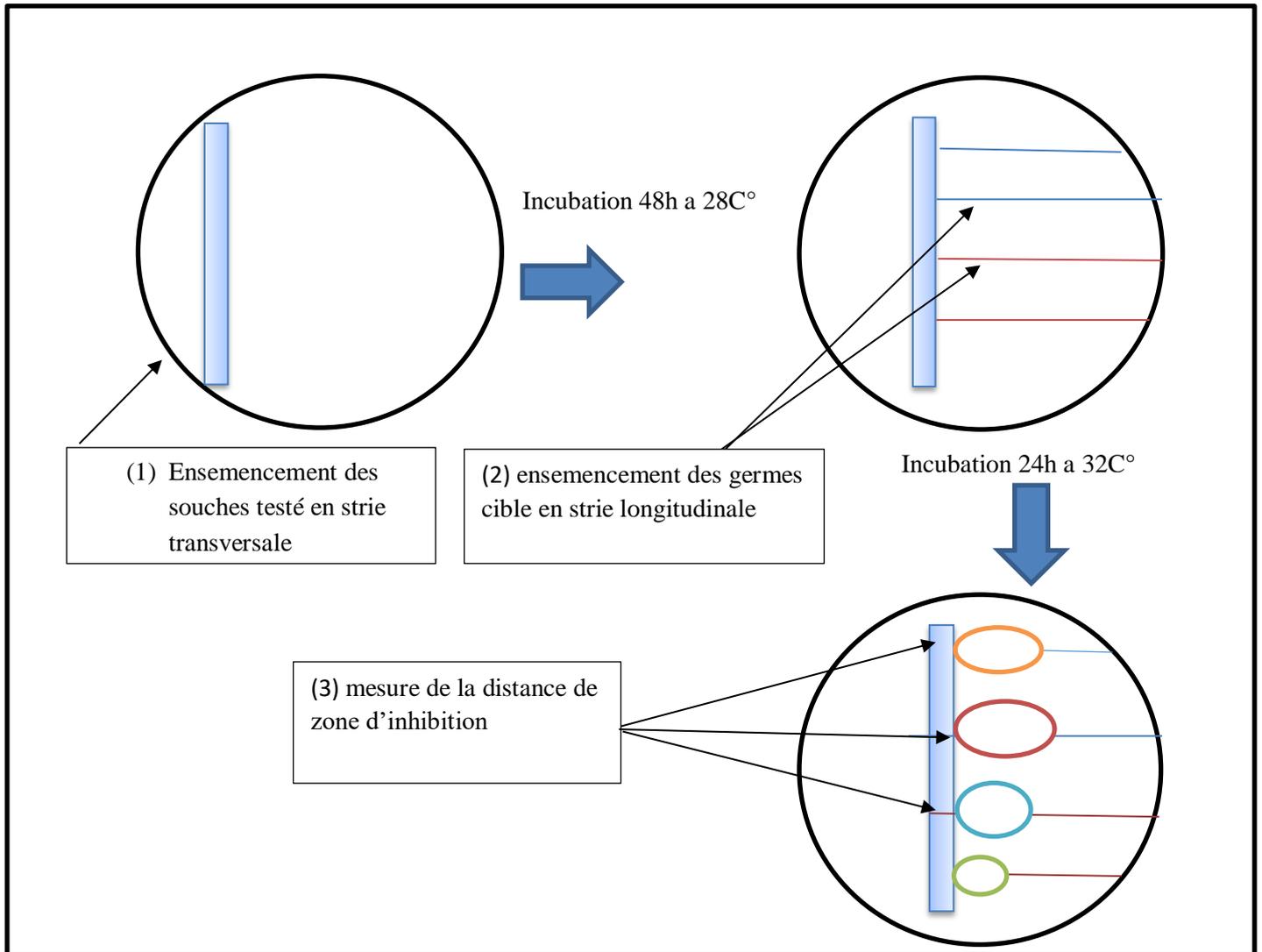


Figure (9) : Mise en évidence de l'activité antagoniste par méthode de strie croisée (Rothrock et Gottlieb, 1981).

Chapitre III

Résultats et discussions

1. Résultats

1.1 Les caractères macroscopiques des isolats sur le milieu Luria Bertani

Les colonies bactériennes obtenues après incubation sur milieu LB à 28°C pendant 24 à 48 h ont été observées à l'œil nu. Selon leurs caractéristiques macroscopiques, parmi 28 isolats étudiés, 17 isolats présentent un aspect irrégulier et 11 isolats ont un aspect circulaire. La totalité des isolats sont de couleur blanchâtre, de forme plate ou bombée, sèche ou muqueuse (tableau 6).

Tableau 6 : Caractères macroscopiques des 28 isolats sur le milieu Luria Bertani

Région		Bactérie	Aspect	Couleur	Texture	Forme
Taghit	TB(R)	TBR4	Irrégulier	Blanchâtre	Sèche	Plate
		TBR5	Irrégulier	Blanchâtre	Sèche	Plate
		BJ42	Irrégulier	Blanchâtre	Muqueuse	Plate
		BF1	Circulaire	Blanchâtre	Sèche	Plate
	TF(R)	TFR61	Circulaire	Blanchâtre	Sèche	Bombé
	TC	TCR51	Irrégulier	Blanchâtre	Sèche	Plate
		XJ3	Circulaire	Blanchâtre	Muqueuse	Bombé
		CF13	Circulaire	Blanchâtre	Sèche	Bombé
		CG2	Circulaire	Blanchâtre	Muqueuse	Plate
		CG3	Circulaire	Blanchâtre	Muqueuse	Plate
		CR5	Circulaire	Blanchâtre	Muqueuse	Plate
		PF91	Irrégulier	Blanchâtre	Sèche	Plate
		PF43	Circulaire	Blanchâtre	Sèche	Bombé
		PF12	Irrégulier	Blanchâtre	Sèche	Plate
		TR	ZF3	Circulaire	Blanchâtre	Sèche
	ZF6		Irrégulier	Blanchâtre	Sèche	Plate
	ZH4		Circulaire	Blanchâtre	Sèche	Plate
Kenadsa	KT	KTF22	Irrégulier	Blanchâtre	Sèche	Plate
		KTR61	Irrégulier	Blanchâtre	Muqueuse	Plate
	KH	KHE3	Irrégulier	Blanchâtre	Sèche	Bombé
		KHE51	Irrégulier	Blanchâtre	Sèche	Plate
		KHE61	Irrégulier	Blanchâtre	Muqueuse	Bombé
		KHE62	Irrégulier	Blanchâtre	Muqueuse	Bombé
		KHE61(3)	Irrégulier	Blanchâtre	Muqueuse	Plate
	KM	KMR4	Irrégulier	Blanchâtre	Muqueuse	Plate
	KF	KFR62	Circulaire	Blanchâtre	Sèche	Bombé
		KFR41	Irrégulier	Blanchâtre	Muqueuse	Plate
		KFR9	Circulaire	Blanchâtre	Muqueuse	Plate

1.2 Résultats des Tests Biochimiques

1.2.1 Résultats de coloration de Gram de test KOH

La réalisation de la coloration de Gram a montré que parmi les 28 souches étudiées, 11 sont de couleur violette, indiquant qu'elles sont à Gram Positif et 17 isolats sont de couleur rose à Gram négatif. Les résultats du test KOH ont confirmé les résultats de la coloration de Gram. Les résultats du test KOH ont montré que 61 % des isolats testés présentaient une formation de filament visqueux bien visible qui sont à Gram négatif, quand au 39% des isolats aucune formation de filaments n'a été observée, les bactéries sont à Gram positif (Figure 10) (Tableau 7).

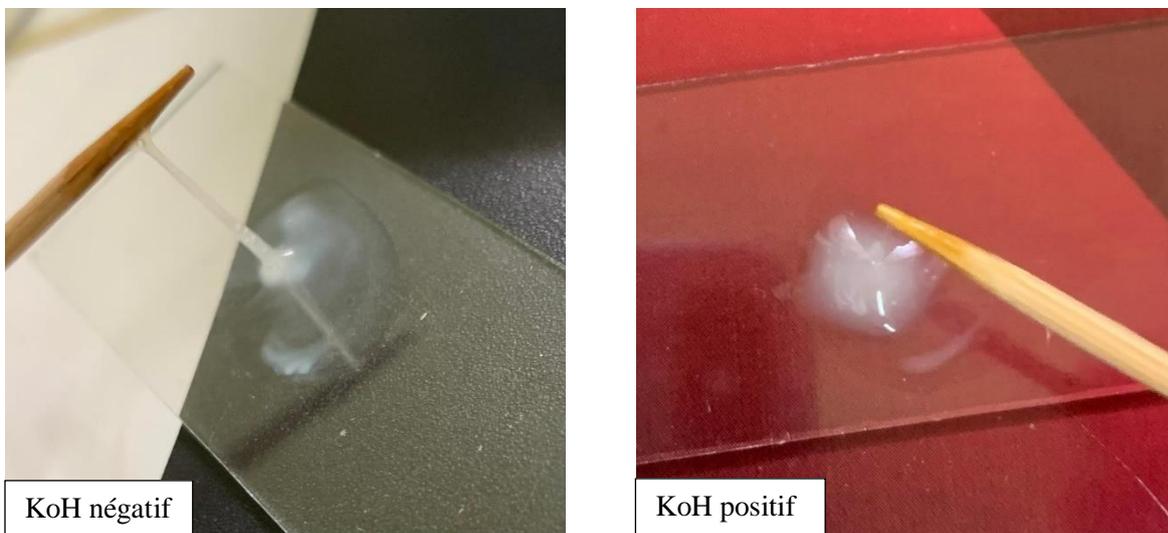


Figure (10) : Résultat du test KoH

Tableau 7 : Résultats du test KoH

Gram positif		Gram négatif	
TBR(R)	TBR4/BF1	TBR(R)	TBR5/ BJ42
TC	TCR51/CG2/PF91/PF12/PF43	TF(R)	TFR61
KT	KTF22	TC	XJ3/CF13/CG3/CR51
KH	KHE3	TR	ZF3/ZF6/ZH4
KM	KMR4	KT	KTR61
KF	KFR62/KFR9	KH	KH51/KHE61/KHE61(3)/KHE62
		KF	KFR41

1.2.2 Résultats de l'activité catalase

Le résultat du test catalase a révélé que les 28 isolats étudiés ont montré un dégagement des bulles après le dépôt du peroxyde d'hydrogène. De ce fait, les isolats sont des catalases positives (+) (Figure 11).



Figure (11) : Réaction positive au test catalase

1.2.3 Résultats de l'activité oxydase

Le test de l'oxydase est un test de détection de l'enzyme cytochrome oxydase chez les bactéries qui produisent cette enzyme.

Parmi les 28 souches testées, 16 endophytes comme TBR4, TRF61, CR51, KMR4, KFR62 sont restées incolores en présence du réactif N N diméthyl paraphénylène diamine indiquant que le test oxydase était négatif. Les 12 autres sont apparues bleu-violet après ajout du réactif, indiquant que le test oxydase était positif comme les souches BF1, TCR51, CG3, KTF22, KFR41 (Figure 12) (Tableau 8).

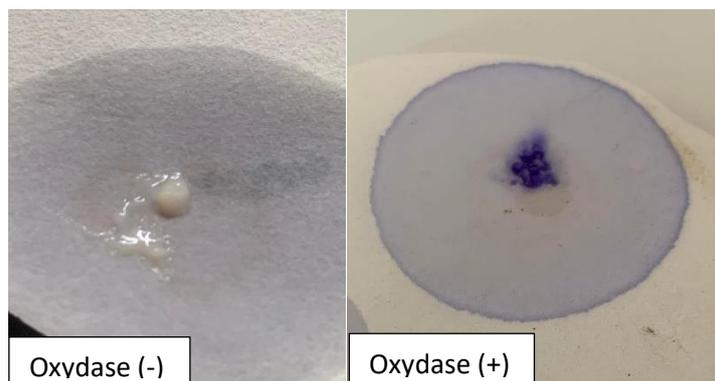


Figure (12) : Réaction des bactéries au test Oxydase

Tableau 8 : Résultats du test oxydase

Région		Bactérie	Reaction	Région		Bactérie	Reaction	
Taghit	TB(R)	TBR4	-	Kenadsa	KT	KTF22	+	
		TBR5	-			KTR61	+	
		BJ42	-		KH	KHE3	+	
		BF1	+			KHE51	-	
	TF(R)	TFR61	-			KHE61	-	
		TC	TCR51			+	KHE62	-
	XJ3		-			KHE61(3)	+	
	CF13		-		KM	KMR4	-	
	CG2		+			KF	KFR62	-
	CG3		+		KFR41		+	
	CR5		-		KFR9		-	
	TR		ZF3		-			
			ZF6		-			
		ZH4	-					

1.2.4 Résultats du test indole

Le test d'indole détermine la capacité d'un organisme à produire de l'indole à partir de la dégradation de l'acide aminé tryptophane.

Après 48 h d'incubation et l'ajout du réactif Kovacs aux isolats testés, une apparition d'un anneau jaune à la surface du milieu est remarquée concernant l'ensemble des vingt-huit isolats, cela reflète que la totalité des cultures bactériennes sont à indole négatif (-), les souches étudiées ne possèdent l'enzyme de l'hydrolyse de l'acide aminé tryptophane (Figure 13).

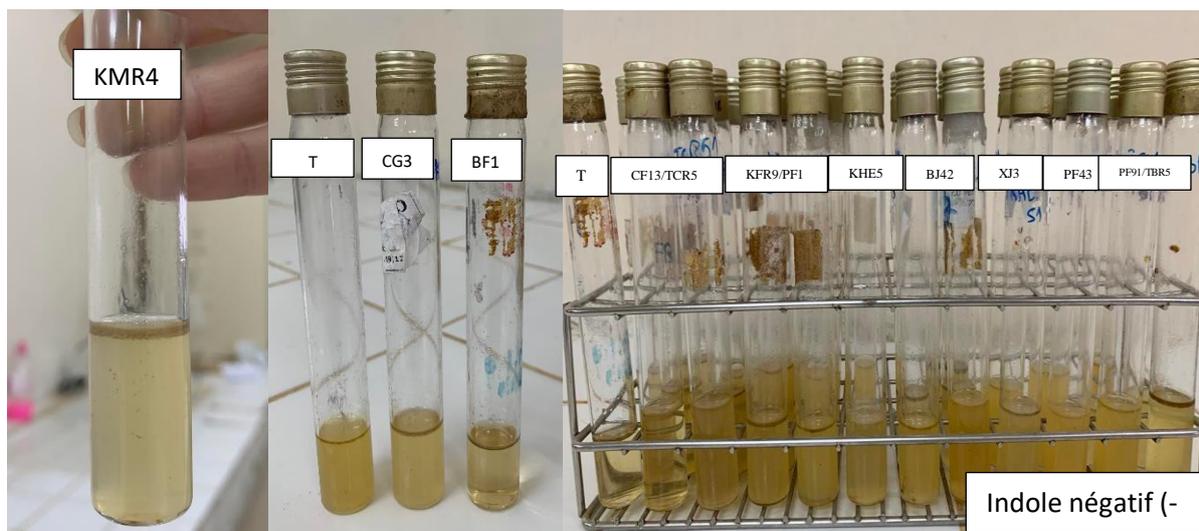


Figure (13) : Résultat du test Indole

1.2.5 Résultats de liquéfaction de gélatine

Le test permet la recherche d'une protéase : la gélatinase. La gélatinase dégrade la gélatine ajoutée à la culture bactérienne.

La lecture des résultats a été faite après emplacement des tubes à une température de 4C° pendant 30min (étape qui suit l'incubation de 7jours à 27C°). Après les 30min, la lecture se fait à l'œil nu, le milieu de l'ensemble des isolats testés reste solide en indiquant une réaction négative qui se traduit par la non hydrolyse de la gélatine pour la totalité des souches étudiées (Figure 14).

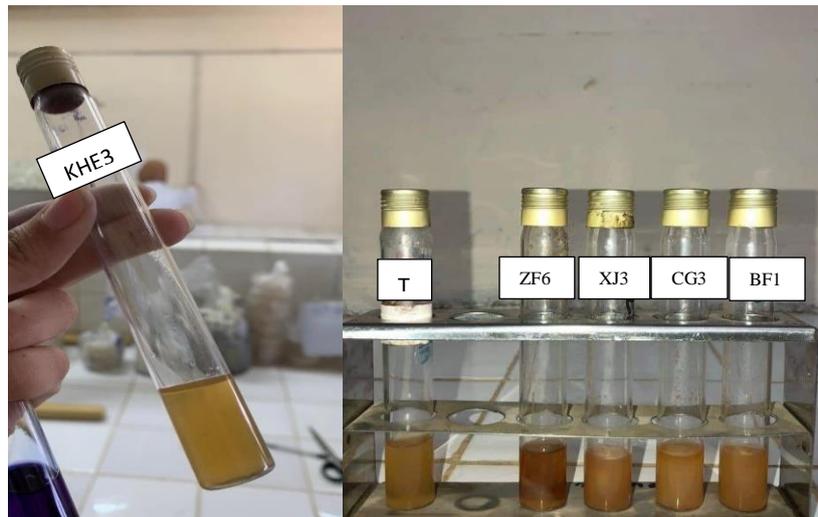


Figure (14) : Résultat négatif de test gélatine

1.2.6 Résultats du test citrate de Simmons

Le test de citrate de Simmons permet la recherche du citrate de sodium comme seule source de carbone et d'énergie pour les bactéries.

Le test citrate de Simmons a montré un résultat positif, après incubation des tubes inclinés pendant 24h dans l'étuve, un changement de couleur du vert au bleu. Le virage de l'indicateur du pH au bleu signifie qu'il y a eu une alcalinisation du milieu chez la totalité des isolats qui sont à citrate + ce qui indique l'utilisation du citrate (Figure15)

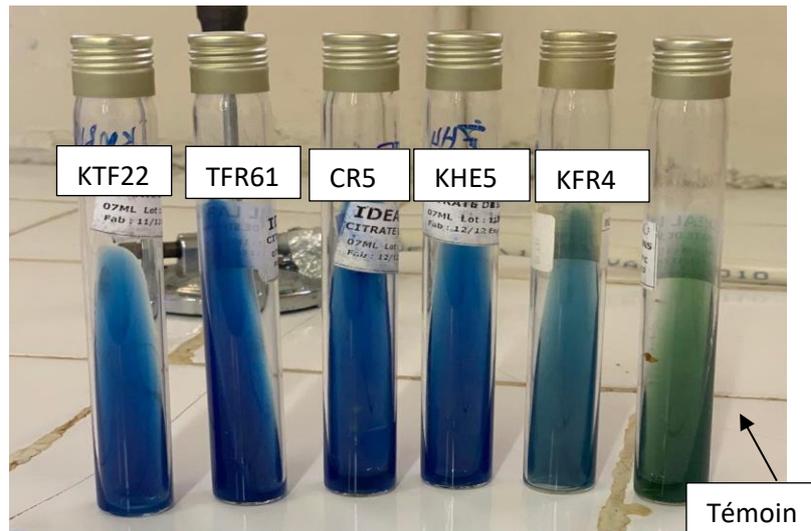


Figure (15) : Résultat positif de test citrate de Simmons

1.2.7 Résultats du test oxydation/fermentation

Le test oxydation/ fermentation détermine la voie d'attaque des glucides. Après incubation des tubes pendant 48h à l'étuve, un virement de couleur et l'apparition d'une couleur jaunâtre a été observée indiquant l'oxydation et la fermentation du glucose sur la totalité des souches testés (KFR9, KMR4, KTF22, TBR5, BF1, TRC51...). Ces résultats révèlent que les 28 souches étudiées fermentent le glucose en présence et en absence de l'oxygène (Figure 16)

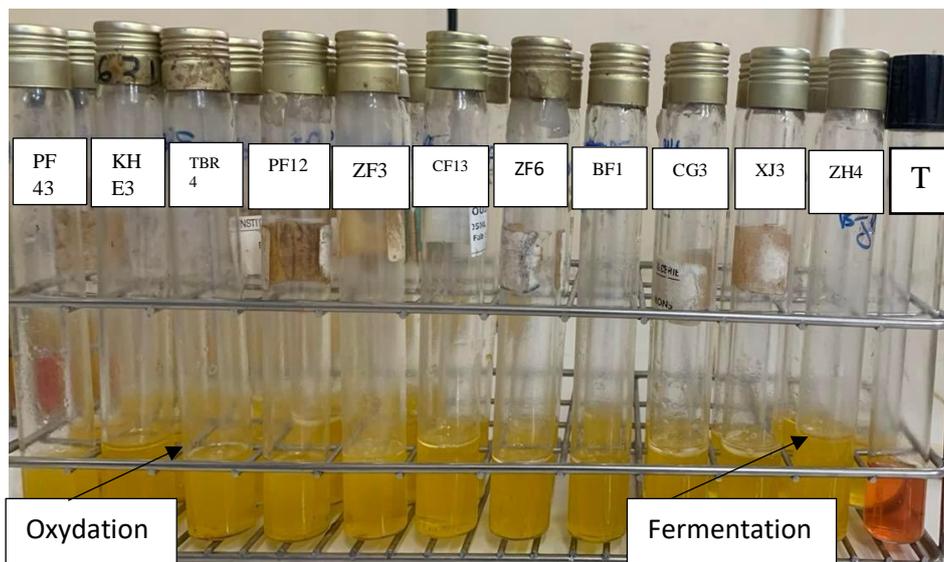


Figure (16) : Résultats positif du test oxydation/fermentation

1.2.8 Résultats de test levane sucrase

Après incubation de culture bactérienne pendant 48 h à l'étuve, la lecture a été faite à l'œil nu. En observant la présence ou l'absence d'une bonne culture bactérienne muqueuse et brillante riche en polysaccharide pour les 28 isolats testés. Parmi les souches étudiées, 9 isolats ont présenté un résultat négatif, pour les 19 autres isolats testés ont donné un résultat positif montrant une bonne culture bactérienne muqueuse et brillante riche en polysaccharides (Tableau 9).

Tableau 9 : Résultat de test levane sucrase

Région		Bactérie	Reaction	Région		Bactérie	Reaction	
Taghit	TB(R)	TBR4	+	Kenadsa	KT	KTF22	-	
		TBR5	+			KTR61	+	
		BJ42	+		KH	KHE3	+	
		BF1	+			KHE51	+	
	TF(R)	TFR61	+			KHE61	+	
		TC	TCR51			+	KHE62	+
	XJ3		-		KHE61(3)	+		
	CF13		+		KM	KMR4	+	
	CG2		-		KF	KFR62	+	
	CG3	-	KFR41			-		
	CR5	-	KFR9			+		
	PF91	-						
	PF	PF43	+					
		PF12	+					
		TR	ZF3		+			
			ZF6		+			
			ZH4		-			

1.2.9 Résultats de test mannitol mobilité nitraté

Le milieu Mannitol-Mobilité-Nitrate est utilisé pour l'identification des bactéries basée sur la fermentation du mannitol, la mobilité et sur la réduction des nitrates en nitrites.

La fermentation du mannitol se traduit par virement du milieu à la couleur jaune, 11 isolats fermentent le mannitol, 17 des isolats sont négatifs et ne fermentent pas le mannitol, la mobilité des bactéries se manifeste à partir de la ligne d'ensemencement en créant un trouble du milieu, un total de 20 isolats sont mobile, dans le cas des bactéries immobile, elle se développe uniquement le long du strie d'ensemencement, 8 isolats ont signalé une immobilité dans le milieu. L'ajout de réactif de Griess (nitrate 1 et nitrate 2) permet de mettre en évidence les nitrites, si les bactéries possèdent une nitrate-réductase positive une coloration rouge signale

la présence de nitrites dans le milieu 26 isolats sont nitrate-réductase positive, en l'absence de coloration rouge l'ajout de zinc qui réduit les nitrates en nitrites. Pas apparition d'une coloration rouge, nitrate réductase positive, apparition de couleur rouge, nitrate réductase négative, 2 des isolats sont nitrate réductase négatives. (Figure 17) (Tableau 10).

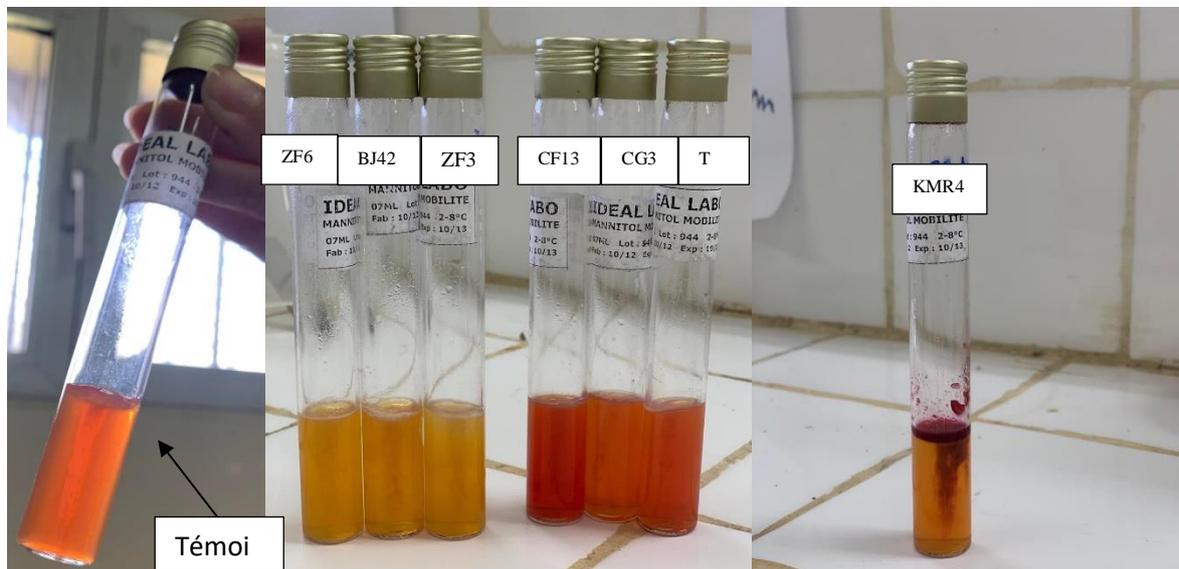


Figure (17) : Résultat du test mannitol mobilité

Tableau 10 : Résultats de test mannitol mobilité nitraté

Nitrate réductase positif		Nitrate réductase négatif	
TBR(R)	TBR4/TBR5/BJ42/BF1	TC	CG3/CR51
TF(R)	TFR61		
TC	TCR51/XJ3/CF13/CG2/PF91/PF43/PF12		
TR	ZF3/ZF6/ZH4		
KT	KTF22/KTR61		
KH	KHE3/KHE51/KHE61/KHE62/KHE61(3)		
KM	KMR4		
KF	KFR62/KFR41/KFR9		

1.3 Résultats des tests enzymatiques

1.3.1 Détermination de l'activité amylolytique

A la suite de l'obtention d'une bonne culture bactérienne cultivée sur la gélose nutritive contenant 1% d'amidon, la gélose de chacune des 28 isolats testés a été bien recouverte d'une solution du lugol, la réaction se fait au bout de quelque seconde.

Parmi la collection bactérienne, 19 isolats testés ont montré l'apparition d'une zone claire autour de la colonie signifiant un résultat positif, par contre 9 isolats testés ont donné un résultat négatif qui se traduit par l'apparition d'une couleur brune autour de la culture bactérienne (Figure 18 ; Tableau 11).

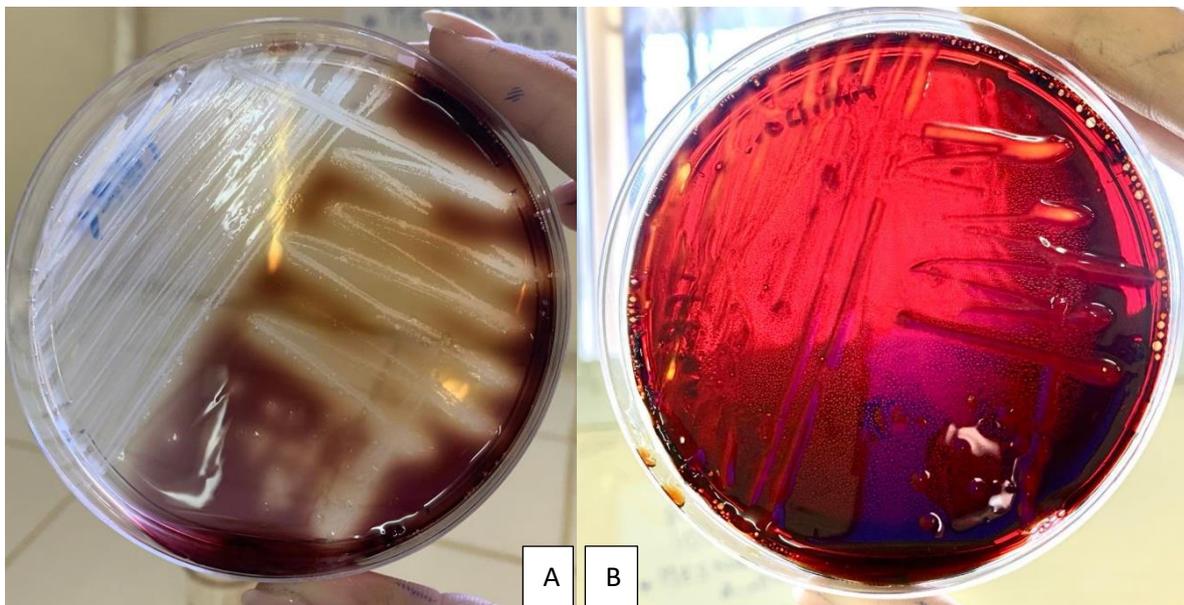


Figure (18) : Résultats du test de la détermination de l'activité amylolytique

(A : résultat positif / B : résultat négatif).

Tableau 11 : Résultats du test de la détermination de l'activité amylolytique

Région		Bactérie	Reaction	Région		Bactérie	Reaction	
Taghit	TB(R)	TBR4	-	Kenadsa	KT	KTF22	+	
		TBR5	+			KTR61	+	
		BJ42	+		KH	KHE3	-	
		BF1	+			KHE51	+	
	TF(R)	TFR61	-			KHE61	-	
		TC	TCR51			+	KHE62	-
	XJ3		+			KHE61(3)	+	
	CF13		-		KM	KMR4	-	
	CG2		+			KF	KFR62	+
	CG3		+		KFR41		+	
	CR5		+		KFR9		+	
	TR		ZF3		-			
			ZF6		+			
		ZH4	-					

1.3.2 Détermination de l'activité Lipolytique

Les activités lipolytiques variables, capables de libérer des acides gras à partir de phospholipides, lysophospholipides, triglycérides, galactolipides ou même d'esters de rétinol.

Les résultats ont été observés après 5 jours d'incubation à l'étuve à une température de 30C°. Pour les 28 isolats testés les résultats sont négatifs se traduisant l'absence de la zone d'hydrolyse autour des colonies bactériennes. Les bactéries endophytes étudiées ne produisent pas la lipase (Figure 19).

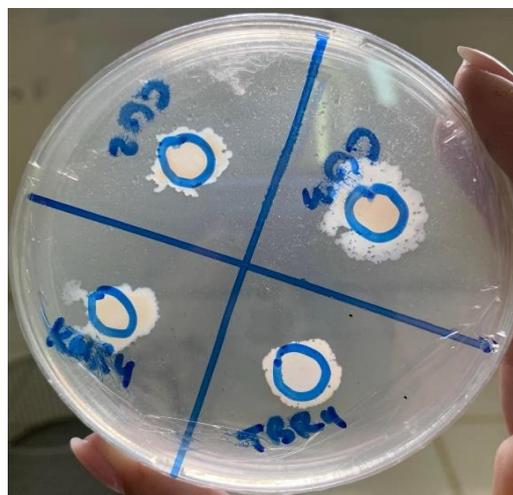


Figure (19) : Résultats du test de la production de la lipase

1.4 L'identification de souches testées

Les caractères morphologiques, les résultats des tests biochimiques effectués et la comparaison de nos résultats avec la bibliographie ont permis de s'orienter aux genres de bactéries et d'identifier les 28 isolats testés.

En effet, onze des isolats testés (CG2, PF91, PF12, KTF22, KFR41, BF1, TCR51, PF43, KHE3, TBR4, KMR4) peuvent appartenir au genre *Bacillus* et qui présentent les mêmes caractères biochimiques, douze isolats (TBR5, BJ42, ZF6, KFR62, KFR9, TFR61, CF13, ZF3, ZH4, KHE51, KHE61, KHE62) peuvent appartenir au genre *Enterobacter*, deux isolats (KTR61, KHE61(3)) peuvent appartenir au genre *Pseudomonas non fluorescent*.

L'isolat CR5 est du genre *Acinetobacter* et l'isolat XJ3 au genre *Rhizobium* présentant les mêmes caractéristiques morphologiques et biochimiques au genre identifié. L'isolat CG3 n'est pas identifié (Tableau 12).

Tableau 12 : Résultat globale des tests réalisés. !

Région		Bactérie	Catalase	Oxydase	KOH	Indole	Gélatine	Citrate	Levane	Milieu Hugh leifson	Mannitol mobilité nitrate 1	Mannitol mobilité nitrate 2	Amidon	Lipase	Genre probable	Reference
Taghit	TB (R)	TBR4	+	-	-	-	-	+	+	+	NR+		-	-	<i>Bacillus</i>	Koua et al,2018
		TBR5	+	-	+	-	-	+	+	+	NR+		+	-	<i>Enterobacter</i>	Toufik, 2013
		BJ42	+	-	+	-	-	+	+	+	NR+		+	-	<i>Enterobacter</i>	Toufik, 2013
		BF1	+	+	-	-	-	+	+	+	NR+		+	-	<i>Bacillus</i>	Koua et al,2018
	TF (R)	TFR61	+	-	+	-	-	+	+	+	NR+		-	-	<i>Enterobacter</i>	Toufik, 2013
	TC	TCR51	+	+	-	-	-	+	+	+	NR+		+	-	<i>Bacillus</i>	Koua et al,2018
		XJ3	+	-	+	-	-	+	-	+	NR+		+	-	<i>Rhizobium</i>	Howieson, 2016
		CF13	+	-	+	-	-	+	+	+	NR+		-	-	<i>Enterobacter</i>	Toufik, 2013
		CG2	+	+	-	-	-	+	-	+	NR+		+	-	<i>Bacillus</i>	Koua et al,2018
		CG3	+	+	+	-	-	+	-	+		NR-	+	-	/	
		CR5	+	-	+	-	-	+	-	+		NR-	+	-	<i>Acinetobacter</i>	Toufik, 2013
		PF91	+	+	-	-	-	+	-	+	NR+		+	-	<i>Bacillus</i>	Koua et al,2018
		PF43	+	+	-	-	-	+	+	+	NR+		+	-	<i>Bacillus</i>	Koua et al,2018
		PF12	+	+	-	-	-	+	-	+	NR+		+	-	<i>Bacillus</i>	Koua et al,2018
	TR	ZF3	+	-	+	-	-	+	+	+	NR+		-	-	<i>Enterobacter</i>	Toufik, 2013
		ZF6	+	-	+	-	-	+	+	+	NR+		+	-	<i>Enterobacter</i>	Toufik, 2013
		ZH4	+	-	+	-	-	+	+	+	NR+		-	-	<i>Enterobacter</i>	Toufik, 2013
	Kenadsa	KT	KTF22	+	+	-	-	-	+	-	+	NR+		+	-	<i>Bacillus</i>
KTR61			+	+	+	-	-	+	-	+	NR+		+	-	<i>Pseudomonas</i>	Ashraf et al,2017
KH		KHE3	+	+	-	-	-	+	+	+	NR+		-	-	<i>Bacillus</i>	Koua et al,2018
		KHE51	+	-	+	-	-	+	+	+	NR+		+	-	<i>Enterobacter</i>	Toufik, 2013
		KHE61	+	-	+	-	-	+	+	+	NR+		-	-	<i>Enterobacter</i>	Toufik, 2013
		KHE62	+	-	+	-	-	+	+	+	NR+		-	-	<i>Enterobacter</i>	Toufik, 2013
		KHE61(3)	+	+	+	-	-	+	+	+	NR+		+	-	<i>Pseudomonas</i>	Ashraf et al,2017
KM		KMR4	+	-	-	-	-	+	+	+	NR+		-	-	<i>Bacillus</i>	Koua et al,2018
KF		KFR62	+	-	+	-	-	+	+	+	NR+		+	-	<i>Enterobacter</i>	Toufik, 2013
		KFR41	+	+	-	-	-	+	-	+	NR+		+	-	<i>Bacillus</i>	Koua et al,2018
	KFR9	+	-	+	-	-	+	+	+	NR+		+	-	<i>Enterobacter</i>	Toufik, 2013	

1.5 Résultats de tolérance aux stress abiotiques

1.5.1 Résultats de test de tolérance à la température

Après incubation des 28 isolats testés pendant 48h aux différentes températures : 4C°, 19C°, 30C°, 42C° et 45C°, la lecture des résultats a été faite à l'œil nue.

Les isolats incubés à la température 4C° et 42C° ont montré une croissance des cultures bactérienne ralentie et très peu abondante pour la totalité des souches testés. À la température de 45C° nous n'avons remarqué aucune apparition de cultures bactériennes, les isolats ne tolèrent pas une température trop élevée, la croissance des 28 isolats testés est négative.

Les isolats incubés à la température de 19C° et 30C° ont montré une bonne culture bactérienne pour les 28 isolats testés. Cette température est favorable pour leur croissance. La température la plus favorable pour les isolats est de 28C° à 30C°. (Figure 20) (Tableau 13)

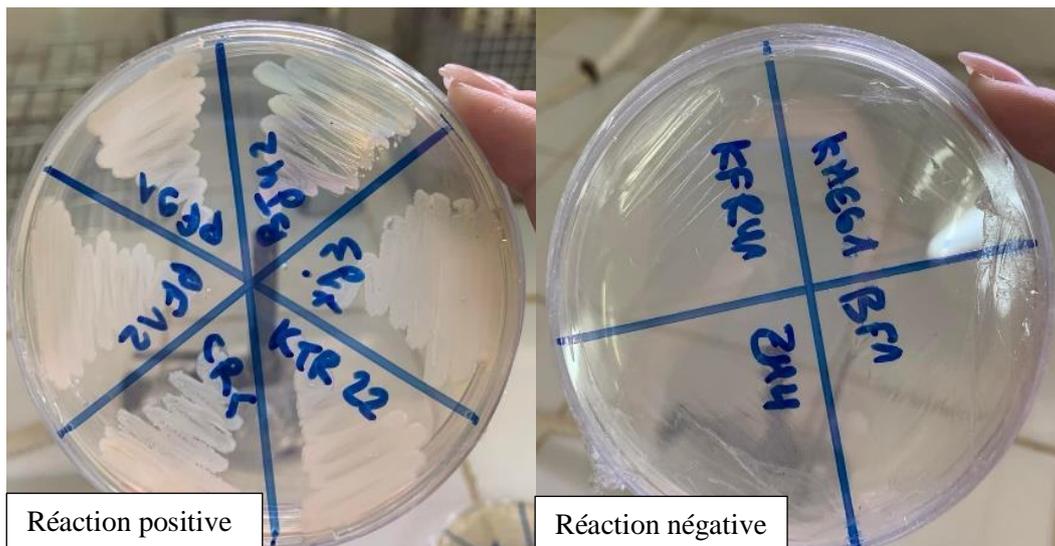


Figure (20) : Résultats de test de tolérance à la température.

Tableau13 : Résultat de test de tolérance à la température

Region		Bactérie	4C°	19C°	30C°	42C°	45C°
Taghit	TB(R)	TBR4	+	++	++++	+	-
		TBR5	+	++	++++	+	-
		BJ42	+	++	++++	+	-
		BF1	+	++	++++	+	-
	TF(R)	TFR61	+	++	++++	+	-
	TC	TCR51	+	++	++++	+	-
		XJ3	+	++	++++	+	-
		CF13	+	++	++++	+	-
		CG2	+	++	++++	+	-
		CG3	+	++	++++	+	-
		CR5	+	++	++++	+	-
		PF91	+	++	++++	+	-
		PF43	+	++	++++	+	-
		PF12	+	++	++++	+	-
		TR	ZF3	+	++	++++	+
	ZF6		+	++	++++	+	-
ZH4	+		++	++++	+	-	
Kenadsa	KT	KTF22	+	++	++++	+	-
		KTR61	+	++	++++	+	-
	KH	KHE3	+	++	++++	+	-
		KHE51	+	++	++++	+	-
		KHE61	+	++	++++	+	-
		KHE62	+	++	++++	+	-
		KHE61(3)	+	++	++++	+	-
	KM	KMR4	+	++	++++	+	-
	KF	KFR62	+	++	++++	+	-
		KFR41	+	++	++++	+	-
KFR9		+	++	++++	+	-	

1.5.2 Résultats de test de tolérance à la salinité :

A la suite de l'incubation des isolats aux différentes concentrations croissantes de sel sur le milieu Luria Bertani, les résultats sont comparés à des témoins sans NaCl (Figure 21).

Les 28 isolats cultivés aux concentrations de sel de 0.3M et 0.5 M ont montré une bonne culture bactérienne semblable aux témoins.

Les isolats incubés aux concentrations plus élevées 0.8M et 1M présentent une croissance bactérienne peu abondante et ralentie, quelques souches aucune croissance n'a été remarquée.

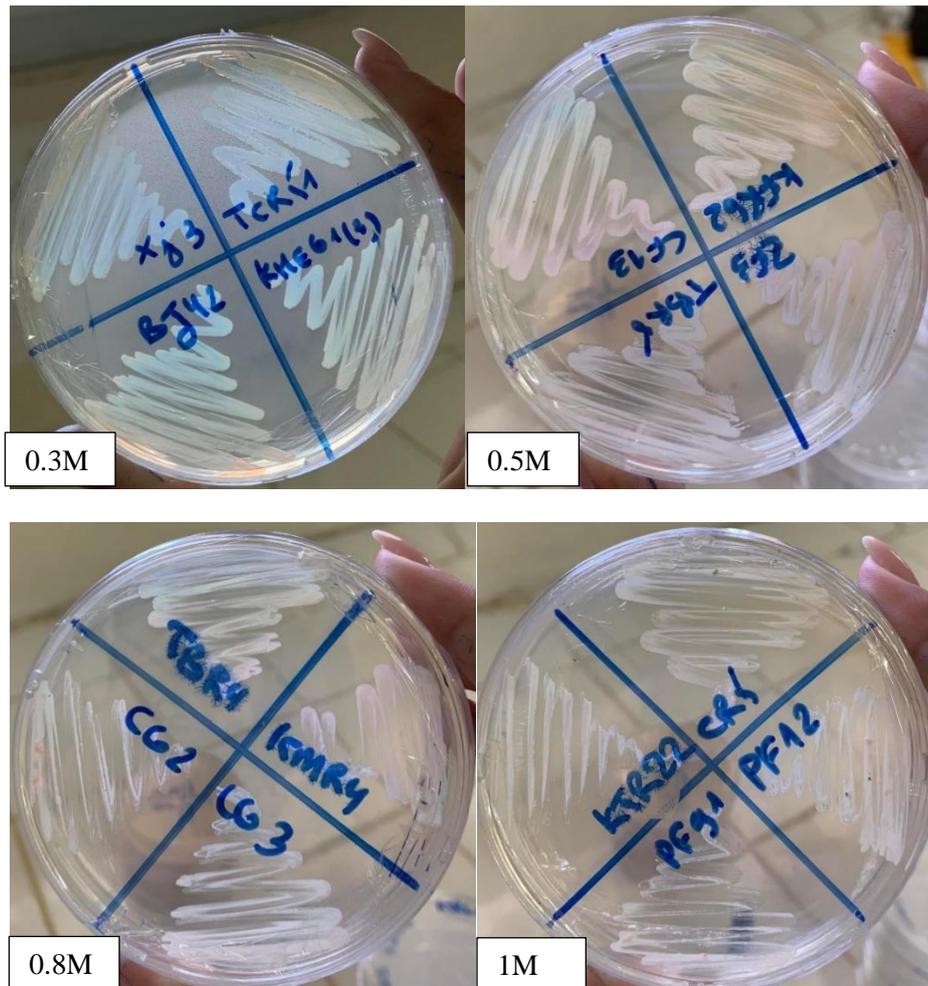


Figure (21) : Résultat de test de tolérance à la salinité.

1.5.3 Résultats de test d'osmolarité :

Après incubation durant 72h, la croissance des souches sur les différentes concentrations de PEG (Polyéthylène glycol) (0%,20%,40%,60%) a été déterminée en mesurant l'absorbance à une longueur d'onde de 600 nm par le spectrophotomètre. (Figure 22) (Tableau 14).

Nous remarquons la densité optique des bactéries diminue d'une manière proportionnelle avec l'augmentation de la concentration du PEG en comparaison avec le témoin.

A une concentration de 0% de PEG la densité optique de souches testées est supérieure à 1, la *Bacillus* sp. (KFR41) atteint une DO la plus élevée de 1,988 et plus forte que les autres souches, *Enterobacter* sp. (KHE61) est la plus faible par rapport aux autres souches qui est inférieure à 1 avec une DO de 0,920. A partir de la concentration de 20%, nous remarquons une diminution proportionnelle des densités optiques des souches testées avec l'augmentation de la concentration de PEG, *Enterobacter* sp. (ZF3) est la plus tolérante présentant une DO de 0,976 à cette concentration, même réaction pour la concentration de 40%, la *Bacillus* sp. (KTF22) est la plus tolérante présentant une DO de 0,789 et à 60% de PEG la densité optique diminue à l'augmentation de ces concentrations de PEG, la *Bacillus* sp. (BF1) atteint une DO de 0,501 est considérée la plus tolérante et la plus forte des souches à cette concentration.

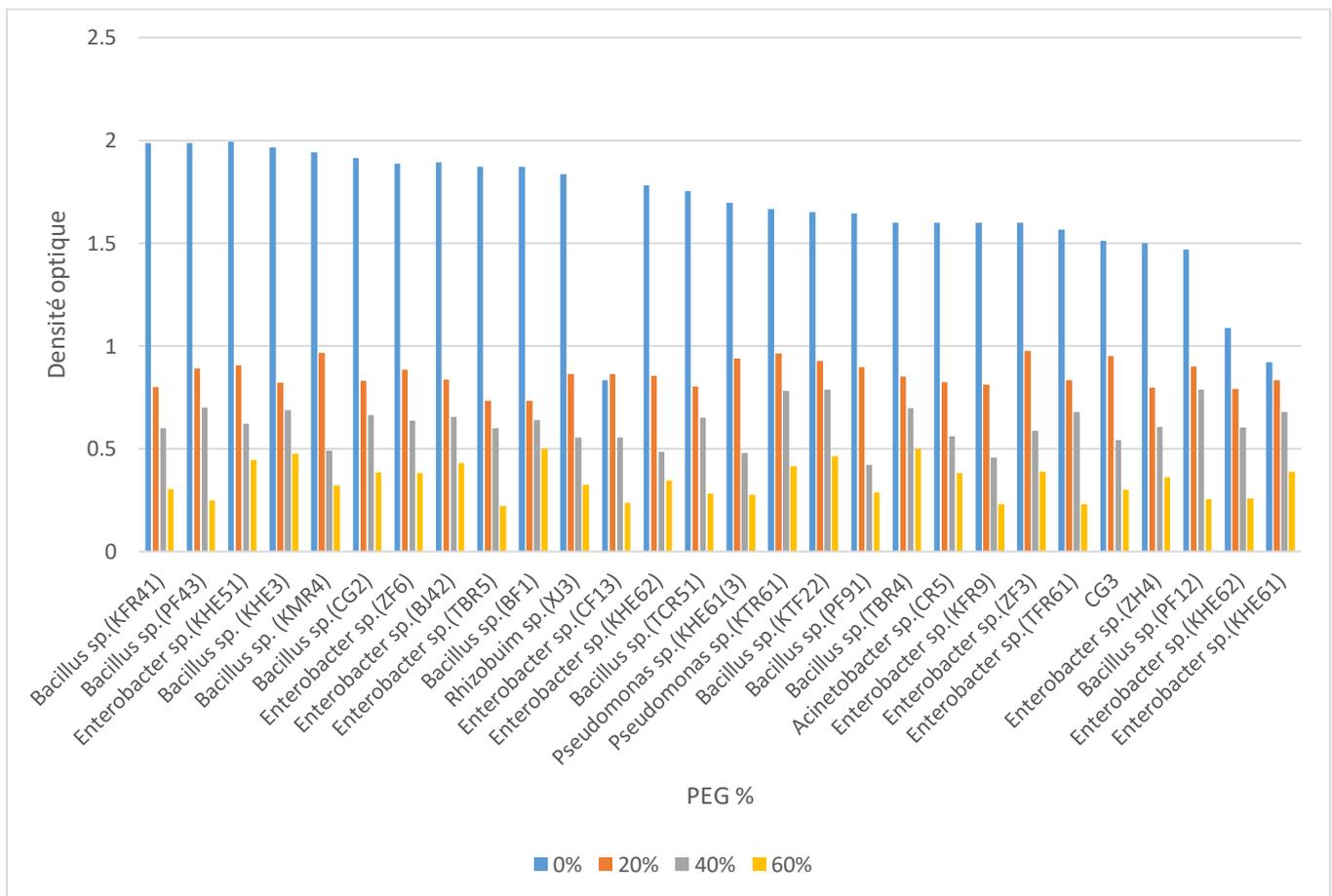


Figure (22) : Densité optique de souches bactériennes testées à différentes concentrations de PEG.

Tableau 14 : Résultat de test d'osmolarité

Region		Bactérie	0%	20%	40%	60%
Taghit	TB(R)	TBR4	1.600	0.850	0.696	0.500
		TBR5	1.872	0.734	0.599	0.222
		BJ42	1.892	0.837	0.654	0.429
		BF1	1.871	0.734	0.640	0.501
	TF(R)	TFR61	1.565	0.843	0.680	0.232
	TC	TCR51	1.753	0.802	0.652	0.281
		XJ3	1.765	0.939	0.458	0.324
		CF13	1.834	0.863	0.553	0.236
		CG2	1.913	0.830	0.664	0.386
		CG3	1.510	0.905	0.543	0.300
		CR5	1.600	0.825	0.560	0.381
		PF91	1.644	0.896	0.421	0.287
		PF43	1.987	0.891	0.699	0.250
		PF12	1.470	0.899	0.788	0.256
		TR	ZF3	1.817	0.976	0.589
	ZF6		1.888	0.885	0.636	0.381
	ZH4		1.500	0.798	0.606	0.362
Kenadsa	KT	KTR22	1.650	0.926	0.789	0.465
		KTR61	1.665	0.964	0.782	0.415
	KH	KHE3	1.964	0.821	0.688	0.476
		KHE51	1.992	0.905	0.622	0.444
		KHE61	0.920	0.833	0.678	0.388
		KHE62	1.780	0.854	0.486	0.346
		KHE61(3)	1.697	0.939	0.478	0.276
	KM	KMR4	1.940	0.965	0.490	0.320
	KF	KFR62	1.088	0.790	0.602	0.258
		KFR41	1.988	0.799	0.600	0.302
KFR9		1.600	0.812	0.457	0.232	

1.6 Mise en évidence de l'activité antagoniste par méthode de stries croisées

L'ensemble des isolats endophytes ont montré une activité antagoniste remarquable contre les bactéries pathogènes *Escherichia coli* et *Agrobacterium tunefaciens*'C58' montrant des zones d'inhibition variables entre 7mm et 15mm (Tableau 15).

Les isolats *Bacillus* sp. (PF43, TCR51) et *Enterobacter* sp. (KFR9) ont présenté une activité antagoniste importante contre les germes cibles *Escherichia coli* et *Agrobacterium tunefaciens* 'C58', notamment une activité plus remarquables sur '*E. coli*' avec une zone d'inhibition de 1,5 cm et des activités variables vis-à-vis la souche de référence *Agrobacterium tunefaciens* 'C58' qui présentent les zone d'inhibition de diamètres de 0,8 cm, 0,7 cm et 0,6 cm respectivement.

Les isolats TRB5, KHE51, ZF3, ZF6 appartenant au genre *Enterobacter* et BF1 appartenant au genre *Bacillus* présentent également une activité antagoniste vis-à-vis des deux germes cibles, une activité moyenne pour ‘*E. coli*’ avec les diamètres des zones d’inhibition entre 0,6 cm et 0,5 cm et pour ‘C58’ variant entre 0,4 cm et 0,3 cm.

Les isolats *Pseudomonas non fluorescent* sp. (KTR61), *Acinetobacter* sp. (CR5), et les *Bacillus* sp. (KTF22, TBR4, KFR41, PF91, CG2) et les *Enterobacter* sp. (CF13, BJ42, KHE61, KHE62) ont montré une faible activité antagoniste contre ‘*E. coli*’ et ‘C58’ dont le diamètre de la zone d’inhibition ne dépasse pas les 0,2cm

Pour le *Pseudomonas non fluorescens* sp. KHE61(3), les *Bacillus* sp. (PF12, KHE3) et les *Enterobacter* sp. (KFR62) une activité antagoniste vis-à-vis du germe cible ‘*E.coli*’ très faible qui varie entre 0,05cm et 1cm et pour la ‘C58’ notamment une activité variant entre 0,1 cm et 0,3 cm. Concernant l’isolat *Rhizobium* sp. (XJ3) aucun effet n’a été enregistré pour les deux germes cibles.

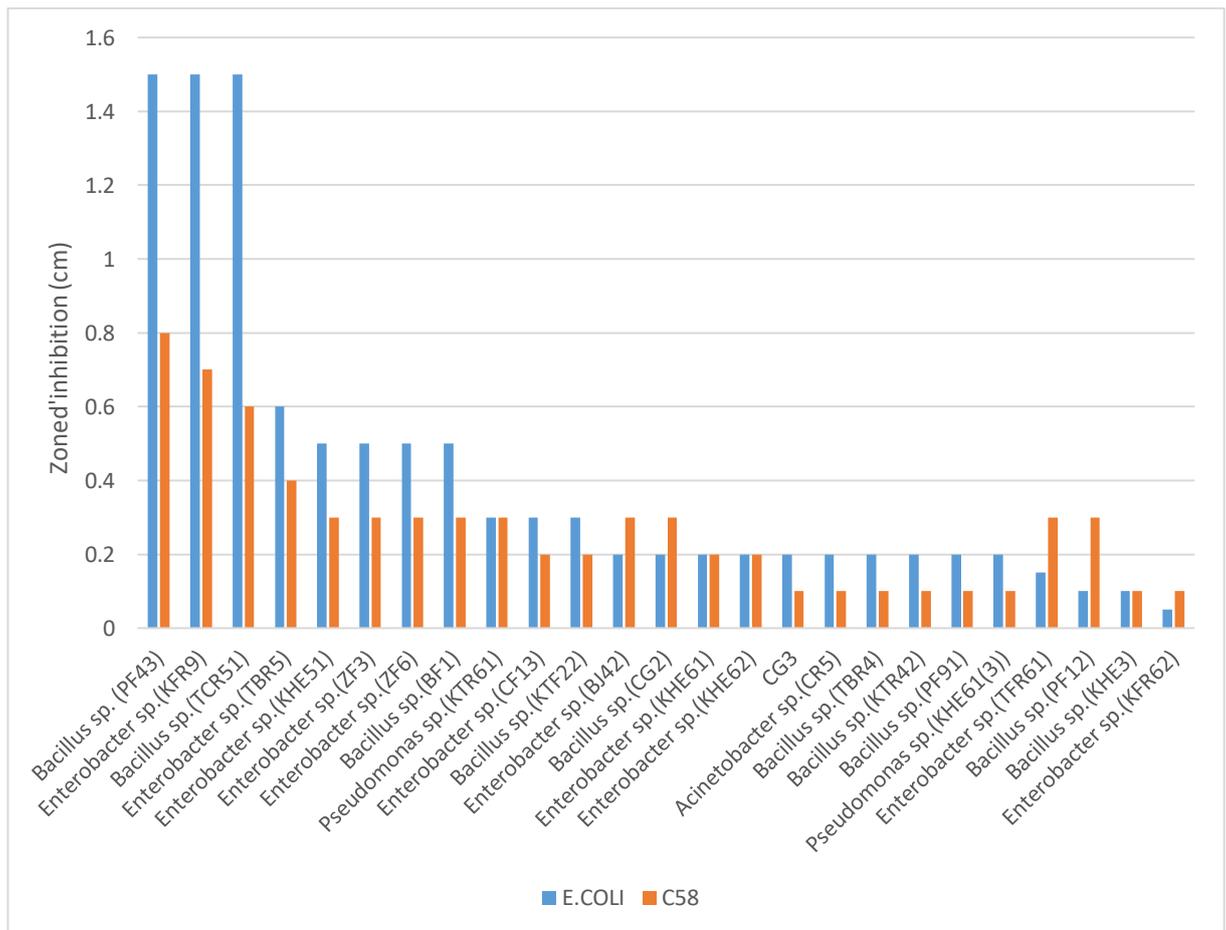


Figure (23) : Activité antagoniste des isolats endophytes testés vis-à-vis deux souches pathogènes ‘*Escherichia coli*’ et ‘*Agrobacterium tumefaciens*’.

Tableau 15 : Résultat de la mise en évidence de l'activité antagoniste par méthode de strie croisée (Rothrock et Gottlieb, 1981).

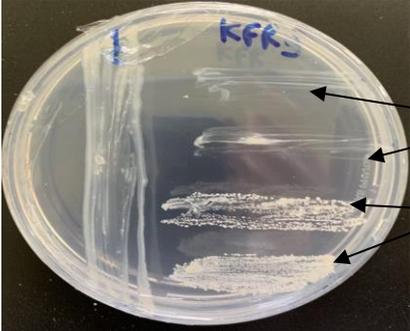
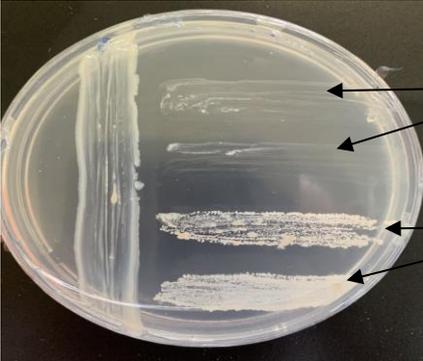
Souches testées	Résultats méthode strie	Germes cibles utilisés
L'isolat KFR9 (<i>Enterobacter</i>)		<p><i>Escherichia coli</i></p> <p><i>Agrobacterium tumefaciens</i></p>
L'isolat PF43 (<i>Bacillus</i>)		<p><i>Escherichia coli</i></p> <p><i>Agrobacterium tumefaciens</i></p>
L'isolat TCR51(<i>Bacillus</i>)		<p><i>Escherichia coli</i></p> <p><i>Agrobacterium tumefaciens</i></p>

Tableau 16 : Valeurs des zones d'inhibitions des isolats testés en cm

Bactérie	<i>Escherichia coli</i>	<i>Agrobacterium tumefaciens</i>
PF43	1,5 cm	0,8 cm
KFR9	1,5 cm	0,7 cm
TCR51	1,5 cm	0,6 cm
TBR5	0,6 cm	0,4 cm
KHE51	0,5 cm	0,3 cm
ZF3	0,5 cm	0,3 cm
ZF6	0,5 cm	0,3 cm
BF1	0,5 cm	0,3 cm
KTR61	0,3 cm	0,3 cm
CF13	0,3 cm	0,2 cm
KTR22	0,3 cm	0,2 cm
BJ42	0,2 cm	0,3 cm
CG2	0,2 cm	0,3 cm
KHE61	0,2 cm	0,2 cm
KHE62	0,2 cm	0,2 cm
CG3	0,2 cm	0,1 cm
CR5	0,2 cm	0,1 cm
TBR4	0,2 cm	0,1 cm
KFR41	0,2 cm	0,1 cm
PF91	0,2 cm	0,1 cm
KHE61(3)	0,15 cm	0,3 cm
TFR61	0,1 cm	0,3 cm
PF12	0,1 cm	0,1 cm
KHE3	0,05 cm	0,1 cm
KFR62	0,05 cm	0,1 cm
KMR4	0,2 cm	/
ZH4	/	0,3 cm
XJ3	/	/

Discussion

L'étude entreprise dans ce présent travail a pour but de caractériser les bactéries endophytes non fluorescentes isolées à partir des racines des palmerais sahariennes de deux régions de la wilaya de Béchar 'Taghit' et 'Kenadsa'.

Les isolats bactériens différents prélevés de 8 cultivars de palmier dattier des deux régions sahariennes ont été isolés par la méthode classique d'extraction par macération des racines en 2021. Un total de 28 isolats non fluorescents ont été sélectionnés, qui ont fait objet de caractérisation macroscopique et de tests biochimiques.

L'identification préliminaire de ces isolats a été faite en premier lieu en se basant sur la caractérisation morphologique : forme, aspect, couleur. Cette étude a montré une diversité des caractères, la totalité des isolats sont de couleurs blanchâtres, 17 souches présentent des colonies sont irrégulières et 11 isolats sont d'aspect circulaire, de forme plate ou bombée.

La caractérisation morphologique est une étape qui est nécessaire afin de différencier les isolats qui donne une indication sur la variation des isolats endophytes (Becker et al., 1985).

La coloration de Gram et sa confirmation par le test KoH permet de mettre en évidence les propriétés de la paroi bactérienne et d'utiliser ces propriétés pour distinguer et classer les bactéries (Gram, 1884). Ces tests ont été effectués sur les 28 isolats endophytes non fluorescents qui ont permis de les grouper en deux catégories, 12 isolats bactériens Gram positif et 16 isolats bactériens à Gram négatif. Ces souches présentent également des diversités de caractères macroscopiques et biochimiques.

L'étude de ces isolats a été ensuite complétée par les études biochimiques, enzymatiques et de tolérance aux stress biotiques ainsi que l'essai de biocontrôle in vitro vis-à-vis de germes pathogènes.

Les tests préliminaires sont les tests biochimiques pour l'identification microbienne ou la différenciation entre des groupes de micro-organismes sont utilisés (Merck, 2022).

Sur les 28 isolats testés 11 isolats (CG2, PF91, PF12, KTF22, KFR41, BF1, TCR51, PF43, KHE3, TBR4, KMR4) ont été caractérisés en tant que des espèces du genre *Bacillus* du fait qu'elles possèdent des caractéristiques biochimiques-suivants Gram positif, catalase positif,

oxydase positif/négatif, nitrate réductase positif, indole négatif rarement positif, hydrolyse de l'amidon. Nos résultats sont similaires à ceux décrits par Koua et al, (2018).

Les micro-organismes *Bacillus* sont les plus abondantes et omniprésente dans la nature, ce sont des bactéries a Gram-positives à faible teneur en GC appartenant au phylum des Firmicutes. Elles représentent un groupe hétérogène des bactéries aérobies ou anaérobies facultatives, et peuvent être anaérobies stricts en forme de bâtonnets et peuvent résister à des conditions environnementales défavorables (Ehling-Schulz et al, 2019).

Les espèces de *Bacillus* sont parmi les bactéries les plus prédominantes dans la plante favorisant la croissance. Elles peuvent améliorer la croissance et le développement des plantes par divers mécanismes (Lopes et al, 2018).

Les espèces du genre *Bacillus* se développent mieux à une température de 28-33°C qu'à 37°C, mais beaucoup d'espèces tolèrent des différences thermiques marquées (Toufik, 2013).

Par rapport à leur tolérance à la salinité et la température. Les *Bacillus* sont halotolérants, ils peuvent croître de 0% à 25% de NaCl. Les conditions optimales de croissance de ces espèces se situent à une température de 10 °C à 50 °C. Ils peuvent aussi former une spore protectrice dure (endospore) lui permettant de tolérer des conditions environnementales difficiles ou extrêmes. Nos résultats sont similaires à ceux décrits par Shi et al., (2011).

Les bactéries appartenant au genre *Bacillus* ont souvent fait l'objet de plusieurs utilisations en biotechnologie, en médecine, et en bioremédiation. La caractérisation et surtout l'identification de ces microorganismes est souvent cruciale vu l'intérêt qu'ils présentent. De nombreux auteurs ont montré que certaines souches des *Bacillus* sont reconnues comme des bactéries non pathogènes (Kaya-Ongoto, 2018).

Ces espèces sont une source d'enzymes industrielles telles que les amylases utilisées dans l'industrie de panification. L'industrie pharmaceutique exploite la capacité de *Bacillus* à produire des antibiotiques, comme la bacitracine, pour fabriquer des médicaments destinés à lutter contre les maux de gorge. Nos résultats enzymatiques sont similaires à ceux de Kaya-Ongoto, (2018).

Sur les 28 isolats, 12 isolats endophytes à Gram négatif (TBR5, BJ42, ZF6, KFR62, KFR9, TFR61, CF13, ZF3, ZH4, KHE51, KHE61, KHE62) ont été caractérisés du genre *Enterobacter* du fait qu'ils possèdent des caractéristiques biochimiques similaires au genre *Enterobacter* à savoir : oxydase négatif, acidifiant le glucose par voie fermentative, réduisant

les nitrates en nitrites, colonie brillante (levane positif). Nos résultats concordent avec les recherches décrits par Toufik, (2013).

D'autre part, 2 isolats à Gram négatif (KTR61, KHE61(3)) sont des espèces probables du genre *Pseudomonas non fluorescents*. Parmi les caractéristiques biochimiques de *Pseudomonas* : la production d'une cytochrome C oxydase (test de l'oxydase positif), catalase positive, d'une nitrate réductase et d'une nitrite réductase permettant la réduction des nitrates (NO₃) en monoxyde d'azote (NO) puis en azote (N₂) (Ashraf et al, 2017).

La plupart des organismes *Pseudomonas* sont facilement reconnaissables sur la base de la morphologie caractéristique des colonies, plates et étalées. La culture des *Pseudomonas* est aisée du fait qu'ils ont des besoins nutritionnels très simples ; une température entre 10°C et 42°C, sur des milieux ordinaires, nos résultats obtenus sont similaires aux résultats décrite par Ashraf et al, (2017).

Un seul isolat CR5 est du genre *Acinetobacter*. En effet, Baumann, Doudoroff et Stanier en 1968 ont proposé de réunir toutes ces variétés dans une seule espèce et un seul genre *Acinetobacter calcoaceticus*. *Acinetobacter* sont à Gram positif qui possèdent des caractères biochimiques suivants : catalase positif et oxydase négatif, les nitrates ne sont pas réduits en nitrites ou alors très rarement et très lentement, acidification du glucose et citrate de Simmons positif. Nos résultats concordent avec les résultats décrits par Toufik, (2013).

Un seul isolat XJ3 à Gram négatif peut être du genre *Rhizobium* qui est caractérisé par des colonies blanchâtres et circulaires, catalase Positif, activité amylolytique positif. Nos résultats sont similaires à ceux de Howieson, (2016).

Les rhizobactéries ont la capacité d'améliorer la croissance des plantes. Le mode d'action des différents rhizobactéries est influencé par des facteurs biotiques (génotype de la plante hôte, stades végétatifs, mécanismes de défense des plantes...) et abiotiques (composition du sol, conditions climatiques...). (Miloud, 2018).

Les *Rhizobium* sont des bactéries de la famille des Rhizobiacées, ils sont Gram négatifs, Ces colonies apparaissent sous forme circulaires, blanches et peuvent être brillante, non sporulant, et sont mobiles. Ce sont des microorganismes aérobies de petite taille dont la température de croissance optimale est de 28°C et le pH optimal est de 6 à 7.

Les *rhizobiums* sont des bactéries hétérotrophes, ils utilisent des carbohydrates relativement simples comme le glucose, le mannitol, Nos résultats concordent avec les résultats décrits par Weir, (2016) et khallef, (2016).

L'activité antagoniste des 28 isolats testés contre les deux souches pathogènes '*Escherichia Coli*' et '*Agrobacterium tunefaciens C58*' a montré qu'elle présentent une activité remarquable, les deux isolats appartenant au genre *Bacillus*, la PF43 et la TCR51 et l'isolat appartenant au genre *Enterobacter*, la KFR9 ont montré une activité importante d'une zone d'inhibition de 1,5 cm à l'égard de '*Escherichia Coli*' et de 0,6 à 0,8 cm à l'égard de '*Agrobacterium tunefaciens*'. les isolats appartenant aussi au genre *Enterobacter*, la TRB5, KHE51, ZF3, ZF6 et BF1 ont une activité moyenne contre les souches pathogènes, les isolats KTR61, CF13, CR5, KTR22, BJ42, CG2, KHE61, KHE62, CG3, CR5, TBR4, KFR41, KHE61(3), PF12, KHE3, KMR4, ZH4, KFR62 PF91 qui appartiennent à divers genres *Bacillus*, *Enterobacter*, *Acinetobacter* et *Pseudomonas non fluorescent* ont montré une faible activité antagoniste d'une zone d'inhibition variant entre 0,1 cm et 0,3cm à l'égard des deux agent pathogènes. L'isolat XJ3 appartenant au genre *Rhizobium* ne manifeste aucun effet antagoniste contre les souches pathogènes testées.

Les endophytes protègent contre les attaques d'agents pathogènes en libérant des composés antimicrobiens qui abandonnent l'infestation par des agents pathogènes, ces bactéries endophytes présentent des caractéristiques uniques, telles que les biofilms afin de protéger contre les pathogènes, les genres endophytes étudié ont un effet antagonistes remarquable contre les deux pathogènes '*Escherichia coli*' et '*Agrobacterium tunefaciens C58*'.

Les microorganismes endophytes peuvent également synthétiser des métabolites antimicrobiens qui ont la capacité de défense face aux agressions et permettent de protéger la plantes contre les stress biotiques et abiotiques par le mécanisme d'antibiose (Zhang et al, 2006).

Les vingt-huit isolats endophytes testés isolés des racines du palmier dattier ont à effet antagoniste vis-à-vis '*Escherichia coli*' et '*Agrobacterium tunefaciens*'. Des travaux de Mohamed Mahmoud (2017) ont mis en évidence le criblage *in vitro* des endophytes isolés du palmier dattier par l'étude de leurs propriétés antagonistes contre des agents pathogènes telluriques.

Conclusion et perspectives

Conclusion et perspectives :

De nombreux composés bioactifs bénéfiques pour les produits pharmaceutiques, industries et agriculture sont produits par les communautés endophytiques.

Les bactéries endophytes aident les plantes dans leurs meilleures croissances en produisant des hormones de croissance, protection de la plantes contre le stress biotiques et abiotiques et améliore l'activité de lutte biologique en réduisant les débris nocifs pour leurs écosystèmes.

La présente étude a porté comme objectif de purifier les bactéries endophytes isolées du palmier dattier dans deux régions de la wilaya de Béchar : Kenadsa et Taghit. Ces souches ont été par la suite caractérisées et identifiées par des tests biochimiques, enzymatiques et des tests de tolérance aux stress abiotiques et testées pour leur activité antagoniste vis-à-vis de bactéries pathogènes. Un total de 28 souches bactériennes non fluorescentes a été étudié.

L'utilisation des tests biochimiques basé sur le test catalase, oxydase, KoH, et autres tests a permis de nous orienter sur la caractérisation et l'identification préliminaire des souches endophytes testées. Les résultats obtenus ont montré que 43% des isolats bactériens sont à Gram positif et 57 % se sont révélés à Gram négatif.

Parmi les 28 bactéries endophytes, 12 isolats ont été caractérisés qui pourraient appartenir au genre *Enterobacter*, onze autres isolats pourrait appartenir au genre *Bacillus*, deux isolats appartiennent au genre *Pseudomonas* non fluorescents, un seul isolat appartient au genre *Acinetobacter*, un seul isolat appartient au genre *Rhizobium*. Un isolat n'a pas pu être identifié.

D'une part, les tests enzymatiques ont montré que 68% des isolats ont une activité amylolytique dégradant l'amidon et que 32% ne présente aucune activité amylolytique. En revanche, la totalité des souches ne produisent pas de lipase.

Ainsi, les résultats des tests de tolérance aux stress abiotiques ont montré que 100% des souches se développent à une température optimale ; de 19C° à 30C°, et sont non tolérantes à une température inférieure à 4C° ou supérieur à 42C°, et à la salinité à la concentration trop élevées 1M (58,6 g/l) et concernant l'osmolarité la densité optique des isolats diminue à l'augmentation des concentrations de PEG (0%, 20%,40%,60%).

Les tests nous ont permis par la suite d'orienter le diagnostic en supposant que les souches bactériennes appartenant aux genres *Bacillus*, *Enterobacter*, *Pseudomonas*, *Rhizobium*, *Acinetobacter*.

L'évaluation de l'activité antagoniste des bactéries endophytes vis-à-vis de bactérie pathogène '*Escherichia coli*' et phytopathogène '*Agrobacterium tunefaciens C58*' par technique de stries croisées a montré que 93% des isolats endophytes testées avait une activité antagoniste contre '*Escherichia coli*' considéré comme agent pathogène pour l'homme causant des infections urinaires et '*Agrobacterium tunefaciens C58*' agent de tumeur du collet des arbres fruitier.

Les trois isolats ; PF43, TCR51 appartenant au genre *Bacillus* et la KF9 appartenant au genre *Enterobacter* ont une forte activité antagoniste avec un taux d'inhibition élevé de 15mm à l'égard du germe '*Escherichia coli*' et de 6 à 8 mm à l'égard de '*Agrobacterium tunefaciens C58*' est sont considérées comme bactéries endophytes performantes et peuvent être potentielles dans différents domaines, en médecine, en pharmacologie, en agriculture et en industrie.

Les résultats obtenus à partir du travail réalisé c'est basé sur des techniques et méthodes physiques du laboratoire classique, il ouvre les perspectives futures notamment pour des études plus larges et plus approfondies dans le but d'identifier les isolats et de déterminer les espèces étudiées en se basant sur les points suivants :

- ✓ La confirmation de non pathogénicité des bactéries endophytes par la réalisation de test d'hypersensibilité sur le tabac
- ✓ La réalisation des tests plus approfondis pouvant être mis en épreuve comme les tests moléculaires afin d'identifier les espèces (PCR, séquençage).
- ✓ Dépistage des activités enzymatiques biochimiques des bactéries endophytes.
- ✓ La recherche de nouveaux métabolites pour faire face à des multiples résistances de microorganismes pathogènes.

Références bibliographiques

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- ❖ **Aberlenc-Bertossi., 2012.** La détermination du sexe chez le palmier dattier.
- ❖ **Achoura A., 2013.** Contribution à la connaissance des effets des paramètres écologiques oasiens sur les fluctuations des effectifs chez les populations de la cochenille blanche du palmier dattier *Parlatoria blanchardi* Targ.1868, (Homoptera, Diaspididae) dans la région de Biskra. Thèse de doctorat en Protection des Végétaux. Université Mohamed Kheider –BISKRA.
- ❖ **Adekunle R , Adeleke R., 2021.** Bioprospecting of endophytic microorganisms for bioactive compounds of therapeutic importance.
- ❖ **Al-Mailem D., 2010.** Oil phytoremediation potential of hypersaline coasts of the Arabian Gulf using rhizosphere technology. *Bioresource technology*. 101(15):5786–5792.
- ❖ **Allam A., 2008.** Etude de l'évolution des infestations du palmier dattier (*Phoenix dactylifera* Linné,1793) par *Parlatoria blanchardi* Targ.(Homoptère diaspididae Targ.1892) dans quelques biotopes de la région de Touggourt. Thèse magister. Institut national-agronomique el Harrach Alger.
- ❖ **Amirou S., 2012.** Etude et mise au point de composite à base de la matière fibreuse du palmier dattier *Phoenix dactylifera* L. Thèse de doctorat Sciences et Techniques du Bois et Eco-matériaux, Université m'hamed bougara-boumerdes.
- ❖ **Amirou S., 2021.** effet de la température sur l'évolution des fruits chez quelques variétés du palmier dattier (*Phoenix dactylifera* L.)
- ❖ **American Public Health Association ., 1917.** Standars methods of analyses.
- ❖ **Alvin, A.; Miller, K.I.; Neilan, B.A., 2014.** Exploring the potential of endophytes from medicinal plants as sources of antimycobacterial compounds. *Microbiol. Res*. 483–495.
- ❖ **Babahani S., 2011.** Analyses biologique et agronomique de palmiers mâles et conduite de l'éclaircissage des fruits chez les cultivars Ghars et Deglet Nour.
- ❖ **Babahani S., 2012.** [Effet de la température sur l'évolution des fruits chez quelques variétés du palmier dattier \(*Phoenix dactylifera* L\).](#)
- ❖ **Barthélemy M., 2019.** Etude de la diversité chimique et biologique d'endophytes de palmiers. Thèse de doctorat en chimie des substances naturelles Sorbonne Université Ecole doctorale : Sciences de la Nature et de l'Homme – ED 227 Institut de Chimie des Substances Naturelles / Métabolites de plantes et micro-organismes associés : isolement, synthèse et bio activité.

- ❖ **Battesti V., 2013.** The agrobiodiversity of the Date Palm (*Phoenix dactylifera* L.) in Siwa Oasis (Egypt): between what is said, written, and forgotten.
- ❖ **Benziouche SE., 2012.** Structure et contraintes de la filière dattes en Algérie.
- ❖ **Ben Chobba I., Elleuch A., Ayadi I., Khannous L., Namsi A., Cerqueira F., Drira N., Gharsallah N. et Vallaeyts T., 2013.** Fungal diversity in adult date palm (*Phoenix dactylifera* L.) revealed by culture-dependent and culture-independent approaches. *Journal of Zhejiang University-Science B (Biomedicine & Biotechnology)*, 14: 1084-1099.
- ❖ **Bouaine M., 2018.** Le palmier dattier une fortune national.
- ❖ **Bourgault A, Lamothe F., 1988.** Evaluation of the KOH test and the antibiotic disk test in routine clinical anaerobic bacteriology.
- ❖ **Castillo U. F., Strobel G. A., Ford E. J., Hess W. M., Porter H., Jensen J. B., Albert H., Robison R., Condrón M. A. M., Teplow D. B., et al., 2002.** Munumbicins, wide-spectrum antibiotics produced by *Streptomyces* NRRL 30562, endophytic on *Kennedia nigricans*. *Microbiology* 148, p. 2675–2685.
- ❖ **Calatayud, JP Garrec, M Nicole Interactions Insects-Plantes; Sauvion, N., Thiéry, Egamberdieva D., Wirth S. J., Alqarawi A. A., Abd_Allah E. F., Hashem A., 2017.** Phytohormones and beneficial microbes: essential components for plants to balance stress and fitness. *Front. Microbiol.* 8, p. 210
- ❖ **Cherif H, Marasco R, Rolli E, Ferjani R, Fusi M, Soussi A, Mapelli F, Blilou I, Borin S, Boudabous A, Cherif A, Daffonchio D, Ouzari H., 2015.** Oasis desert farming selects environment-specific date palm root endophytic communities and cultivable bacteria that promote resistance to drought.
- ❖ **Compant, S.; Van Der Heijden, M.G.A.; Sessitsch, A., 2010.** Climate change effects on beneficial plant–microorganism interactions. *FEMS Microbiol. Ecol.*, 73, 197–214.
- ❖ **Compant S, Cambon M, Vacher C, Mitter B, Samad A, Sessitsch A., 2020.** The plant endosphere world - bacterial life within plants.
- ❖ **COAG., 2021 .** comité de l’agriculture
- ❖ **Carbonnelle D., Kouyoumdjian S., Audurier A., (1988).** Bactériologie médicale techniques usuelles. *Méd. Mal. Inf. France.* 251 p.
- ❖ **Dalal, J.; Kulkarni, N., 2014.** Antagonistic and Plant Growth Promoting Potentials of Indigenous Endophytic Actinomycetes of Soybean (*Glycine max* (L) Merrill). *CIBTech J. Microbiol.*

- ❖ **Dandurishvili, N.; Toklikishvili, N.; Ovadis, M.; Eliashvili, P.; Giorgobiani, N.; Keshelava, R.; Tediashvili, M.; Vainstein, A.; Khmel, I.; Szegedi, E., 2011.** Broad-range antagonistic rhizobacteria *Pseudomonas fluorescens* and *Serratia plymuthica* suppress *Agrobacterium* crown gall tumours on tomato plants. *J. Appl. Microbiol.* 110, 341–352
- ❖ **Defranceschi Oliveira AC, Farion Watanabe FM, Coelho Vargas JV, et al., 2012.** Production of methyl oleate with a lipase from an endophytic yeast isolated from castor leaves. *Biocatal Agric Biotechnol* 1: 295–300.
- ❖ **Devendra Singh, Neelam Geat, Mahendra Vikram Singh Rajawat, Radha Prasanna, Abhijit Kar, Anju Mahendru Singh & Anil Kumar Saxena., 2018** Prospecting endophytes from different Fe or Zn accumulating wheat genotypes for their influence as inoculants on plant growth, yield, and micronutrient content *Annals of Microbiology* volume 68, pages815–833.
- ❖ **De Vos P., Garrity G. M., Jones D., Krieg N. R., Ludwig W., Rainey F. A., Schleifer K.H. and Whitman W. B. (2009).** *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*, 2 ed., The Firmicute. Springer. New York. Volume Three. 63-67.
- ❖ **Dhaked, B.S., Triveni, S., Reddy, R.S., Padmaja, G., 2017.** Isolation and Screening of Potassium and Zinc Solubilizing Bacteria from Different Rhizosphere Soil. *Int. J. Curr. Microbiol. Appl. Sci.* 6, 1271–1281
- ❖ **Ding L, Münch J, Goerls H, et al., 2010.** Xiamycin, a pentacyclic indolosesquiterpene with selective anti-HIV activity from a bacterial mangrove endophyte. *Bioorganic Med Chem Lett* 20:6685–6687
- ❖ **Dorra G, Ines K, Imen BS, et al., 2018.** Purification and characterization of a novel high molecular weight alkaline protease produced by an endophytic *Bacillus halotolerans* strain CT2. *Int J Biol Macromol* 111: 342–351.
- ❖ **Emna., 2022.** Site web : <https://housekeeping.tn/est-ce-que-les-palmiers-ont-beaucoup-de-racines-3/>
- ❖ **Edison T E. dela Cruz ; Torres JM., 2012.** Gelatin Hydrolysis Test Protocol. American Society for Microbiology © 2016.
- ❖ **FAOSTAT., 2022.** production FAOSTAT Food and agriculture Organisation of the United Nations. Rome.
- ❖ **Ghemmar K., 2018.** le palmier dattier face au pétrole. *Journal Elwatan.*

- ❖ **Glick, B.R., 2012.** Plant Growth-Promoting Bacteria: Mechanisms and Applications. Scientifica 2012 , 1–15.
- ❖ **Gros-Balthazard M, Claire Newton, Sarah Ivorra, Margareta Tengberg, Jean-Christophe Pintaud et Jean-Frédéric Terral., 2013.** Origines et domestication du palmier dattier (*Phoenix dactylifera* L.). p 1-12
- ❖ **Groot, P. H. E., Van Stiphout, W. A. H. J., Krauss, X. H., Jansen, H., Van Tol, A., Van Ramshorst, E., Chin-On, S., Hofman, A., Cresswell, S. R. & Havekes, L. (1991).** Postprandial lipoprotein metabolism in normolipidemic men with and without Coronary Artery Disease. *Arteriosclerosis and Thrombosis* 11, 653-662.
- ❖ **Hallmann, J. , Berg, G., 2006.** Spectrum and population dynamics of bacterial root endophytes. Schulz, B. , Boyle, C. and Sieber, T. . *Microbial root endophytes*. Springer-Verlag, Berlin Heidelberg, pp. 15–31.
- ❖ **Hayat R., 2010.** Soil beneficial bacteria and their role in plant growth promotion:a review. *Annals of Microbiology*. 60(4):579–598
- ❖ **Hardoim P. R., van Overbeek L. S., et al., 2015.** The hidden world within plants: ecological and evolutionary considerations for defining functioning of microbial endophytes. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 79, p. 293–320.
- ❖ **Hemant Sharma., Arun Kumar Rai., Divakar Dahiya., Rajen Chettri³ and Poonam Singh Nigam., 2021.** Exploring endophytes for in vitro synthesis of bioactive compounds similar to metabolites produced in vivo by host plants.
- ❖ **Haas D, Defago G.. 2005.** Biological control of soil-borne pathogens by fluorescent pseudomonads. *Nat Rev Microbiol* 3: 307-319.
- ❖ **Hiruma K, Nina Gerlach, Soledad Sacrista, Marcel Bucher Richard J. O’Connell, Paul Schulze-Lefer., 2016.** Root Endophyte *Colletotrichum tofieldiae* Confers Plant Fitness Benefits that Are Phosphate.
- ❖ **Hildebrand, D.F., Hamilton-Kemp, T.R., Legg , C.S., and Bookjans, G. (1988).** Plant Lipoxygenases: Occurrence, properties, and possible functions. *Curr. Top. Plant Biochem*
- ❖ **Hugh R., Leifson E., 1953.** The taxonomic significance of fermentation versus oxidative metabolism of carbohydrates by various Gram negative bacteria. *J. Bacterial*, 2nd edition. Pp. 44-81.
- ❖ **Jourjon., 2013.** Site web : <https://desert-maroc.com/phoenix-dactylifera/>

- ❖ **Kandel, S.L.; Firrincieli, A.; Joubert, P.M.; Okubara, P.A.; Leston, N.D.; McGeorge, K.M.; Mugnozza, G.S.; Harfouche, A.; Kim, S.-H.; Doty, S.L., 2017** An in vitro study of bio-control and plant growth promotion potential of Salicaceae endophytes. *Front. Microbiol.*
- ❖ **Kakembo, D., Lee, Y.H., 2019.** Analysis of traits for biocontrol performance of *Pseudomonas parafulva* JBCS1880 against bacterial pustule in soybean plants. *Biol. Control* 134, 72–81.
- ❖ **Khan, M.M.A.; Haque, E.; Paul, N.C.; Khaleque, M.A.; Al-Garni, S.M.; Rahman, M.; Islam, M.T., 2017.** Enhancement of growth and grain yield of rice in nutrient deficient soils by rice probiotic bacteria. *Rice Sci* 264–273.
- ❖ **Khan, M.S.; Zaidi, A.; Ahmad, E., 2014.** Mechanism of phosphate solubilization and physiological functions of phosphate-solubilizing microorganisms. In *Phosphate Solubilizing Microorganisms: Principles and Applications of Microphos Technology*; Khan, M.S., Zaidi, A., Musarrat, J., Eds.; Springer International Publishing: Cham, Switzerland, Volume 108, ISBN 978-3-319-08215-8.
- ❖ **Khan, K.S.; Joergensen, R.G., 2009.** Changes in microbial biomass and P fractions in biogenic household waste compost amended with inorganic P fertilizers. *Bioresour. Technol.* 100, 303–309.
- ❖ **King E.O., 1954.** WARD M. et RANEY D.E.J., *J. Lab. Clin.Méd.*, 44, p. 301.
- ❖ **Kloepper J. W., Ryu C.-M. 2006.** Bacterial endophytes as elicitors of induced systemic resistance. *Microbial root endophytes*, p. 33–52
- ❖ **Kovacs, L.G., Ballati, P.A., Kroshman, H.B., & Pueppke, S.G. (1995).** Transcriptional organisation and expression of *nol* XWBTUV. A Locus that regulate cultivar-specific nodulation soybean by *Rhizobium fredii* USDA257. *Molecular Microbiology.* 17: 923-933.
- ❖ **Lelliott RA, Stead DE, 1987.** *Methods for the Diagnosis of Bacterial Diseases of Plants.* Oxford, UK: Blackwell Scientific Publications.
- ❖ **Le Minor, L., & Richard, C. (1993).** *Laboratory methods for the identification of enterobacteria.* Institut Pasteur : Paris, France ; 217. M.
- ❖ **Liu, H.; Zhang, L.; Meng, A.; Zhang, J.; Xie, M.; Qin, Y.; Faulk, D.C.; Zhang, B.; Yang, S.; Qiu, L., 2017.** Isolation and molecular identification of endophytic diazotrophs from seeds and stems of three cereal crops. *PLoS ONE* 12, e0187383.

- ❖ **Liu, Y., Shi, Z., Yao, L., Yue, H., Li, H., and Li, C., 2013.** Effect of IAA produced by *Klebsiella oxytoca* Rs-5 on cotton growth under salt stress. *J. Gen. Appl. Microbiol.* 59, 59–65.
- ❖ **Ma, Y.; Oliveira, R.S.; Nai, F.; Rajkumar, M.; Luo, Y.; Rocha, I.D.S.; Freitas, H., 2015.** The hyperaccumulator *Sedum plumbizincicola* harbors metal-resistant endophytic bacteria that improve its phytoextraction capacity in multi-metal contaminated soil. *J. Environ. Manag.* 156, 62–69.
- ❖ **MacWilliams MP., 2009.** Citrate Test Protocol .American Society for Microbiology © 2016.
- ❖ **MacWilliams MP., 2009.** Indole Test Protocol..American Society for Microbiology © 2016.
- ❖ **Marx, S. P., S. Winkler and W. Hartmeier, 2000.** Metabolization of β -(2, 6)-linked fructose-oligosaccharides by different bifidobacteria. *FEMS Microbiology Letter* 182:163-169.
- ❖ **Malfanova, N.V., 2013.** Endophytic Bacteria with Plant Growth Promoting and Biocontrol Abilities. Ph.D. Thesis, Leiden University, Leiden, The Netherlands.
- ❖ **Malfanova, N.; Kamilova, F.; Validov, S.; Shcherbakov, A.; Chebotar, V.; Tikhonovich, I.; Lugtenberg, B., 2011.** Characterization of *Bacillus subtilis* HC8, a novel plant-beneficial endophytic strain from giant hogweed. *Microb. Biotechnol.* 523–532.
- ❖ **Márquez S. S., Bills G. F., Acuña L. D. et Zabalgoeazcoa I., 2010.** Endophytic mycobiota of leaves and roots of the grass *Holcus lanatus*. *Fungal Diversity*, 41 (1): 115-123.
- ❖ **Martinez-Romero., 2006.** Bacterial endophytes and their interactions with hosts.
- ❖ **Marchal N et Bourdon J.L., (1973).** Milieux de culture et identification biochimique des bactéries. EdDoin. Paris.
- ❖ **Mohsin Ali, Qurban Ali, Muhammad Aamir Sohail, Muhammad Furqan Ashraf, Muhammad Hamzah Saleem, Saddam Hussain and Lei Zhou., 2021.** Diversity and Taxonomic Distribution of Endophytic Bacterial Community in the Rice Plant and Its Prospective 28,14-28.
- ❖ **Mohamed Mahmoud F., 2017.** Activités biologiques de champignons endophytes isolés du palmier dattier (*Phoenix dactylifera* L.). Thèse de doctorat en Phytopathologie. Université de Saad Dahleb Blida 1.

- ❖ **Mugesh S, Thangavel A, Maruthamuthu M., 2014.** Chemical stimulation of biopigment production in endophytic fungi isolated from *Clerodendrum viscosum* L. *Chem Sci Rev Lett* 3:280–287.
- ❖ **Nair and S. Padmavathy., 2014.** Impact of Endophytic Microorganisms on Plants, Environment and Humans.p. 1-7
- ❖ **Nautiyal S, Bhadauria S, Kumar P, Lal, Rajesh Mondal H, Verma D., 2000.** Stress induced phosphate solubilization in bacteria isolated from alkaline soils.
- ❖ **Ortiz-Castro, R.; Contreras-Cornejo, H.A.; Macías-Rodríguez, L.; López-Bucio, J., 2009.** The role of microbial signals in plant growth and development. *Plant Signal. Behav.* 2, 4, 701–712.
- ❖ **Partida-Martinez LP., 2011.** The microbe-free plant: fact or artifact.
- ❖ **Pérez-García A., Romero Antoniode Vicente D., 2011.** Plant protection and growth stimulation by microorganisms: biotechnological applications of Bacilli in agriculture.
- ❖ **Penuelas, J.; Rico, L.; Ogaya, R.; Jump, A.; Terradas, J.J.P.B., 2012.** Summer season and long-term drought increase the richness of bacteria and fungi in the foliar phyllosphere of *Quercus ilex* in a mixed Mediterranean forest. *Plant Biol.* 14, 565–575.
- ❖ **Phetcharat P, Duangpaeng A., 2012.** Screening of endophytic bacteria from organic rice tissue for indole acetic acid production.
- ❖ **Piccolo Lo, S.; Ferraro, V.; Alfonzo, A.; Settanni, L.; Ercolini, D.; Burruano, S.; Moschetti, G., 2010.** Presence of endophytic bacteria in *Vitis vinifera* leaves as detected by fluorescence in situ hybridization. *Ann. Microbiol.* 60, 161–167.
- ❖ **Pradhan, A., Pahari, A., Mohapatra, S., Mishra, B.B., 2017.** Phosphate-Solubilizing Microorganisms in Sustainable Agriculture: Genetic Mechanism and Application, in: *Advances in Soil Microbiology: Recent Trends and Future Prospects, Microorganisms for Sustainability.* Springer Nature Singapore, India, pp. 81–97.
- ❖ **Probio., 2018.** Testes microbiologique : Test KOH web : <http://probiologiste.blogspot.com/2018/10/testes-microbiologique-test-koh.html>
- ❖ **Radwan S., 2009.** Phytoremediation for Oily Desert Soils, in *Advances in Applied Bioremediation*, Singh A, Kuhad CR, and P.O. Ward, Berlin, Heidelberg: Editors Springer Berlin Heidelberg; 2009. p. 279–298.
- ❖ **Rajkumar M, Ae N, Freitas H., 2009.** Endophytic bacteria and their potential to enhance heavy metal phytoextraction. *Chemosphere.* 77(2):153– 16.
- ❖ **Reiner K., 2010.** Catalase Test Protocol .American Society for Microbiology © 2016.

- ❖ **Rhouma C.S., Choulak S., Zehdi-Azzouzi S., Chatti K., Said Khaled.,2014.** Molecular polymorphism and phylogenetic relationships within Tunisian date palm (*Phoenix dactylifera* L.): Evidence of non-coding trnL-trnF regions of chloroplast DNAs - *Scientia Horticulturae* (170). 32–38p
- ❖ **Romano G, Costantini M, Sansone C, et al. (2017).** Marine microorganisms as a promising and sustainable source of bioactive molecules. *Mar Environ Res* 128: 58–69.
- ❖ **Rothrock C.S., et Gottlieb D., (1981).** Role of antibiosis in antagonism of *Streptomyces hygrosopicus* var. *geldanus* to *Rhizoctonia solani*. *Canadian Journal of Microbiology.*, 30:1440-1447.
- ❖ **Rybakova D., 2015.** Endophytes–assisted biocontrol: novel insights in ecology and the mode of action of *Paenibacillus*. *Plant and Soil.*p. 1–16

- ❖ **Salomon, M. V., Bottini, R., de Souza Filho, G. A., Cohen, A. C., Moreno, D., Gil, M., et al., 2014.** Bacteria isolated from roots and rhizosphere of *Vitis vinifera* retard water losses, induce abscisic acid accumulation and synthesis of defense-related
- ❖ terpenes in in vitro cultured grapevine. *Physiol. Plant.* 51, 359–374. doi: 10.1111/ppl.12117
- ❖ **Sedra, My.H. 2003.** Le bayoud du palmier dattier en Afrique du nord, FAO, RNE/SNEA-Tunis. Edition FAO sur la protection des plantes. Imprimerie Signes, Tunis, Tunisie, 125p.
- ❖ **Shi, Y.; Yang, H.; Zhang, T.; Sun, J.; Lou, K., 2014.** Illumina-based analysis of endophytic bacterial diversity and space-time dynamics in sugar beet on the north slope of Tianshan mountain. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 98, 6375–6385.
- ❖ **Shields P, Cathcart L., 2010.** Oxidase Test Protocol .American Society for Microbiology © 2016.

- ❖ **Siala R, Ben Chobba I, Vallaeyts T, Ali Trik M, Jrad M, Cheffi M, Ayedi I, Elleuch A, Nemsy A, Cerqueira F, Gdoura R, Drira1 N, Gharsallah., 2016.** Analysis of the Cultivable Endophytic Bacterial Diversity in the Date Palm (*Phoenix dactylifera* L.) and Evaluation of Its Antagonistic Potential against Pathogenic *Fusarium* Species that Cause Date Palm Bayound Disease.
- ❖ **Singh, R. P., and Jha, P. N., 2016.** A halotolerant bacterium *Bacillus licheniformis* HSW-16 augments induced systemic tolerance to salt stress in wheat plant (*Triticum aestivum*). *Front. Plant Sci.* 7:1890. doi: 10.3389/fpls.2016. 01890

- ❖ **Silva-Hughes A. F., Wedge D. E., Cantrell C. L., Carvalho C. R., Pan Z., Moraes R. M., Madoxx V. L., Rosa L. H., 2015.** Diversity and antifungal activity of the endophytic fungi associated with the native medicinal cactus *Opuntia humifusa* (Cactaceae) from the United States. *Microbiol. Res.* 175, p. 67–77.
- ❖ **Simmons, J.S. 1926.** A culture medium for differentiating organisms of typhoid-colon aerogenes groups and for isolation of
- ❖ certain fungi. *J. Infect. Dis.*, 1926, 39 : 209.
- ❖ **Sharifi M., Bashtani M., Naserianb A.A., Farhangfara H., 2015.** The effect of feeding low quality date palm (*Phoenix dactylifera* L.) on the performance, antioxidant status and ruminal fermentation of mid-lactating Saanen dairy goats. *Small Ruminant Research* (130). 95–100.
- ❖ **Tafifet L, Raio A, Holeva M, Dikhai R, Ould CH, Kouskoussa, Cesbron S, Krimi Z., 2020.** Molecular characterization of Algerian *Erwinia amylovora* strains by VNTR analysis and biocontrol efficacy of *Bacillus* spp. and *Pseudomonas brassicacearum* antagonists.
- ❖ **Truyens, S.; Weyens, N.; Cuypers, A.; Vangronsveld, J., 2015.** Bacterial seed endophytes: Genera, vertical transmission and interaction with plants. *Environ. Microbiol. Rep.* 7, 40–50.
- ❖ **Van Der Heijden, M.G.A., Bardgett, R.D. and Van Straalen, N.M., 2008.** The Unseen Majority: Soil Microbes as Drivers of Plant Diversity and Productivity in Terrestrial Ecosystems. *Ecology Letters*, 11, 296-310.
- ❖ **Vesina, L., & Lacroix, M. (2000).** Classical biochemical tests for the identification of pectobacterium(*Erwinia pectinolytiques*) et des pseudomonas fluorescents. *Laboratoire de diagnostic en phytoprotection- MAPAQ.9p*
- ❖ **Vidal S. L. B., Jaber L. R., 2015.** Entomopathogenic fungi as endophytes: plant-endophyte-herbivore interactions and prospects for use in biological control. *Curr. Sci.* 109, p. 46–54.
- ❖ **Weyens N., 2009.** Phytoremediation:plant–endophyte partnerships take the challenge. *Current Opinion in Biotechnology.* 20(2):248–254
- ❖ **Whipps J. M., 2001.** Microbial interaction and biological in the rhizosphere. *J. Exp. Bot.*, 52: 487-511.
- ❖ **Yaish M. W., Antony I. et Bernard R. G., 2015.** Isolation and characterization of endophytic plant growth promoting bacteria from date palm tree (*Phoenix dactylifera*

L.) and their potential role in salinity tolerance. *Antonie van Leeuwenhoek*, 107: 1519-1532.

- ❖ **Zhang H. W., Song Y. C. et Tan R. X., 2006.** Biology and chemistry of endophytes. *Natural Product Reports.*, 23: 753-771.
- ❖ **Zohary, D., Hopf, M. & Weiss, E.. 2012.** Domestication of plants in the Old World.

Annexe

Annexe 1

Composition des milieux de culture utilisés

- **Composition du milieu King B (King et al, 1954)**
 - Proteose peptone20g/l
 - K₂HPO₄.....1.5g/l
 - MgSO₄,7H₂O.....1.5g/l
 - Glycérol.....15ml/l
 - Agar.....15g/l
 - PH : 7,2
 - Eau distillé1l
- **Composition du milieu LB (Bertani, 1953)**
 - Bactotryptone10g/l
 - Extrait de levure5g/l
 - NaCl5g/l
 - Agar.....20g/l
 - Eau distillé1L
- **Composition du milieu Indole (Mac Williams, 2009) (5 ml/tube)**
 - Peptone.....20 g
 - NaCl.....5 g
 - Eau distillée.....1 L
- **Gélatine (Edison et Tores, 2012) (5 ml/tube)**
 - Gélatine120 g
 - Extrait de levure..... 3g
 - Peptone 5g
 - Eau distillée.....1 L
- **Milieu Mannitol-Mobilité-Nitrate (Gesvrine, 2010) (pique centrale au fond) (5 ml/tube)**
 - Peptone de caséine 10,00 g
 - Mannitol 7,50 g
 - Nitrate de potassium 1,00 g
 - Rouge de phénol 0,04 g
 - Agar 3,50g
 - Eau distillée.....1 L
 - La réduction des nitrates sera mise en évidence par l'addition des réactifs Nitrate A et B.

- **Composition citrate de Simmons (incliné) (Simmons, 1926)**

- Citrate de sodium 1g
- Chlorure de sodium 5.0g
- Sulfate de magnésium 0.2g
- Phosphate mono-ammonique 1g
- Phosphate dipotassique 1g
- Bleu de bromothymol 0,08g
- Agar 15g

- **Composition du milieu Hugh et Leifson (Hugh et leifson, 1953)**

- Bactotryptone.....2 g
- Phosphate de potassium dibasique.....0,3 g
- Chlorure de sodium5 g
- Bleu de bromothymol.....0,03 g
- D(+)-glucose.....10 g
- Agar bactériologique.....0,3 g
- Eau distillée.....1 L

- **Gélose nutritive (composition en g/l) (APHA, 1917)**

- Extrait de viande..... 1,0g
- Extrait de levure2,0 g
- Peptone 5,0 g
- Chlorure de sodium5,0 g
- Agar15,0 g
- Eau distillée1000 ml
- PH ; 7,4

Tableau : Isolats bactériennes sélectionné

Région		Bactérie
		TBR5
		BJ42
		BF1
	TF(R)	TFR61
	TC	TCR51
		XJ3
		CF13
		CG2
		CG3
		CR5
		PF91
		PF43
		PF12
		TR
	ZF6	
	ZH4	
Kenadsa	KT	KTF22
		KTR61
	KH	KHE3
		KHE51
		KHE61
		KHE62
		KHE61(3)
	KM	KMR4
	KF	KFR62
		KFR41
KFR9		