REPUBLIQUE ALGERIENNE DEMOCRATIQUE ET POPULAIRE
MINISTERE DE L'ENSEIGNEMENT SUPERIEUR ET DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE
UNIVERSITE SAAD DAHLEB BLIDA 1
FACULTE DES SCIENCES DE LA NATURE ET DE LA VIE
DEPARTEMENT DE BIOTECHNOLOGIE ET DE L'AGRO-ECOLOGIE

Mémoire de fin d'études
En vue de l'obtention du diplôme de Master 2

Option : Biotechnologie Microbienne

Thème

Contribution du biofilm et du quorum sensing dans la bioprotection par les endophytes bactériens

Présenté par

Ammar Mouhoub Romaissa **Oussal Yousra Nesrine**

Soutenu devant le jury :

AMMAD F.	M.C.A.	U. Blida 1	Présidente
BENSAID F.	M.A.A.	U. Blida 1	Examinatrice
MEKHALDI D.	M.A.B	U. Blida 1	Promotrice
BENCHABANE M.	Professeur	U. Blida 1	Co-promoteur

ANNEE UNIVERSITAIRE 2021/2022

Remerciements

Tout d’abord, nous tenons à remercier Allah, le clément et le miséricordieux de nous avoir donné la force et la patience de mener à bien ce modeste travail

Nous tenons tout particulièrement a remercié notre chère promotrice MEKHALDI D. pour avoir accepté de diriger ce travail et pour sa disponibilité, son sérieux et ses conseils judicieux durant toute la période de notre PFE, sans les quels ce travail n’aurait pas pu prendre forme. Merci Delel pour ta modestie, tes précieux conseils, merci parce que nous avons beaucoup appris avec toi.

Aussi notre ferveur et admiration et tous nos respects au Professeur BENCHABANE M. notre co-promoteur et le chef de la spécialité Biotechnologie Microbienne pour ses encouragements et son aide.

Nous tenons à exprimer notre grand remerciement à Madame AMMAD F., qui nous a orientés vers la spécialisation en deuxième année, et aujourd'hui nous exprimons toute notre gratitude à elle pour avoir accepté de présider le jury et pour sa grande disponibilité et pour son total dévouement. Nous remercions également Madame Bensaid.F. d’avoir accepté d’évaluer ce mémoire et d'en être l’examinatrice.

Un merci très spécial à l’ingénieur de laboratoire PFE madame Ihsene et à l’ingénieur de laboratoire de mycologie FADIL Djamila, pour leur disponibilité et ses encouragements durant toute l’expérimentation.

Nos remerciements vont à tous les enseignants du département de Biotechnologie de l’université de Blida qui ont contribué à notre formation. Nous n’oublions pas de remercier la promotion Biotechnologie Microbienne 2021-2022.

Enfin, notre témoignage et gratitude à toute personne qui a contribué de près ou de loin, à l’élaboration de ce travail.

Dédicace

À l'aide de Dieu tout puissant, qui m'a tracé le chemin de ma vie.

J'ai le grand plaisir de dédier ce modeste travail :

A mes très chers parents **Ibrahim** et **Hizia** qui se sont dévoués corps et âme pour me voir réussir dans ma vie et qui me donne toujours l'espoir de vivre, leurs encouragements, son soutiens, surtout pour leur amour et leurs sacrifice afin que rien n'entrave le déroulement de mes études, que dieu les garde.

A mes sœurs bien aimées **Manel** et **Ikram** et mes chers frères **Abd el rahman** et **Abd el Hamid** qui ont été là pour moi jusqu'à ce jour.

À ma très chère tante **Louiza** pour sa tendresse et son soutien.

A tonton **Dr Menzou** pour sa patience avec moi, son amour et ses encouragements durant mes cinq ans d'étude.

A toute ma grande famille, de grand jusqu'au petit...

A la fin je dédie très chaleureusement ce mémoire à mon **Binôme** d'étude **Romaissa** et sa famille.

Merci à vous

□ *Yousra* □

Dédicace

Tout d'abord «الحمد لله»

Louange à Dieu le tout puissant, pour la force et la volonté et la patience qu'il m'a donné pour mener à bien ce modeste travail que je dédie :

A **mon cher père** décédé qui est toujours vivant dans mon cœur, je sais que vous êtes très heureux dans votre tombe, que la paix soit sur votre âme.

A celles qui représentent le symbole du sacrifice, ma très chère mère **Nora** et ma précieuse grand-mère **Aicha**. Je vous remercie pour tous, votre aide, soutien, encouragement, et votre patience pendant toute ma vie. Je vous remercie d'avoir fait de moi ce que je suis maintenant.

Mon cher frère **Nassim** qui a été toujours à mes côtés et ma soutenu par sa façon.

Mon cher fiancé **Safouane**, pour son soutien et le courage qui m'a apporté.

A ma chère **Touati Souad** qui ma aider énormément, merci pour votre encouragement.

À ma chère cousine **Meriem** et toute ma famille et ma future belle famille.

A la fin je dédie très chaleureusement ce mémoire à mon **Binôme** d'étude **Yousra** et sa famille.

Merci à vous

□ *Romaissa* □

Résumé

Contribution du biofilm et du quorum sensing dans la bioprotection par les endophytes bactériens

Notre travail consiste à mettre en évidence l'effet bioprotecteur d'isolats bactériens endophytes et la contribution du quorum sensing et la formation du biofilm vis-à-vis des agents phytopathogènes. Nous avons isolé les bactéries endophytes associées aux racines du romarin (*Rosmarinus officinalis* L.). Un total de 10 isolats a été sélectionné. Une identification préliminaire des isolats a été réalisée, basée sur la description des critères culturaux, morphologique et métabolique. Les bactéries identifiées comprennent des coques à Gram positif, des coques à Gram négatif, des bacilles à Gram négatif et une cocobacille à Gram positif. La coloration au vert de malachite a mis en évidence la présence de spores chez trois isolats (Rm1, Rm2, et Rm10). La recherche des enzymes respiratoire a montré que tous les isolats endophytes sont catalase (+), tandis que trois isolats seulement sont oxydase (+). La confrontation directe *in vitro* des isolats endophytes avec la souche phytopathogène de *Fusarium oxysporum* f.sp. *albidinis* a signalé le pouvoir antagoniste de la souche Rm2, alors que les autres isolats ont enregistré une activité antagoniste moins importante. La mise en évidence *in vitro* de la formation de biofilm a été effectuée selon deux techniques : l'ensemencement sur gélose rouge Congo et la quantification sur microplaques. Les résultats de ces deux techniques ont été en accord en confirmant la capacité de 7 isolats endophytes à produire des biofilms.

Mots clés : bioprotection, bactéries endophytes, romarin, biofilm, quorum sensing.

Abstract

Contribution of biofilm and quorum sensing in bioprotection by endophytic bacteria

Our work aims to highlight the bioprotective effect of endophytic bacterial isolates and the contribution of quorum sensing and biofilm formation againt phytopathogenic agents. We isolated endophytic bacteria associated with the rosemary roots (*Rosmarinus officinalis L.).* A total of 10 isolates were selected. Preliminary isolates identification was performed based on the description of cultural, morphological and metabolic criteria. Identified bacteria included Gram-positive cocci, Gram-negative cocci, Gram-negative bacilli, and a Gram-positive cocobacillus. Malachite green staining revealed the presence of spores in three isolates (Rm1, Rm2, and Rm10). Respiratory enzyme testing showed that all endophytic isolates are catalase (+), while only three isolates are oxidase (+). Direct *in vitro* confrontation of endophytic isolates with *Fusarium oxysporum* f.sp. *albidinis* phytopathogenic strain reported the antagonistic power of Rm2 strain, while the other isolates recorded a less important antagonistic activity. The *in vitro* demonstration of biofilm formation was performed by two techniques: plating on Congo red agar and quantification on microplates. The results of these two techniques were in agreement by confirming the capacity of 7 endophytic isolates to produce biofilms.

Key words: bioprotection, endophytic bacteria, rosemary, biofilm, quorum sensing.

ملخص

مساهمة الغشاء الحيوي و quorum sensing في الحماية الحيوية بواسطة البكتيريا الداخلية

يتمثل عملنا في إبراز التأثير الوقائي الحيوي للعزلات البكتيرية الداخلية ومساهمة quorum sensing وتشكيل الأغشية الحيوية ضد مسببات الأمراض النباتية. قمنا بعزل البكتيريا الداخلية المرتبطة بجذور إكليل الجبل(*Rosmarinus officinalis L.*) . حيث تم اختيار 10 عزلات منها. تم إجراء تحديد أولي للعزلات ، بناءً على وصف المعايير الزراعية والمورفولوجية والحيوية الايضية. تشمل البكتيريا التي تم تحديدها المكورات الموجبة ال Gram، المكورات سالبة الGram ، والعصيات سالبة الGram ، و cocobacillusإيجابية الجرام. أظهر تلوين الملكيت الأخضر وجود أبواغ في ثلاث عزلات (Rm1، Rm2، Rm10). أظهر البحث عن الإنزيمات التنفسية أن جميع العزلات الداخلية كانت كاتلاز (+) ، في حين أن ثلاث عزلات فقط كانت أوكسيداز (+). أظهرت المواجهة المباشرة في المختبر للعزلات البكتيرية الداخلية مع سلالة ممرضة للنبات *Fusarium oxysporum* f.sp. *albidinis* عن فاعلية معادية للسلالة Rm2 ، بينما أظهرت العزلات الأخرى نشاطًا عدائيًا أقل. تم إجراء الكشف في المختبر عن تكوين الأغشية الحيوية باستخدام تقنيتين: الاستنبات في الوسط الغذائي مضافا اليه كونغو الأحمر والتقدير الكمي على الألواح الدقيقة. كانت نتائج هاتين الطريقتين متوافقتين ، مما يؤكد قدرة 7 عزلات للبكتيريا الداخلية على إنتاج الأغشية الحيوية.

الكلمات المفتاحية: الحماية البيولوجية ، البكتيريا الداخلية ، إكليل الجبل ، الغشاء الحيوي ، استشعار النصاب.

Liste des abréviations

AHL	Acyl homosérine lactone
AI	Auto-inducteurs
AIP	Auto-inducteurs péptidiques
UFC	Unite formant colonie
EPS	Exopolysaccharides
f. sp.	Forme spéciale
Foa	*Fusarium oxysporum* f.sp. *albidinis*
G	Grossissement
GN	Gélose nutritive (milieu de culture)
IBMA	*International Biocontrol Manufacturers Association*
PBS	*Phosphate-Buffered Saline*
PGPR	*Plant Growth Promoting Rhizobacteria*
QQ	Quorum quanching
QS	Quorum sensing
TSA	Gélose trypticase soja (milieu de culture)
TSB	Bouillon trypticase soja (milieu de culture)

Liste des figures

Figure 1 : Voies de transmission des endophytes chez les plantes à fleurs……..7

Figure 2 : Communauté microbienne endophyte et ses différents mécanismes d'action……..9

Figure 3 : Etapes de formation du biofilm……...…12

Figure 4 : Quorum sensing chez les bactéries Gram-positives……..…..15

Figure 5 : Quorum sensing chez les bactéries Gram-négatives……...…15

Figure 6 : Le romarin (*Rosmarinus officinalis L.)* ……..20

Figure 7 : Test de l'activité antagoniste in vitro……..24

Figure 8 : Aspect des boites d'ensemencement après une semaine d'incubation…..…..27

Figure 9 : Aspect cultural de quelques isolats purifiés……28

Figure 10 : Observation microscopique à l'état frais des isolats endophytes (G×100)….30

Figure 11 : Observation microscopique des frottis après la coloration de Gram des isolats endophytes (G×100)……...….30

Figure 12 : Observation microscopique des frottis après la coloration au vert de malachite des isolats endophytes (G×100)……..…....31

Figure 13 : Résultat du test de production de catalase……...…….…….…32

Figure 14 : Résultat du test de production d'oxydase……..….32

Figure 15 : Résultats du pouvoir antagoniste in vitro des isolats endophytes sélectionnés…….……33

Figure 16 : Valeurs moyennes des diamètres des colonies de l'agent pathogène (Foa) en interaction avec les isolats endophytes…….…….....…33

Figure 17 : Résultats du test de la formation de biofilm sur milieu gélosé rouge Congo…….…….…..…34

Figure 18 : Résultats de la quantification du biofilm sur microplaque.……...……..…35

Liste des tableaux

Tableau 1 : Description macroscopique des isolats endophytes après purification 29
Tableau 2 : Résultats des observations microscopiques après colorations 31
Tableau 3 : Résultats des tests de production des enzymes respiratoires par les bactéries endophytes isolées……..……32

Table des matières

REMERCIMENTS

DEDICACE

RESUME

ABSTRAT

ملخص

Liste des abréviations

Liste des figures

Liste des tableaux

Introduction……....1

Chapitre I. Synthèse bibliographique

1. Bioprotection contre les maladies des plantes……...4

1.1. Contrôle biologique, ou biocontrôle…….……..…..4

1.1.1 Définition……...4

1.2. Méthodes de biocontrôle……...…4

1.2.1. Agents de biocontrôle de type macroorganismes……...…..…….4

1.2.2. Les médiateurs chimiques (dont les phéromones)……..…..….4

1.2.3. Substances naturelles……..…...4

1.2.4. Les microorganismes (bactéries, virus, champignons)……...……..….... 4

2. Utilisation des bactéries endophytes comme agent de biocontrôle……..…..5

2.1. Définition des endophytes…….....5

2.2. Les bactéries endophytes……..…..…..6

2.3. Répartition des endophytes……..…..……6

2.4. Localisation et colonisation des plantes……..…..…….6

2.5. Transmission des endophytes……..……..7

2.6. Interactions plante-bactéries endophytes…….……8

2.7. Mécanismes d'action des endophytes bactériens……..…...9

2.7.1. La compétition pour l'espace et les nutriments……...……8

2.7.2. L'antibiose…….……10

2.7.3. La sécrétion des enzymes lytiques…….……10

2.7.4. L'hyperparasitisme…….…...10

2.7.5. Induction de la résistance de l'hôte……....11

3. Contribution du biofilm et le quorum sensing dans le biocontrôle……...……11

3.1. Le biofilm……...….11

3.1.1 Formation du biofilm……...…..12

3.1.2 Rôle du biofilm dans le biocontrôle…….……...…14

3.2 Le quorum Sensing (QS)…….……..……...14

3.2.1. QS chez les bactéries à Gram positif……..…14

3.2.2. QS chez les bactéries à Gram négatif…….……15

3.2.3. Les voies de signalisation QS……...…16

3.2.4. Rôle de quorum sensing dans le biocontrôle……...…17

Chapitre II. Matériel et Méthodes

1. Matériel végétal……19

2. Isolement des bactéries endophytes du romarin……...…21

2.1. Désinfection des échantillons……...……21

2.2. Préparation de la solution mère……...….21

2.3. Ensemencement et incubation…….….21

2.4. Purification et conservation des isolats……..…….....22

3. Identification préliminaire des isolats endophytes…….……..22

3.1. Etude des caractères culturaux…….22

3.2. Etude des caractères morphologiques et structuraux……..…..22

3.2.1. Examen microscopique à l'état frais…….…22

3.2.2. Coloration de Gram……...…23

3.2.3. Coloration au vert de malachite……..……..……..23

3.3. Etude de quelques caractères métaboliques…….…….24

3.3.1. Test de catalase…….…….24

3.3.2. Test d'oxydase…….……..24

4. Recherche in vitro d'activité antagoniste des isolats endophytes……..…….....24

5. Mise en évidence in vitro de la production de biofilm par les isolats endophytes…….…..25

5.1. Test de production de biofilm sur gélose rouge Congo……..…..25

5.2. Méthode de quantification du biofilm sur microplaque……...25

Chapitre III. Résultats et discussion

1. Isolement des bactéries endophytes du romarin…….…..…….27

2. Identification préliminaire des isolats endophytes ……..27

2.1. Description macroscopique des isolats……28

2.2. Caractères morphologiques et structuraux…….……28

2.2.1. Observation à l'état frais……...……28

2.2.2. Coloration de Gram…….……..30

2.2.3. Coloration au vert de malachite…….....……....30

2.3. Caractérisation métabolique des isolats endophytes……..……31

3. Activité antagoniste in vitro des isolats endophytes…….……...33

4. Production de biofilm par les isolats endophytes……...…..….34

4.1. Production sur milieu gélosé rouge Congo……..……34

4.2. Quantification du biofilm sur microplaque…….…….34

5. Discussion générale…….....…35

Conclusion……41

Références bibliographiques…….……44

Annexes

Introduction

Introduction

À l'échelle mondiale, les maladies des plantes peuvent survenir dans l'ensemble de la chaîne de production végétale et restent l'une des plus grandes menaces pour le développement durable, entraînant une perte de rendement annuelle de 13 à 22% pour les denrées de base telles que le riz, le blé, le maïs et la pomme de terre, ainsi que des coûts supplémentaires pour l'éducation et le développement de stratégies de gestion (Oerke 2006 ; Savary *et al.,* 2019).

Les maladies des plantes résultent d'interactions complexes entre les végétaux, les agents pathogènes et l'environnement (He *et al.,* 2021). Au cours de la longue histoire de l'agriculture, l'homme a développé une variété d'approches pour manipuler ces interactions afin de créer un système favorable à la croissance et au développement des cultures. En raison des préoccupations croissantes concernant la pollution de l'environnement et la toxicité écologique résultant de l'utilisation aveugle de formulations chimiques, il existe un besoin immédiat de baser les stratégies modernes de protection des plantes sur les ressources naturelles (Bicht *et al.,* 2020 ; Jamiołkowska ,2020).

La lutte biologique est une méthode de gestion des maladies des plantes en inhibant les agents phytopathogènes, en améliorant l'immunité des plantes et/ou en modifiant l'environnement par les effets de micro-organismes bénéfiques, de composés ou de systèmes de culture sains (Sommerhalder *et al.,* 2010 ; Bragard *et al.,* 2013 ; Burketova *et al.,* 2015 ; Vandenberghe *et al.,* 2017 ; Zhou et wang , 2018 ; Yang *et al.,* 2019 ; Poveda *et al.,* 2020). Les agents de lutte biologique microbiens protègent les cultures des dommages causés par les maladies *via* différents modes d'action. Certains d'entre eux interagissent avec les plantes en induisant une résistance ou en amorçant les plantes sans aucune interaction directe avec le pathogène cible. D'autres agissent à travers la compétition des nutriments ou d'autres mécanismes modulant les conditions de croissance de l'agent pathogène. Les antagonistes agissant par hyperparasitisme et antibiose interfèrent directement avec le phytopathogène. Les composés impliqués, tels que les composés de signalisation, les enzymes et autres métabolites interférents, sont produits *in situ* à faible concentration pendant l'interaction (kohl *et al.,* 2019).

Une attention particulière a récemment été portée sur l'utilisation d'endophytes antagonistes comme agents de lutte biologique sous la forme d'une alternative intéressante pour la gestion de certaines maladies des plantes, entraînant des effets environnementaux minimes (Priya *et al.,* 2022). Les endophytes ont un grand potentiel pour être utilisés comme biofertilisants et biopesticides dans le développement d'un système agricole durable, sûr et efficace (Afzal *et al.,* 2019). De plus, les bactéries endophytes stimulent la croissance des plantes en augmentant la capacité d'absorption des nutriments de la rhizosphère et en améliorant la photosynthèse (Wu *et al.,* 2021).

Il est connu maintenant qu'environ 40 à 80% des cellules bactériennes sur terre peuvent former des biofilms (Flemming et Wuertz, 2019). Ce sont des structures complexes formées par une communauté de microbes adhérant à une surface et/ou entre eux par la sécrétion d'une matrice adhésive et protectrice. La mise en place de ces structures nécessite une coordination de l'action entre les micro-organismes grâce à de puissants systèmes de communication tels que le quorum sensing (Bourigault *et al.,* 2021).

Malgré leurs impacts négatifs, les biofilms bactériens peuvent également avoir des effets bénéfiques (Rosche *et al.,* 2009). Par exemple, les bactéries Gram-négatives utilisent souvent les N-acyl-homosérine lactones (AHLs) comme molécules de signalisation, qui sont synthétisées par l'AHL synthase (luxI) et détectées par un régulateur transcriptionnel (luxR). Il est intéressant de noter que les molécules AHL peuvent également déclencher une réponse dans la plante hôte, où elle pourrait bénéficier de la capacité de répondre ou d'interférer avec ce signal de détection de quorum (Delalande *et al.,* 2005 ; Sieper *et al.,* 2014 ; Legein *et al.,* 2020).

Notre travail a pour objectif d'étudier la contribution du biofilm et du quorum sensing dans la bioprotection des plantes à travers une recherche bibliographique sur les endophytes et leurs mécanismes d'action. Une partie expérimentale a été réalisée afin d'isoler et identifier les bactéries endophytes du romarin (*Rosmarinus officinalis* L.) et de mettre en évidence leur capacité à produire le biofilm.

Chapitre I.
Synthèse bibliographique

Chapitre I. Synthèse bibliographique

1. Bioprotection contre les maladies des plantes

Les plantes sont menacées par des maladies qui causent d'importantes pertes de rendement, sur les cultures vivrières, fruitières, légumières et ornementales, en particulier dans les zones tropicales et tempérées chaudes (Della Mussia, 2014). Le mot "bioprotection" a été appliqué à un large éventail de processus et d'applications utilisant des microorganismes. Ils comprennent la réponse de défense induite par les microorganismes dans les interactions plante-sol et le traitement des cultures. Les produits utilisés en bioprotection ne doivent pas présenter un risque sur la santé humaine et animale ni contribuer au développement d'une résistance aux antibiotiques (IBMA, 2018). La lutte biologique ou le biocontrôle, dans sa forme la plus élémentaire, est l'utilisation de tout organisme vivant pour combattre une maladie ou un ravageur spécifique des plantes (Eilenberg *et al.*, 2001).

1.1. Contrôle biologique, ou biocontrôle

1.1.1. Définition

Le contrôle biologique ou biocontrôle est parmi les méthodes de lutte non chimiques contre les ravageurs et les agents pathogènes des plantes. Autrement dit, il peut être défini comme la réduction ou l'inhibition complète des phytopathogènes par les micro-organismes bénéfiques. Le biocontrôle est sans danger pour l'environnement, durable, économiquement viable et hautement spécifique (Aswathy *et al.*, 2020 , Pandit *et al.*, 2022).

Le biocontrôle peut être défini aussi comme l'ensemble des méthodes de protection des végétaux basées sur la gestion des équilibres des populations d'agresseurs plutôt que sur leur éradication par l'utilisation de mécanismes naturels. Seules ou associées à d'autres moyens de protection, ces techniques sont fondées sur les mécanismes et interactions qui régissent les relations entre espèces dans le milieu naturel (Dubernard, 2017). En 2020, le marché français du biocontrôle s'élève à 236 M€. Il représente plus de 12 % du marché de la protection des plantes. L'ambition d'IBMA est de passer le cap des 30% d'ici 2030 (IBMA, 2022).

1.2. Méthodes de biocontrôle

1.2.1. Agents de biocontrôle de type macroorganismes

Ces agents comprennent les nématodes, les insectes auxiliaires ou encore les acariens. Un exemple emblématique est l'utilisation de la coccinelle qui est un prédateur naturel de

pucerons. Dans son jardin, il est possible d'accrocher des plaques d'œufs de coccinelles dont les larves et les coccinelles adultes se nourriront des pucerons. Les plantes seront ainsi protégées (Gombert et Broucqsault, 2018).

1.2.2. Les médiateurs chimiques (dont les phéromones)

Des diffuseurs peuvent être accrochés aux branches dans les vergers des arbres fruitiers comme les pommiers. Ceux-ci diffusent des phéromones et brouillent le message entre les adultes d'insectes mâles et les femelles, ce qui diminue le risque de reproduction et donc la présence de larves à l'intérieur des fruits (Gombert et Broucqsault, 2018).

1.2.3. Substances naturelles

Les substances naturelles sont définies comme des « substances organiques ou minérales, non issues de la synthèse chimique, d'origine végétale, animale ou minérale dont les composants existent dans la nature » comme le cuivre ou la poudre de kaolin (Gombert et Broucqsault, 2018).

1.2.4. Les microorganismes (bactéries, virus, champignons)

De nombreuses bactéries ont été utilisées comme biofertilisants ou biopesticides sur le marché mondial et gèrent activement les maladies des plantes. Par exemple, la bactérie *Bacillus thuringiensis* produit une toxine qui freine le développement des chenilles, voire les élimine. Elle peut être utilisée pour lutter contre la pyrale, un papillon qui fait des ravages sur plusieurs cultures, car sa chenille dévore les feuilles et même les fruits (Manoj *et al.,* 2020).

2. Utilisation des bactéries endophytes comme agent de biocontrôle

Les végétaux abritent une communauté de micro-organismes commensaux et mutualistes dont les plus connus et étudiés se trouvent au sein de leur système racinaire. Que ce soit dans la phyllosphère (parties aériennes) ou dans la rhizosphère (racines), les interactions plantes/microorganismes sont nombreuses et diverses. L'importance des endophytes augmente puisque presque toutes les espèces de plantes existant à la surface de la terre sont colonisées par un ou plusieurs microorganismes endophytes (Ryan *et al*., 2008).

2.1. Définition des endophytes

La première description des endophytes a été faite par le botaniste allemand Heinrich Friedrich Link en 1809, suggérant la présence de microorganismes à l'intérieur des plantes (Segaran *et al.*, 2022). Alors que le terme «endophyte» a été inventé par De Bary en 1866 en utilisant deux mots grecs «*endon*» qui signifie «à l'intérieur» et «*phyton*» qui signifie «plante» pour définir les microorganismes qui poussent à l'intérieur des plantes. Cette définition a été

modifiée plus tard par d'autres chercheurs (Chanway, 1997). Ils ont été définis de plusieurs façons, mais la définition la plus couramment utilisée pour décrire les endophytes est celle de Petrini (1991) : «les microorganismes qui résident à l'intérieur des tissus végétaux, durant tout ou une partie de leur cycle de vie, sans détruire ni infecter les cellules » (Hyde et Soytong, 2008).

2.2. Les bactéries endophytes

Les bactéries endophytes sont définies comme des bactéries qui colonisent les tissus végétaux sains sans provoquer de symptômes ni causer de lésions évidentes à l'hôte (Bacon et Hinton, 2006). Elles sont considérées comme une sous-classe de bactéries rhizosphériques (Reinhold-Hurek et Hurek, 1998). Selon Bacon et Hinton (2006), un endophyte bactérien est un microorganisme qui vit en association avec des plantes formant une relation biotrophe intercellulaire asymptomatique.

Les bactéries endophytes permettent aux plantes d'avoir une meilleure survie face aux défis biotiques et abiotiques et à la concurrence d'autres plantes, donc ils offrent à leur hôte un énorme potentiel de protection et d'augmentation des performances agronomiques (Hardoim *et al.,* 2008) .

2.3. Répartition des endophytes

Les endophytes peuvent être divisés en trois grandes catégories de stratégies de vie. Les endophytes obligatoires sont incapables de se reproduire en dehors des plantes et sont très probablement transmis par les graines plutôt que par la transmission rhizosphérique. Les endophytes facultatifs vivent librement dans le sol, mais ils coloniseront les plantes lorsque l'occasion se présentera, généralement par une infection coordonnée (Hardoim *et al.,* 2008). Les endophytes passifs, la troisième catégorie, ne cherchent pas activement à coloniser la plante, mais le font plutôt à la suite d'événements aléatoires tels que l'ouverture de plaies le long des poils absorbants. Parce que l'endophyte n'a pas la machinerie cellulaire nécessaire à la colonisation des plantes, cette stratégie de survie passive peut le rendre moins compétitif (Verma *et al.,* 2004; Rosenblueth et Martínez-Romero, 2006 ; Hardoim *et al.,* 2008).

2.4. Localisation et colonisation des plantes

Les bactéries colonisent principalement de manière intercellulaire (Hinton et Bacon 1995 ; Hallmann *et al.,* 1997). Les tissus internes des plantes offrent un milieu favorable pour les microorganismes en les protégeant des conditions extrêmes de l'environnement comme la température, la radiation ultraviolette et la compétition microbienne (Hallmann *et al.,* 1997). En outre, les sucres, acides aminés et minéraux sont abondants à l'intérieur du tissu végétal,

bien qu'on les trouve aussi fréquemment dans les tissus vasculaires des plantes hôtes (Kobayashi et Palumbo, 2000).

Les densités bactériennes les plus élevées sont généralement observées dans les racines et diminuent progressivement de la tige aux feuilles (Quadt-Hallman et Kloepper, 1996 ; Lamb *et al.,* 1996). Indépendamment de la taille initiale de l'inoculum, les populations endophytes ont tendance à se rapprocher des densités optimales en fonction du tissu végétal (Lodewyckx *et al.*, 2002).

2.5. Transmission des endophytes

Les voies de transmission de nombreux endophytes restent à déterminer, mais des études ont pu montrer que la transmission verticale se produit des plantes à leur progéniture (transmission d'une plante « mère » à une plante « fille »). Tandis que la transmission horizontale se produit entre les plantes (transmission par des facteurs environnementaux) (Figure 1) (Morgane, 2019).

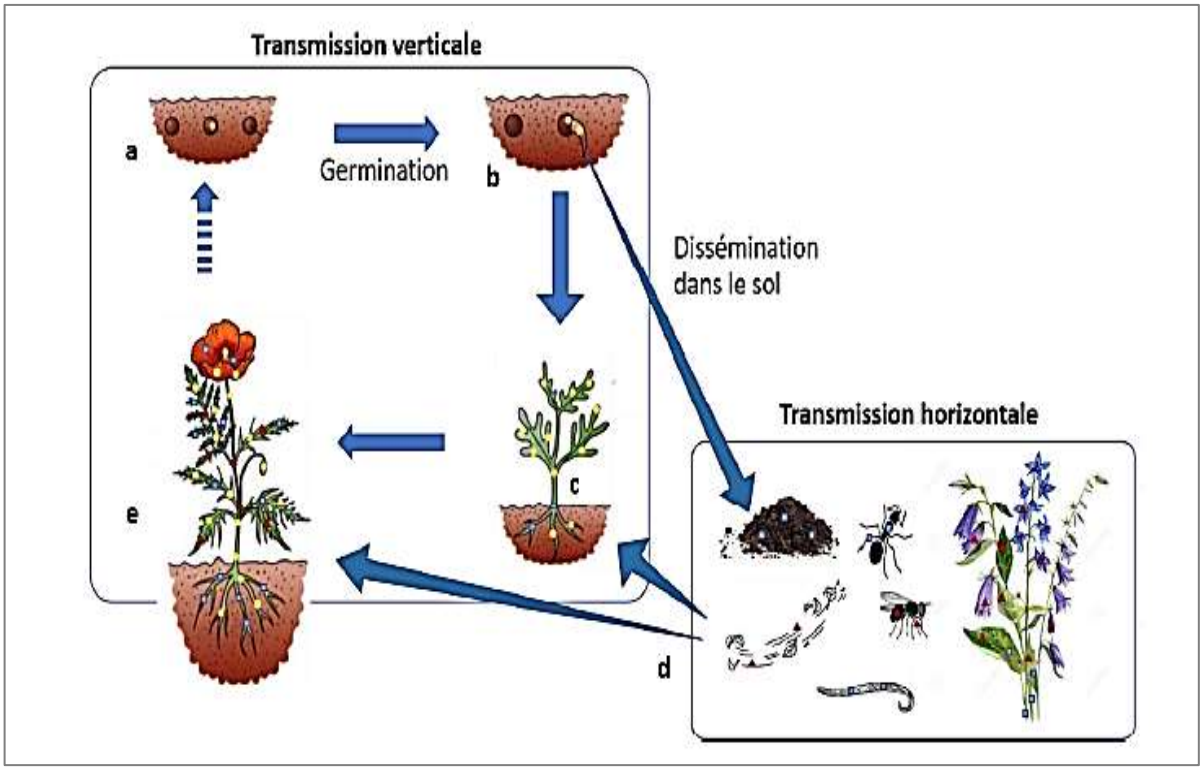

Figure 1. Voies de transmission des endophytes chez les plantes à fleurs (Morgane, 2019).

a) Graine colonisée par un endophyte provenant d'une plante-mère, b) germination de la graine et colonisation par l'endophyte de la racine ainsi que la dissémination dans la rhizosphère, c et d) colonisation verticale du jeune plant et colonisation horizontale par différents microorganismes.

Les semences de plante-hôte sont l'une des voies de transfert identifiées de l'endophyte. En se développant au sein d'un embryon de graine, les endophytes aboutissent à la colonisation du jeune plant une fois cette dernière germée (Shahzad *et al.,* 2018) . La colonisation des graines permettant cette transmission verticale peut s'effectuer selon trois voies (Kandel *et al.,* 2017) :

- *via* les tissus non-vascularisés ou le xylème des plantes ;
- *via* les organes reproducteurs femelles comme le stigmate ;
- ou par la contamination exogène des graines à partir de l'environnement.

Indépendamment d'une transmission verticale, un végétal peut à tout moment être colonisé par les endophytes sur différents organes (Frank *et al.,* 2017). Cette transmission horizontale s'effectue à travers le sol, l'atmosphère par la dissémination de spores, ou encore *via* des vecteurs tels que les insectes (Figure 1). Pour les bactéries endophytes, le sol est l'endroit privilégié pour une transmission horizontale (Christian *et al.,* 2016) .

2.6. Interactions plante-bactéries endophytes

En 1997, Hallmann indique que les micro-organismes endophytes établissent une relation plus étroite avec leur hôte et ils sont davantage protégés contre les stress biotiques et abiotiques et peuvent, de ce fait, interagir plus longtemps avec la plante. Les endophytes peuvent augmenter la condition physique des plantes en améliorant sa tolérance à la sécheresse et aux métaux lourds, promouvant ainsi sa croissance et réduisant l'installation des phytopathogènes (Segaran *et al.,* 2022) .

Les endophytes peuvent former plusieurs types de relations avec leurs hôtes, tels que le mutualisme, le neutralisme, l'antagonisme ou le commensalisme (Narayanasamy, 2013) :

- Le mutualisme est la condition où la relation est bénéfique aux deux organismes.
- L'antagonisme se produit lorsque l'organisme hôte supprime strictement la croissance et l'activité normale des agents pathogènes.
- Le commensalisme, c'est quand la relation ne cause aucun avantage ou préjudice particulier au partenaire.
- L'association neutraliste entre deux organismes en interaction ne montre aucun effet, mais lorsqu'un organisme exerce des effets néfastes sur un autre au cours de l'interaction, il s'agit alors d'un antagonisme.

2.7. Mécanismes d'action des endophytes bactériens

Les espèces bactériennes endophytes ont été identifiées par de nombreux chercheurs, et il a été de plus en plus rapporté qu'elles réduisaient la croissance et l'activité d'une gamme d'agents pathogènes des plantes (Latha *et al.*, 2019) . Les mécanismes d'action impliqués dans le contrôle biologique comprennent la compétition pour les nutriments ou pour l'espace, l'antibiose, la sécrétion des enzymes lytiques et la stimulation des mécanismes de défense de la plante (Figure 2) (Gayathri *et al.*, 2022) .

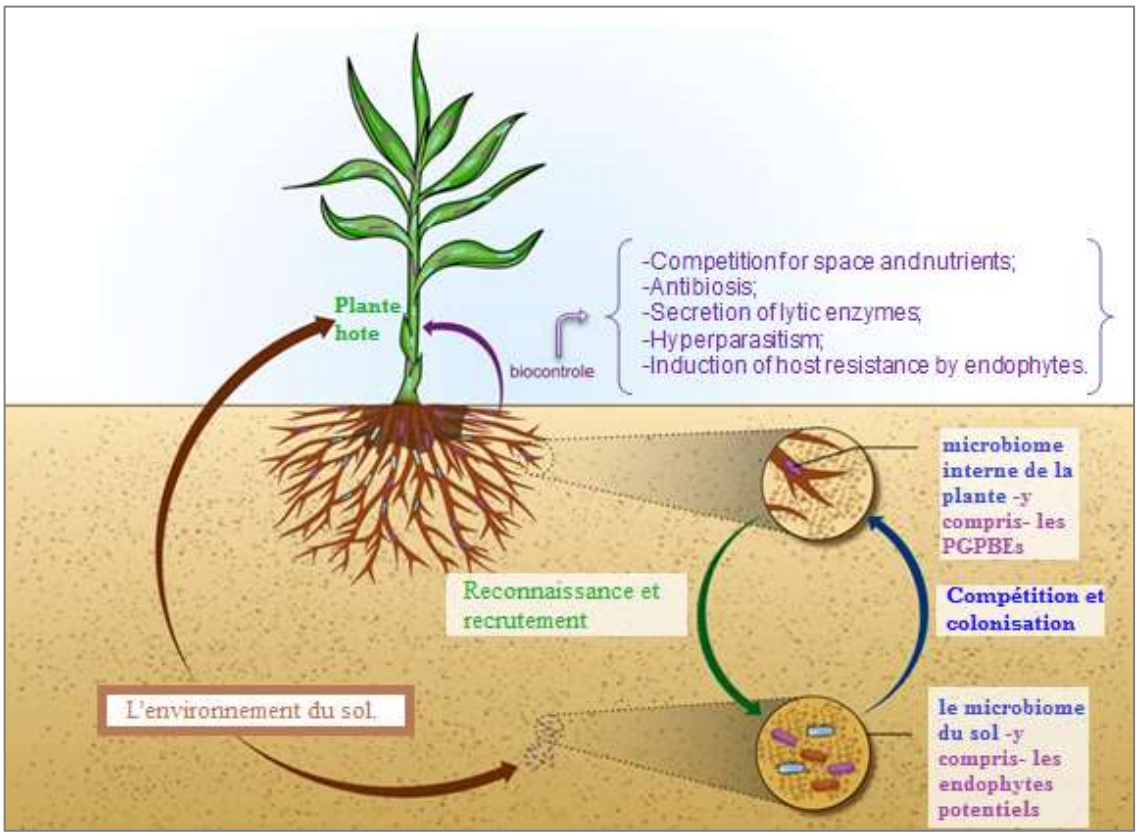

Figure 2. Communauté microbienne endophyte et ses différents mécanismes d'action (Gaiero *et al.*, 2013)

Le sol est capable d'influencer la composition de son microbiome et également la physiologie de la plante (flèches brunes). La plante sélectionnent et recrutent des endophytes potentiels (flèche verte) grâce aux différences d'architecture racinaire. Les endophytes potentiels coopèrent et se rivalisent les sites d'invasion sur la racine (flèche bleue). Une fois établis à l'intérieur de la racine puis vers la plante entière, certains endophytes peuvent influencer la croissance de la plante (flèche violette) en assurant une bioprotection.

2.7.1. La compétition pour l'espace et les nutriments

La concurrence féroce qui persiste entre les microorganismes bénéfiques et nuisibles pour la nourriture a entraîné l'inhibition des agents phytopathogènes. La compétition pour ces nutriments et niches est un mécanisme fondamental avec lequel les rhizobactéries promotrices de la croissance végétale (PGPR) ainsi que les endophytes protègent les plantes. La

chimiotaxie pour le carbone, les sucres, les vitamines et les acides aminés qui sont exsudés dans la rhizosphère par les plantes hôtes peut expliquer la compétition au niveau de la rhizosphère (Compant *et al.*, 2010).

La compétition pour le fer présente un cas particulier de compétition pour les éléments nutritifs (Ongena *et al.,* 2002). Le fer est un élément essentiel pour presque tous les êtres vivants. Cependant, il est peu biodisponible et est toxique dans sa forme libre car il engendre des formes réactives de l'oxygène. Pour se procurer le fer, les microorganismes sécrètent de petites molécules nommées sidérophores ayant une très forte affinité pour Fe^{3+}. Les sidérophores sont requis pour la pathogénie de plusieurs agents pathogènes sur l'hôte, mais ce sont également des éliciteurs de défense (Aude, 2014).

2.7.2. L'antibiose

L'antibiose est le processus de libération de métabolites secondaires et autres composés volatils tels que les antibiotiques par le microorganisme bénéfique pour contrôler la pathogenèse des agents phytopathogènes (Fravel, 1988). Les antibiotiques ont un mode d'action différent pour inhiber les agents pathogènes en affectant la membrane cellulaire ou les ribosomes ou d'autres constituants cellulaires. À des concentrations sous-inhibitrices, les antibiotiques provoquent des effets physiologiques extrêmes sur les microorganismes cibles et suppriment la production de facteurs de virulence extracellulaires et les mécanismes d'adhérence chez les bactéries (Ulloa-Ogaz *et al.,* 2015).

2.7.3. La sécrétion des enzymes lytiques

En plus des antibiotiques, plusieurs endophytes produisent des enzymes qui dégradent la paroi cellulaire pour lutter contre les phytopathogènes. Ces enzymes de dégradation ont la capacité d'altérer l'intégrité structurelle de la paroi cellulaire de certains champignons et ainsi d'inhiber ou de tuer les pathogènes (Aswathy *et al.,* 2020). Les enzymes lytiques des agents de biocontrôle dégradent directement la matrice de la paroi cellulaire ou perturbent le stade de développement particulier de l'agent pathogène (Ulloa-Ogaz *et al.,* 2015).

2.7.4. L'hyperparasitisme

L'hyperparasitisme est une stratégie écologique utilisé par les endophytes pour protéger leurs plantes hôtes pendant laquelle l'agent pathogène est directement attaqué et détruit par un endophyte particulier (Tripathi *et al.,* 2008). Ce terme peut être utilisé pour les actinomycètes qui sécrètent des enzymes de dégradation de la paroi cellulaire du champignon hôte et pour d'autres bactéries qui parasitent les champignons phytopathogènes (Kohl et *al.,* 2019).

2.7.5. Induction de la résistance de l'hôte

La résistance systémique se distingue en deux types principaux, qui comprennent la «résistance systémique induite (ISR)» et la «résistance systémique acquise (SAR)». L'acide salicylique (SA) joue un rôle exceptionnel dans la SAR, tandis que l'ISR nécessite de l'éthylène et de l'acide jasmonique. La communication croisée entre ces signaux hormonaux permet à la plante d'équilibrer finement la réponse de défense. Le renforcement des appositions des parois cellulaires est l'un des mécanismes de défense pouvant être induits par les bactéries endophytes, empêchant ainsi la pénétration des agents pathogènes en renforçant les barrières structurelles de la plante (Latz *et al.,* 2018).

La SAR se développe lorsque les plantes réussissent à activer leurs mécanismes de défense en réponse à une primo-infection par un pathogène, notamment lorsque celle-ci induit une réaction d'hypersensibilité. A travers cette dernière réaction, le pathogène est limité dans une lésion locale nécrotique du tissu desséché et ne peut se propager vers les parties saines (Bakker *et al.,* 2007). Tandis que, L'ISR induite par les endophytes représente une défense systémique dont la protection des différentes parties de la plante est garantie sans migration des bactéries. Le signal est souvent transporté à travers le système vasculaire ou à travers les tissus grâce à l'acide salicylique (Bent, 2005).

3. Contribution du biofilm et le quorum sensing dans le biocontrôle

Les plantes affrontent de nombreux agents biotiques, notamment des bactéries, des champignons, des virus, des herbes indésirables et des nématodes (Gayathri *et al.,* 2022). Plusieurs études ont rapporté que les microorganismes associés aux plantes formant un biofilm, protègent la plante de ces agents pathogènes et améliorent sa croissance (Matilla *et al.,* 2009 ; Selin *et al.,* 2010 ; Arrebola *et al.,* 2010 ; Fan *et al.,* 2011 ; Xu *et al.,* 2014 ; Zeriouh *et al.,* 2014 ; Wu *et al.,* 2015 ; Abd El Daim *et al.,* 2015 ; Chowdhury *et al.,* 2015 ; Zhou *et al.,* 2016).

3.1. Le biofilm

La capacité des microorganismes à coloniser les surfaces biotiques et abiotiques est un processus universel. Ce processus conduit à la formation de dépôts plus ou moins structurés, regroupés sous le terme générique de « biofilm ». Ce comportement des bactéries apparaît comme une réponse adaptative à un environnement plus ou moins hostile, ou du moins peu favorable à une croissance sous forme planctonique (Davey et O'Toole, 2000).

Le biofilm a été découvert pour la première fois par Van Leeuwenhoek en tant que croissance sur les surfaces des dents (Kathirvel *et al.,* 2020). Costerton (1995) a considéré comme biofilm toute association de microorganismes adhérant entre eux ou à une surface. De ce fait, les biofilms sont des structures complexes formées par une communauté de microorganismes adhérant à une surface et/ou entre eux par la sécrétion d'une matrice adhésive et protectrice. La mise en place de ces structures nécessite une coordination de l'action entre les microorganismes grâce à de puissants systèmes de communication tels que le quorum sensing (Bourigault *et al.*, 2021).

3.1.1. Formation du biofilm

Les bactéries forment des biofilms en réponse à des stress environnementaux tels que le rayonnement UV, la dessiccation, la carence en nutriments, un pH ou température extrême, des concentrations élevées de sel, une pression élevée et des agents antimicrobiens (Musa *et al,*. 2020). La formation de biofilm est un processus de développement initié par des organismes planctoniques (libres) formant des agrégats et/ou passant à un mode de vie associé à la surface, et se termine lorsque les cellules s'échappent de la structure du biofilm dans un processus appelé « dispersion » pour revenir au mode de croissance monocellulaire et planctonique (Figure 3) (Rumbaugh et Sauer, 2020).

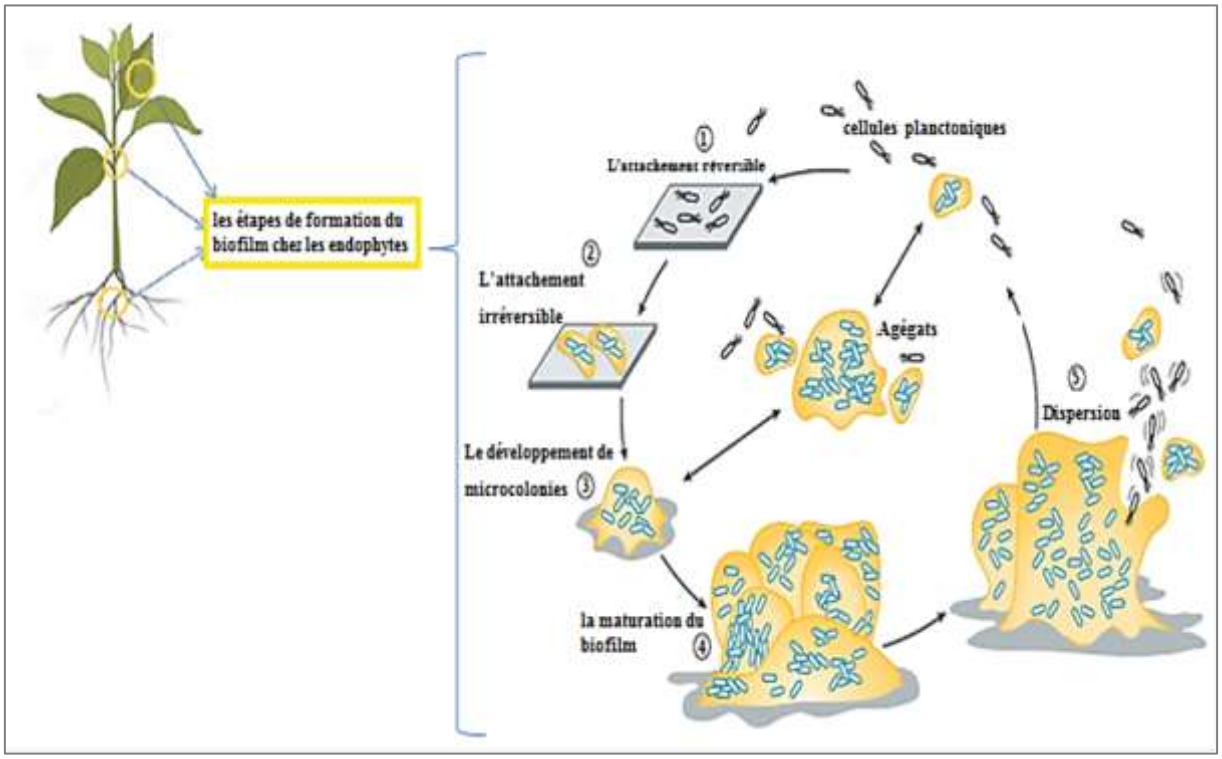

Figure 3. Etapes de formation du biofilm (Rumbaugh et Sauer, 2020).

Divers facteurs génétiques et environnementaux régulent la formation d'un biofilm. La mobilité bactérienne facilitée par les flagelles est essentielle pour établir la connexion entre la bactérie et la surface, tandis que la mobilité facilitée par les fimbriae est requise pour la formation de la microcolonie (Mari et Vranes, 2007). Pour qu'il se forme, le biofilm passe par plusieurs étapes (Figure 3).

a. L'attachement réversible

L'attachement des cellules bactériennes à la surface est la première étape de formation du biofilm. Il s'agit d'un processus aléatoire médié par le mouvement colloïdal et les forces gravitationnelles. Il est déclenché lorsque les microorganismes arrivent à la surface à une certaine distance (entre 2 à 50 nm) (Beloin *et al.,* 2008 ; Kostakioti *et al.,* 2013).

b. L'attachement irréversible

L'attachement réversible conduit à un attachement de nature irréversible en raison d'une liaison permanente en présence d'exopolysaccharides (EPS) (Hall-Stoodley *et al.,* 2004). Les EPS jouent un rôle fondamental dans la formation d'un biofilm et son attachement à l'hôte. Leur quantité produite influence directement la force d'adhésion entre les microorganismes et l'organisme hôte (Bianciotto *et al.*, 2009 ; Velmourougane *et al.,* 2017).

c. Le développement de microcolonies

À ce stade, la formation des microcolonies se produit en raison de l'accumulation ainsi que de la croissance des microorganismes. En outre, cette accumulation nourrit le lien entre les bactéries et la surface, tout en protégeant les colonies des stress environnementaux (Hall-Stoodley *et al.,* 2004 ; Vlamakis *et al.,* 2013). Cette étape est avantageuse car elle permet l'échange de substrats intraspécifiques ainsi que l'élimination des produits finaux des bactéries (Hall-Stoodley *et al.*, 2004 ; Madsen *et al.*, 2012).

d. La maturation

L'étape de maturation comprend essentiellement divers processus adhésifs reliant les bactéries entre elles lors de la prolifération ainsi que des processus perturbateurs formant finalement des canaux dans la structure du biofilm (Stoodley *et al.,* 2000). Ces canaux servent de système circulatoire simple à travers lequel la distribution des nutriments aux microcolonies se produit, ainsi que d'une voie de perception des métabolites nocifs (Costerton, 1995 ; Maric et Vranes, 2007). De plus, à ce stade, le contact de surface active des réponses qui conduisent finalement à des changements dans l'expression des gènes et à une régulation positive de divers facteurs, notant que la division cellulaire est rare dans un biofilm mature et l'énergie est utilisée pour produire les EPS (Divjot *et al.,* 2020).

e. La dispersion

A ce stade, les cellules retournent finalement à leur état planctonique (Kaplan, 2010). Lorsque le biofilm mûrit, il y a une limitation des ressources, et une accumulation des déchets qui stimule la dispersion du biofilm. Les bactéries disséminées possèdent la capacité de relancer le processus de formation du biofilm lorsque les conditions environnementales sont adéquates (Divjot *et al.,* 2020).

3.1.2. Rôle du biofilm dans le biocontrôle

Malgré leurs effets nocifs, les biofilms bactériens peuvent également avoir des effets bénéfiques (Rosche *et al.,* 2009). Autrement dit, la formation de biofilms bactériens est souvent importante dans les milieux agricoles (Bogino *et al.,* 2013). Ces biofilms bénéfiques sont actuellement utilisés comme agents de lutte biologique (Timmusk *et al.,* 2017). Les bactéries bénéfiques productrices de biofilm pourraient être utilisées comme biofertilisants pour favoriser la croissance des plantes en produisant des phytohormones, ainsi que la suppression des maladies et la protection contre le stress biotique et abiotique (Bais *et al.,* 2004 ; Khan *et al.,* 2018).

3.2. Le quorum sensing (QS)

Le quorum sensing (QS) est un système de communication intercellulaire présent chez de nombreux microorganismes (Yi *et al.,* 2021). Le QS est un mode de signalisation bactérienne qui repose sur la production de petites molécules médiatrices appelées " auto-inducteurs" (AI), pendant la phase de croissance. Lorsqu'un seuil de concentration est atteint, ces auto-inducteurs interagissent avec un régulateur transcriptionnel, permettant l'expression spécifique d'un groupe de gènes, en réponse à une forte concentration de ces AI (Abdelhakim *et al.,* 2017). Ces derniers sont classés en trois types en fonction de leurs voies de synthèse, à savoir les auto-inducteurs de type 1 (AI-1), les auto-inducteurs de type 2 (AI-2), et les auto-inducteurs peptidiques (AIP) (Williams, 2007).

3.2.1. QS chez les bactéries à Gram positif

Les bactéries Gram-positives utilisent une signalisation basée sur les oligopeptides avec un capteur. Ces oligopeptides auto-inducteurs sont détectés par des protéines transmembranaires transportant les signaux par une cascade de phosphorylation. Les variations sont reconnues par les récepteurs à deux composantes et assurent la spécificité du signal (Figure 4) (Abdelhakim e*t al.,* 2017).

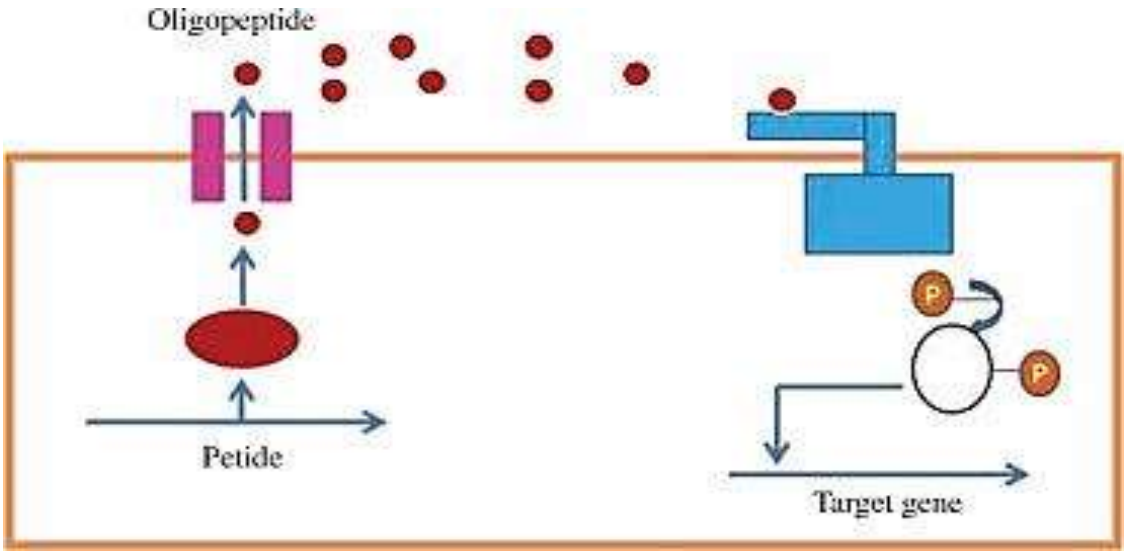

Figure 4. Quorum sensing chez les bactéries Gram-positives (Abdelhakim *et al.*, 2017).

3.2.2. QS chez les bactéries à Gram négatif

Les bactéries Gram-négatives produisent des auto-inducteurs de type acyl homosérine lactone (AHL), par l'enzyme AHL-synthase. À faible densité, les molécules AHL sont activement transportées de l'environnement externe vers le cytoplasme par un processus de transport dépendant de l'ATP. A forte concentration, le transport s'effectue par diffusion passive. Lorsque la concentration d'AHL atteint un seuil, les molécules auto-inductrices d'AHL interagissent avec une protéine régulatrice R. Le complexe R-AHL se lie au promoteur des gènes cibles et initie leur transcription couplée à la densité bactérienne (Figure 5) (Abdelhakim *et al.*, 2017).

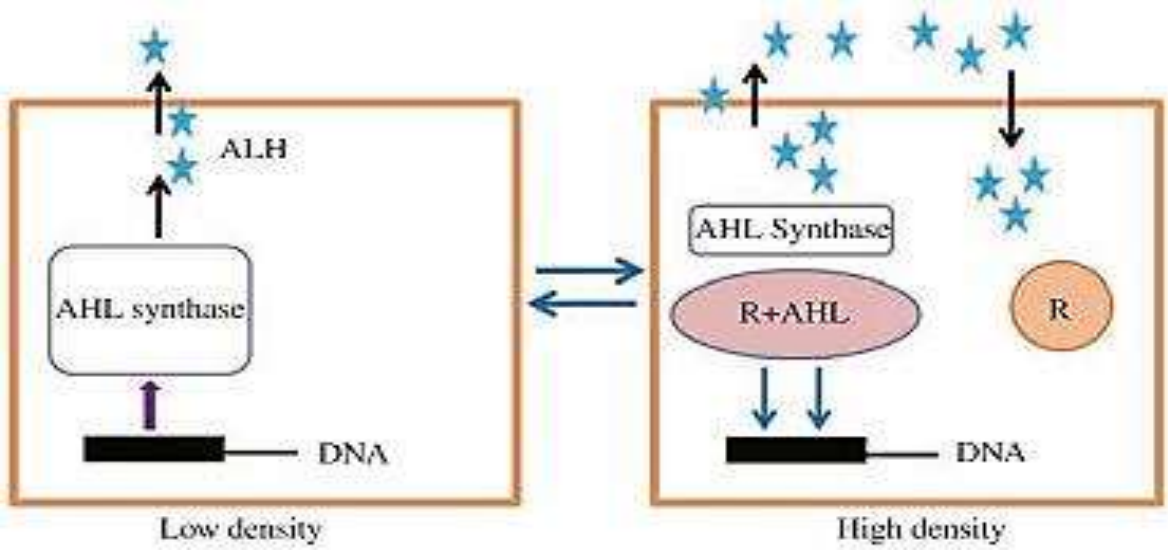

Figure 5. Quorum sensing chez les bactéries Gram-négatives (Abdelhakim *et al.*, 2017).

3.2.3. Les voies de signalisation QS

Différentes espèces bactériennes génèrent différentes IA pour mener à bien leurs fonctions de régulation dépendantes du QS (Jianfei *et al.,* 2018).

a. QS basé sur les molécules AHL

L'AHL est principalement extracellulaire et pénètre dans les cellules en se liant au récepteur LuxR. Cela conduit à l'activation de ce dernier, à l'induction de l'expression d'exopolysaccharides synthétiques, de facteurs de virulence, et à la régulation de la formation du biofilm (Li *et al.,* 2019).

b. QS basé sur la sécrétion de peptides (AIP)

Ce système est basé sur la formation de l'oligopeptide à partir du peptide. Ils sont sécrétées dans le milieu extracellulaire et ont une affinité pour les récepteurs membranaires de type kinases de l'histidine (Amara *et al.,* 2011). L'expression des AIPs est liée à la famille de gènes *agrD.* Une fois exprimée, la protéine AgrB liée à la membrane modifie leur confirmation par l'ajout de thiolactone et peut ainsi être exportée vers le milieu extracellulaire sous forme d'oligopeptide (Saenz *et al.,* 2000). Lorsque la concentration extracellulaire des AIP atteint un seuil, ces molécules peuvent se lier au récepteur AgrC. La transduction du signal transmembranaire génère l'auto-phosphorylation de l'AgrA activant ainsi plusieurs voies de signalisation responsables de l'expression de la protéine agrBDCA (Li *et al.,* 2012).

c. QS basé sur la production du système AI-2

Il est basé sur une molécule de signalisation appelée furanosyl borate diester (AI-2). Cette molécule bascule entre le signal inter- et intraspécifique en fonction de la concentration et de la densité cellulaire (Walters *et al.,* 2006). Ces molécules sont synthétisées par l'Al-2 synthase dans toutes les bactéries qu'elles utilisent. Cependant, ils peuvent l'utiliser dans la transduction du signal pour percevoir et servir une variété de bactéries dans leur environnement (Abdelhakim *et al.,* 2017). La protéine AI-2 est également translatée dans les cellules *via* des transporteurs spécifiques. Une fois à l'intérieur de la cellule, l'AI-2 subit une phosphorylation et génère une voie de signalisation qui finit par réguler l'opéron régulé par *luxS* (Roux *et al.,* 2009).

d. QS basé sur les produits d'un autre système

Une fluctuation naturelle du système QS est également observée .En fait, certaines bactéries ne produisent pas d'auto-inducteurs, mais répondent plutôt aux signaux produits par les auto-inducteurs d'autres bactéries (Abdelhakim *et al.,* 2017). il a été démontré que

Burkholderia cepacia répondait aux signaux QS produits par *Pseudomonas aeruginosa via* les molécules signales de nature furanique (Riedel *et al.,* 2006).

3.2.4. Rôle de quorum sensing dans le biocontrôle

Les métabolites microbiens qui font partie des systèmes de communication microbienne QS, sont utilisés efficacement dans les programmes de lutte contre les maladies des plantes (Jayaprakashvel et Mathivanan, 2011). C'est pour cela, les systèmes de régulation QS sont répandus chez les bactéries associées aux plantes, y compris les PGPR et les souches des agents de biocontrôle (Chernin, 2011). Par exemple, plusieurs études ont fourni des preuves indirectes que les AHL jouent un rôle dans l'immunité des plantes (Schikora *et al.*, 2011). Diverses PGPR capables de protéger les plantes contre les maladies fongiques et bactériennes, se sont avérées productrices des AHL et d'autres signaux QS (Loh *et al.,* 2002 ; Haas et Defago, 2005).

Chapitre II.
Matériel et Méthodes

Chapitre II. Matériel et méthodes

Notre étude porte sur l'isolement des bactéries endophytes du romarin, leur identification préliminaire, leur éventuel pouvoir antagoniste envers les agents phytopathogènes et la mise en évidence *in vitro* de la formation du biofilm par ces endophytes. Notre travail expérimental a été réalisé au niveau du laboratoire de PFE du département de Biotechnologie et de l'Agro-écologie de l'université Saad Dahleb (Blida 1).

1. Matériel végétal

La plante du romarin (*Rosmarinus officinalis* L.) a été récoltée de jardin botanique du Hamma à Alger. L'identification botanique de l'espèce végétale a été effectuée par M^{me} Touahri S., ingénieure botaniste au niveau du jardin d'essais d'Alger.

Selon Quezel et Santa (1963), la classification taxonomique du romarin est la suivante :

- **Règne** : *Plantae*
- **Embranchement :** Phanérogames
- **Sous-règne :** *Tracheobionta*
- **Division :** *Magnoliophyta*
- **Classe :** *Magnoliopsida*
- **Ordre :** *Lamiales*
- **Famille :** *Lamiaceae* (Labiées)
- **Sous-famille :** *Nepetoideae*
- **Genre :** *Rosmarinus*
- **Espèce :** *officinalis*

Le romarin se désigne « *iklil eljabal* » en arabe, « *leklil* » en dialecte ou « *lhalhal* » dans certaines régions en Algérie. Il se trouve dans tous les pays méditerranéens, de préférence dans les lieux secs et arides, exposés au soleil. A l'état sauvage, il se trouve sur des sols calcaires (Boulezazen, 2017).

Les feuilles du romarin sont linéaires, gaufrées, coriaces, sessiles, opposées, rigides, brillantes à bords repliés, verdâtres en dessus et plus ou moins hispides blanchâtres en dessous (Figure 6.A). La plante est un arbuste ou sous arbrisseau de 0.5 à 2 m de longueur avec une

tige tortueuse, anguleuse et fragile. L'écorce est linéaire à cyme plus ou moins simulant des épis. La racine du romarin est profonde et pivotante. Ses fleurs varient du bleu pâle au violet avec des fruits sous forme de baies sèches et lisses (Figure 6.B et C) (Boulezazen, 2017).

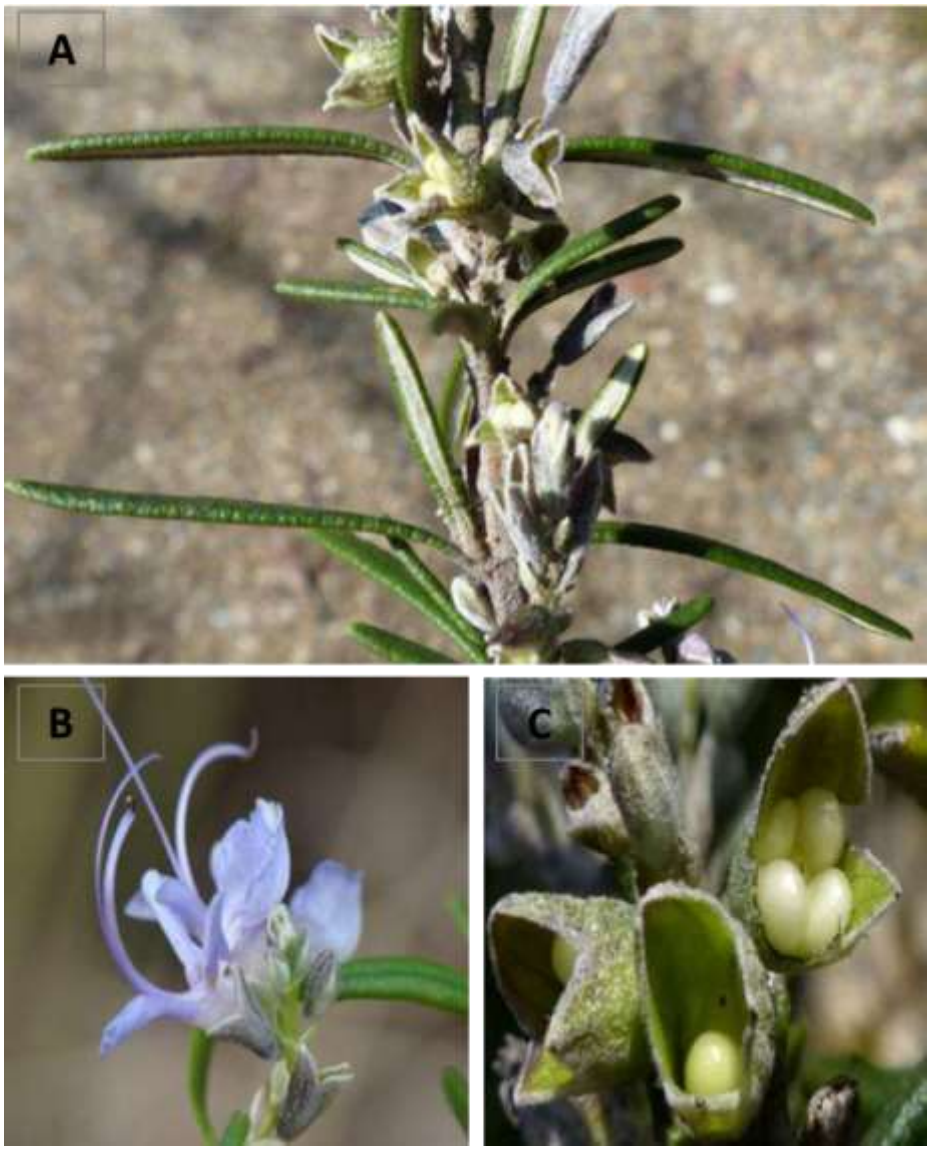

Figure 6. Le romarin (*Rosmarinus officinalis* L.) (Boulezazen, 2017).

(A) feuilles et tige, (B) fleurs et (C) fruits.

Le romarin peut être retrouvé à l'état sauvage, comme peut être cultivé. C'est la plante la plus populaire dans le bassin méditerranéen. Les fleurs s'épanouissent tout au long de l'année ce qui attire de nombreux insectes (Emberger, 1960). Il est une plante ayant des qualités et propriétés stimulantes, antiseptiques et insecticides (Sedjelmassi., 1993). Le romarin a des usages multiples et est cultivé à des fins commerciales. Il peut être un remède aux problèmes d'hypotension, de dépression et de fatigue chronique. Il est efficace aussi en cas de faiblesses de la mémoire. Tandis qu'il doit néanmoins être utilisé avec précaution, car en cas surdosage il peut provoquer un empoisonnement (Kunkele et Lobmeyer, 2007).

2. Isolement des bactéries endophytes du romarin

Nous avons procéder à l'isolement des bactéries endophytes à partir des racines fraîchement collectées du romarin, transportées dans des sacs en plastiques puis conservées au frais. Des échantillons sains, macroscopiquement dénués de lésions ont été choisis. Après le tri, les échantillons sont lavés et frottés légèrement sous l'eau du robinet afin d'enlever les impuretés.

2.1. Désinfection des échantillons

La désinfection superficielle des échantillons a pour objectif d'éliminer les microorganismes qui adhèrent à la surface des tissus des racines tout en préservant la population microbienne endophyte. La désinfection des racines a été effectuée selon la méthode décrite par de Favaro *et al.* (2012). Des segments de racines d'environ 1 cm ont été initialement désinfectés dans le méthanol à 70% pendant 1 min puis dans une solution d'hypochlorite de sodium à 2% pendant 5 min. La désinfection a été suivie par 5 rinçages successifs à l'eau distillée stérile puis par un séchage sur du papier filtre stérile.

Pour vérifier l'efficacité de la désinfection, nous avons étalé un volume de 0,1 ml du rinçage final sur le milieu de culture et l'incubée pendant une nuit à 30 ºC. Les bactéries qui se développent seront qualifiées de « contaminants », et elles peuvent être utilisées comme référence. Si des souches identiques aux contaminants sont obtenues, elles seront systématiquement éliminées.

2.2. Préparation de la solution mère

Après la désinfection, l'échantillon des racines a été broyé à l'aide d'un pilon et d'un mortier sous conditions d'asepsie. Par la suite, 1 g du broyat a été placé dans 90 ml d'eau distillée stérilisée puis ajusté à 100 ml. La suspension mère ainsi préparée a été diluée en séries de cinq fois de (10^{-2} à 10^{-6}) (Pettipher *et al.*, 2005).

2.3. Ensemencement et incubation

Des aliquotes de 0,2 ml des trois dernières suspensions, ont été déposés dans des boites de Pétri, puis le milieu GN (gélose nutritive) en fusion a été coulé sur le volume de suspension déposé. Le milieu ensemencé est par la suite mélangé en réalisant des mouvements en huit sur le plan du travail, afin d'incorporer la suspension (Pettipher *et al.*, 2005).

Après l'ensemencement, les boîtes ont été maintenues à 30°C pendant une semaine. Les bactéries isolées ont été dénombrées et la concentration exprimée en UFC/g a été calculée suivant la formule (Pettipher *et al.*, 2005) :

$N = \frac{\sum C}{V \times d}$, dont :

- N : nombre d'UFC par gramme de végétal.
- ∑C : somme totale des colonies comptées.
- d : taux de dilution à partir duquel le comptage a été obtenu.
- V : volume de solution déposée.

2.4. Purification et conservation des isolats

Afin de purifier les isolats obtenus, nous avons réalisé un étalement progressif des bactéries sur une boîte de pétri à l'aide d'un fil de platine stérile, en effectuant des stries à la surface de la gélose. Après incubation à 30°C pendant 24 à 48 h, les isolats obtenus ont été ensuite conservés à 4°C pour d'autres utilisations ultérieures.

3. Identification préliminaire des isolats endophytes

L'identification préliminaire des isolats endophytes comprend l'étude des caractères culturaux, l'étude morphologique et structurale et l'étude de quelques caractères métaboliques.

3.1. Etude des caractères culturaux

Pour chaque isolat, nous avons effectué une analyse macroscopique en notant l'aspect, le relief, le contour, la couleur, la consistance, la forme, la taille des colonies et les transformations macroscopiques du milieu de culture (présence de pigment et couleur) (Erkmen, 2021).

3.2. Etude des caractères morphologiques et structuraux

Chaque espèce possède une morphologie propre, reconnaissable principalement à l'aide des critères morphologiques et structuraux. L'étude de ces caractères a été réalisée sous microscope à immersion, au grossissement ×100 des cellules à l'état frais ou après fixation.

3.2.1. Examen microscopique à l'état frais

A l'aide d'une anse stérile, nous avons prélevé de la crème bactérienne et la déposé sur une lame en verre. Une goutte du colorant bleu de méthyle a été ajoutée sur la crème bactérienne et bien remuée afin de l'incorporer. Les bactéries ont été observées sous

microscope optique (G : ×100). L'examen permet de connaître la morphologie et le mode de groupement des cellules bactériennes de chaque isolat (Zhou et Li, 2015).

3.2.2. Coloration de Gram

La coloration de Gram permet à la fois de connaître la forme des bactéries et de les classer en 2 groupes en fonction de leur capacité ou non à retenir la coloration violette du cristal violet. Elle teste l'alcoolo-résistance des bactéries et met en évidence la constitution de la paroi.

Pour procéder à cette coloration, nous avons appliqué le protocole proposé par Coico (2005). Des frottis ont été réalisés en étalant la crème bactérienne sur une lame en verre. Les cultures bactériennes des isolats endophytes doivent être jeunes ne dépassant pas 48 h. Les frottis ont été fixés par la suite à la chaleur sur la flamme du bec Bunsen, puis colorés avec le cristal violet (violet de gentiane phéniqué) durant 1 min. Un rinçage à l'eau a été effectué suivi d'un mordançage au lugol pendant 1 minute afin d'accentue la coloration. L'épreuve de l'alcoolo-résistance consiste à plonger les frottis colorés 3 à 4 fois dans un pot d'alcool pendant quelques secondes. Après le rinçage des frottis à l'eau, une contre coloration à la fuschine a été réalisée pendant une minute.

Un dernier rinçage à l'eau du robinet a été effectué suivi d'un séchage entre deux feuilles de papier absorbant pour que les lames soient observées à l'objectif 100 à immersion, à pleine lumière. La coloration violette des cellules indique que la bactérie est à Gram positif, tandis que la coloration rose indique que la bactérie est à Gram négatif.

3.2.3. Coloration au vert de malachite

Cette coloration met en évidence la présence ou l'absence des spores bactériennes. Pour la réaliser, nous avons appliqué la technique décrite par Schaeffer et Fulton (1933), selon les étapes suivantes :

- Réalisation d'un frottis à partir de la crème bactérienne.
- Fixation du frottis à la chaleur.
- Coloration par une solution aqueuse de vert de malachite à 5%.
- Chauffage à la vapeur pendant 10 min.
- Rinçage à l'eau du robinet.
- Coloration à la safranine pendant 30 secondes.
- Observation microscopique à l'objectif 100 à immersion, à pleine lumière.

Sous microscope optique, la présence de spores est indiquée par une coloration verte, tandis que les cellules végétatives se colorent en rouge.

3.3. Etude de quelques caractères métaboliques

3.3.1. Test de catalase

Une colonie bactérienne a été disposée sur une goutte d'eau oxygénée (H_2O_2 10 volumes). La présence d'une catalase se traduit, en quelques secondes, par la formation de bulles d'oxygène (effervescence) (Reiner, 2010).

3.3.2. Test d'oxydase

Le principe de ce test repose sur la propriété de l'oxydase, une enzyme respiratoire, à catalyser la réaction d'oxydation d'un substrat organique. La colonie bactérienne a été étalée sur un disque imprégné de solution à 1 % de chlorhydrate de tetraméthyl-p-phenylènediamine. Une réaction positive se traduit par une coloration violet-pourpre en quelques secondes (Shields et Cathcart, 2010).

4. Recherche *in vitro* d'activité antagoniste des isolats endophytes

Les bactéries endophytes isolées ont été testées pour leur pouvoir antagoniste *in vitro* vis-à-vis d'une souche phytopathogène de *Fusarium oxysporum* f.sp. *albidinis*, c'est un agent d'un flétrissement vasculaire du palmier-dattier (*Phoenix dactylifera*), appelé maladie du Bayoudh (CMI, 1978, 1992; EPPO/CABI, 1997). Ces principaux moyens de transmission sont les spores et le mycélium dans le sol. La contamination a lieu principalement par les racines et s'étend dans les plantes par le système vasculaire. Le pathogène se dissémine par les rejets, le sol, et les hôtes ne présentant pas de symptômes (OEPP,2003).

Cette dernière fait partie de la collection de laboratoire de Mycologie de notre département. Pour mettre en évidence cette activité antagoniste, nous avons suivi la méthode décrite par Howell (2003). Chaque isolat bactérien a été ensemencé en trait sur GN et incubé à 30°C pendant 24 h. Après incubation, un disque du champignon pathogène a été prélevé à l'aide d'une pipette de Pasteur puis déposé sur le milieu de culture à 3 cm du trait de la bactérie déjà ensemencée (Figure 7). Les témoins consistent à des boites contenant le disque du champignon pathogène où l'inoculum bactérien est remplacé par l'eau distillée stérile. La lecture des résultats consiste à mesurer la distance parcourue par le champignon en direction de la bactérie.

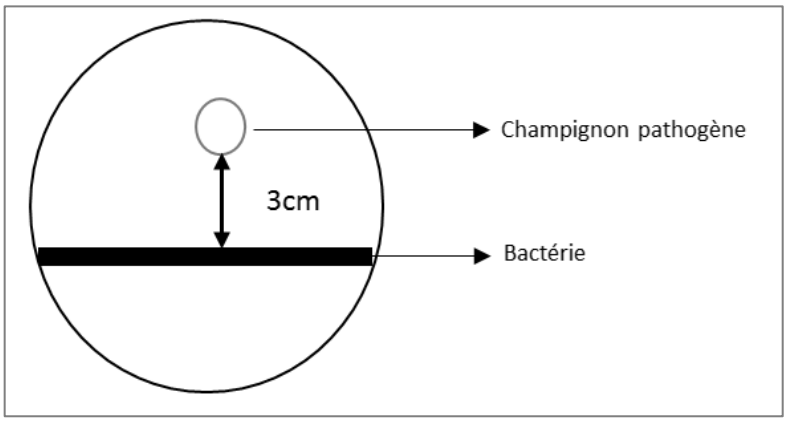

Figure 7. Test de l'activité antagoniste *in vitro*.

5. Mise en évidence *in vitro* de la production de biofilm par les isolats endophytes

5.1. Test de production de biofilm sur gélose rouge Congo

Nous avons utilisé la méthode préconisée par Freeman *et al*. (1989) par culture des isolats bactériens sur la gélose rouge Congo et incubation pendant 24 heures à 37°C en condition aérobie. La formation de biofilm est révélée par la présence des colonies noires avec un cristallin de consistance sèche, tandis qu'un résultat négatif est traduit par des colonies rouges.

5.2. Méthode de quantification du biofilm sur microplaque

La méthode est basée sur la technique décrite par Stepanovic *et al*. (2007). Les isolats bactériens ont été cultivés sur gélose trypticase soja (TSA) avec 2% de glucose et incubés pendant 24h à 37°C. Une colonie a été transférée dans un tube contenant 10 ml du bouillon trypticase soja (TSB) avec 2% de glucose. Les tubes ont été incubés à 37°C pendant 24h. Les cultures ont été ensuite diluées à 1/100 avec du milieu neuf (TSB) et 200 µl de chaque suspension bactérienne a été inoculée en triplicata, dans les puits d'une microplaque. Un bouillon stérile a été utilisé comme témoin, également diluée, incubée et introduit dans la plaque pour vérifier la stérilité. La microplaque a été incubée à 37°C pendant 24 heures, puis la suspension bactérienne a été aspirée et les puits ont été lavés trois fois avec 200 µl de solution tampon (PBS : *Phosphate-Buffered Saline*) pour éliminer les bactéries planctoniques et les biofilms formés ont été fixés avec 200 µl d'éthanol pendant 15 min.

La microplaque a été séchée à la température ambiante puis colorées avec 200 µl de solution de cristal violet à 2% pendant 5 min. L'excès de colorant a été rincé par lavage à l'eau distillée et la plaque séchée à la température ambiante. Une forte production de biofilm est indiquée par la coloration foncée de la paroi des puits de la microplaque.

Chapitre III.
Résultats et discussion

Chapitre III. Résultats et discussion

1. Isolement des bactéries endophytes du romarin

L'ensemencement et l'incubation de la solution du dernier rinçage des racines du romarin n'ont montré aucune croissance bactérienne ou fongique sur le milieu, indiquant l'efficacité de la désinfection superficielle de notre échantillon (Figure 8.A).

Pour obtenir des isolats des bactéries endophytes, les suspensions dilutions du broyat des racines ont été ensemencées sur le milieu général GN, et incubées pendant une durée d'une semaine pour permettre le développement d'un maximum de bactéries. Après incubation, 130 colonies ont été dénombrées sur la boite correspondant à la dilution 10^{-3} (Figure 8.B). La concentration en bactéries endophytes par gramme de notre échantillon est estimée alors à une valeur de $6{,}5\times10^{5}$ UFC/g.

Figure 8. Aspect des boites d'ensemencement après une semaine d'incubation.
(A) Eau du dernier rinçage, (B) ensemencement de la dilution 10^{-3}.

2. Identification préliminaire des isolats endophytes

Après isolement, nous avons sélectionné 10 isolats différents : Rm1, Rm2, Rm3, Rm4, Rm5, Rm6, Rm7, Rm8, Rm9, et Rm10. La sélection de ces isolats a été basée sur les critères culturaux. Les différentes colonies sélectionnées ont été réensemencées dans des boites de

Pétri contentant le même milieu d'isolement. La procédure est répétée jusqu'à l'obtention des cultures pures (Figure 9).

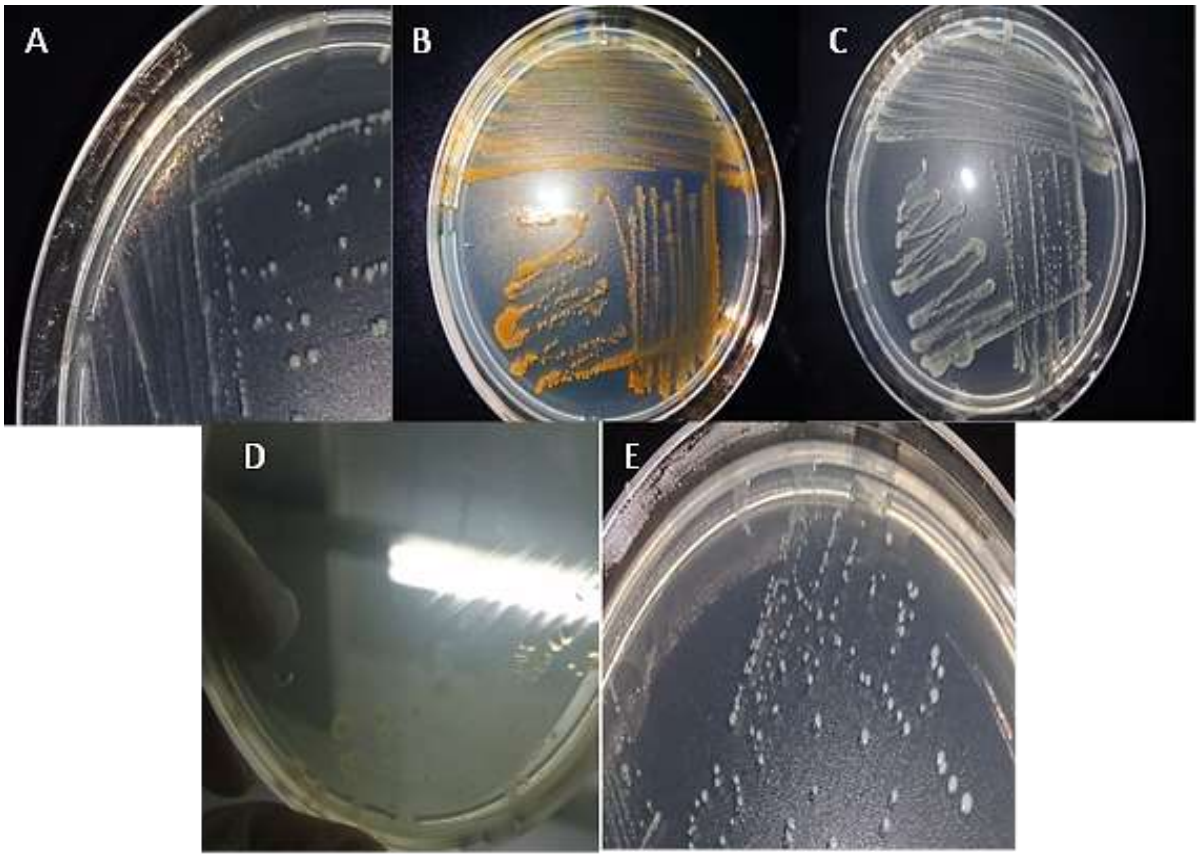

Figure 9. Aspect cultural de quelques isolats purifiés.
(A) Rm1, (B) Rm2, (C) Rm4, (D) Rm8, (E) Rm9.

2.1. Description macroscopique des isolats

La majorité des isolats présentent un aspect brillant, une consistance crémeuse avec une forme circulaire régulière et regrouper en points (Figure 9). Les résultats de la description des critères culturaux de chaque isolat pur sont résumés dans le Tableau 1.

2.2. Caractères morphologiques et structuraux

2.2.1. Observation à l'état frais

Après l'ajout de bleu de méthylène aux prélèvements et leur observation à l'état frais sous microscope photonique, nous avons noté que la morphologie des cellules bactériennes varie entre coques, bacilles et une qui a la forme coccobacille (Tableau 2, Figure 10).

Tableau 1 : Description macroscopique des isolats endophytes après purification.

Isolat	Couleur	Taille	Aspect	Forme et contour	Elévation	Consistance	Opacité
Rm 1	Crème	Petite [> 1]	Brillante	Circulaire régulière	Bambée	Crémeuse	Opaque
Rm 2	Orange	Petite [> 1]	Brillante	Circulaire régulière	Elevée	Crémeuse	Opaque
Rm 3	Jaunâtre	Petite [< 1]	Brillante	Regroupé en points	Bambée	Crémeuse	Opaque
Rm 4	Crémeuse	Petite [> 1]	Brillante	Circulaire régulière	Elevée	Crémeuse	Opaque
Rm 5	Crème	Petite [> 1]	Mat	Circulaire régulière	Elevée	Sèche	Opaque
Rm 6	Jaune	Moyenne [> 2]	Brillante	Circulaire régulière	Bambée	Crémeuse	Opaque
Rm 7	Crème	Petite [> 1]	Brillante	Circulaire régulière	Bambée	Crémeuse	Opaque
Rm 8	Crème	Moyenne [> 1]	Brillante	Circulaire régulière	Bambée	Grasse	Opaque au centre et translucide au bord
Rm 9	Blanche	Petite [> 1]	Brillante	Circulaire régulière	Bambée	Crémeuse	Opaque
Rm 10	Orange	Petite [< 1]	Brillante	Regroupé en points	Elevée	Crémeuse	Opaque

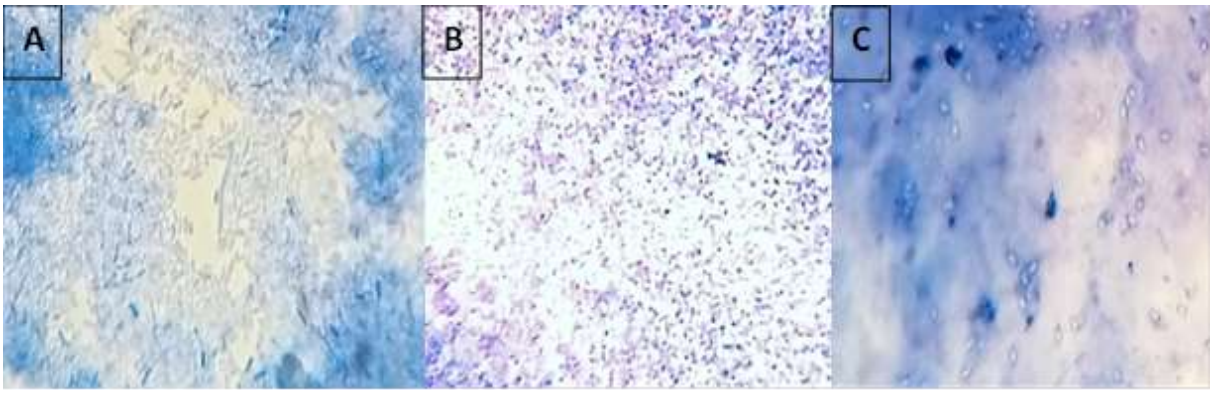

Figure 10. Observation microscopique à l'état frais des isolats endophytes (G×100).

(A) Bacille, (B) coque, (C) coccobacille.

2.2.2. Coloration de Gram

L'observation des frottis fixés des 10 isolats endophytes sélectionnés après coloration de Gram a révélé la présence des deux types de Gram, dont 7 isolats sont à Gram positif et 3 isolats sont à Gram négatif (Tableau 2, Figure 11).

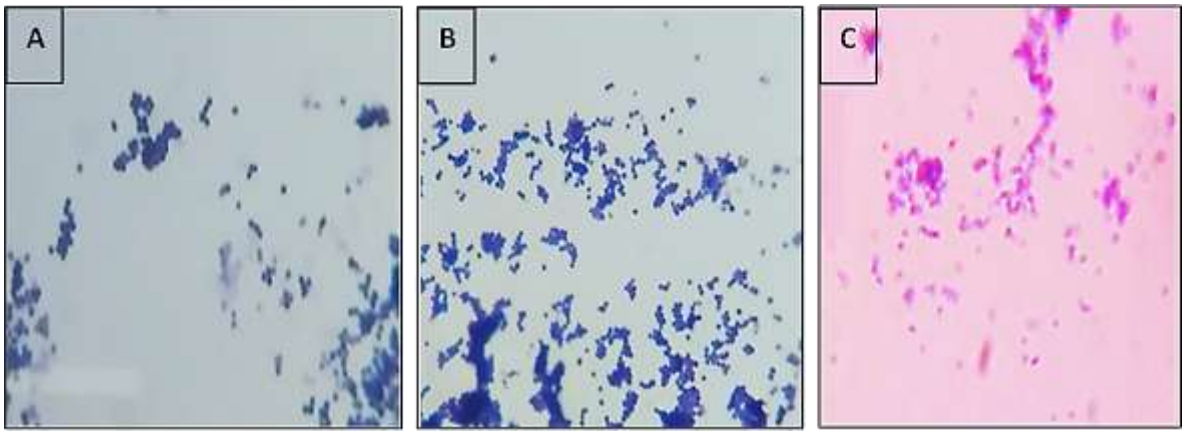

Figure 11. Observation microscopique des frottis après la coloration de Gram des isolats endophytes (G×100).

(A) Rm1 (Gram +), (B) Rm7 (Gram +), (C) Rm6 (Gram -).

2.2.3. Coloration au vert de malachite

Les résultats de la coloration de nos isolats au vert de malachite, ont montré la présence de spores colorés en vert chez 3 isolats parmi le total de 10. Il s'agit de Rm1, Rm2 et Rm10, tandis que les 7 autres isolats endophytes n'ont pas produit de spores (Tableau 2, Figure 12).

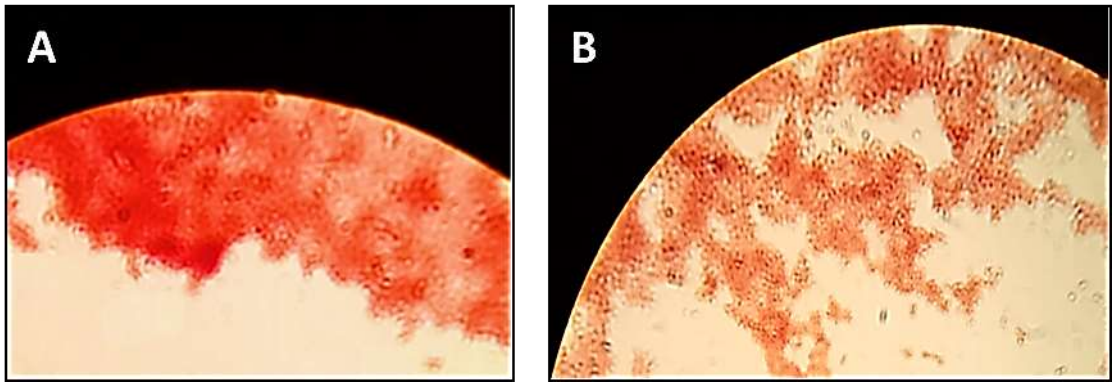

Figure 12. Observation microscopique des frottis après la coloration au vert de malachite des isolats endophytes (G×100).

(A) Rm4 (absence de spores), (B) Rm2 (présence de spores colorées en vert).

Couleur verte : endospore ; Couleur rouge : cellule végétatif.

Tableau 2 : Résultats des observations microscopiques après colorations.

Isolat	Morphologie	Gram	Sporulation
Rm1	Coque	+	(+)
Rm2	Coque	+	(+)
Rm3	Coque	+	(-)
Rm4	Coque	+	(-)
Rm5	Coque	+	(-)
Rm6	Coque	-	(-)
Rm7	Coque	+	(-)
Rm8	Bacille	-	(-)
Rm9	Bacille	-	(-)
Rm10	Coccobacille	+	(+)

2.3. Caractérisation métabolique des isolats endophytes

La recherche de la catalase et d'oxydase est une étape primordiale à effectuer. Pour le test de catalase, tous nos 10 isolats endophytes sont producteurs de cette enzyme, dont nous avons enregistré la formation d'effervescence suite à leur contact avec le peroxyde d'hydrogène (Tableau 3, Figure 13). Alors que pour le test d'oxydase, les trois isolats Rm1, Rm8 et Rm9 produisent cette enzyme en montrant une couleur violette en contact avec le

disque contenant le réactif, tandis que les 7 autres isolats ne la produisent pas (Tableau 3, Figure 14).

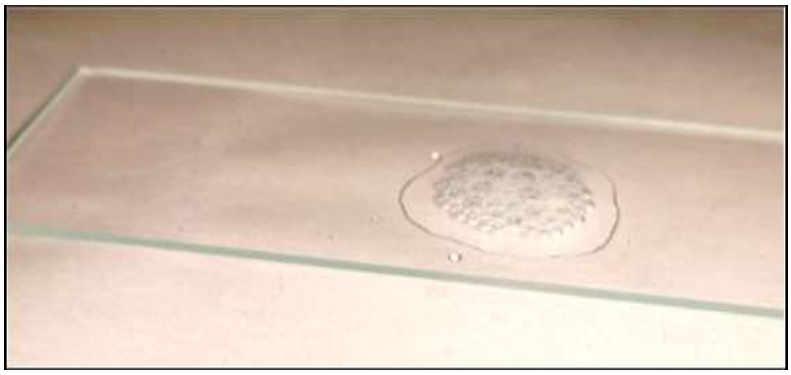

Figure 13. Résultat du test de production de catalase.

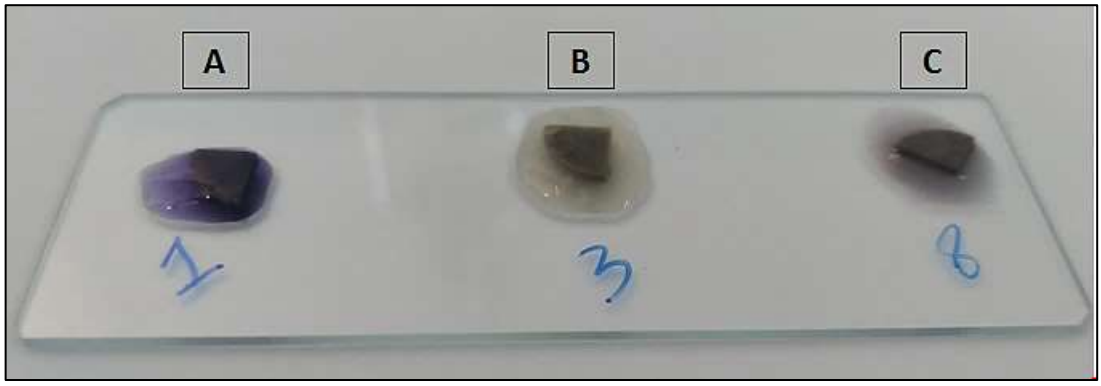

Figure 14. Résultat du test de production d'oxydase.

(A) Rm1 (oxydase +), (B) Rm3 (oxydase -), (C) Rm8 (oxydase +).

Tableau 3 : Résultats des tests de production des enzymes respiratoires par les bactéries endophytes isolées.

Isolat	Catalase	Oxydase
Rm1	(+)	(+)
Rm2	(+)	(-)
Rm3	(+)	(-)
Rm4	(+)	(-)
Rm5	(+)	(-)
Rm6	(+)	(-)
Rm7	(+)	(-)
Rm8	(+)	(+)
Rm9	(+)	(+)
Rm10	(+)	(-)

3. Activité antagoniste *in vitro* des isolats endophytes

Pour révéler le pouvoir antagoniste des bactéries endophytes, on a mis en interaction nos isolats avec l'agent pathogène *Fusarium oxysporum* f.sp. *albidinis* (Foa). L'apparition de zones d'inhibition a été enregistrée chez certaines interactions en montrant l'effet inhibiteur de certains de nos isolats (Figure 15). Les résultats numériques de l'activité antagoniste des 10 isolats sont représentés dans la Figure 16.

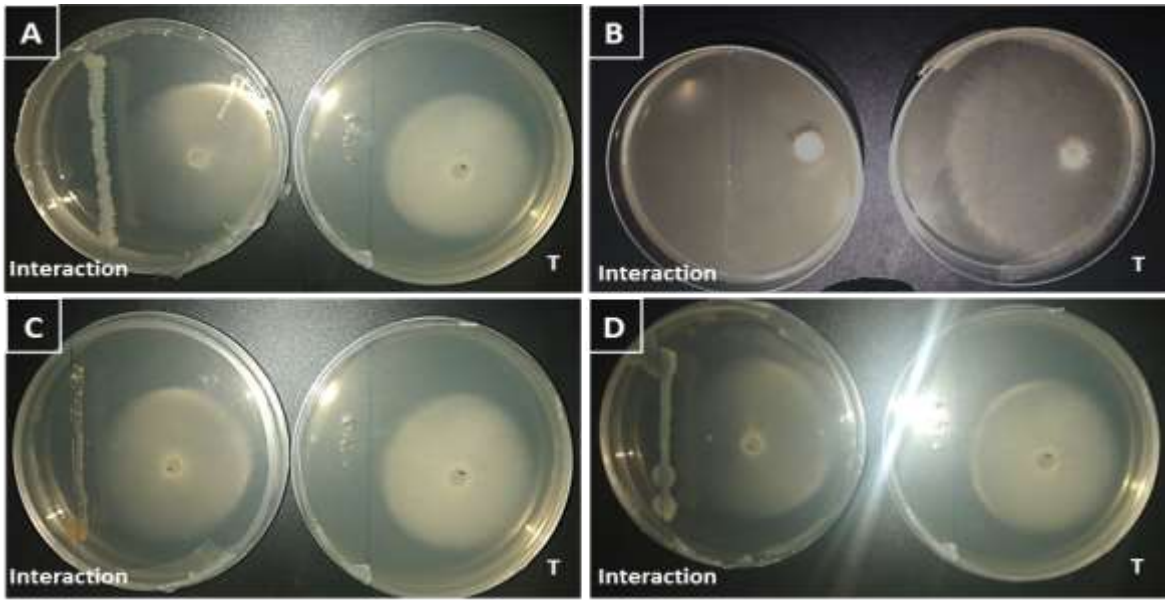

Figure 15. Résultats du pouvoir antagoniste *in vitro* des isolats endophytes sélectionnés.
(T) Témoin (Foa), (A) Foa × Rm1, (B) Foa × Rm4, (C) Foa × Rm2, (D) Foa × Rm7.

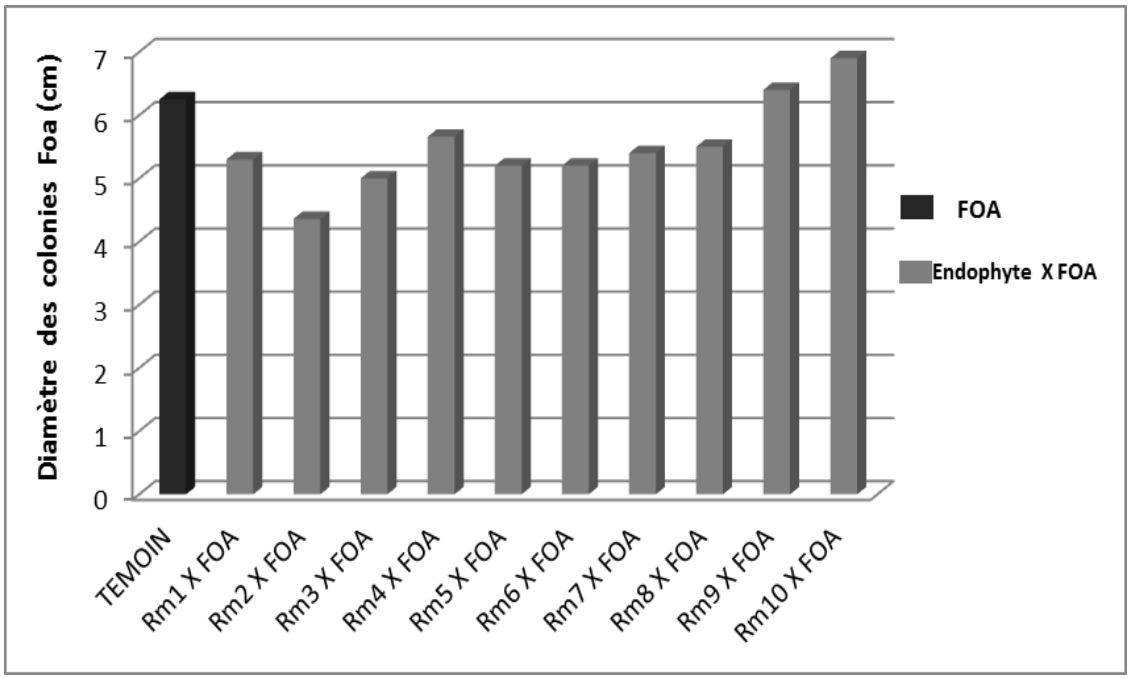

Figure 16. Valeurs moyennes des diamètres des colonies de l'agent pathogène (Foa) en interaction avec les isolats endophytes.

Le témoin représenté par les boites contenant seulement la souche de Foa, a enregistré une valeur moyenne de 6,25 cm. Les isolats qui ont montré un effet inhibiteur de la croissance mycélienne du pathogène sont Rm1, Rm2, Rm3, Rm4, Rm5, Rm6, Rm7 et Rm8, en enregistrant des valeurs inférieures au témoin allant de 4,36 cm (Rm1) à 5,66 cm (Rm4). Tandis que les deux isolats Rm9 et Rm10 ont enregistré des valeurs moyennes de 6,4 cm et 6,9 cm, respectivement, dépassant ainsi les valeurs enregistrées par le témoin (Figure 16).

4. Production de biofilm par les isolats endophytes

4.1. Production sur milieu gélosé rouge Congo

D'après les résultats obtenus de ce test, 7 isolats endophytes parmi le total de 10 ont pu produire du biofilm sur la gélose rouge Congo, montrant des colonies noires brillantées (Figure 17.A). Il s'agit des isolats Rm1, Rm2, Rm4, Rm5, Rm6, Rm9 et Rm10. Tandis que les trois isolats Rm3, Rm7 et Rm8 n'ont pas produit de biofilm, présentant des colonies rouges (Figure 17.B).

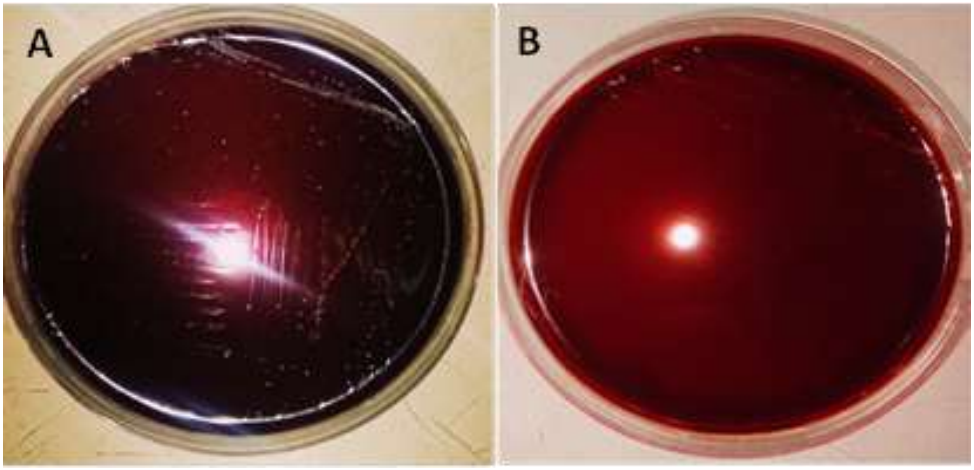

Figure 17. Résultats du test de la formation de biofilm sur milieu gélosé rouge Congo.
(A) Colonies noires (présence de biofilm), (B) Colonies rouges (absence de biofilm).

4.2. Quantification du biofilm sur microplaque

La quantification du biofilm a révélé la capacité de certains isolats à s'adhérer à la paroi des puits de la microplaque. Dans le cas des isolats Rm1, Rm2, Rm4, Rm5, Rm6, Rm9 et Rm10, les puits correspondant ont retenu une coloration très foncée du cristal violet, ce qui indique une production très importante des constituants du biofilm. Par contre, les isolats Rm3, Rm7 et Rm8 n'ont pas adhéré à la paroi des puits, dont ces derniers ont été complétement incolores identiquement au témoin (Figure 18). Les résultats de la quantification du biofilm sur microplaque confirment ceux obtenus dans le test précédent réalisé sur gélose rouge Congo.

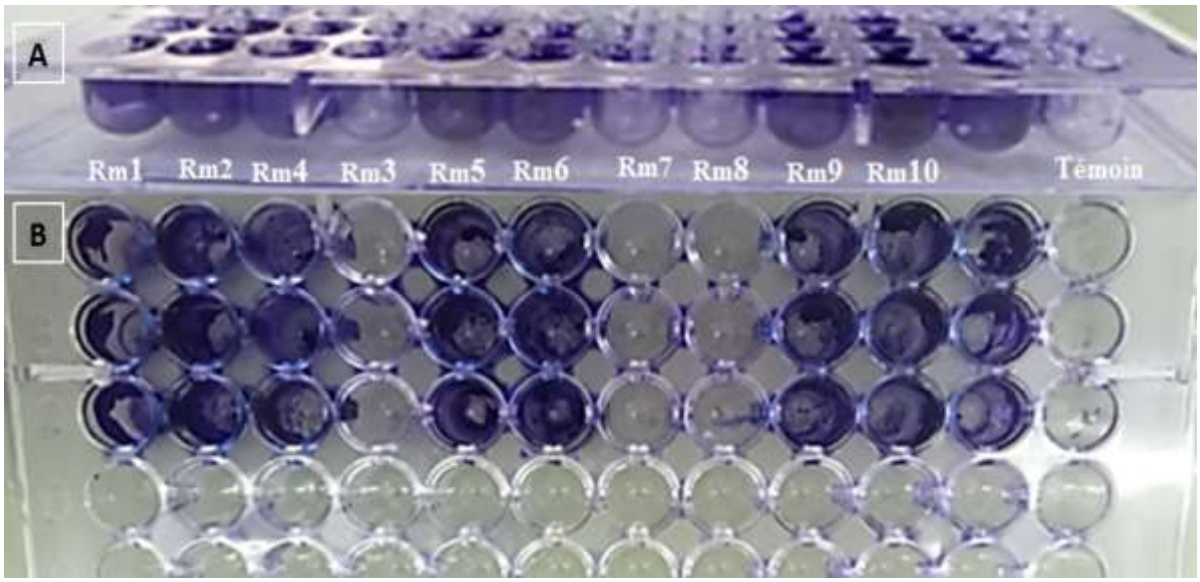

Figure 18. Résultats de la quantification du biofilm sur microplaque.

(A) Vue de profil, (B) vue de dessus.

5. Discussion générale

Les endophytes bactériens isolés des plantes médicinales possèdent un rôle vital, remplissent des missions importantes dans le maintien de la croissance et de la santé des plantes, où elles pourraient être utilisés comme inoculant pour établir un système de production agricole durable (Hassan, 2017, Kushwaha *et al.*, 2020).

Notre travail avait pour objectif d'isoler les bactéries endophytes du romarin (*Rosmarinus officinalis* L.), et de mettre en évidence la formation du biofilm par les isolats sélectionnés et leur éventuelle utilisation comme agent de bioprotection contre les agents phytopathogènes (*Fusarium oxysporum* f.sp. *albidini* dans notre étude).

La première partie de notre travail consiste à isoler les bactéries endophytes qui colonisent les racines du romarin. Aucune croissance bactérienne ou fongique n'a été enregistrée sur le milieu de culture utilisé pour la boite ensemencée par la solution du dernier rinçage des racines, indiquant l'efficacité de la méthode de désinfection, dont nous pouvons considérer que les étapes de la désinfection réalisées sont suffisantes pour éliminer les épiphytes et que les isolats obtenus peuvent être considérés comme des endophytes de la plante (Abu-Gharbia *et al.*, 2020). La clé majeure pour réussir à isoler et étudier les endophytes est de s'assurer de la stérilité de la surface des échantillons choisis (Hallmann *et al.*, 1997).

Après la sélection de dix isolats parmi 130 colonies poussées sur le milieu d'isolement, l'observation de ces isolats à l'état frais a montré la présence d'une diversité

morphologique importante (des bactéries sous forme de coques, de bacilles et de coccobacilles). La réalisation de la coloration de Gram et l'observation microscopique des frottis sous fort grossissement (×100), a montré que les isolats Rm1, Rm2, Rm3, Rm4, Rm5 et Rm7 sont des coques à Gram positif et que Rm6 est une coque à Gram négatif. Les deux bacilles Rm8 et Rm9 sont à Gram négatif, alors que Rm10 est une coccobacille à Gram positif. La coloration de Gram est une coloration de base de la bactériologie. Il existe deux grands groupes de bactéries basés sur les différences structurales de la paroi cellulaire. Cette coloration permet de distinguer ces deux groupes. C'est une coloration double qui permet de différencier les bactéries non seulement d'après leur forme et leur disposition, mais surtout d'après leur affinité pour les colorants liée à la structure de la paroi (Brian-Jaisson, 2014 ; Lezzar et Abdelmalek, 2016). Elle permet d'apprécier l'importance et l'équilibre de la flore entre les bactéries à Gram positif et à Gram négatif (Mariani-Kurkdjian *et al.,* 2016).

Dans un travail de Minakshi *et al.* (2021) sur la bioprospection des communautés bactériennes endophytiques bénéfiques associées à *Rosmarinus officinalis* pour soutenir la santé et la productivité des plantes, ils ont trouvé que parmi 42 souches isolées, 17 étaient à Gram positif et 25 à Gram négatif, variant de bâtonnets, cocci à coccobacilles. Les bactéries à potentiel de biocontrôle multiple comprennent des genres classés comme cellules Gram-positives, telles que les firmicutes *Bacillus, Paenibacillus* et *Brevibacillus*, les actinomycètes tels que les isolats de *Streptomycètes* et les isolats Gram-négatifs, y compris *Pseudomonas*, *Photorhabdus* et *Serratia* (Lee *et al.,* 2022).

Dans d'autres recherches, un total de 11 ordres et 88 genres de bactéries endophytes avaient documenté des associations avec des plantes médicinales dans la littérature. Les commandes les plus courantes étaient les Bacillales, les Enterobacterales et les Pseudomonadales, qui représentaient 72,62 %. Les genres les plus courants étaient *Bacillus* , *Pantoea* et *Pseudomonas* , qui représentaient 58,92 %. *Streptomyces* sont largement signalés comme favorisant la croissance et le développement des plantes, et*Bacillus* , *Pseudomonas* et *Paenibacillus* peuvent influencer la croissance, la résistance au stress et le métabolisme des plantes médicinales (Gao *et al.,* 2015 ; Zhao *et al.,* 2015 ; Qi *et al.,* 2021).

Dans une autre étude réalisée par Morgane en 2019 sur la diversité chimique et biologique d'endophytes de palmiers, neuf genres différents parmi les 66 souches bactériennes ont été isolés et identifiés comme *Bacillus, Paenibacillus, Caballeronia, Paraburkholderia, Luteibacter, Enterobacter, Serratia, Pantoea et Stenotrophomonas*. Des

souches des ordres *Bacilliales* et *Burkholderiales* sont couramment isolées lors de la recherche d'endophytes. Il a été montré que leur présence chez une plante-hôte pouvait prévenir de maladies, promouvoir le développement de la plante ou encore stimuler ses défenses (Choudhary et Johri, 2009 ; Depoorter *et al.*, 2016).

Les tests de recherche des enzymes respiratoires dans notre étude indiquent que tous les isolats endophytes produisent la catalase, par contre, seulement trois isolats (Rm1, Rm8 et Rm9) produisent l'oxydase. L'importance des réactions catalytiques, par lesquelles le peroxyde d'hydrogène est décomposé en eau et en oxygène, est bien connue en ce qui concerne la différenciation des organismes Gram-positifs. En outre, le test catalase est facile, rapide et peu coûteux (Taylor et Achanzar, 1972). L'activité puissante de la catalase est l'une des caractéristiques biochimiques déterminantes de plusieurs espèces bactériennes (Taylor et Achanzar, 1972). Par ailleurs, d'après White *et al.* (2021), l'absence de catalase modifie gravement la composition de la matrice EPS, entraînant une sensibilité accrue aux antibiotiques des bactéries associées au biofilm. Tandis que l'oxydase ou cytochrome oxydase, est un test de base d'identification des Grams-négatifs. La recherche de cette enzyme est utile dans le repérage des colonies de *Neisseriaceae* et dans le diagnostic des bacilles à Gram négatif (Delarras, 2014).

La capacité des bacilles à former des endospores résistantes facilite leur formulation et leur durée de conservation (Ongena et Jacques, 2008). Les spores des bactéries se présentent, examinées à l'état frais, dans la goutte pendante ou entre lame et lamelle sous forme de corpuscules fortement réfringents qui paraissent, suivant la mise au point du microscope, soit brillants et lumineux, soit sombres. Or il arrive que certains bacilles contiennent des granulations, le plus souvent des substances de réserve, qui ressemblent à première vue à des spores. Le but de la coloration des spores est de permettre au bactériologiste de s'assurer qu'il ne confond pas les spores avec ces granules fortement réfringents (Dorner 1926). Nos résultats de la coloration des spores avec le vert de malachite montre que les isolats Rm1, Rm2 et Rm10 sont des bactéries sporulant, tandis que les isolats Rm3, Rm4, Rm5, Rm6, Rm7, rm8 et Rm9 ne forment pas de spores. Dans l'étude menée par Minakshi *et al.,* 2021, la formation d'endospores a été observée chez 16 isolats parmi un total de 42 souches.

La corrélation entre les composés bioactifs produits par les bactéries endophytes et la tolérance aux maladies des plantes hôtes a été largement étudiée (Bibi *et al.*, 2012). De même, certaines bactéries endophytes de *Panax ginseng*, démontrent une activité antimicrobienne contre *Botrytis cinerea* et *Cylindrocarpon destructans* (Hong *et al.,* 2018). Cependant,

l'utilisation d'endophytes antagonistes comme agents de biocontrôle fait l'objet d'une attention particulière en tant qu'option intéressante pour la gestion de certaines maladies des plantes, avec un impact minimal sur l'environnement (De Silva *et al.,* 2019).

Dans notre étude, nous avons comparé la croissance du champignon phytopathogène *Fusarium oxysporum* f.sp. *albidinis*, cultivé seul sur milieu de culture, avec sa croissance en présence de nos 10 isolats endophytes sélectionnés. L'isolat Rm2 a montré l'effet inhibiteur le plus remarquable, tandis que Rm4, Rm9 et Rm10 ont présenté une faible activité antagoniste. Récemment, plusieurs études ont préconisé le rôle des endophytes, en particulier des endophytes bactériens, dans l'atténuation du stress abiotique et biotique chez les plantes cultivées en apportant aux plantes plusieurs avantages directs et indirects (Sarma et Saikia, 2014 ; Rho *et al.,* 2018). Les souches antagonistes potentielles d'endophytes peuvent être criblées pour leur capacité de lutte biologique car toutes les souches ne présentent pas une activité similaire. Ceci a été montré par Gonthier *et al.* sur l'utilisation de *Suillus luteus* contre les pathogènes fongiques *Heterobasidion irregulare* et *H. annosum* qui infectent le pin sylvestre (*Pinus sylvestris*) qui résultait en une diminution de la sensibilité à *H. annosum* uniquement, et non à *H. irregulare* (Gonthier *et al.,* 2019).

En outre, dans l'étude réalisée par Zicca *et al.* (2020) sur l'activité antagoniste des *Bacillus* endophytes de l'olivier contre *Xylella fastidiosa,* ils ont montré que les souches appartenant aux espèces *B. velezensis et B. amyloliquefaciens* ont montré la plus forte activité antagoniste contre la souche pathogène et que l'activité des souches appartenant aux espèces *B. subtilis, B. simplex, B. mojavensis, B. safensis et B. pumilus* était également remarquable. En revanche, les souches appartenant aux autres espèces de *Bacillus* utilisées dans cette étude n'ont provoqué aucune inhibition de la croissance de *X. fastidiosa*.

Les mécanismes de lutte biologique comprennent la production d'agents antifongiques ou antibactériens, de sidérophores, la compétition des nutriments et l'induction d'une résistance ou d'une immunité systémique de l'hôte (Thakur *et al.* 2020). Les endophytes peuvent également conférer aux plantes une résistance aux métaux et réduire leur toxicité en raison de leur capacité intrinsèque à tolérer différents types de métaux (Ma *et al.* 2016).

Diverses souches d'endophytes appartenant aux genres *Serratia, Pseudomonas, Rhizobium, Bacillus, Azotobacter, Burkholderia, Enterobacter, Bradyrhizobium, Streptomyces* et *Cladosporium*, ont été identifiés à partir de diverses espèces végétales, agissent comme agents de lutte biologique et peuvent sécréter des enzymes hydrolytiques pour éliminer des pathogènes fongiques des plantes tels que *F. oxysporum, Rhizoctonia*

solani, *Pythium ultimum* et *Sclerotium rolfsii* (Mercado-Blanco et Bakker, 2007 ; Jadhav, 2016 ; Khare et Yadav, 2017).

Les résultats obtenus dans notre étude montrent que 7 isolats parmi les 10 sélectionnés sont des souches capables de produire un biofilm. Une prévalence un peu inferieure (60%) a été rapportée par Ouchar *et al.,* (2013), avec des souches pathogènes issues de produits alimentaires. Par ailleurs, les substances exopolymères (EPS) peuvent déterminer les interactions plantes-microorganismes et ont un grand potentiel en tant que composés bioactifs (Jaroszuk-Ściseł *et al.,* 2020). Ces polymères, qui sont très souvent abondants dans les biofilms bactériens (40% à 95% de la biomasse totale), permettent aux micro-organismes de coloniser, de s'adapter et de prospérer dans de nouvelles niches écologiques et dans des conditions physiques, chimiques et biologiques extrêmes (Flemming et Wingender, 2001 ; Czaczyk et Myszka, 2004 ; Górska *et al.,* 2007 ; Donot *et al.,* 2012).

Plusieurs rhizobactéries telles que *Holomonas, Pseudomonas* et *Bacillus* produisent également des EPS, contribuant à atténuer le stress salin et arsenical chez le riz (Mukherjee *et al.* 2019). En 2018, Kakar *et al.* ont montré qu'avec la formation de biofilm, *Alcaligenes faecalis* et *Bacillus amyloliquefaciens* ont pu supprimer les maladies du riz. De plus, Haggag et Timmusk (2008) ont prouvé que *Paenibacillus polymyxa* inhibe la pourriture du collet chez *Arabidopsis*, en formant le biofilm. Avec cette même bactérie, Kasim *et al.* (2016) ont démontrés qu'elle améliore la tolérance de l'orge au stress dû à la salinité.

Chez *B. subtilis*, il a été révélé que la production et la sécrétion des molécules QS jouent un rôle important dans la formation du biofilm (Lopez *et al.,* 2009). En outre, les études révèlent que les EPS ainsi que les signaux QS jouent un rôle essentiel dans la formation du biofilm (Rinaudi et Giordano, 2010). Aujourd'hui, le biofilm joue un rôle clé dans la protection des cultures contre différentes conditions de stress et dans la production de cultures (Divjot *et al.,* 2020). Plusieurs rapports ont fourni des preuves indirectes que les AHL jouent un rôle dans l'immunité des plantes (Schikora *et al.,* 2011). Dans une étude récente réalisée par Suryanti *et al.* (2020), 9 isolats parmi un total de 20 avaient la capacité de réduire la formation de pigment de violacéine et les symptômes de la pourriture molle des pommes de terre en produisant les AHLs. Ces résultats montrent que la lactonase AHL produite par ces isolats peut être utilisée comme agent quorum quenching (QQ) pour inhiber le mécanisme QS de l'agent pathogène.

Conclusion

Conclusion

Au cours de ce mémoire, nous avons étudié les bactéries endophytes afin de mieux cerner leur importance dans la bioprotection et leur éventuelle utilisation en tant qu'agent de biocontrôle. La présente étude s'articule sur deux axes, le premier a permis de définir les différents rôles des bactéries endophytes dans les plantes et les mécanismes impliqués à travers une recherche bibliographique. Le deuxième vise à l'isolement et la caractérisation de différentes bactéries endophytes associées au romarin (*Rosmarinus officinalis* L.).

Les résultats de l'isolement ont démontré que les racines du romarin sont colonisées par des bactéries endophytes. Dans un premier temps, les résultats de l'examen macroscopique et microscopique des souches bactériennes endophytes ont mis en évidence 10 isolats bactériens appartenant à priori à différents genres (morphologie, type de Gram et production de spores).

Le pouvoir antagoniste des isolats endophytes vis-à-vis de la souche phytopathogène de *Fusarium oxysporum* f.sp. *albidinis* (Foa), a été testé par confrontation directe. L'isolat Rm2 a enregistré l'effet inhibiteur le plus important, ce qui suggère que c'est une souche potentiellement active, et est susceptible de produire des substances antifongiques et autres molécules impliquées dans l'inhibition des agents pathogènes. En outre, les isolats Rm1, Rm3, Rm5, Rm4, Rm5, Rm6 et Rm7 n'ont montré qu'une faible activité antagoniste, tandis que les deux isolats Rm9 et Rm10 n'ont présenté aucun effet inhibiteur envers la souche pathogène.

Les résultats de la mise en évidence de la formation de biofilm ont montré l'aptitude de certains isolats endophytes sélectionnés à produire des biofilms. Parmi un total de 10 bactéries, 7 isolats ont produit des biofilms sur la gélose rouge Congo ainsi que sur les parois de la microplaque.

Ce présent travail, bien que les essais ne soient que préludes, permet de mieux cibler et délimiter d'avance l'enchaînement des investigations futures. Ces bactéries endophyte ont une grande importance médicale et biotechnologique et mérite d'autres études plus approfondies. Il sera donc intéressant d'identifier davantage ces bactéries avec des méthodes génomiques, d'élargir les tests des isolats bactériens sur une gamme plus large de champignons et bactéries phytopathogènes, d'identifier les métabolites bioactifs des souches antagonistes, de tester

l'activité antagoniste des métabolites bioactifs *in vitro* mais aussi *in vivo*, comme il sera intéressant également de tester d'autres activités biologiques, telles que l'activité anti-oxydante et anticancéreuse, afin de les valoriser dans les différents domaines biotechnologiques.

Références Bibliographiques

Références bibliographiques

A

Abd El Daim I.A., Haggblom P., Karlsson M., Stenstrom E., Timmusk S., 2015 - *Paenibacillus polymyxa* A26 Sfp-type PPTase inactivation limits bacterial antagonism against *Fusarium graminearum* but not of *F. culmorum* in kernel assay. *Front. Plant Sci.* Vol (06). Pages: 368.

Abdelhakim B., Dakka N., Et-Touys A.,, Abrini j., Bakri Y.,2017 - Medicinal plant products targeting quorum sensing for combating bacterial infections. *Asian Pacific Journal of Tropical Medicine*, Vol 10(8), Pages: 729-743. Doi: https://doi.org/10.1016/j.apjtm.2017.07.021.

Abdelmalek A., lezzar A., 2016 - Les bactéries du groupe Klebsiella, entérobacter8-, Serratia responsables des bactériémies au CHU de Constantine et leurs profils de résistances aux antibiotiques. Mémoire de master, université des frères mentouri, ALgérie, p32.

Abu-Gharbia M. A. ,Rehab M. et Mohamed A. A.,2020 - Metabolic Profiling of Endophytic *Bacillus subtilis* US2 Isolated from *Rosmarinus officinalis* Leaves with Potential Antimicrobial Activity. *Journal of Pharmaceutical and Applied Chemistry*, Vol (6), pages : 9-20. DOI: http://dx.doi.org/10.18576/jpac/060102

Afzal I., Shinwari Z.Kh., Sikandar Sh., Shahzad Sh., 2019 - Bactéries endophytes bénéfiques pour les plantes : mécanismes, diversité, gamme d'hôtes et déterminants génétiques.In, *Recherche microbiologique, science direct.* Vol(221).Page : 36-49. DOI : https://doi.org/10.1016/j.micres.2019.02.001 .

Agnès R., Shelley M. P., Michael S. G., 2009 - Gilmore Microbial telesensing: probing the environment for friends, foes, and food Cell Host Microbe, vol: 6, Pages: 115-124.

Amara N., Bastiaan P. K., Gunnar F., Kaufmann, Michael M., 2011 - Inhibition macromoléculaire du quorum sensing : enzymes, anticorps et bien plus encore. *Chem Rev*, vol (111). Pages : 195 – 208.

Arrebola, E., Jacobs, R., Korsten, L., 2010. Iturin A is the principal inhibitor in the biocontrol activity of *Bacillus amyloliquefaciens* PPCB004 against postharvest fungal pathogens. *Appl. Microbiol*. Vol(108). Pages: 386–395.

Aswathy J., Veena P. K., Meritta J., Indu C. Nair and Remakanthan A., Radhakrishnan E.K. 2020 - Mécanismes favorisant la croissance des plantes des endophytes. In, *Microbial Endophytes (Biologie fonctionnelle et applications),Ed: Elsevier,* Pages 57-7. Doi : https://doi.org/10.1016/B978-0-12-819654-0.00003-X

Aude A., 2014 - Etude du rôle des sidérophores microbiens dans la modulation des défenses de la plante *Arabidopsis thaliana,* Université Paris Sud - Paris XI, Ecole doctorale Sciences du Végétal, Disponible sur : https://tel.archives-ouvertes.fr/tel-01249389. Consulter Le : 18/06/2022.

B

Bacon C.W., Hinton D.M., 2006 - Endophytes bactériens : La niche endophyte, ses occupants et son utilité. In, Gnanamanickam, *Ed: Plant-Associated Bacteria. Springer, Dordrecht.* DOI: https://doi.org/10.1007/978-1-4020-4538-7_5

Bais H.P., Fall R., Vivanco J.M., 2004 - Le contrôle biologique de *Bacillus subtilis* contre l'infection des racines d' *Arabidopsis* par *Pseudomonas syringae* est facilité par la formation de biofilm et la production de surfactine. *Physique Végétale*. Vol (134). Pages: 307–319.

Bakker, P.A., Pieterse, C., Van Loon, L.C. 2007 - Induced systemic resistance by fluorescent *Pseudomonas spp. Phytopathology*. Vol (97). Pages: 239-243.

Beloin, C., Roux, A., Ghigo, J.-M., 2008 - *Escherichia coli* biofilms. *In: Bacterial Biofilms. Springer*, Pages: 249–289.

Bent E., 2005 - Induced systemic resistance mediated by plant growth-promoting rhizobacteria (PGPR) and fungi (PGPF). In, Multigenic and induced systemic Resistance in Plants, *Ed: S. Tuzun and E. Bent: Springer.*

Bianciotto, V., Andreotti, S., Balestrini, R., Bonfante, P., Perotto, S., 2009 - Extracellular polysaccharides are involved in the attachment of *Azospirillum brasilense* and *Rhizobium leguminosarum* to arbuscular mycorrhizal structures. *Eur. J. Histochem.* Vol(45). Pages : 39–50.

Bibi F., Yasir M., Song G., Lee S., Chung Y., 2012 - Diversité et caractérisation des bactéries endophytes associées aux plantes d'estran et leurs effets antagonistes sur les phytopathogènes oomycètes. *Pathologie végétale J.* Vol(28). Pages : 20–31.DOI : 10.5423/ppj.Oa.06.2011.0123

Bicht N., Mishra S.K., Chauhan P.S.2020 - *Bacillus amyloliquefaciens* inoculation alters physiology of rice (*Oryza sativa L.* var. IR-36) through modulating carbohydrate metabolism to mitigate stress induced by nutrient starvation. *J. Biol. Macromol.* Vol(143). Pages : 937–951. DOI: 10.1016/j.ijbiomac.2019.09.154.

Bogino P.C., Oliva M.L., Sorroche F.G., Giordano W., 2013 - Le rôle des biofilms bactériens et des composants de surface dans les associations plantes-bactéries. *Int. J. Mol. Sci.* Vol (14). Pages : 15838–15859.

Boulezazen A., 2017- Evaluation de l'activité antioxydante et antimicrobienne d'une plante aromatique (*Rosmarinus Officinalis L.)* de la forêt Béni Melloul –Khenchela.Pages :63.

Bounoua M.Dj., ESSAIS D'utilisation des *Pseudomonas* spp. Et *Bacillus* spp dans le biocontrole de *Fusarium oxysporum f.sp. lycopersici* sur tomate et *verticillium dahliae* sur l'olivier. Université d'Oran, intérêt des microorganismes en agriculture et en agro-alimentaire. Page : 90.

Bourigault Y., Rodrigues S., Crépis A., Chane A., Taupin L., Bouteiller M., Dupont Ch., Merieau A., Konto- Ghiorghi Y., Boukerb A., Turner M., Hamon C., Dufour A., Barbey C., Laour X., 2022 - Biocontrol of Biofilm Formation: Jamming of Sessile-Associated Rhizobial Communication by Rhodococcal Quorum-Quenching. *Journal international des sciences moléculaires* .Vol : 22(15). Pages: 8241. DOI: 10.3390/ijms22158241

Bragard C., Caciagli P., Lemaire O., Lopez-Moya J.J., MacFarlane S., Peters D., Susi P., Torrance L., 2013 - Statut et perspectives du contrôle des virus végétaux par interférence avec la transmission vectorielle. *Phytopathol.* Vol(51). Pages : 177–201. DOI : 10.1146/annurev-phyto-082712-102346.

Brian-Jaisson F., 2014 - Identification et caractérisation des exopolymères de biofilms de bactéries marines. *école doctorale n° 548 « Mer et Sciences », Microbiologie / Biochimie.* Pages : 257.

Burketova L., Trda L., Ott P.G., Valentova O., 2015 - Inducteurs de résistance biosourcés pour une protection durable des plantes contre les agents pathogènes. *Biotechnol.* Vol (33). Pages: 994–1004. DOI: 10.1016/j.biotechadv.2015.01.004.

C

CMI (1978) Descriptions of Pathogenic Fungi and Bacteria, no. 211 *Fusarium oxysporum*. CAB International, Wallingford (GB).

CMI (1992) Descriptions of Pathogenic Fungi and Bacteria, no. 1111 *Fusarium oxysporum* f. sp. *albedinis*. CAB International, Wallingford (GB).

Chanway C.P., 1997 - Inoculation of tree roots with plant growth promoting soil bacteria: An emerging technology for reforestation Forest Science. Vol (43). Pages: 99-112.

Chernin L.S., 2011 – Quorum sensing signals as mediators of PGPR's benefical traits. In: Bacteria in Agrobiology : Plant Nutrient Management. *Springer link.* Pages: 209-236. DOI: https://doi.org/10.1007/978-3-642-21061-7_9

Choudhary D. K., Johri B. N., 2009 - Interactions of *Bacillus spp.* and plants – With special reference to induced systemic resistance (ISR). *Microbiol.* Vol(164). Pages: 493–513.

Chowdhury S.P., Uhl J., Grosch R., Alqueres S., Pittroff S., Dietel K., Schmitt-Kopplin P., Borriss R., Hartmann A., 2015 - Cyclic lipopeptides of *Bacillus amyloliquefaciens* subsp. *plantarum* colonizing the lettuce rhizosphere enhance plant defense responses toward the bottom rot pathogen *Rhizoctonia solani. Ed: Plant-Microbe Interact.*Vol(28). Pages: 984–995.

Christian N., Sullivan C., Visser D.N., Clay K., 2016 - Plant host and geographic location drive endophyte community composition in the face of perturbation. *Ed: Microb. Ecol.* Vol(72). Pages: 621–632.

Coico R. 2005 - Gram staining. Curr. Protoc. Microbiol. Appendix 3 : Appendix 3C.

Compant, S., Clément, C., Sessitsch A., 2010 - Plant growth-promoting bacteria in the rhizo- and endosphere of plants: Their role, colonization, mechanisms involved and prospects for utilization. *Soil Biology and Biochemistry* . Vol(42). Pages: 669-678.

Costerton, J.W., 1995 - Biofilms microbiens. *Revue annuelle de microbiologie.* Vol(49). Pages : 711-745. DOI : https://doi.org/10.1146/annurev.mi.49.100195.003431

D

De Favaro LCL, de Sebastianes FLS, Araujo WL. 2012 - Epicoccum nigrum P16, un endophyte de la canne à sucre, produit des composés antifongiques et induit la croissance des racines. DOI :https://doi.org/10

De Silva N.I., Siraprapa B., Lumyong S., Hyde K.D., 2019 - Utilisation d'endophytes comme agents de lutte biologique.In, Avis sur la biologie fongique. Vol : 33(2). Pages 133-148. DOI : https://doi.org/10.1016/j.fbr.2018.10.001.

Delalande L., Faure D., Raffoux A., Uroz S., D'Angelo-Picard C., Elasri M., Carlier A., Berruyer R., Petit A., Williams P., Dessaux Y., 2005 - La N-hexanoyl-L-homosérine lactone, un médiateur de la régulation bactérienne de la détection du quorum, présente une stabilité dépendante de la plante et peut être inactivée par la germination des semis de *Lotus corniculatus. Microbiol FEMS. Écol.* Vol(52). Pages: 13–20. DOI: 10.1016/j.femsec.2004.10.005

Delarras C., 2014 - Pratique en microbiologie de laboratoire ? Recherche de bactéries et de levures-moisissures. *Ed, Lavoisier,* Pages : 772. Disponible sur : https://books.google.dz/books?id=MSXJAwAAQBAJ&printsec=frontcover&hl=fr#v=onepage&q&f=false

Della Mussia S., 2014 - Les maladies des plantes, Le portail d'information sur la biodiversité et l'agriculture dans l'océan Indien. [En ligne]. Disponible sur : http://www.agriculture-biodiversite-oi.org/Nature-agriculture/Nouvelles-du-terrain/Dossiers-thematiques/Fiches-plantes-maladies-insectes/Les-maladies-des-plantes

Depoorter E., Bull M. J., Peeters Ch., Coenye T., Vandamme P., Mahenthiralingam E., 2016 - *Burkholderia*: an update on taxonomy and biotechnological potential as antibiotic producers. *Appl. Microbiol. Biotechnol. Vol*(100). Pages : 5215–5229.

Divjot K., Kusam L R., Tanvir K., Neelam Y., Ajar N. Y., Ali A. Rastegari, Anil K. S., 2020 - Chapitre 18 - Biofilms microbiens : Annotation fonctionnelle et applications

potentielles en agriculture et secteurs connexes. In : Développements nouveaux et futurs de la biotechnologie microbienne et de la bio-ingénierie : biofilms microbiens. Pages: 283-301. DOI: https://doi.org/10.1016/B978-0-444-64279-0.00018-9.

Dorner W., 1926 - UN PROCÉDÉ SIMPLE POUR LA COLORATION DES SPORES. Avec une planche en couleurs. *Le Lait, INRA Editions,* vol : 6 (51). Pages : 8-12. Disponible sur : https://hal.archives-ouvertes.fr/hal-00894818/document

Dubernard N., 2017 - Evaluation de l'efficacité de produits de biocontrôle à base de micro-organismes dans la lutte contre *Phytophthora nicotianae* sur lavande. *Production et Technologie du Végétal,* Université de Rennes I. Pages : 91.

E

Eilenberg J., Hajek A., Lomer C., 2001 - Suggestions for unifying the terminology in biological control. *BioControl.* Vol(46) Pages : 387–400. DOI: 10.1023/A:1014193329979.

Emberger.L., 1960- Traité botanique fascicule II. *Masson.* Pages : 335.

Erkmen O. 2021 - Practice 14 - Cultural characteristics of bacteria. *Laboratory Practices in Microbiology.* Pages: 135-141.

EPPO/CABI , 1997 - *Fusarium oxysporum* .f. sp. *albedinis*. In: Quarantine Pests for Europe, 2nd edn. CAB International, Wallingford (GB). pp. 758–763.

F

Fan B., Chen X.H., Budiharjo A., Bleiss W., Vater J., Borriss R., 2011 - Efficient colonization of plant roots by the plant growth promoting bacterium *Bacillus amyloliquefaciens* FZB42, engineered to express green fluorescent protein. *Biotechnol*. Vol(151). Pages : 303–311.

Flemming H.C., Wuertz S., 2019 - Bactéries et archées sur Terre et leur abondance dans les biofilms. *Rév. Microbiol.* Vol(17). Pages: 247–260.

Frank A.C., Saldierna Guzmán J. P., Shay E. J., 2017 - Transmission of bacterial endophytes. *Microorganisms* .Vol(5). Pages: 70.

Fravel, D., 1988 - Role of antibiosis in the biocontrol of plant diseases. *Annual Review of Phytopathology.* Vol(26). Pages : 75–91.

Freeman D.J, Falkiner F.R and Keane C.T., 1989 - New method for detecting slime production by coagulase negative staphylococci. J Clin Pathol. Vol(42).Pages :872–4.

G

Gaiero J.R., Mccall C.A., Thompson K.A., Day N.J., Best A.S., Dunfield K.E., 2013 - À l'intérieur du microbiome racinaire : endophytes racinaires bactériens et promotion de la croissance des plantes. Vol (100).Pages : 1738–1750. DOI : 10.3732/ajb.1200572.

Gao Y., Liu Q., Zang P., Li X., Ji Q., He Z., et al. (2015). Une bactérie endophyte isolée du Panax ginseng CA Meyer améliore la croissance, réduit la morbidité et stimule la biosynthèse des ginsénosides.Phytochem.Lett.Vol(11).Pages :132–138. 10.1016/j.phytol.2014.12.007.

Gayathri S., Saranya S., Mythili S., 2022 - Chapter 1 - Colonization, diversity, and distribution of endophytic microbial communities in different parts of plants. In, Mécanismes de biocontrôle des microorganismes endophytes. *Ed: Elsevier.* Pages : 1-30. DOI:https://doi.org/10.1016/B978-0-323-88478-5.00015-8

Gombert J. et Broucqsault L.M., 2018 - Biocontrôle: Définition, état des lieux et perspectives. *Journée d'Information Technique – Céréales et Protéagineux*. Disponible sur le site : file:///C:/Users/LENOVO/Downloads/10._JIT_2018_Biocontrole.pdf

Gonthier P., Giordano E., 2019 - Une symbiose ectomycorhizienne affecte différemment la sensibilité de l'hôte à deux pathogènes fongiques congénères. Ecol. Vol (39).Pages : 250–256. doi : 10.1016/j.funeco.2018.12.008.

H

Haas R.É., Defago G., 2005 - Lutte biologique contre les pathogènes du sol par les pseudomonades fluorescentes. *Microbiol* .Vol(3) .Pages: 307–319.

Haggag W., Timmusk S., 2008 - Colonization of peanut roots by biofilm-forming Paenibacillus polymyxa initiates biocontrol against crown rot disease. *J. Appl. Microbiol.* Vol(104). Pages: 961–969.

Hallmann, A. Quadt-Hallmann, W. F. Mahaffee, J. W. Kloepper; Can. J.,1997 - Bacterial endophytes in agricultural crops. *Microbiol.* vol (43).Pages :895-914.

Hall-Stoodley, L., Costerton, J.W., Stoodley, P., 2004. Bacterial biofilms: from the natural environment to infectious diseases. *Nat. Rev. Microbiol*. Vol(2). Pages: 95.

Hardoim, P. R., Overbeek L. S., Elsas J. D., 2008 - Properties of bacterial endophytes and their proposed role in plant growth. *Trends in Microbiology*. Vol(16). Pages: 463–471. DOI:10.1016/j.tim.2008.07.008.

Hassan S.E., 2017 - Plant growth-promoting activities for bacterial and fungal endophytes isolated from medicinal plant of *Teucrium polium L*. Vol 8(6). Pages: 687-695. DOI:10.1016/j.jare.2017.09.001.

He D.C., He M.H., Amalin D.M., Liu W., Alvindia D.G., Zhan J., 2021 - Contrôle biologique des maladies des plantes : une considération évolutive et éco-économique. *Pathogènes.* Vol 10 (10). Pages: 1311. DOI:10.3390/pathogens10101311.

Helfrich E. J. N. N., Vogel C. M., Ueoka R., Schäfer M., Ryffel F., Müller D. B., 2018 - Bipartite interactions, antibiotic production and biosynthetic potential of the Arabidopsis leaf microbiome. *Nat. Microbiol.*Vol(3) Pages: 909–919. doi: 10.1038/s41564-018-0200-0

Hinton D.M. et Bacon, C.W., 1995 - *Enterobacter cloacae* is an endophytic symbiont of corn. Mycopathology.Vol(129).Pages :117–125.

Howell C.R., 2003 – Mechanisms employed by *trichoderma* species in the biological control of plant diseases: the history and evolution of current concepts. *Plant disease.* Vol (87).Pages: 04-10.

Hyde K.D., Soytong K., 2008 - The fungal endophyte dilemma. *Fungal Diversity*. Vol (33). Pages : 163-173.

J

Jadhav H.P.,2016 - Enzymes hydrolytiques Sayyed RZ des microbes rhizosphériques dans la protection des cultures. *MOJ Cell Sci. Rep.*Vol(3). Pages : 135–136.

Jamiołkowska A. 2020 - Composés naturels en tant qu'éliciteurs de la résistance des plantes contre les maladies et nouvelles stratégies de lutte biologique. *Agronomie.* Vol(10).Pages : 173. DOI : 10.3390/agronomie10020173.

Jaroszuk-Ściseł J, Nowak A, Komaniecka I, Choma A, Jarosz-Wilkołazka A, Osińska-Jaroszuk M, Tyśkiewicz R, Wiater A, Rogalski J., 2020 - Differences in Production, Composition, and Antioxidant Activities of Exopolymeric Substances (EPS) Obtained from Cultures of Endophytic *Fusarium culmorum* Strains with Different Effects on Cereals. Molecules.Vol 25(3). Pages: 616. doi: 10.3390/molecules25030616.

Jayaprakashvel, M., Mathivanan, N., 2011 - Management of plant diseases by microbial metabolites . In, Bacteria in Agrobiology : Plant Nutrient Management.*Springer link* . DOI: https://doi.org/10.1007/978-3-642-21061-7_10

Jianfei L., Kaifei F., Chenglin W., Kewei Q., Fei L., Lijun Z., 2018 - "In-Group" Communication in *Marine Vibrio* : A Review of N-Acyl Homoserine Lactones-Driven Quorum Sensing. *Devant. Cellule. Infecter. Microbiol* .Vol (8). Pages: 139. DOI: 10.3389/fcimb.2018.00139.

K

Kakar K., Nawa, Z., Cui Z., Almoneafy A., Ullah R., Shu Q.Y., 2018 - Rhizosphere-associated Alcaligenes and Bacillus strains that induce resistance against blast and sheath blight diseases, enhance plant growth and improve mineral content in rice. J. *Appl. Microbiol.* Vol(124). Pages: 779–796.

Kandel S. L., Joubert P. M., Sharon L.D., 2017 - Bacterial endophyte colonization and distribution within plants. *Microorganisms*. Vol(5). Pages: 77–103.

Kaplan J.A., 2010 - Biofilm dispersal: mechanisms, clinical implications, and potential therapeutic uses. *Journal Dent. Res.* Vol (89).Pages : 205–218.

Kasim, W.A., Gaafar, R.M., Abou-Ali, R.M., Omar, M.N., Hewait, H.M., 2016 - Effect of biofilm forming plant growth promoting rhizobacteria on salinity tolerance in barley. Ann. Agric. Sci. 61, 217–227.

Kathirvel B., LewisOscar F., Mylonakis E., Sabarathinam SH., Nath Verma T., Arivalagan P., 2020 - Biofilm and Quorum sensing mediated pathogenicity in *Pseudomonas aeruginosa. Process Biochemistry*. Vol(96). Pages: 49 -57. DOI: https://doi.org/10.1016/j.procbio.2020.06.001.

Khan N., Martinez-Hidalgo P., Ice T.A., Maymon M., Humm E.A., Nejat N., Sanders E.R., Kaplan D., Hirsch A.M., 2018 – Antifungal activity of *Bacillus* species against *Fusarium* anD analysis of the potential mechanisms used in biocontrol. *Front Microbiol*.Vol(9). Pages: 2363. DOI: 10.3389/fmicb.2018.02363.

Khare E., Yadav A., 2017- Le rôle des systèmes enzymatiques microbiens dans la promotion de la croissance des plantes. Clim. Chang. Environ. Soutenir.Vol(5).Pages : 122. DOI : 10.5958/2320-642X.2017.00013.8.

Kobayashi D.Y., Palumbo J.D., 2000 - Bacterial endophytes and their effects on plants and uses in agriculture. In, Bacon CW, White JF. *Microbial endophytes.* Pages: 199–236.

Köhl, J., Kolnaar, R., Ravensberg, W. J., 2019 - Mode of action of microbial biological control agents against plant diseases: relevance beyond efficacy. *Frontiers in plant science*. Vol(10). Pages: 845. DOI : 10.3389/fpls.2019.00845.

Kostakioti M., Hadjifrangiskou M., Hultgren S.J., 2013 - Bacterial biofilms: development, dispersal, and therapeutic strategies in the dawn of the postantibiotic era. *Cold Spring Harb. Perspect. Med.* Vol 3(4). DOI : 10.1101/cshperpect.a010306.

Kunkle U. et Lobmeyer T.R, 2007- Plantes médicinales. Identification, récolte, propriétés et emplois. *Ed.Parragon* .Pages: 87-99.

Kushwaha P., Kashyap P.L., Srivastava A.K., Tiwari R.K., 2020 - Stimulation de la croissance des plantes et activité antifongique dans les souches endophytes de *Bacillus* du millet perlé (*Pennisetum glaucum*). *Journal brésilien de microbiologie.* Vol 51 (1). Pages : 229–241. DOI : https://doi.org/10.1007/s42770-019-00172-5.

L

Lamb, T.G., Tonkyn, D.W., Kluepfel, D.A. 1996 - Movement of *Pseudomonas aureofaciens* from the rhizosphere to aerial plant tissue. *Microbiol.* Vol(42). Pages:1112–1120.

Latha, P., Karthikeyan, M., Rajeswari, E., 2019 - Bactéries endophytes : perspectives et applications pour la gestion des maladies des plantes. In, Plant Health Under Biotic Stress. *Springer, Singapour*. Pages: 50. DOI : https://doi.org/10.1007/978-981-13-6040-4_1.

Latz M.A.C., Jensen B., Collinge D.B., Jørgensen H.J.L., 2018 - Champignons endophytes en tant qu'agents de lutte biologique : élucider les mécanismes de suppression des maladies. *Diversité de l'écologie végétale* .Vol 11 (5-6). Pages : 555 – 567.

Lee J.H., Anderson A.J., Kim Y.C., 2022 - Root-Associated Bacteria Are Biocontrol Agents for Multiple Plant Pests. Microorganisms.Vol10(5). Pages :1053. doi: 10.3390/microorganisms10051053.

Legein M., Smets W., Vandenheuvel D., Eilers T., Muyshondt B., Prinsen E., Samson R., Lebeer S., 2020 - Modes d'action du biocontrôle microbien dans la phyllosphère. *Microbiol*. Pages :18.

Li H.Y., Tian X., 2012 - Quorum Sensing and Bacterial Social Interactions in Biofilms. Vol 12 (3). Pages: 2519-2538. DOI: https://doi.org/10.3390/s120302519.

Li Y., Li J., Liu B, Wang Y., 2019 - Avancées de la recherche sur les molécules signal régulant les biofilms. *Journal mondial de microbiologie et de biotechnologie*. Vol 35 (8). Pages: 1-8.

Lodewyckx C., Vangronsveld J., Porteous E. B., Moore S., Taghavi M., Mergeay ,Van Der L., 2002 - Endophytic bacteria and their potential applications. *Crit. Rev. Plant Sci.* Vol(21). Pages: 583–606.

Loh J., Pierson E.A., Stacey G. Chatterjee U.N., 2002 - Quorum sensing chez les bactéries associées aux plantes. *Plant Biol*. Vol (5). Pages :285–290.

M

Ma Y., Rajkumar M., Zhang C., Freitas H., 2016 - Rôle bénéfique des endophytes bactériens dans la phytoremédiation des métaux lourds. J Environ Gérer. Vol(174).Pages : 14–25. doi : 10.1016/j.jenvman.2016.02.047.

Madsen, J.S., Burmølle, M., Hansen, L.H., Sørensen, S.J., 2012 - The interconnection between biofilm formation and horizontal gene transfer. FEMS Immunol. *Med. Microbiol.* Vol(65). Pages: 183–195.

Manisha A. P., Jitendra K., Saloni G., Neeru B., Poonam M., Roma K., Charu D. R., Vachaspati M., Jasleen K., 2022 - Stratégies majeures de contrôle biologique des agents

pathogènes des plantes. *Pathogens* .Vol 11(2). Pages: 273. DOI:10.3390/pathogens11020273.

Manoj K.S., Anjali C.S.,Baby K., Brijendra K.K., Rajesh K., 2020 – Chapitre 12: Plant and soil-associated biofilm-forming bacteria: Their role in green agriculture, In, New and Future Developments in Microbial Biotechnology and Bioengineeringed. *Science direct,* Pages 151-164.

Mariani-Kurkdjian P., Bonacorsi S., Bingen E.,2016 - Diagnostic bactériologique des infections gastro-intestinales. Bactériologie Médicale. Pages : 149–61. doi: 10.1016/B978-2-294-74616-1.00015-7.

Maric, S., Vranesˇ, J., 2007- Characteristics and significance of microbial biofilm formation. *Period. Biol.* Vol(109). Pages: 115–121.

Matilla, M.A., Ramos, J.L., Bakker, P.A.H.M., Doornbos, R., Badri, D.V., Vivanco, J.M., Ramos-Gonza´lez, M.I., 2009 - *Pseudomonas putida* KT2440 causes induced systemic resistance and changes in Arabidopsis root exudation. *Environ. Microbiol.* Vol(2). Pages: 381–388.

Matthew W., Marcelo P.S., Vanessa S., 2006 - AI-3 synthesis is not dependent on luxS in *Escherichia coli* J Bacteriol, vol (168). Pages: 5668-5681.

Mercado-Blanco J., Bakker P.A.H.M.,2007 - Interactions entre plantes et bénéfiques Pseudomonas spp. : Exploitation des traits bactériens pour la protection des cultures. *Antonie Leeuwenhoek.* Vol(92). Pages : 367–389. doi : 10.1007/s10482-007-9167-1.

Minakshi Sh., Gaurav S., Anjali Ch.,2021- Bioprospecting beneficial endophytic bacterial communities associated with Rosmarinus officinalis for sustaining plant health and productivity.Ed: World Journal of Microbiology and Biotechnology. Vol (37). Pages : 17.

Morgane Barthélémy, Etude de la diversité chimique et biologique d'endophytes de palmiers, Thèse de doctorat en Chimie des substances naturelles, sous la direction de Véronique EPARVIER et David TOUBOUL, Sorbonne Université, 2019, Page :358.

Muhammad MH, Idris AL, Fan X., Guo Y., Yu Y., Jin X., Qiu J., Guan X. et Huang T. (2020). Au-delà du risque : les biofilms bactériens et leurs approches de régulation. Frontières en microbiologie , 11 , 928. https://doi.org/10.3389/fmicb.2020.00928.

Mukherjee P., Mitra A., Roy M., 2019 - Les rhizobactéries d' *Halomonas Avicennia* marina des Sundarbans indiens favorisent la croissance du riz sous des contraintes salines et de métaux lourds grâce à la production d'exopolysaccharides. *Microbiol avant.* Vol(10). Pages: :1207. doi : 10.3389/fmicb.2019.01207.

N

Narayanasamy P.,2013 - Detection and identification of fungal biological control agents Biological Management of Diseases of Crops. *Progress in Biological Control, Springer*. vol. (15). Pages: 9-98

O

Oerke E.C. 2006 - Crop losses to pests. *Journal Agric. Sci.* Vol(144). Pages :31–43. DOI: 10.1017/S0021859605005708.

Ongena M., Jacques P., Delfosse P., Thonart P., 2002 - Unusual traits of the pyoverdin mediated iron acquisition system in *Pseudomonas putida* strain BTP1. *Biometals.* Vol 15 (1). Pages : 1-13.

OEPP/EPPO, 2003 - Normes OEPP. Bulletin 33, Pages: 265–269. Disponible sur le site : https://www.eppo.int/media/uploaded_images/RESOURCES/eppo_standards/pm7/pm7-016-01-fr.pdf

O'toole G.A., 2000 - Biofilms microbiens : de l'écologie à la génétique moléculaire. Revues de microbiologie et de biologie moléculaire, 64, 847-867. DOI : https://doi.org/10.1128/MMBR.64.4.847-867.2000

P

Pettipher G.L., Jay J.M. et Wang H.H., 2005- Microbiological techniques. *Encyclopedia of Analytical Science (2nd Edition).*Pages: 16-25.

Poveda J., Abril-Urias P., Escobar C., 2020 - Contrôle biologique des nématodes phytoparasites par des champignons filamenteux inducteurs de résistance : *Trichoderma*, champignons mycorhiziens et endophytes. *De face. Microbiol*. Vol (11).Pages: 992. DOI:10.3389/fmicb.2020.00992.

Priya J., Sristi K., Sankalp M., Vijaykant D., Shashank K.M., Puneet S.Ch., 2022 - Chapitre 8 : Nouvelles tendances dans les applications endophytes pour la gestion des maladies des plantes. In, Mécanismes de biocontrôle des microorganismes endophytes.,*science direct*, Pages : 167-180. DOI : https://doi.org/10.1016/B978-0-323-88478-5.00014-6

Q

Quadt-Hallmann, A. and Kloepper, J.W. 1996 - Immunological detection and localization of the cotton endophyte *Enterobacter asburiae* JM22 in different plant species. *Can. J. Microbiol.* Vol(42). Pages :1144–1154.

Quezel.p., et Santa s, 1963 -Nouvelle flore d'Algérie et des régions désertiques méridionales Tome II. *C.N.R.Sc*. Pages : 781-793.

Qi Y., Li X., Wang J., Wang C., Zhao S., 2021 - Efficacité des bactéries favorisant la croissance des plantes *Streptomyces werraensis* F3 pour les modifications chimiques du sol malade du ginseng. *Biocontrôle Sci. Technol*.Vol(31).Pages:219–233. DOI: 10.1080/09583157.2020.1843598

R

Reiner K., 2010 - Catalase Test Protocol. *American Society for Microbiology*.

Reinhold-Hurek B., Hurek T., 1998 - Life in grasses: diazotrophic endophytes Trends Microbiol., Vol (6). Pages: 139-144.

Rho H., Hsieh M., Kandel S.L., Cantillo J., Doty S.L., Kim S.H., 2018 - Les endophytes favorisent-ils la croissance des plantes hôtes sous stress ? Une méta-analyse sur l'atténuation du stress des plantes par les endophytes. *Microb. Écol.* doi : 10.1007/s00248-017-1054-3.

Riedel k., Köthe M., Kramer B., Saeb W., Astrid Gotschlich, Aldo Ammendola, Eberl L., 2006 - Conception assistée par ordinateur d'agents qui inhibent le système de détection de quorum cep de *Burkholderia cenocepacia* Antimic Agents Chemoth. Vol(50). Pages: 318 -323. DOI : https://doi.org/10.1128/AAC.50.1.318-323.2006.

Rinaudi L.V., Giordano W., 2010 - An integrated view of biofilm formation in rhizobia. FEMS Microbiol. Vol: 304, 1–11.

Roosjen A., Kaper H.J., Van Der H.C, Norde W., Busscher H.J., 2003 - Inhibition de l'adhérence des levures et des bactéries par des brosses en poly (oxyde d'éthylène) sur du verre dans une chambre à flux à plaques parallèles. *Microbiologie*. Vol (149).Pages: 3239–3246.

Rosenblueth M., Martínez-Romero E., 2006 - Bacterial endophytes and their interactions with hosts. *Molecular Plant-Microbe Interactions*. Vol(19). Pages: 827–837.

Rumbaugh K.P. Sauer K., 2020 - Biofilm dispersion. *Nature Reviews Microbiology*. Vol 18(10). Pages : 571-587. DOI : https://doi.org/10.1038/s41579-020-0385-0

Ryan R.P., Germaine K., Franks A., Ryan D. J., Dowling D.N., 2008 - Bacterial endophytes: Recent developments and applications FEMS Microbiology Letters, Vol (278). Pages: 1-9.

S

Saenz H.L, Augsburger V., Vuong C., Ralph W. J., Götz F., Otto M., 2000 - Inducible expression and cellular location of AgrB, a protein involved in the maturation of the staphylococcal quorum-sensing pheromone. *Microbiol* .Vol(174). Pages: 452-457.

Sarma R.K., Saikia R., 2014 - Atténuation du stress hydrique chez le haricot mungo par la souche Pseudomonas aeruginosa GGRJ21. Sol végétal. Vol(377). Pages : 111–126. doi : 10.1007/s11104-013-1981-9.

Savary S., Willocquet L., Pethybridge S.J., Esker P., McRoberts N., Nelson A., 2019 - The global burden of pathogens and pests on major food crops. *Nat. Ecol.* Vol(3). Pages :430–439. DOI: 10.1038/s41559-018-0793-y.

Schaeffer A.B., et Fulton M.?1933 - A simplified method of staining endospores. *Science.* Vol(77).Pages :194.

Schikora A., Sebastian T. Schenk, Elke S., Molitor A., Zuccaro A., Kogel K.,2011 - N-Acyl-Homoserine Lactone Confers Resistance toward Biotrophic and Hemibiotrophic Pathogens *via* Altered Activation of AtMPK6 .*Plant Physiology,* Vol (157), Pages 1407–1418, https://doi.org/10.1104/pp.111.180604.

Sedjelmassi A., 1993- Les plantes médicinales du Maroc, Najah et El Djadida Casa. pp.201-203.

Selin, C., Habibian, R., Poritsanos, N., Athukorala N.P., Fernando, D., De Kievit, T.R., 2010 - Phenazines are not essential for *Pseudomonas chlororaphis* PA23 biocontrol of *Sclerotinia sclerotiorum,* but do play a role in biofilm formation. *FEMS Microbiol. Ecol.* Vol(71). Pages:73–83.

Shahzad R., Khan A.L., Saqib B., Sajjid A., Lee I.J., 2018 - What is there in seeds? Vertically transmitted endophytic resources for sustainable improvement in plant growth . *Front. Plant Sci.* Vol 9(24).

Shields P. et Cathcart L. (2010). Oxidase Test Protocol. *American Society for Microbiology.*

Sieper T., Forczek S., Matucha M., Krämer P., Hartmann A., Schröder P., 2014 - L'absorption de N-acyl-homosérine lactone et le transport systémique dans l'orge reposent sur les parties actives de la plante. *Nouveau phytol.* Vol (201). Pages: 545–555. DOI: 10.1111/nph.12519.

Sinde, E., Carballo, J., 2000 - Attachment of *Salmonella sp.* and *Listeria monocytogenes* to stainless steel, rubber and polytetrafluorethylene: the influence of free energy and the effect of commercial sanitizers. *Food Microbiol*. Vol(17). Pages : 439–447.

Sommerhalder R.J., McDonald B.A., Mascher F., Zhan J., 2010 - Les recombinants sexuels contribuent de manière significative aux épidémies causées par l'agent pathogène du blé

Phaeosphaeria nodorum . Phytopathologie. Vol(100). Pages : 855–862. DOI : 10.1094/PHYTO-100-9-0855.

Souza Vandenberghe L.P., Garcia L.M., Rodrigues C., Camara M.C., de Melo Pereira G.V., de Oliveira J., Soccol C.R., 2017 - Applications potentielles des micro-organismes probiotiques végétaux dans l'agriculture et la foresterie. *AIMS Microbiol*. Vol(3). Pages: 629–648.

Stepanovic S., Dragana V., Veronika H., Giovanni D. B., Sodanka D., Ivana I. et Filip R., 2007 - Quantification of biofilm in microtiter plates: overview of testing conditions and practical recommendations for assessment of biofilm production by staphylococci.Vol(115). Pages : 9- 891.

Stoodley P., Cargo R., Rupp C.J., Wilson S., Klapper I., 2002 - Biofilm material properties as related to shear-induced deformation and detachment phenomena. *Journal Ind. Microbiol. Biotechnol.* Vol(29). Pages: 361–367.

Stoodley P., Hall-Stoodley L., Boyle J.D., Jorgensen F., Lappin-Scott H.M., 2000 - Environmental and genetic factors influencing biofilm structure. In: Allison, D., Gilbert, P., Lappin-Scott, H.M., Wilson, M. (Eds.), Community Structure and Cooperation in Biofilms. Cambridge University Press, Cambridge, UK. Pages : 54–64.

Struss A.K., Pasini P., Flomenhoft D., Shashidhar H., Daunert S., 2012 - Investigating the effect of antibiotics on quorum sensing with whole-cell biosensing systems Anal Bioanal Chem, Vol (402), Pages: 3227-3236.

Suryanti E., Wahyudi A., Akhdiya A. et Rusmana I., 2020 - ACYL homoserine lactone lactonase bacteriapotential as biocontrol agent ofsoft rot infection. Malays. Appl. Biol., vol 49(1). Pages :131–140. Disponible sur le site : https://jms.mabjournal.com/index.php/mab/article/view/1664/154 .

T

Taylor W.I., Achanzar D., 1972 - Test de catalase comme aide à l'identification des Enterobacteriaceae . Appl Microbiol. Vol(24). Pages: 58–61.DOI : 10.1128/am.24.1.58-61.1972.

Thakur M.P., Phillips H., Brose U., De Vries FT., Lavelle P., Loreau M., Mathieu J., Mulder C., Van der Putten W.H., Rillig M.C., Wardle D.A., Bach E.M., Bartz M., Bennett JM., Briones M., Brown G., Decaëns T., Eisenhauer N., Ferlian O., Guerra C.A., Cameron E.K., 2020 - Towards an integrativee understanding of soil biodiversity. Biol Rev Camb Philos Soc. Vol(95). Pages:350–364. doi: 10.1111/brv.12567.

The International Biocontrol Manufacturers Association , SEPTEMBRE 2018, DÉFINITION IBMA - Bioprotection comme terme global pour toutes les technologies de biocontrôle,

sur le site : https://ibma-global.org/latest-news-2/ibma-definition-bioprotection-as-the-global-term-for-all-biocontrol-technologies ,consulter le : 28/05/2022.

The International Biocontrol Manufacturers Association, 2022, Biocontrôle & Protection des plantes, sur le site : https://www.ibmafrance.com/biocontrole/ consulter le : 17/06/2022.

Timmusk S., Behers L., Muthoni J., Muraya A., Aronsson A.C., 2017 - Perspectives et défis de l'application microbienne pour l'amélioration des cultures. *Devant. Usine Sci.* Vol(8). Pages: 49. DOI: 10.3389/fpls.2017.00049

Tripathi S., Kamal S., Sheramati I., Oelmuller R., Varma A., 2008 - Mycorrhizal fungi and other root endophytes as biocontrol agents against root pathogens. *Mycorrhiza.* Vol (3). Pages: 281-306.

U

Ulloa-Ogaz AL., Muñoz-Castellanos L., Nevárez-Moorillón G., 2015 - Biocontrôle des phytopathogènes : la production d'antibiotiques comme mécanisme de contrôle A. Méndez-Vilas (Ed.) , *The Battle Against Microbial Pathogens: Basic Science, Technological Advances and Educational Programs (1st ed.)*. Pages : 305 – 309.

V

Velmourougane K., Prasanna R., Saxena A.K., 2017 - Agriculturally important microbial biofilms: present status and future prospects. *Journal BasicMicrobiol*. Vol (57).Pages: 548–573.

Verma S. C., Singh A., Chowdhury S. P., Tripathi A. K., 2004 - Endophytic colonization ability of two deep-water rice endophytes, *Pantoea sp*. and *Ochrobactrum sp*. using green fluorescent protein reporter. *Biotechnology Letters*. Vol(26). Pages: 425–429.

Visick K., Skoufos L. 2011 - Capteur à deux composants requis pour la colonisation symbiotique normale des scolopes d'*Euprymna* par *Vibrio fischeri*. *Journal Bacteriol* .Vol(183). Pages : 835 – 842.

Vlamakis H., Chai Y., Beauregard P., Losick R., Kolter R., 2013 - Sticking together: building a biofilm the *Bacillus subtilis* way. *Nat. Rev. Microbiol*. Vol(11). Pages : 157.

W

White A.N., Learman B.S., Brauer A.L., Armbruster C.E.,2021 - Catalase Activity is Critical for Proteus mirabilis Biofilm Development, Extracellular Polymeric Substance Composition, and Dissemination during Catheter-Associated Urinary Tract Infection. *Infect Immun*. Vol(16) ; Pages : 89. doi: 10.1128/IAI.00177-21.

Williams P. 2007 - Détection de quorum, communication et signalisation inter-royaumes dans le monde bactérien. [En ligne] *Microbiologie.* Vol 153 (12).pages : 3923–3938. DOI : 10.1099/mic.0.2007/012856-0.

Wu K., Fang Z., Guo R., Pan B., Shi W., Yuan S., Guan H., Gong M., Shen B., Shen Q., 2015 - Pectin enhances bio-control efficacy by inducing colonization and secretion of secondary metabolites by *Bacillus amyloliquefaciens* SQY 162 in the rhizosphere of tobacco. *PLoS One.* Pages:10.

Wu W., Chen W., Liu S., Wu J., Zhu Y., Qin L. et Zhu B., 2021 – Benefical relationships between endophytic bacteria and medicinal plants. *Frontières en phytologie* . Vol(12). DOI : https://doi.org/10.3389/fpls.2021.646146

X

Xu Z., Zhang R., Wang D., Qiu M., Feng H., Zhang N., Shen Q., 2014 - Enhanced control of cucumber wilt disease by *Bacillus amyloliquefaciens* SQR9 by altering the regulation of its DegU phosphorylation. *Appl. Environ. Microbiol*. Vol(80). Pages : 2941–2950.

Y

Yadav G., Meena M., 2021 - Bioprospection des endophytes dans les plantes médicinales du désert du Thar : une ressource attrayante pour les produits biopharmaceutiques. Rep Biotechnol (Amst) . Pages : 30. DOI: https://doi.org/10.1016%2Fj.btre.2021.e00629

Yang L.N., Pan Z.C., Zhu W., Wu E.J., He D.C., Yuan X., Qin Y.Y., Wang Y., Chen R.S., 2019 - Thrall PH Amélioration de la durabilité agricole grâce à la diversification au sein des espèces. *Nat. Soutenir.* Vol(2). Pages : 46–52. DOI : 10.1038/s41893-018-0201-2.

Yi Z., GUO Sh., Sui F., Yang Q., Wei Y., Li X. 2021 - Applications des systèmes de détection de quorum en biologie synthétique. *Biotechnologie chinoise*. Vol 41(11). Pages: 100-109.

Z

Zeriouh H., Vicente A., Perez-Garcı´a A., Romero D., 2014 - Surfactin triggers biofilm formation *of Bacillus subtilis* in melon phylloplane and contributes to the biocontrol activity. *Environ. Microbiol.* Vol(16).Pages: 2196–2211.

Zhou H., Luo C., Fang X., Xiang Y., Wang X., Zhang R., Chen Z., 2016 - Loss of GltB inhibits biofilm formation and biocontrol efficiency of Bacillus subtilis Bs916 by altering the production of g-polyglutamate and three lipopeptides. PLoS One 11, e0156247.

Zhou M., Wang W., 2018 - Progrès récents dans les inducteurs chimiques synthétiques de l'immunité des plantes. *De face. Usine Sci.*Vol (9). Pages: 1613. DOI: 10.3389/fpls.2018.01613.

Zhou X. et Li Y. 2015- Chapter 1 - Basic Biology of Oral Microbes. *Atlas of Oral Microbiology : From Healthy Microflora to Disease*, Pages: 1-14.

Zicca S., Palmira DB. MarioM., Maria S., Pasquale S., Donato B., Angelo S.,2020 - Antagonistic activity of olive endophytic bacteria and of Bacillus spp. strains against Xylella fastidiosa.In: Microbiological Research, Science direct, Vol: 236, pages:7. DOI: https://doi.org/10.1016/j.micres.2020.126467.

Annexes

Annexes

Annexe 1

Milieux de culture utilisés

- **Milieu Gélose nutritif (GN**)

Extrait de viande	1 g
Extrait de levure	2,5 g
Peptone	5 g
Chlorure de sodium (NaCl)	1,25 g
Agar	15 g
Eau distillé	1000 ml

- **Milieu Gélose trypticase soja (TSA)**

Peptone de caséine	15 g
Peptone de soja	5 g
Chlorure de sodium	5 g
Agar	15 g
Eau distillé	1000 ml

- **Bouillon trypticase soja (TSB)**

Peptone de caséine	17 g
Peptone de soja	3 g
Chlorure de sodium	5 g
Phosphate dipotassique	2,5 g
Glucose monohydraté	2,5 g
Eau distillé	1000 ml

Annexe 1

(Suite)

- **Milieu Gélose rouge Congo**

Bouillon cœur cervelle	37 g
Saccharose	50 g
Gélose	10g
Colorant de rouge Congo	0,8g
Eau distillé	1000 ml

Les milieux sont par la suite autoclavés pendant 20 min à 120° C.

Annexe 2

Préparation des solutions

- **Vert malachite (solution aqueuse à 0,5% (poids / volume))**

Vert malachite	0,5 g
Eau distillée	100 ml

- **Solution de Safranine (solution alcoolique à 2,5% (poids / volume))**

Safranine	2,5 g
Ethanol à 95%	100 ml

Annexe 3

Valeurs moyennes du diamètre des colonies de *Fusarium oxysporum* f.sp. *albidinis* en interaction avec les 10 isolats endophytes

Isolat endophyte	Diamètre des colonies de Foa (cm)
Rm1	5,3
Rm2	4,36
Rm3	5,00
Rm4	5,66
Rm5	5,20
Rm6	5,20
Rm7	5,40
Rm8	5,50
Rm9	6,4
Rm10	6,9
Témoin	6,25