

Populaire et Démocratique Algérienne République
Ministère de L'enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique

Faculté de sciences de la nature et de la vie

Université Blida 1



Mémoire

En vue l'obtention du Diplôme de Master en biologie

Option : Microbiologie

Thème

Caractérisation des bactéries non fluorescentes du palmier dattier et leur utilisation en biocontrôle contre quelques maladies des plantes

Soutenu le : 16/07/2023

Présenté par :

- BOUCHELAGHEM AMIRA

- LADJRI AHLEM

Devant le jury composé de :

Mme HAMAIDI.F	Professeur	USDB1	Présidente
Mme LOUNACI. L.	M.C.B	USDB1	Examinatrice
Mme TAFIFET.L.	M.C.B	USDB1	Promotrice

Année universitaire 2022/2023

Remerciements

Nous commençons tout d'abord par remercier ALLAH de nous avoir donné la volonté et le courage de mener à bien ce modeste travail.

En second lieu notre promotrice **Mme TAFIFET Lamia.**, on lui exprime ici nos remerciements pour sa disponibilité ainsi que son soutien et orientation constants avec beaucoup d'efforts et de patience pour la réalisation de ce mémoire.

Nous tenons à remercier vivement les membres du jury **Mme HAMMAIDI.F** en tant que présidente et **Mme LOUNACIL** en tant qu'une examinatrice pour leur présence, lecture attentive de notre mémoire ainsi que pour les remarques qu'ils nous adresseront lors de cette soutenance afin d'améliorer notre travail.

Nous adressons nos sincères remerciements à tous les professeurs intervenants en particulier Mme Ait Saadi et Mme Mohamed Mahmoud, qui par leurs conseils et leurs ont guidé nos réflexions.

Sans oublier de remercier **Mme Ammam Selma** l'ingénieure de laboratoire LVPAB pour son aide et soutien durant les manipulations de stage.

Ainsi que **Mr Degaichia Housseem** pour son aide dans l'analyse des résultats obtenus soulignant l'importance de son temps, de son expertise et de son dévouement.

Enfin, nous tenons également à remercier toutes les personnes qui ont participé de près ou de loin à la réalisation de ce travail.

Dédicaces

Je dédie ce modeste travail

En premier lieu à Mes chers parents, qui m'ont toujours aidé à devenir ce que je suis aujourd'hui, et m'ont encouragé à aller de l'avant, je les remercie pour leur soutien inconditionnel tout au long du parcours de mes études

A mes frère «Mohamed » , «Abdelatif» et Abdelhak »qui n'ont cessé d'être pour moi des exemples de persévérance, de courage.

A mes très chères amies

Je souhaite tout particulièrement remercier ma confidente Nessrine pour sa présence constante et son soutien inconditionnel. Sa proximité et sa compréhension ont été d'un grand réconfort pour moi. Je suis également reconnaissante à Houda pour Sa proximité et encouragement qui ont été une véritable source de motivation et d'inspiration

A toute ma famille notamment ma cousine Nour pour son soutien indéfectible et ta présence précieuse

Amira

Dédicaces

Je dédie ce modeste travail

A l'ame de mon père décédé cette année puisse dieu, le tou
puissant l'avoir en sa sainte miséricorde

A ma mère qui m'a entouré d'amour et m'a toujours soutenue

A Mes frère «Hamada » , «Nazih» et «Walid» qui ont été toujours là
pour moi

A mes chères copines pour leurs encouragements permanents, et leur
soutien moral,

A tous mes camarades de la promotion

Ahlem

Résumé :

Dans cette étude, une collection de 15 souches de bactéries non fluorescentes endophytes et rhizosphériques appartenant aux genres *Bacillus*, *Agrobacterium*, *Chromobacterium*, *Enterobacter*, *Rhizobium*, *Azotobacter* et *Burkholderia*, isolées à partir du palmier dattier de la région de Béchar en 2020.

Ces bactéries ont été évaluées pour leur capacité d'antagonisme *in vitro* vis-à-vis des 2 bactéries phytopathogènes *Erwinia amylovora* et *Agrobacterium tumefaciens* par la méthode Spray, ainsi que trois champignons phytopathogènes *Fusarium oxysporum* fsp. *lycopersici*, *Fusarium oxysporum* fsp. *Albedinis* et *Botryosphaeria* sp. par la méthode de traits doublés.

De plus, cinq souches ayant montré une efficacité *in vitro* intéressante ont été testées par une confrontation *in vivo* contre le champignon *Botryosphaeria* sp. Agent responsable de la maladie du bois de la vigne sur les fragments de rachis de palmier.

Les résultats de l'antagonisme *in vitro* ont révélé que les espèces *Agrobacterium* spp. TC5 et TC1, *Chromobacterium* sp. KF2 et *Bacillus* sp. TCR51 ont démontré la capacité d'inhiber la croissance des deux bactéries pathogènes *E.amylovora* EMEA et *A.tumefaciens* C58, après 48h les diamètres de zone d'inhibition varient de 1mm jusqu'à 12,5 mm, dont le genre *Agrobacterium* est le plus potentiel.

Pour le test d'antagonisme antifongique *in vitro*, toutes les souches bactériennes étudiées ont montré une capacité d'inhibition significatifs, avec des pourcentages d'inhibition de la croissance fongique allant de 5% jusqu'à 89,6% après 7 jours d'incubation. Les souches *Agrobacterium* spp. TC1 et TC5 et *Enterobacter* sp. KF2 ont montré un effet important les trois champignons avec des pourcentages qui dépassent 80% d'inhibition.

L'essai d'antagonisme *in situ* sur les fragments de rachis à l'égard de champignon *Botryosphaeria* sp., a révélé que les 5 souches testées *in vitro* *Enterobacter* sp. ZF3, *Agrobacterium* sp. TC5, *Chromobacterium* sp. KF2 et *Bacillus* spp. TCR51 et PF43 étaient capables de réduire les nécroses, de moins de 50 jusqu'à 100 %.

Enfin, dix souches bactériennes efficaces ont été soumises aux tests de production des enzymes, biofilm et sidérophores. Les résultats ont révélé une activité chitinolytique de toutes les souches dont *Agrobacterium* spp. TC1 et TC5, ont montré les résultats les plus prometteurs dans de nombreux tests. Ces résultats soulignent le potentiel des souches sélectionnées en tant qu'agents de lutte biologique contre les agents pathogènes étudiés.

Mots clés : PGPR, endophytes, lutte biologique, palmier dattier, bactéries non fluorescentes

Characterization of date palm non fluorescent bacteria and their use in biocontrol against some plant diseases

Abstract

In this study, a collection of 15 strains of non-fluorescent endophytic bacteria and rhizospheric belonging to the genera *Bacillus*, *Agrobacterium*, *Chromobacterium*, *Enterobacter*, *Rhizobium*, *Azotobacter* and *Burkholderia*, isolated from the date palm of the Region of Béchar in 2020.

Those bacteria were evaluated for their ability of the antagonism *in vitro* against the 2 phytopathogenic bacteria *Erwinia amylovora* and *Agrobacterium tumefaciens* by the Spray method, as well as three phytopathogenic fungi *Fusarium oxysporum* fsp. *lycopersici*, *F.oxysporum* fsp. *albedinis* and *Botryosphaeria* sp. by the double line methodes ,

In addition, five strains with interesting *in vitro* efficacy were tested by an *in vivo* confrontation against the fungus *Botryosphaeria* sp. Agent of grapevine trunk disease on palm rachis fragments.

Results of *in vitro* antagonism revealed that *Agrobacterium* spp. TC5 and TC1, *Chromobacterium* sp. KF2 and *Bacillus* sp. TCR51 showed the ability to inhibit the growth of the two pathogenic bacteria *E. amylovora* EMEA and *A. tumefaciens* C58, after 48h incubations with TC5 and TC1 having the highest inhibition zones ranging from 2 mm to 12,5 mm, of which the genus *Agrobacterium* is the most potential.

For the *in vitro* antifungal antagonism test, all the bacterial strains studied showed an ability to inhibit, with percentages of inhibition of fungal growth ranging from 5% to 89.6% 7 days incubation.

The strains *Agrobacterium* spp. TC1 and TC5 and *Enterobacter* sp. KF2 showed a significant effect against the three fungi with percentages that exceed 80% inhibition

In situ antagonism assay against *Botryosphaeria* sp. on rachis fragments, revealed that the 5 strains tested *in vitro* *Enterobacter* sp. ZF3 *Agrobacterium* sp. TC5 *Chromobacterium*. KF2 and *Bacillus* spp. TCR51 and PF43 were able to reduce necrosis by less than 50 to 100%.

Finally, ten effective bacterial strains were tested for their potentiality to produce enzymes , biofilm and siderophores. The results revealed chitinolytic activity of all strains including *Agrobacterium* spp. TC1 and TC5, showed the most promising results in many tests. These results highlight the potential of the strains selected as biological control agents against the pathogens studied.

Keywords : PGPR, endophytes, biological control, date palm, non-fluorescent bacteria

توصيف بكتيريا نخيل التمر غير المشعة, واستخدامها في مكافحة الحيوية ضد بعض أمراض النبات

ملخص :

في هذه الدراسة، مجموعة من 15 سلالة من البكتيريا الداخلية والجزرية غير المشعة التي تنتمي إلى أجناس

Agrobacterium Chromobacterium Enterobacter Rhizobium Azotobacter Bacillus و *Burkholderia*، معزولة من نخيل التمر في منطقة بشار في عام 2020.

تم تقييم هذه البكتيريا لقدرتها على معادة البكتيريا المسببة للأمراض النباتية في المختبر مقابل 2 البكتيريا المسببة للأمراض النباتية *Erwinia amylovora* و *Agrobacterium tumefaciens* بطريقة الرش، بالإضافة إلى ثلاثة فطريات ممرضة للنباتات *Fusarium oxysporum fsp.albidinis.Fusarium oxysporum fsp.lycopersici* و *Botryosphaeria sp* بطريقة الخط المضاعف.

بالإضافة إلى ذلك، تم اختبار خمس سلالات أظهرت فعالية مثيرة للاهتمام في المختبر من خلال المواجهة في الجسم الحي ضد الفطريات *Botryosphaeria sp* العامل المسبب لمرض خشب العنب على شظايا النخيل.

كشفت نتائج العداء في المختبر أن *Agrobacterium spp. TC,TC1 5*، *Chromobacterium KF2*، *Bacillus sp TCR51* أظهرت القدرة على تثبيط نمو البكتيريا المسببة للأمراض *E. amylovora* و *A. tumefaciens C58* بعد حضانة 48 ساعة مع تختلف اقطار مناطق التثبيط من 2 ملم إلى 12.5 ملم *TC1* و *TC5* مع أكثر فعالية.

بالنسبة لاختبار العداء المضاد للفطريات في المختبر، أظهرت جميع السلالات البكتيرية التي تمت دراستها القدرة على التثبيط، حيث تتراوح النسب المئوية لتثبيط نمو الفطريات من 5% إلى 89.6% حضانة لمدة 7 أيام. السلالات *Agrobacterium spp. TC1 and TC5 and Enterobacter sp. KF2* أظهر تأثيرا كبيرا ضد الفطريات الثلاثة بنسب مئوية تتجاوز 80% من التثبيط في معادة الجسم الحي، كشف فحص شظايا العمود الفقري لبوتروسفيريا *sp.*، أن سلالات 5 تم اختبارها في المختبر *Enterobacter sp. ZF3 Agrobacterium sp. TC5 Chromobacterium. KF2* و *عصوية عصوية. TCR51 and PF43* تمكنوا من تقليل النخر بأقل من 50 إلى 100%.

أخيراً، تم اختبار عشر سلالات بكتيرية فعالة لإمكاناتها البيوكيميائية. كشفت النتائج عن نشاط تحلل الكيتين لجميع السلالات بما في ذلك *Agrobacterium spp. TC1 TC5*، أظهرت النتائج الواعدة في العديد من الاختبارات. تسلط هذه النتائج الضوء على إمكانات السلالات المختارة كعوامل مكافحة بيولوجية ضد مسببات الأمراض التي تمت دراستها.

الكلمات المفتاحية: مكافحة البيولوجية، نخيل التمر، البكتيريا غير المشعة، PGPR، البكتيريا الداخلية.

Liste des tableaux

N°	Titre	Page
1	Diversité des bactéries endophytes et rhizosphériques étudiée	9
2	Taux d'inhibition des champignons phytopathogènes méthode simultanée	18
3	Taux d'inhibition inhibition des champignons phytopathogènes méthode Tardive	19
4	Résultats de test de production de biofilm	25
5	Résultats de test de production de sidérophores	26
6	Résultats de test cellulase	28
7	Résultats de test pectinase	28
8	Résultas de test amylase	29

Liste des figures

N°	Titre	Page
1	Morphologie de palmier dattier	4
2	Schéma du test d'antagonisme antifongique de double traits <i>in vitro</i>	12
3	Inoculation de bactéries antagonistes dans l'incision	14
4	Résultats de test d'antagonisme <i>in vitro</i> vis-à-vis des bactéries phytopathogènes	17
5	Histogramme des zones d'inhibition de la croissance des Bactéries phytopathogènes par les bactéries antagoniste	17
6	Analyse statistique des pourcentages d'inhibition de la croissance des champignons par les bactéries antagonistes par les 2 méthodes Simultanée et tardive (SPSS)	20
7	Résultats de test d'antagonisme <i>in vitro</i> vis-à-vis de Champignons <i>F.O.f.sp. albedinis</i>	21
8	Résultats de test d'antagonisme <i>in vitro</i> vis-à-vis de Champignons <i>F.O.f.sp. lycopersici</i>	22
9	Résultats de test d'antagonisme <i>in vitro</i> vis-à-vis de Champignons <i>Botryosphaeria sp.</i>	22
10	Résultat d'antagonisme <i>in situ</i> vis-à-vis de champignon <i>Botryosphaeria</i>	23
11	Résultats de tests d'antagonisme antifongique <i>in situ</i>	24
12	Résultats de test de production biofilm	25
13	Résultats de test de production de sidérophores	26
14	Résultats de test de protéase	27
15	Résultat de test cellulase	27
16	Résultats de test pectinase	28
17	Résultats de test amylase	29
18	Résultats de test chitinase	29

Liste des Abréviations

PGPR: Plant Growth Promoting Rhizobacteria. (Bactéries promotrices de la Croissance des Plantes)

Fe³⁺ : Fer ferrique

HCN : Cyanure d,hydrogène

EPS : Exopolysaccharides

DO : Densité optique

LB : Lauria Bertani

KB: King B

PDA: potato dextrose agar

Table des matières

Remerciements	
Dédicaces	
Résumé Abstract	
ملخص	
Liste des tableaux Liste	
des figures Liste des	
abréviation	
Introduction.....	1

CHAPITRE I : (Synthèse bibliographique)

I.1. Présentation générale sur le palmier dattier	3
I.1.1 Caractéristiques du palmier dattier.....	3
I.1.2. Principales Maladies et ravageurs du palmier	4
I.2. Communauté bactérienne endophyte et rhizosphérique.....	5
I.2.1 Les rhizobactéries.....	5
I.2.2. Les bactéries endophytes	6
I.3. Activités de promotion croissance et biocontrôle des bactéries endophytes et rhizosphériques.....	7
I.3.1. Promotion de la croissance des plantes.....	7
I.3.2. Bioremédiation.....	7
I.3.3. Lutte biologique.....	8

CHAPITRE 02 : (Matériel et méthodes)

II.1. Essai de lutte biologique in vitro vis-à-vis d'agents pathogènes	9
II.1.1. Souches bactériennes antagonistes.....	9
II.1.2. Bactéries phytopathogènes étudiées.....	9
II.1.3. Purification des bactéries antagonistes et pathogènes.....	10

II.2. Détermination de l'activité antibactérienne <i>in vitro</i>	10
II.2.1. Dépôt des spots bactériens antagonistes.....	10
II.2.2. Pulvérisation des souches pathogènes par la méthode de Spray.....	10
II.3. Détermination de l'activité antifongique <i>in vitro</i>	11
II.3.1 Ensemencement des bandes striées	11
II.3.2. Méthode simultanée.....	11
II.3.3. Méthode tardive.....	12
II.3.4. Dépôt des disques mycéliens.....	12
II.4. Essai d'antagonisme in situ des souches bactériennes à l'égard du pathogène <i>Botryosphaeria</i> sp...13	
II.4.1. Désinfection et préparation de matériel végétal.....	13
II.4.2. Inoculation du pathogène et antagoniste.....	13
II.5. Caractérisation des souches bactériennes : Activité enzymatique, production de biofilm et sidérophores	14
II.5.1 Formation de biofilm.....	14
II.5.2. Production de sidérophores.....	14
II.5.3. Tests enzymatiques.....	15
II.5.4. Activité protéasique.....	15
II.5.5. Activité amylolytique.....	15
II.5.6. Activité cellulasique.....	15
II.5.7. Activité pectinasique.....	15
II.5.8. Activité chitinasique.....	15
II.6. Analyses statistiques des résultats.....	15

CHAPITRE 03 : (Résultats et interprétations)

III.1. Résultats de l'activité antibactérienne <i>in vitro</i>	16
III.2. Résultats de l'activité antifongique <i>in vitro</i>	18
III.3. Résultats d'essai d'antagonisme in situ	22
III.4. Résultats de caractérisation des souches bactériennes	25
III.4.1 Résultats de test de production de biofilm.....	25
III.4.2. Résultats de test de production de sidérophores.....	25
III.4.3. Criblage de l'activité enzymatique.....	26
III.4.3.1. Résultats de test de la protéase.....	27

III.4.3.3. Resultats de test pectinase.....	28
III.4.3.4. Resultats de test amylase.....	28
III.4.3.5. Resultats de test chitinase.....	29
Chapitre IV Discussion.....	30
Conclusion.....	35
Références bibliographiques	
Annexes	

Introduction

Introduction

Le palmier dattier (*Phoenix dactylifera* L.) est une plante monocotylédone arborescente de la famille des Palmacées (El Hadrami et Al-Khayri, 2012). La rhizosphère du palmier dattier contient une grande variété de micro-organismes bénéfiques, notamment des moisissures, des levures et des bactéries, bien que la flore bactérienne soit considérée comme la plus dominante (Mahmoud et al., 2015). Cependant, la culture de cette plante est sujette à divers problèmes phytosanitaires qui entravent son développement et son extension. Le Bayoud, causé par le champignon *Fusarium oxysporum* fsp. *albedinis*, est considéré comme la principale menace pour la phoeniculture, en particulier dans la région du sud-ouest de l'Algérie (Benzohra, 2022). Le recours à l'utilisation de la lutte biologique peut constituer une solution à problème (Mohamed mahmoud, 2017).

Plusieurs travaux ont montré l'utilité des bactéries bénéfiques pour la promotion de la croissance végétale et la protection des cultures contre les infections par les agents pathogènes (Messaoudi, 2015). Les rhizobactéries et les endophytes constituent un groupe de bactéries bénéfiques, les rhizobactéries résidents dans la rhizosphère, la région entourant les racines, tandis que les endophytes représentent les bactéries ayant capacité de coloniser les tissus internes des plantes sans leur causer de dommages. (Gouda et al., 2018).

Ces bactéries bénéfiques associées à des interactions symbiotiques avec les plantes peuvent être soit fluorescentes, appartenant généralement au genre *Pseudomonas*, soit non fluorescentes, appartenant à différents genres tels que *Bacillus*, *Rhizobium*, *Azospirillum*, *Bradyrhizobium*, (Lahlali et al., 2022)

Les bactéries bénéfiques endophytes et PGPR présentent de nombreuses applications dans la médecine, les industries et notamment en agriculture (Wu et al., 2021)

Plusieurs biopesticides d'origine bactérienne sont disponibles, tels que *Bacillus subtilis* QST 713, (Aldwinckle et al., 2002), *B. subtilis* BD170 (Broggini-Schärer et al., 2005),

Ces espèces jouent un rôle essentiel dans l'amélioration de la santé des plantes et de la productivité agricole. Elles produisent une variété de métabolites, tels que des antibiotiques, des endotoxines, des bactériocines, des sidérophores, des enzymes hydrolytiques et d'autres composés, qui sont toxiques pour les agents pathogènes et contribuent ainsi à la prévention des maladies des plantes. Parmi ces bactéries bénéfiques, les espèces de *Bacillus*, notamment *Bacillus thuringiensis* (Bt), sont largement utilisées dans les applications de lutte biologique et de promotion de la croissance des cultures. (Lahlali et al., 2022)

En effet, les méthodes biologiques, basées sur l'utilisation de ces micro-organismes du sol et d'endophytes offrent une solution respectueuse pour l'environnement et un remplacement plus durable des pesticides chimiques. (**Shyam et al.,2017**).

Ces produits phytosanitaires peuvent devenir inefficaces et ont des effets négatifs sur l'environnement et la santé humaine (**Martinez-Viveros et al., 2010**).

Dans ce contexte, notre principal objectif vise à une étude d'évaluation de pouvoir antagoniste des souches endo et rhizosphérique non fluorescentes principalement à Gram-négatifs appartenant aux genres *Agrobacterium*, *Chromobacterium*, *Enterobacter*, *Burkholderia* et *Rhizobium* et *Azotobacter* ainsi que le genre *Bacillus* de Gram positif, à l'égard de quelques bactéries et champignons phytopathogènes.

Notre projet de fin d'étude consiste à poursuivre ces travaux préliminaires en explorant le potentiel de ces souches *in vitro* vis-à-vis deux bactéries phytopathogènes : *Erwinia amylovora* l'agent responsable du feu bactérien des Maloidées et *Agrobacterium tumefaciens* l'agent causal de la tumeur du collet. Ainsi que 3 champignons pathogènes *Fusarium oxysporum* fsp.*albedinis* responsable du bayoud du palmier dattier , *F.oxysporum* fsp.*lycopersici* agent causal de flétrissement sur tomate et *Botryosphaeria* sp. responsable de la maladie de vigne.et un essai d'antagonisme *in situ* vis-à-vis du champignon *Botryosphaeria* sp. responsable de maladie de la vigne sur des fragments de rachis du palmier. Enfin, les souches performantes ont été testées pour leurs propriétés par des tests de potentialité biochimiques y compris la production de biofilm, sidérophores et les enzymes hydrolytiques (protéase, pectinase, amylase, cellulase et chitinase.

Pour la présentation de ce travail, trois parties sont illustrées dans cette présente recherche :

Une première partie correspond à la synthèse bibliographique, qui permet de situer le travail dans son contexte scientifique. La seconde partie traite le travail expérimental et décrit successivement le matériel et les méthodes utilisées pour répondre aux objectifs de cette recherche. Enfin l'ensemble des résultats et discussion obtenus, Et se termine par une conclusion générale.

Chapitre I
Synthèse
bibliographique

I.1. Présentation générale sur le palmier dattier

I.1.1 Caractéristiques du palmier dattier

Le palmier dattier (*Phoenix dactylifera* L.) tire son nom du mot phénicien pour "dattier" et du terme grec pour "doigt", en référence à la forme de ses fruits. Les espèces du genre *Phoenix* sont des arbres dioïques, avec des arbres mâles appelés dokkars ou pollinisateurs et des arbres femelles appelés Nakhla, produisant respectivement du pollen et des dattes (Aksa, 2019 ;Peyron,2000) .

Depuis l'Antiquité, le palmier dattier a été cultivé jouant un rôle essentiel dans l'agriculture oasienne, limitant la désertification et l'ensablement des terres grâce à la formation d'oasis. En outre cette espèce présente un rôle écologique important en empêchant la progression des zones steppiques.

Le palmier dattier présente une morphologie caractérisée par un tronc unique, ligneux et de couleur brune et ses grandes feuilles dressées en spirale, formant une couronne dense. Les fleurs blanches du palmier dattier sont regroupées sur un spadice entouré d'un spathe, avec des fleurs femelles de couleur ivoire à vert clair et des fleurs mâles ivoires (El hadrami,2012 ; Mattalah,2021). Le système racinaire s'étend sur une profondeur de 8 à 10 mètres et comprend quatre types de racines fonctionnelles : racines respiratoires, racines de nutrition, racines d'absorption d'eau et racines en faisceaux avec un géotropisme positif (Sahouli, 2021). Les dattes sont des baies monospermes portées par un régime avec un pédoncule et un rachis ramifié (Cros-Balthazard, 2012)

En Algérie, le palmier dattier occupe une superficie de 168 855 hectares en Algérie, avec les wilayas de Biskra et El Oued ayant la plus grande superficie de culture (Rekis, 2021). Il existe plus d'un millier de cultivars, dont Deglet Nour, recensés sur 17 wilayas du Sud algérien où le climat est chaud et sec. Les palmiers-dattiers sont cultivés dans plusieurs Oasis et leur production annuelle est de 7 893 570 de quintaux, avec un total de 18 millions de palmiers-dattiers. L'Algérie est considéré comme l'un des grands pays à fort potentiel phoenicicole (Aimene, 2018).

Cependant, Cette culture est sujette à plusieurs ravageurs, maladies et mauvaises herbes qui menacent la santé du patrimoine phoenicicole, entraînant des pertes considérables de production et une érosion génétique.

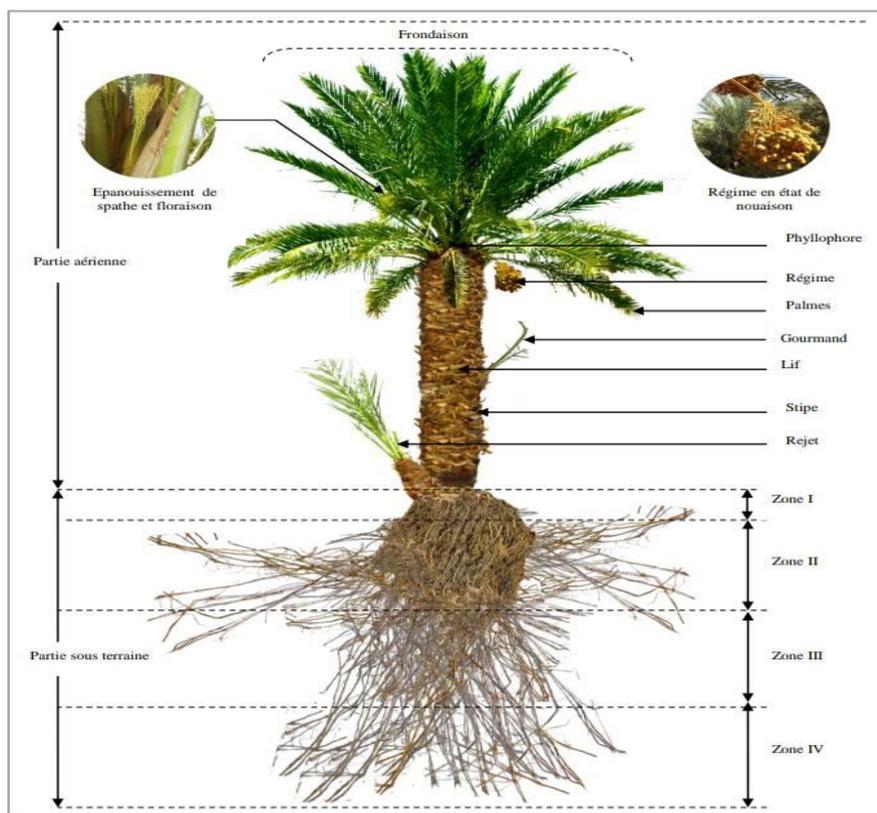


Figure 01 : Morphologie du palmier dattier adulte (Sahouli, 2021)

I.1.2.Principales Maladies et ravageurs du palmier dattier

Les maladies fongiques et les ravageurs constituent des menaces importantes pour les palmiers dattiers qui peuvent réduire la production de fruits et même causer la mort de l'arbre. (Bensalah et al., 2013)

De nombreux ennemis ravageurs du palmiers dattiers sont présents en Algérie et provoquent des dégats sur la culture comme la Pyrale des dattes causée par l'insecte *Ectomyelois ceratoniae*, le Boufaroua causé par l'acarien *Oligonychus afrasiaticus* et la Cochenille blanche est causée par l'insecte *Parlatoria blanchardi*.

Les principales maladies fongiques comprennent la pourriture des inflorescences (*Mauginiella scattae*), la Pourriture du cœur (*Phytophthora* spp.). Le Bayoud causé par *Fusarium oxysporum* f.sp. *albedinis*, est considéré comme la contrainte majeure de la phoeniculture surtout dans région du sud-ouest algérien (Benzohra,2022). Le champignon infecte les racines et les vaisseaux conducteurs de la plante, entraînant le flétrissement des

feuilles, la nécrose des tissus et, éventuellement, la mort du palmier (**Khayl et al.,2020**)

La maladie de Bayoud a détruit plus de deux tiers des palmeraies marocaines, soit 12 millions d'arbres, en un siècle, et continue de causer des pertes annuelles entre 4,5% et 12% des palmiers dattiers. En Algérie, plus de trois millions d'arbres ont également été détruits, principalement dans les régions de Tidikelt, Touat à Adrar et M'zab à Ghardaia (**Bahriz et Bourasb, 2020**).

D'autre part, le palmier dattier abrite également une grande variété de bactéries non pathogènes endophytes et rhizosphérique qui peuvent aider à renforcer l'immunité de la plante, améliorer sa croissance et servir d'agents de lutte biologique contre les agents phytopathogènes nuisibles aux cultures.

I.2. Communauté bactérienne endophyte et rhizosphérique

Les bactéries rhizosphériques et endophytes représentent un groupe de microorganismes bénéfiques , et deviennent de plus en plus utilisées en agriculture, dans le but d'augmenter le rendement des cultures en augmentant la disponibilité des nutriments, en améliorant la capacité d'absorption et les protégeant contre les maladies et les ravageurs (**Grobela et al., 2014 ; Khenaka, 2021**). Ces bactéries sont divisées en espèces fluorescentes appartenant souvent au genre *Pseudomonas* et d'autres non fluorescentes comme *Bacillus*, *Azotobacter*, *Burkholderia* (**David et al.,2018 ; Khan et al.,2020**)

I.2.1 Les rhizobactéries

Les bactéries rhizosphériques stimulatrices de la croissance des plantes ou PGPR (Plant Growth-Promoting Rhizobacteria) sont des bactéries colonisant la rhizosphère ou la racine des plantes et capables d'améliorer le développement, la croissance, et/ou la santé du végétal (**Vacheron et al.,2013**). Ces espèces interagissent étroitement avec le végétal, ce qui détermine la santé des plantes, de la productivité et de la fertilité des sols (**Iyer et Rajkumar, 2017**).

Ces bactéries appartiennent principalement aux genres *Acetobacter*, *Acinetobacter*, *Arthrobacter*, *Azoarcus*, *Azospirillum*, *Azotobacter*, *Bacillus*, *Burkholderia*, *Derxia*, *Enterobacter*, *Klebsiella*, *Ochrobactrum*, *Pantoea*, *Pseudomonas*, *Serratia*, *Stenotrophomonas* . (**Chaitanya et Meenu,2015**)

L'intense activité microbienne est la caractéristique essentielle de la rhizosphère. Elle est due à la libération dans le sol de composés carbonés (les rhizodépôts) qui stimulent la croissance et le développement des microorganismes du sol. L'influence des racines sur l'activité des microorganismes est appelée « effet rhizosphère ». (Durand,2017).

I.2.2. Les bactéries endophytes

Les endophytes sont des micro-organismes qui vivent entre les cellules des plantes sans leur nuire et qui ont une relation bénéfique ou commensaliste avec leur plante-hôte. (Card et al.,2016 ; Hardoimet al.,2015) . La présence d'endophytes est impérative pour la croissance et le développement des plantes (Maheshwari et al, 2020).

Ces bactéries bénéfiques ont été isolées, observées et étudiées chez une large sélection d'espèce de plantes de Monocotylédones et Dicotylédones, mais leur densité de population est très variable et dépend de l'espèce bactérienne, du génotype de l'hôte, de son stade de développement et des conditions environnementales (Kobayashi et Palumbo, 2000 ;Del Barrio-Duque et al., 2019)

Les endophytes racinaires participent à la transformation des nutriments du sol, aident à la réduction des stress abiotiques et l'amélioration phénotypique de l'architecture racinaire (De Meyer et al., 2015 ; Zhang et al., 2018).

Actuellement, plus de 200 espèces de bactéries associées aux plantes ont été identifiées, dont la majorité appartient aux phylums Actinobacteria, Proteobacteria et Firmicutes (Elazreg,2020). Les genres bactériens les plus courants sont *Pseudomonas*, *Bacillus*, *Burkholderia*, *stentrophomonas*, *Micrococcus*, *Pantoea* et *microbacterium* (Sravanthi et junhyun,2021)

Les endophytes et les rhizobactéries peuvent être utilisées dans différents domaines l'industrie, la médecine, la biotechnologie et notamment en agriculture pour améliorer la croissance des plantes, en bioremédiation pour dépolluer les sols, et dans la lutte biologique pour la suppression des agents phytopathogènes et des ravageurs.

I.3. Activités de promotion de croissance et biocontrôle des bactéries endophytes et rhizosphériques

I.3.1. Promotion de la croissance des plantes

Les bactéries endophytes et rhizosphériques peuvent améliorer la capacité de croissance des plantes et le processus de développement en produisant des phytohormones telles que les auxines y compris l'AIA (Acide indole acétique) et l'AIB (l'acide indole-3-butérique) ou leur précurseurs qui affectent la croissance des plantes en augmentant la taille, le poids, le nombre de branches et la surface en contact avec le sol des racines. **(Chaitanya et Meenu,2015)**.

Les gibbérellines sont aussi des hormones de croissance produites et libérées dans le sol, impliquées dans la division et l'allongement cellulaire ainsi que dans la germination des graines **(Mercado-Blanco et Lugtenberg, 2014 ; Kang et al., 2019)**.

L'amélioration de la croissance consiste à faciliter l'absorption des nutriments par la fixation d'azote atmosphérique qui est réalisée par des genres bactériens tels que *Azoarcus*, *Azotobacter*, *Clostridium* et *Rhizobium* suivant le processus biologique de nitrification **(Barthelemy,2019)**. Elle est assurée également par la solubilisation de phosphate en sécrétant de phosphatases et d'acides organiques par des endophytes bactériens des genres *Rhizobium*, *Bacillus*, *Klebsiella*, *Pseudomonas*, *Pantoea*, *Methylobacterium*, *Acinetobacter*, *Micrococcus* **(Sravanthi et junhyun,2021)**.

L'assimilation du fer par les plantes est améliorée grâce à la production microbienne de sidérophores qui ont une grande affinité pour les ions Fe^{3+} et Fe^{2+} **(Ma et al., 2016)**.

I.3.2. Bioremédiation

Les bactéries endophytes et rhizobactéries peuvent réduire la toxicité des métaux lourds dans les plantes en les précipitant, les séquestrant ou les réduisant. De plus, les bactéries rhizosphériques produisent des polymères extracellulaires qui aident à l'expulsion ou à la récupération des métaux de la rhizosphère par biosorption. Par exemple, l'inoculation dans le sol des bactéries *Methylobacterium orizae* et *Burkholderia* sp. réduit la toxicité et l'accumulation du nickel et du cadmium aux plants de la tomate. **(Barthélemy,2019)**.

I.3.3. Lutte biologique

Il existe plusieurs approches pour prévenir ou réduire les dommages causés par les agents bioagresseurs sur les cultures. Ces approches sont classées en méthodes biologiques, physiques, mécaniques, chimiques ou encore génétiques (**Nassraoui, 2006 ; Hanemiane, 2012**).

La lutte biologique, qui utilise des microorganismes bénéfiques et des prédateurs naturels pour contrôler les pathogènes, est souvent considérée comme une méthode respectueuse de l'environnement et durable, du fait qu'elle peut réduire l'utilisation de produits chimiques et favoriser l'équilibre écologique en protégeant la plante contre les pathogènes fongiques du sol ou les agents délétères bactériens (**Shyam et al., 2017 ; Kanouni, 2019**).

Les bactéries antagonistes agissent directement et indirectement sur l'agent pathogène, par différents mécanismes d'action, notamment la production d'enzymes, l'antibiose, l'induction de la résistance de la plante et la compétition pour les nutriments et l'espace.

Cependant, la production des enzymes lytiques est l'un des importants mécanismes d'action impliqués par les bactéries, qui peuvent attaquer la croissance des agents pathogènes (**Compant et al., 2005**). La chitinase, la glucanase et la cellulase, lipases sont d'importantes enzymes particulièrement dans le contrôle antifongique, par leurs activités de la détérioration des composés des parois (**Joshi et al., 2015; Hakim et al., 2021**). Par exemple les bactéries *Bacillus cereus* et *Bacillus cepacia* produisent l'hydrolase qui dégradent les parois cellulaires de plusieurs agents pathogènes telluriques (**Karthika et al., 2020**).

Les bactéries bénéfiques ont recours à d'autres mécanismes pour lutter contre les organismes pathogènes, tels que la concurrence de nutriments ou de l'espace, (**soufiane, 1998**), comme le cas pour les sidérophores qui se lient au fer, en limitant ainsi sa disponibilité et par conséquent inhibent la croissance et l'activité des agents pathogènes du sol (**Lahlali et al., 2022**). Certaines bactéries bénéfiques produisent des enzymes qui inhibent les agents bioagresseurs. Les lactonases, acylases et AHL-oxydoréductases sont des enzymes clés. Les lactonases, produites par des bactéries comme *Bacillus* et *Rhizobium*, inhibent les agents phytopathogènes et la formation de biofilm chez *Pseudomonas aeruginosa*. Certaines bactéries bénéfiques peuvent également produire des antibiotiques ainsi que du cyanure d'hydrogène (HCN) qui possède une activité antimicrobienne, (**Khenaka, 2021**).

Chapitre II

MATERIEL ET METHODES

Ce présent travail a été réalisé au niveau du Laboratoire de protection et de valorisation des ressources agrobiologiques (LVPAB) de l'université Blida1 pendant la période allant du mois février jusqu'à la fin Juin 2023.

II.1. Essai de lutte biologique *in vitro* vis-à-vis d'agents pathogènes

II.1.1. Souches bactériennes antagonistes

Un total de 15 souches bactériennes ont été sélectionnées dont 4 souches de *Bacillus* spp., 3 espèces d'*Enterobacter* spp., 2 espèces *Chromobacterium* spp., 2 souches d'*Agrobacterium* spp., 2 souches *Burkholderia* spp., une espèce d'*Azotobacter* sp. et une souche de *Rhizobium* sp. (Tableau 1)

Ces souches appartiennent à la collection du laboratoire LVPAB de l'année 2022 isolées à partir du sol rhizosphériques et de racine du palmier dattier des deux régions Kenadssa et Taghit situées à la wilaya de Béchar. Ces bactéries ont été pré-identifiées par l'utilisation de tests physiologiques et biochimiques.

Tableau 01: Diversités des souches bactériennes étudiées

souches Rhizosphériques	
Code	Nom de souche
TC4 TF6	<i>Bacillus</i> sp.
TC1 et TC5	<i>Agrobacterium</i> spp.
TF4 et KF2	<i>Chromobacterium</i> spp.
TC3 et TC13	<i>Burkholderia</i> spp.
TF8	<i>Azotobacter</i> sp.
ZF3	<i>Enterobacter</i> sp.
XJ3	<i>Rhizobium</i> sp.

souches Endophytes	
Code	Nom de souche
PF43	
TCR51	<i>Bacillus</i> spp.
TBR5	
KFR9	<i>Enterobacter</i> spp.

II.1.2. Bactéries phytopathogènes étudiées

Deux bactéries phytopathogènes ont été testées *in vitro* : l'espèce *Agrobacterium tumefaciens* C58, agent causal de la maladie de la tumeur du collet chez les arbres fruitiers et *Erwinia amylovora* EMEA responsable du feu bactériens des Pomoidées. Ces souches font partie de la collection du laboratoire (LVPAB).

II.1.3. Purification des bactéries antagonistes et pathogènes

La purification des souches bactériennes a été effectuée sur milieu King B par un repiquage d'une colonie, diluée dans l'eau distillée stérile (2 ml) pour disperser les bactéries ce qui permet d'avoir des colonies isolées après incubation durant 48h h à 28°C . ce milieu de culture permet de vérifier et confirmer la non fluorescence des souches étudiées en exposant les culture à la lampe UV. La purification est réalisée par épuisement en trois secteurs. L'opération est répétée jusqu'à l'obtention des colonies pures puis conservés dans des tubes inclinés au réfrigérateur à 4C pour une utilisation ultérieure.

A partir de souches conservées, un autre repiquage est effectué sur le milieu LB de 24 à 48 h avant la réalisation des tests de confrontation et de potentialité pour obtenir des cellules bactériennes jeunes.

II.2. Détermination de l'activité antibactérienne *in vitro*

II.2.1. Dépôt des spots bactériens antagonistes

le test a été réalisé en suivant la méthode de (Cooksey et Moor,1980 ; Moore et al., 1988) pour mettre en évidence l'activité antibactérienne des isolats endophytes et rhizobactéries contre les souches pathogènes cibles ,

Un total de 15 souches bactériennes âgées de 48 heures ont été récupérées pour la préparation des suspensions bactériennes des antagonistes homogénéisés et ajustés à une densité cellulaire de 10^8 UFC/ml, à une longueur d'onde de 620 nm. Nous avons considéré le ratio de 10 : 1 c'est-à-dire , pour l'antagoniste, d'une concentration 10 fois supérieur par rapport à celui de la souche pathogène (Cabrefiga et al.,2007)-

Trois spots de 40 µl de la suspension bactérienne antagoniste, ont été déposés sous forme de triangle dans la boîte de Pétri contenant le milieu LB à l'aide d'une micropipette. Après le dépôt de ces échantillons, une étape d'incubation à une température de 30°C pendant 24 heures a été réalisée.

II.2.2. Pulvérisation des souches pathogènes par la méthode de Spray

Après 24h d'incubation, des colonies typiques de bactéries antagonistes qui sont centriques se développent en boîte de Pétri.

Pour la confrontation directe, à l'aide d'un pulvérisateur stérile les suspensions bactériensous des deux souches d'*Erwinia amylovora* et *Agrobacterium tumefaciens* ont été pulvérisées directement sur les colonies centriques de chaque bactérie antagoniste, suivie par une étape d'incubation à-30°C pendant 24h à 48h.

Les témoins négatifs sont représentés par des boîtes de Pétri contenant trois gouttes de 40 µl d'eau distillée stérile sur le milieu LB déposée 24h avant la pulvérisation des deux souches pathogènes. Les boîtes de Pétri sont par la suite entourées avec le parafilm le long du bord pour éviter les contaminations.

Pour chaque bactérie antagoniste, deux répétitions ont été préparées pour l'antagonisme contre les deux souches pathogènes, *Erwinia amylovora* et *Agrobacterium tumefaciens*.

Après l'incubation, la présence d'une zone d'inhibition a été observée sur les boîtes et la mesure est effectuée au centre des spots à la limite de la zone de croissance de l'antagoniste. La moyenne de la taille des trois zones est retenue.

II.3. Détermination de l'activité antifongique *in vitro*

Le test d'antagonisme antifongique est basé sur la technique de double culture par deux méthodes simultanée et tardive (Anith et al., 2021).

Les souches utilisées dans cette étude appartiennent à trois espèces de champignons phytopathogènes : *Fusarium oxysporum fsp.albedinis* responsable du bayoud du palmier dattier , *F.oxysporum fsp. lycopersici* agent causal de flétrissement sur tomate et *Botryosphaeria* sp. Responsable de la maladie de vigne.

Ces champignons ont été purifiés par des repiquages successifs sur le milieu PDA jusqu'à l'obtention de cultures pures. Le repiquage se fait par prélèvement d'un fragment de colonie à l'aide d'une pipette Pasteur, en évitant son contact avec les autres colonies avoisinantes de la même boîte. Ce fragment est déposé au centre d'une nouvelle boîte sur laquelle on indique la date de repiquage et les coordonnées de la boîte de prélèvement. Le repiquage se fait aseptiquement près du bec Bunsen.

II.3.1 Ensemencement des bandes striées

Pour l'ensemencement des deux traits, une colonie bactérienne de 24-48h a été raclée à l'aide d'une anse stérile de chaque souche antagoniste est striée pour créer deux bandes parallèlement une à l'autre sur les plaque gélosés LB/PDA à une distance de 3 cm du centre du boîte pétrie et 1.5 cm à la bordure du boîte.(Figure02)

II.3.2.Méthode simultanée

Dans cette méthode, l'ensemencement des deux traits bactériens est effectué le même jour avec le dépôt des disques mycéliens pathogènes de chaque espèce fongique.

II.3.3. Méthode tardive

L'ensemencement des deux traits se fait 24h avant le dépôt de disque du mycélium puis incubé à 30° pendant 24h.

Les boîtes inoculées avec une souche bactérienne antagoniste et phytopathogène (plaque test) et les boîtes contenant un phytopathogène seul (plaque témoin) ont été incubées pendant 7 jours et des observations sur les rayons de la colonie fongique et de la zone d'inhibition ont été effectuées pendant l'incubation. L'expérience a été répétée deux fois.

II.3.4. Dépôt des disques mycéliens

Un disque mycélien de 5mm de diamètre a été prélevé à partir de la périphérie de croissance d'une colonie jeune de phytopathogène à l'aide d'une pipette stérile et placé au centre d'une boîte inoculée avec deux traits bactériens

Le témoin est préparé par un repiquage de l'agent pathogène seul au centre de la boîte de Pétri qui contient la gélose LB/PDA comme témoin.

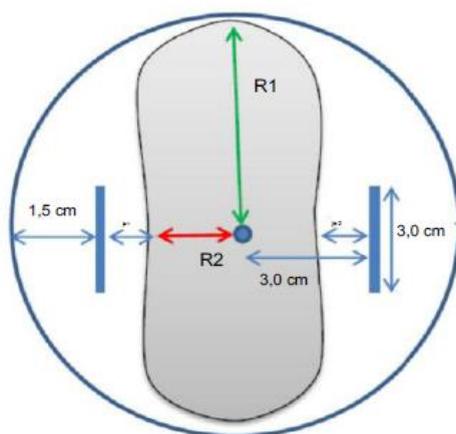


Figure 02 : schéma du test d'antagonisme antifongique *in vitro*

Le pourcentage d'inhibition de la croissance mycélienne (PGI) du pathogène est calculé selon la formule (**wang,2022**) :

$$\text{PGI (\%)} = (C-T/C) \times 100$$

PGI (%): Pourcentage d'inhibition de la croissance mycélienne,

C: Diamètre moyen des colonies du champignon en l'absence de l'antagoniste (témoin).

T: Diamètre moyen des colonies du champignon en présence de l'antagoniste,

II.4. Essai d'antagonisme *in situ* des souches bactériennes à l'égard du pathogène *Botryosphaeria* sp

Le test d'antagonisme *in situ* a été réalisé en choisissant 5 bactéries antagonistes qui présentaient un fort pouvoir inhibiteur dans le test *in vitro* dont deux souches *Bacillus* spp. (PF43, TCR51) et une souche de *Chromobacterium* sp.(ZF3), *Agrobacterium* sp. (TC5) et *Burkholderia* sp. (TC3) vis-à-vis le champignon pathogène *Botryosphaeria* sp.

Ce test a été réalisé sur des fragments du rachis du palmier .La méthodologie utilisée est inspirée de celle utilisée par **Moral, et al., (2010)** pour confirmer l'action inhibitrice des agents antagonistes sur la pathogénéicité des Botryosphaeriaceae associées au dépérissement de la vigne.

II.4.1. Désinfection et préparation de matériel végétal

Le matériel végétal du palmier été coupé en petits fragments de 10 cm et la surface a été stérilisée dans une solution d'hypochlorite de potassium à 0,1% pendant 2 min pour éliminer la flore saprophyte superficielle puis rincés trois fois dans de l'eau distillée stérile. Les tissus végétaux sont ensuite séchés sur du papier filtre stérile.

II.4.2. Inoculation du pathogène et antagoniste :

L'essai d'antagonisme *in situ* a été réalisé selon la méthode de **Moral et al.,(2010)** sur un ensemble de 120 rachis. Dix répétitions ont été réalisées pour chaque témoin (positif et négatif) et pour chaque rachis traité.

A l'aide d'un scalpel stérile, des incisions ont été réalisées pour enlever l'écorce . Des pastilles de 10 mm de diamètre de mycélium de chaque isolat ont été prélevées en utilisant une pipette Pasteur puis déposées avec l'antagoniste au niveau des incisions (Figure03).

Dix répétitions par isolats ont été effectuées en 2 blocs. Après inoculation, les incisions ont été enveloppées avec du coton stérile humide puis scellées avec du parafilm.

Les boutures ont été incubées sur du coton stérile humide dans des plateaux stériles Afin d'éviter le dessèchement, les boutures ont été enveloppées avec du papier aluminium .

Les témoins positifs ont été inoculés avec seulement des pastilles de la souche fongique. Les sites d'inoculation ont été examinées après trois semaines d'incubation.



Figure 03: Inoculation de bactéries antagonistes dans le site de l'incision

II.5. Caractérisation des souches bactériennes : Activité enzymatique, production de biofilm et sidérophores

Afin de déterminer la performance de nos souches dans le biocontrôle, certaines enzymes et molécules sont recherchées en dépit de leur grand intérêt dans la lutte biologique.

II.5.1 Formation de biofilm

L'utilisation de la technique d'ensemencement par stries sur milieu de rouge Congo permet d'identifier les souches bactériennes productrices de biofilm, car ce milieu interagit directement avec certains polysaccharides bactériens. Les colonies noires rugueuses à la surface du milieu indiquent un résultat positif pour la production de biofilm, tandis que les colonies rouges à la surface lisse indiquent un résultat négatif (**Rewatkar et Wadher, 2013 ; Kara Terki, 2014**).

II.5.2. Production de sidérophores

La production de sidérophores par les bactéries a été détectée en ajoutant un volume égal de 2% de solution aqueuse de chlorure ferrique au surnageant de la culture bactérienne qui étéensemencée sur bouillon

King B et incubée dans un roto agitateur à 28 ± 2 oC pendant 72 heures à 10000 rpm pendant 10 minutes pour séparer le surnageant.

La formation de couleur orange ou rouge-brun indique un résultat positif. (**Suryakala et al.,2016**).

II.5.3. Tests enzymatiques

Les enzymes sont généralement impliqués dans la dégradation de la paroi cellulaire des champignons phytopathogènes (cellulase, protéase, Amylase, chitinase et pectinase).

II.5.4. 5Activité protéasique

L'activité protéasique des souches a été déterminée par l'ensemencement des spots bactériens au milieu gélosé autoclavé additionné de 5% de lait écrémé et incubées à 30°C pendant 48 heures. La présence de protéase est indiquée par l'apparition d'un halo transparent autour des colonies ce qui signifie l'hydrolyse des protéines du lait. Un résultat négatif ne montre aucune zone d'hydrolyse autour de la culture (**Bach et Munch ,2000 ; De Vos et al., 2009**).

II.5.5. Activité amylolytique

L'évaluation de l'activité amylolytique consiste à ensemencer une gélose nutritive contenant de l'amidon avec des disques de 5 mm de chaque souche à tester. Après incubation à 30°C pendant 48-72 heures, une solution de lugol est dispersée sur toute la surface du milieu et la lecture se fait en observant la présence ou l'absence d'une zone claire autour des disques d'agar. Une zone claire indique une présence d'activité amylolytique chez les souches (Vinoth Raj et al. 2009). Tandis qu'une absence de zone claire se traduit par une couleur brune autour de la culture. (**Gordon et al., 1973 ; De Vos et al., 2009**).

II.5.6. Activité cellulasique

Pour identifier les souches bactériennes ayant une activité cellulolytique, un milieu supplémenté par 0,5% de carboxyméthylcellulose (CMC) est ensemencé et incubée à 30°C pendant 48 heures, puis remplies d'une solution de rouge Congo et placées à 45°C pendant 15 à 30 minutes. Après lavage avec une solution saline de NaCl pendant 10 minutes, la production de cellulase est observée par la présence de zones claires autour des colonies (**Bragger et al, 1989**).

II.5.7. Activité pectinasique

Le milieu pectine agar ensemencé avec des spots bactériens de chaque souche testée a été incubé à 30° pendant 48 heures pour sélectionner les souches productrices de pectinase. Les boîtes ont été immergées dans une solution d'acétate de cuivre à 75% pendant 10 minutes, Si un halo clair apparaît autour des disques, cela indique un résultat positif, tandis qu'une absence de halo clair indique un résultat négatif (**Snaiki et al., 2006**).

II.5.8. Activité chitinasique

L'activité chitinolytique a été estimée sur gélose à la chitine sans glucose, selon la méthode décrite par **Renwick et al., (1991)**. Le développement de colonies après 5 jours d'incubation à 30°C indique une activité chitinolytique positive.

II.6. Analyses statistiques des résultats

Les résultats de l'activité antifongique *in vitro* ont été présentés par la moyenne pour chaque confrontation en utilisant le test de **Student**.

L'analyse statistique a été réalisée par le logiciel SPSS en utilisant le test de l'analyse de la variance (**ANOVA**) à un facteur. Ce test nous permet de vérifier si les échantillons sont issus de la même population ou présentant des différences significatives. Le niveau de signification était de 5 %.(voir annexe)

Chapitre III

Résultats et interprétation

III - Résultats de l'essai de lutte biologique *in vitro* des bactéries non fluorescentes vis-à-vis d'agents phytopathogènes

III.1. Résultats de l'activité antibactérienne *in vitro*

Ce présent travail avait pour objectifs d'évaluer le potentiel antagoniste de 15 souches bactériennes endophytes et rhizosphériques appartenant aux genres *Bacillus*, *Agrobacterium*, *Chromobacterium*, *Enterobacter*, *Rhizobium*, *Azotobacter* et *Burkholderia* vis-à-vis des 2 bactéries phytopathogènes : *Erwinia amylovora* EMEA, responsable du feu bactérien des Pomoidées et *Agrobacterium tumefaciens* C58 ; agent causal de la maladie de la tumeur du collet chez les arbres fruitiers.

Le témoin dans notre expérience de confrontation bactéries-bactéries est utilisé comme référence pour évaluer l'activité inhibitrice des autres souches bactériennes testées. L'activité inhibitrice des bactéries antagonistes se manifestent par l'apparition d'une zone chaire autour des spots (figure 04).

Les deux souches d'*Agrobacterium tumefaciens* TC5 et TC1 ont montré un potentiel antagoniste le plus important par rapport aux autres bactéries antagonistes vis-à-vis des deux bactéries pathogènes *Erwinia amylovora* EMEA et *Agrobacterium tumefaciens* C58.

En effet, les résultats du test d'antagonisme *in vitro* envers la souche *Erwinia amylovora* ont démontré que les 2 souches Rhizosphériques d'*Agrobacterium* spp. (TC5 et TC1) et la souche endophyte *Bacillus* sp. TCR51 ont présenté un effet antibactérien avec des diamètres de zones d'inhibition de 12,5 mm et 10 mm et 2mm respectivement..

Toutefois, l'espèce *Chromobacterium* sp. KF2 a affiché une efficacité limitée avec un diamètre très faible de 1 mm.

Concernant l'effet antibactérien vis-à-vis de la bactérie *Agrobacterium tumefaciens*, les deux souches rhizosphériques du genre *Agrobacterium* (TC5 et TC1), ont provoqué un effet antibactérien présentant des diamètres de zones d'inhibition similaires de 11,5 mm.

La bactérie *Chromobacterium* sp. KF2 a affiché une efficacité avec un diamètre de zone d'inhibition égale à 8,5 mm (Annexe 08).

Aucune activité inhibitrice des autres souches endophytes et rhizosphériques, n'a été observée par rapport au témoin, cela signifie qu'elles n'ont pas réussi à inhiber la croissance

des autres souches bactériennes testées indiquant une résistance des pathogènes.

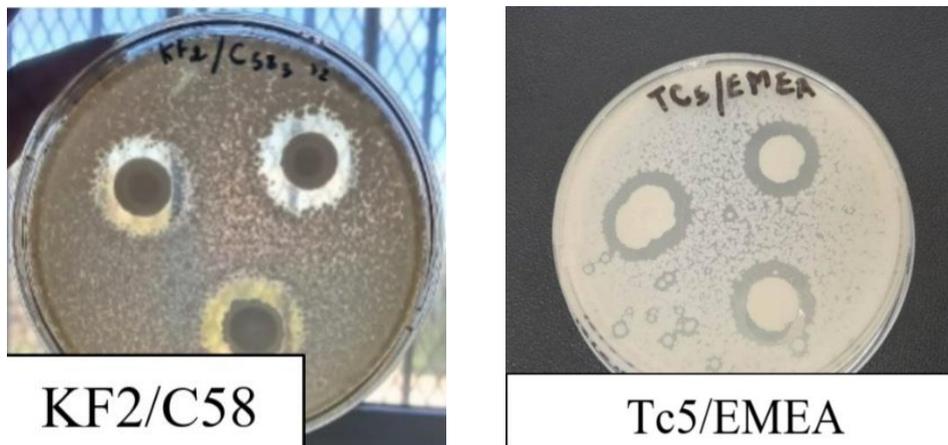


Figure 04 : Résultats d'antagonisme *in vitro* vis-à-vis des bactéries phytopathogène

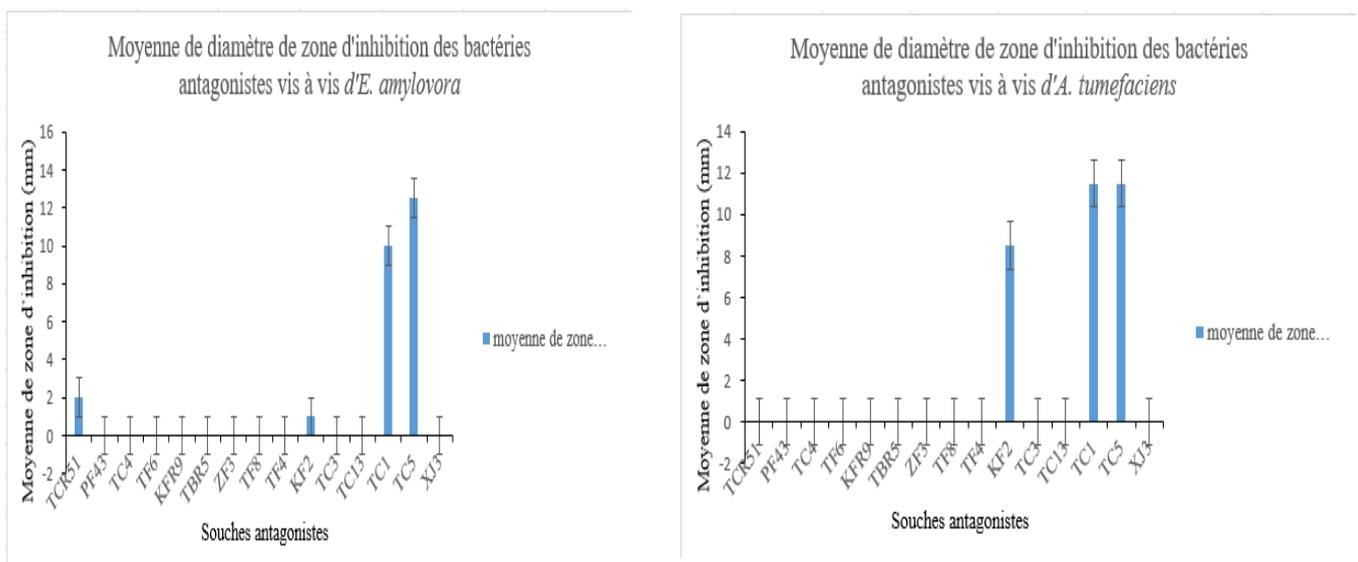


Figure 05 : Analyse des diamètres des zones d'inhibition vis-à-vis des bactéries pathogènes

L'activité inhibitrice des bactéries antagonistes peut-être dû à la production des substances antimicrobiennes telles que des antibiotiques, des enzymes ou des métabolites secondaires, qui tuent ou perturbent la croissance des autres bactéries. De plus, les bactéries peuvent compétitionner avec d'autres pour les nutriments, modifier l'environnement en changeant le pH, la concentration d'oxygène ou la disponibilité des nutriments, former des

biofilms qui empêchent la croissance d'autres bactéries, et interagir avec le système immunitaire de l'hôte.

III.2. Résultat de l'activité antifongique *in vitro* des bactéries endophytes et rhizosphériques

Les souches bactériennes endophytes et rhizosphériques appartenant aux genres *Bacillus*, *Agrobacterium*, *Chromobacterium*, *Enterobacter*, *Rhizobium*, *Azotobacter* et *Burkholderia* ont été confrontées à l'égard de trois champignons phytopathogènes (*Fusarium oxysporum* f.sp. *albedinis*, *Fusarium oxysporum* f.sp. *lycopersici* et *Botryosphaeria* sp.) en utilisant deux méthodes ; simultanée et tardive. Les pourcentages d'inhibition de la croissance mycélienne (PGI %) ont été calculés après 7 jours d'incubation à 30°C. (Tableaux 02 et 03).

Les résultats indiquent que toutes les souches bactériennes antagonistes ont présenté un spectre d'action antifongique contre les 3 champignons, avec des pourcentages d'inhibition allant de 5% jusqu'à plus de 89% selon l'espèce bactérienne en comparaison avec le témoin.

En effet, les 2 souches *Agrobacterium* sp. TC5 et *Enterobacter* sp. ZF3 se sont révélées les plus efficaces contre les 3 espèces fongiques en utilisant les deux méthodes de confrontation avec des pourcentages très élevés de 86,6% et 86% respectivement comparé au témoin ($P < 5\%$). Les souches *Enterobacter* sp. KFR9 et *Bacillus* sp. ont présenté des taux d'inhibition modérés, compris entre 40% à 55%. Ces souches ont montré une efficacité moyennement significative pour inhiber la croissance des 3 champignons.

Cependant, la souche du genre *Rhizobium* XJ3 a montré une efficacité moins importante à l'égard des trois champignons étudiés avec des pourcentages d'inhibition qui varient entre 16% à 41%.

Tableau 02: Taux d'inhibition des champignons phytopathogènes dans la méthode simultanée.

METHODE SIMULTANEE				
	Souches antagonistes	FOA	G2	BT
<i>Bacillus</i> spp.	TCR51	34,38%	17,33%	33,35%
	PF43	43,13%	16,66%	36,84%
	TC4	19,38%	43,33%	54,60%
	TF6	48,13%	34%	42,10%
<i>Enterobacter</i> spp.	KFR9	34,38%	49,33%	40,13%
	TBR5	45,50%	31,33%	38,15%
	ZF3	74,38%	86%	74,34%
<i>Azotobacter</i> sp.	TF8	29,38%	40%	43,42%
<i>Chromobacterium</i>	TF4	48,75%	44%	38,15%

spp.	KF2	58,13%	62,66%	50%
<i>Burkholderia</i> spp.	TC3	26,25%	28,66%	36,18%
	TC13	54,375%	41,33%	32,89%
<i>Agrobacterium</i> spp.	TC1	58,75%	51,31%	34,21%
	TC5	70%	76,66%	46,71%
<i>Rhizobium</i> sp.	XJ3	41,88%	16%	27,36%

Tableau 03 : Taux d'inhibition des champignons phytopathogènes dans la méthode tardive

METHODE TARDIVE				
	Souches antagonistes	FOA	G2	BT
<i>Bacillus</i> spp.	TCR51	45%	44%	41,44%
	PF43	20%	84%	42,76%
	TC4	44,38%	42,66%	50%
	TF6	66,88%	5,33%	42,76%
<i>Enterobacter</i> spp.	KFR9	40%	52%	54,60%
	TBR5	33,13%	38%	50,65%
	ZF3	83,13%	76,66%	75,65%
<i>Azotobacter</i> sp.	TF8	44,38%	89,33%	48,02%
<i>Chromobacterium</i> spp.	TF4	44,38%	22%	35,52%
	KF2	53,13%	51,33%	27,39%
<i>Burkholderia</i> spp.	TC3	67,50%	66%	34,86%
	TC13	49,38%	86%	38,15%
<i>Agrobacterium</i> spp.	TC1	68,13%	70,66%	43,42%
	TC5	86,25%	60%	49,34%
<i>Rhizobium</i> sp..	XJ3	26,88%	39,33%	40,78%

Parmi les espèces fongiques traitées, le champignon *Fusarium oxysporum* fsp. *lycopersici* s'est révélé le plus sensible aux différentes souches bactériennes dans les deux méthodes de confrontation, avec un pourcentage d'inhibition le plus élevé obtenu pour ce champignon qui atteint 89.66%. Suivi de *Fusarium oxysporum* fsp. *albedinis* puis *Botryosphaeria* sp.

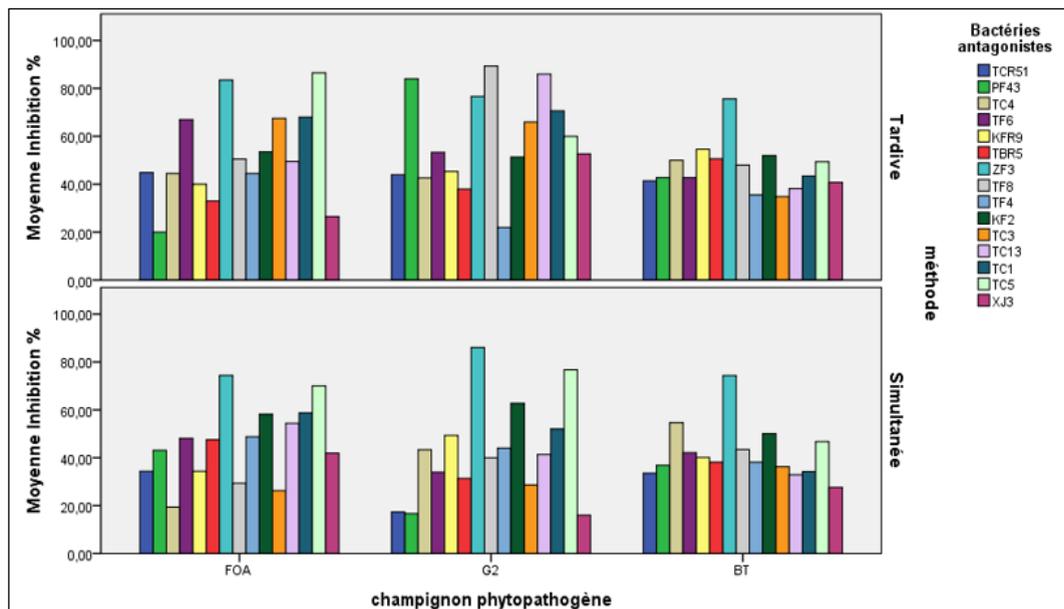


Figure 06 : Analyse statistique des pourcentages d'inhibition de la croissance des champignons par les bactéries antagonistes par les 2 méthodes Simultanée et tardive (SPSS)

Dans la méthode simultanée, les souches *Enterobacter* sp. ZF3, *Agrobacterium* sp. TC5 et *Chromobacterium* sp. KF2 ont présenté les pourcentages d'inhibition les plus élevés contre les champignons *Fusarium oxysporum* f.sp. *albedinis* (FOA) et *Fusarium oxysporum* f.sp. *lycopersici* (G2), atteignant respectivement 74,38%, 70% et 58,13% pour FOA.

Les souches bactériennes du genre *Chromobacterium* TF4 et *Bacillus* TF6 ont manifesté des taux d'inhibition moyens élevés. De 48,75% et 84,23% respectivement.

Cancernant la souche fongique G2, les antagonistes *Chromobacterium* sp. KF2, *Agrobacterium* sp. TC5 et *Enterobacter* sp. ZF3 ont présenté les pourcentages d'inhibition les plus élevés, respectivement 86%, 76,66% et 62,66% et moyennement élevé avec les souches *Agrobacterium* sp. TC1 (58,75%), et *Chromobacterium* sp. TF4 (44%).

Pour le champignon *Botryosphaeria* sp., les souches *Enterobacter* sp. ZF3, *Bacillus* sp. TC4 et *Chromobacterium* KF2, ont affiché les pourcentages d'inhibition les plus élevés, atteignant respectivement 74,34% 54,60%, 50%. Les taux d'inhibition moyens ont été observés avec les souches *Agrobacterium* sp. TC5, *Bacillus* sp. PF43 et *Burkholderia* sp. TC3 qui atteignent respectivement 46,76%, 36,84%, 36,18% d'inhibition.

Dans la méthode tardive, lors de l'évaluation de l'effet des souches bactériennes sur le champignon *Fusarium oxysporum* f.sp. *albedinis*, les résultats ont montré que l'espèce *Agrobacterium* sp. TC5 a montré un pourcentage d'inhibition le plus élevé de 86,25%, suivi par *Enterobacter* sp. ZF3 avec 83,13%. Les 2 souches *Agrobacterium* sp. TC1 et *Burkholderia*

sp.TC3 ont également présenté des pourcentages d'inhibition élevés, atteignant respectivement 68,13% et 67,50%. Parmi les souches bactériennes qui ont montrés des pourcentages d'inhibition moyennement élevé, sont *Bacillus* spp. TCR51 et TF8 qui atteignent 45% et 44,38% respectivement (Figure08).

En effet, concernant l'effet des souches bactériennes sur le champignon *Fusarium oxysporum* fsp. *lycopersici*, les résultats ont révélé que la souche *Azotobacter* sp.TF8 a montré un effet inhibiteur le plus élevé, atteignant 89,33%. Les souches *Burkholderia* TC13 *Bacillus* sp .PF43, *Agrobacterium* sp.Tc5 et *Enterobacter* sp.KFR9 ont également été efficaces avec des pourcentages d'inhibition respectifs élevés e 86 % 84%, 60% et 52%.(Figure07).Les taux d'inhibition moyens ont été observés par les souches *Bacillus* spp. KFR9 (52%), TCR51 (44%) et TC4 (42,66%).

Toutefois, pour le champignon *Botryosphaeria* sp, les 3 souches bactériennes *Enterobacter* spp.ZF3 .KFR9, et TBR5 ainsi que *Bacillus* sp. TC4 ont montré les pourcentages d'inhibition les plus élevés dont ZF3 avec 75,65% , KFR9 a atteint un pourcentage d'inhibition de 54,60%, et TBR5 de 50,65 % . En outre TC4 a atteint une inhibition de 50% .(Figure 09).

Les taux d'inhibition moyens ont été observées par certains souches appartenant au genre *Bacillus* PF43, TCR51 et TC4 avec des pourcentages d'inhibition respectivement (42,76%), (41,44%) et (50%)

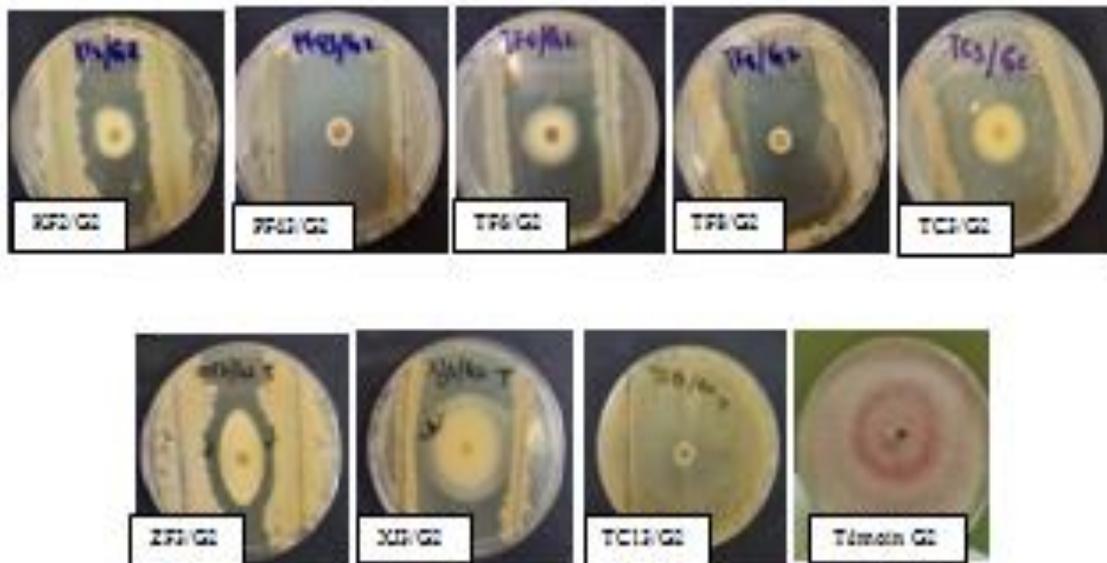


Figure 07 : Résultats d'antagonisme *in vitro* vis-à-vis de champignon *F.o* fsp *lycopersici*



Figure 08 : Résultats d'antagonisme *in vitro* vis-à-vis de champignon *F.o.f.sp. albedinis*

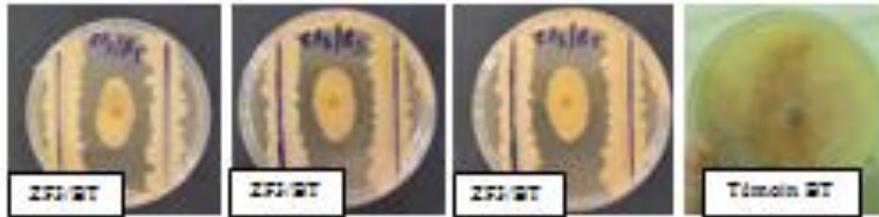


Figure 09 : Résultats d'antagonisme *in vitro* vis-à-vis de champignon *Botryosphaeria sp.*

L'analyse comparative des deux méthodes de confrontation révèle que certaines souches bactériennes se distinguent dans chaque approche. Globalement, les souches bactériennes ont montré des pourcentages d'inhibition considérablement pertinents ($P < 5\%$) dans la méthode tardive par rapport à la méthode simultanée.

Dans la méthode tardive les espèces *Bacillus sp.* TF8, *Enterobacter sp.* ZF3 et *Agrobacterium spp.* TC5 et TC1 sont efficaces contre les trois champignons, tandis que dans la méthode simultanée, *Agrobacterium sp.* TC5, *Enterobacter sp.* ZF3, *Chromobacterium sp.* KF2 et *Bacillus sp.* TC4 ont des effets antifongiques élevés contre les trois champignons.

Cette efficacité importante peut être due au fait que dans la méthode tardive, les bactéries ont eu plus de temps pour surmonter les mécanismes de défense des champignons et exercer leur effet inhibiteur.

III.3. Résultats de l'antagonisme *in situ* des bactéries endophytes et rhizosphériques vis-à-vis du champignon *Botryosphaeria sp.*

Dans l'étude de la lutte biologique *in vivo*, nous avons évalué l'efficacité de cinq souches bactériennes, il s'agit de l'espèce *Enterobacter sp.* ZF3, *Agrobacterium sp.* TC5, *Chromobacterium sp.* KF2 et *Bacillus spp.* PF43 et TCR51 sélectionnées à partir des résultats de l'antagonisme *in vitro* présentant une potentialité antibactérienne et antifongique.

Ces souches bactériennes ont fait objet d'une confrontation sur des rachis de palmier dattier vis-à-vis du champignon phytopathogène *Botryosphaeria sp.*

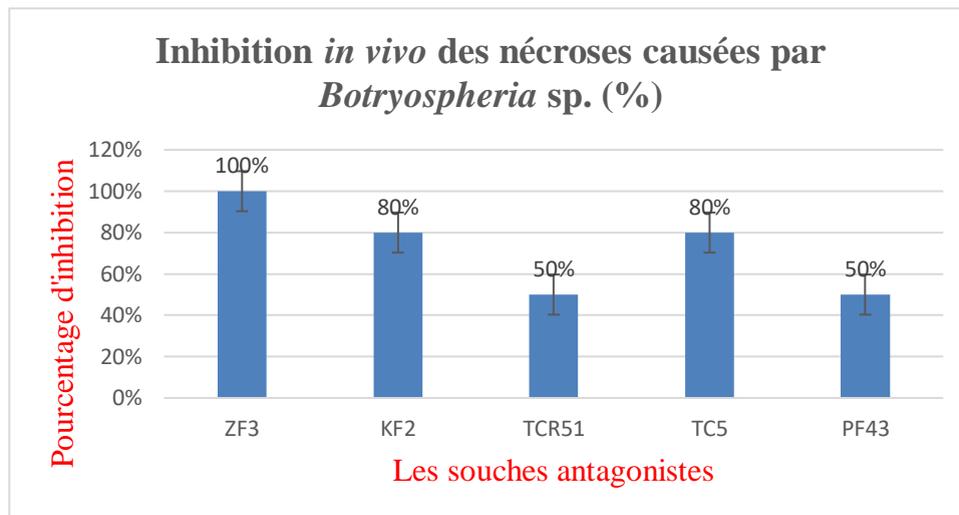


Figure 10 : Résultat d'antagonisme *in situ* vis-à-vis de champignon *Botryosphaeria* sp

Après 21 jours, les résultats ont montré que la souche *Enterobacter* ZF3 a obtenu les meilleurs résultats, en inhibant les nécroses jusqu'à 100% (absence totale de symptômes) se traduisant par l'absence totale de nécroses sur les fragments de rachis traités en comparaison avec le témoin positif qui a présenté 100% de nécroses au niveau du site d'inoculation et le témoin négatif ne présentant aucun symptôme.

La souche *Agrobacterium* sp. TC5 a également montré une forte inhibition réduisant les nécroses avec un intervalle de 80% jusqu'à 100%. La souche *Chromobacterium* sp. KF2 a montré une inhibition modérée de 50% à 80 %, tandis que les souches *Bacillus* spp. TCR51 et PF43, ont montré des inhibitions relativement faibles de moins de 50 % respectivement. (figure10)

Les résultats obtenus lors des tests *in situ* des souches efficaces correspondent aux résultats observés lors des tests *in vitro*. Cette potentialité suggère que les effets bénéfiques des souches de bactéries observés *in vitro* se manifestent également dans des conditions réelles *in situ*

Les souches *Enterobacter* sp. ZF3, *Agrobacterium* sp. TC5 et *Chromobacterium* sp. KF2 méritent une attention particulière pour de futures études et applications de lutte biologique.

La variation des résultats obtenus est liée aux mécanismes d'action antifongiques impliqués par les endophytes et rhizobactéries qui sont principalement, la compétition, l'antibiose ainsi que le phénomène de parasitisme.

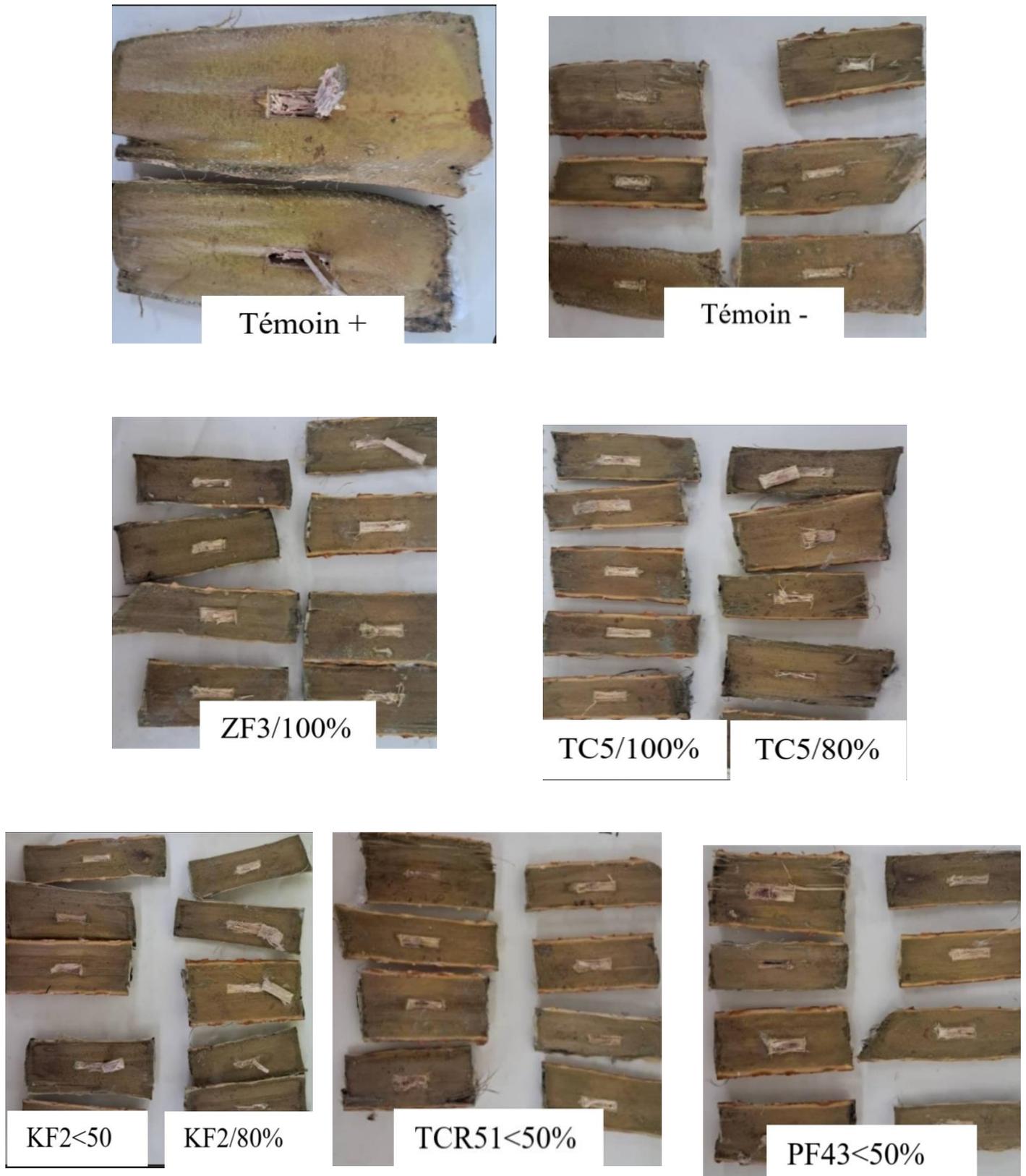


Figure 11 : Résultats de test d'antagonisme *in situ* vis-à-vis le champignon *Botryosphaeria*

sp.

III.4. Résultats de la caractérisation des souches bactériennes

Afin de mettre en évidence la production de biofilm, de sidérophores et l'activité enzymatique, nous avons sélectionné différents milieux spécifiques pour chaque activité, contenant des substrats inducteurs appropriés.

III.4.1 Résultats de test de production de biofilm

Le virage de couleur des colonies bactériennes en noir indique la production de biofilm, cependant, il est important de noter que l'absence de coloration noire des colonies ne signifie pas nécessairement l'absence de biofilm. Cette réponse peut plutôt indiquer une variation dans les caractéristiques du biofilm formé par ces souches spécifiques (figure 11)

Les résultats obtenus après 9 jours mettent en évidence que parmi les souches testées, trois d'entre elles ont provoqué un résultat positif il s'agit de *Bacillus* sp. PF43 et *Burkholderia* sp .TC3 et *Enterobacter* KFR9 indiquant la formation de biofilm. En revanche, aucune transformation n'a été observée pour les autres souches (tableau 04).

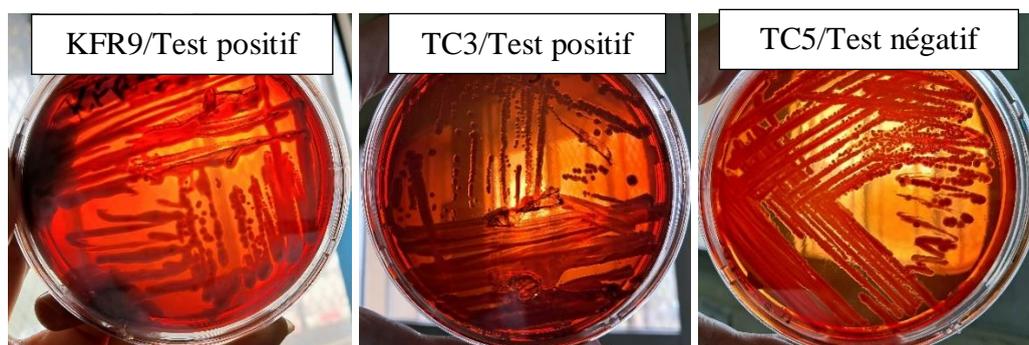


Figure 12: Résultats de test de production de biofilm.

Tableau 04: Résultats du test de biofilm

Souches antagonistes	1- Tc5	2- Tc3	3- Pf43	4- Kf2	5- Zf3	6- Tcr51	7- Tf6	8- Kfr9	9- Xj3	10- Tc1
Biofilm	-	+	-	-	-	-	+	+	-	-

III.4.2. Résultats de test de production de sidérophores

Les résultats du test indiquent que parmi les souches testées, quatre ont démontré un résultat positif appartenant au genre *Bacillus* TF6 et *Agrobacterium* TC1, TC5 et *Rhizobium* XJ3 ce qui leur permet de chélater et d'utiliser le fer disponible dans le milieu (Tableau 05).

La capacité de produire les sidérophores par les bactéries se manifeste par un changement de couleur du surnageant en orange après l'ajout d'une solution de chlorure ferrique à 2% après 48h lorsque les sidérophores se lient au fer, cela peut entraîner un

Souches antagonistes	1- Tc5	2- Tc3	3- Pf43	4- Kf2	5- Zf3	6- Tcr51	7- Tf6	8- Kfr9	9- Xj3	10- Tc1
Sidérophore	+	-	-	-	-	-	+	-	+	+

changement de couleur du milieu (figure 12)

Tableau 05 : Résultats de test de production de sidérophores.

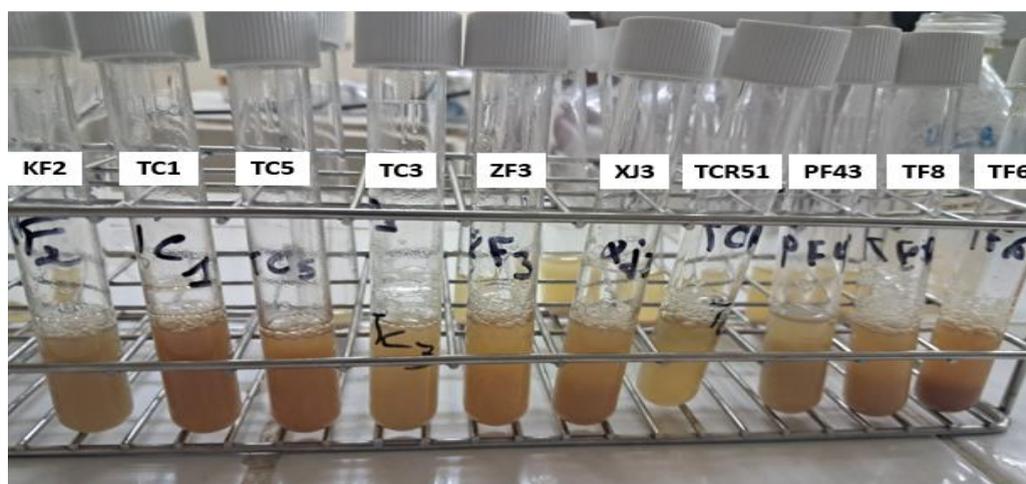


Figure 13 : Résultats de test de production de sidérophores des bactéries testées

III.4.3. Criblage de l'activité enzymatique

Le criblage de l'activité enzymatique des souches bactériennes endophytes et rhizosphériques a été effectué pour cinq enzymes à intérêt de lutte biologique et qui a été réalisé sur des milieux de culture solide.

III.4.3.1. Résultats de test de la protéase

Le résultat du test de protéase a été positif pour une seule souche *Bacillus* sp. PF43 parmi les souches testées sur la gélose nutritive additionnée de lait écrémé. Après 48 heures d'incubation, un halo clair autour de chaque spot de la bactérie a été observé (figure 13), ce résultat indique que cette souche particulière est capable de produire et de sécréter des enzymes protéolytiques qui ont la capacité de dégrader les protéines présentes dans le lait

écrémé.

Cette activité protéolytique suggère que cette souche a un potentiel dans la lutte biologique en dégradant les protéines des organismes pathogènes, limitant ainsi leur croissance et leur impact.



Figure 14 : Test positif de protéase

III.4.3.2. Résultats de test cellulase

Les résultats de test cellulase ont révélé que parmi les souches testées, 5 souches : *Agrobacterium* spp. TC5 TC1, *Burkholderia* sp.TC3 et *Bacillus* spp. KFR9 et TF6 ont démontré la capacité de produire la cellulase après l'ajout de la solution rouge Congo .(figure14) .Lors de l'observation des colonies, il a été constaté qu'elles étaient entourées d'une zone claire. Ces résultats indiquent que ces souches sont capables de décomposer le carboxyméthylcellulose CMC, ce qui se manifeste par la formation de la zone claire autour des colonies. La présence de cette zone claire est due à l'interaction de la solution rouge Congo avec les produits de dégradation du CMC par les enzymes cellulases produites par ces souches.



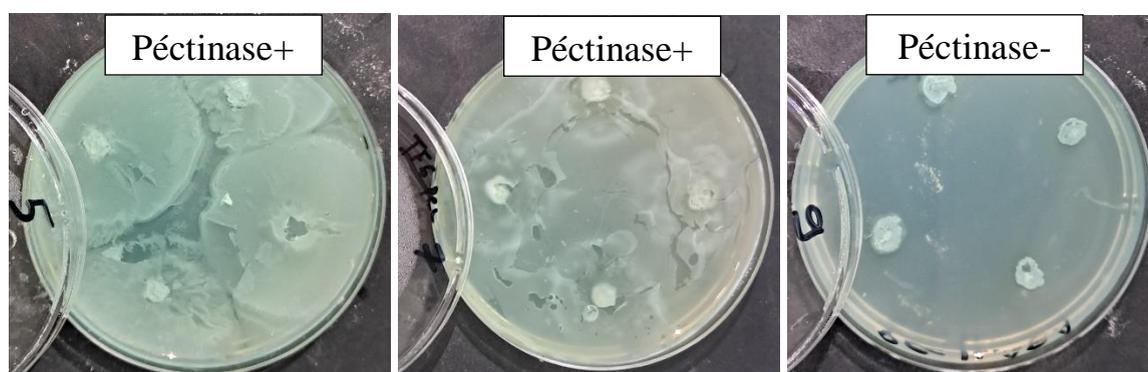
Figure 15 : Résultats de test cellulase.**Tableau 06** : Résultats de test Cellulase des bactéries testées.

Souches antagonistes	1- Tc5	2- Tc3	3- Pf43	4- Kf2	5- Zf3	6- Tcr51	7- Tf6	8- Kfr9	9- Xj3	10- Tc1
Cellulase	+	+	-	-	-	-	+	+	Noir	+

III.4.3.3. Resultats de test pectinase

Les résultats du test de pectinase ont révélé que trois souches ont donné une réaction positive (figure 15). Il s'agit des souches TC5, TF6 et PF43 appartenant aux genres *Agrobacterium* et *Bacillus* respectivement.

Ces souches ont montré la formation d'un halo clair autour des spots après inondation des colonies avec une solution d'acétate de cuivre. La présence d'un halo clair suggère que les enzymes pectinases produites par ces souches sont capables de dégrader la pectine présente dans le milieu.

**Figure 16** : Résultats de test pectinase.**Tableau 07** : Résultats de test pectinase des bactéries testée

Souches antagonistes	1- Tc5	2- Tc3	3- Pf43	4- Kf2	5- Zf3	6- Tcr51	7- Tf6	8- Kfr9	9- Xj3	10- Tc1
Péctinase	+	-	+	-	-	-	+	-	-	-

III.4.3.4. Résultats de test amylase

La présence d'une zone de dégradation claire ou d'un halo autour des colonies bactériennes sur le milieu contenant de l'amidon indique une réaction positive de l'amylase. Les résultats du test d'amylase ont révélé que les cinq souches *Agrobacterium* spp. TC1, TC5, *Bacillus* spp. PF43, TF6 et *Chromobacterium* KF2 ont donné un résultat positif (figure 16) . Ces souches produisent l'enzyme amylase, qui est capable de dégrader l'amidon. Ce résultat indique que ces cinq souches bactériennes ont le potentiel d'être utilisées dans la lutte biologique.

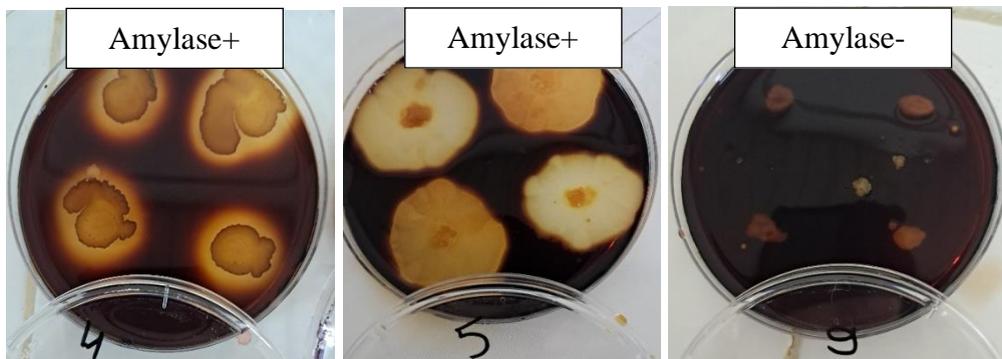


Figure 17 : Résultats de test amylase.

Tableau 08 : Résultats de test amylase des bactéries testées

Souches antagonistes	1- Tc5	2- Tc3	3- Pf43	4- Kf2	5- Zf3	6- Tcr51	7- Tf6	8- Kfr9	9- Xj3	10- Tc1
Amylase	+	-	+	++	-	-	+	-	-	+

III.4.3.5. Résultats de test chitinase

La croissance des colonies dans le milieu gélosé à base de chitine indique la capacité de production d'enzymes chitinases par les bactéries (figure17). D'après les résultats obtenus, toutes les souches testées ont montré la capacité de dégrader la chitine, car il y a eu une croissance bactérienne dans toutes les boîtesensemencées.

Étant donné que la chitine était la seule source présente dans le milieu, cela suggère que les souches ont été capables d'utiliser la chitine comme substrat pour leur croissance. La capacité des souches à dégrader la chitine indique la présence des enzymes chitinases qui peuvent couper la chitine en unités plus petites.



Figure 18 : Résultats de test de Chitinase.

Chapitre IV
Discussion

IV : DISCUSSION

Dans cette étude, notre objectif était d'évaluer l'efficacité de différentes souches bactériennes endophytes et rhizosphériques non fluorescentes dans la lutte biologique principalement à Gram-négatif appartenant aux genres *Agrobacterium*, *Chromobacterium*, *Enterobacter*, *Burkholderia* et *Rhizobium* et *Azotobacter* ainsi que le genre *Bacillus* à Gram positif.

Le pouvoir d'antagonisme *in vitro* de ces bactéries a été étudié à l'égard des deux bactéries phytopathogènes, à savoir *Agrobacterium tumefaciens* C58 et *Erwinia amylovora*, EMEA ainsi que trois champignons *Fusarium oxysporum* fsp. *albedinis* FOA et *Fusarium oxysporum* fsp. *lycopersici* G2 et *Botryosphaeria* sp. BT

Les résultats de l'activité antibactérienne *in vitro* montrent que parmi les souches étudiées, les rhizobactéries du genre, *Agrobacterium*, *Chromobacterium* et *Bacillus* ont été particulièrement efficaces dans l'inhibition de la croissance des bactéries pathogènes *E.amylovora* et *A.tumefaciens*. La taille des zones d'inhibition variait de 1mm à 12,5 mm. Nos résultats sont en accord avec plusieurs études montrant le potentiel des endophytes bactériens et rhizobactéries comme agents de lutte biologique contre les maladies des plantes (**Ben selama et al.,2021**).

En effet, les maladies bactériennes causées par *Erwinia amylovora* et *Agrobacterium tumefaciens* causent des dommages significatifs aux plantes. L'espèce *Erwinia amylovora*, responsable de la maladie du feu bactérien de nombreuses Rosaceae, est classée parmi les agents pathogènes bactériens les plus destructeurs, provoquant la nécrose rapide des tissus végétaux des arbres fruitiers à pépins (**Taffet et al.,2020 ; Benjam, 2021**). D'autre part, la pathogénicité de *Agrobacterium tumefaciens* repose sur le transfert l'ADN-T de son plasmide, ce qui induit la formation de tumeurs chez les cellules végétales hôtes. Ces bactérioses induisent à des pertes économiques importantes, en particulier chez les plantes appartenant aux familles Vitaceae et Rosacées (**González Mula, 2017; Jailani et al.,2022**).

Des résultats proches à la présente étude ont été approuvés dans une initiale recherche réalisée par **Malik et al. (2021)** ayant démontré l'efficacité de la souche *Agrobacterium radiobacter* K84 dans le contrôle de la galle du collet causée par *A. tumefaciens*. De plus, **Kohl et al.,(2019)** ont montré l'effet antibactérien des souches de *Bacillus*, notamment contre *Agrobacterium tumefaciens* et *Erwinia carotovora*. Ces résultats concordent avec ceux obtenus dans notre étude. De même, **Taffet et al., (2020)** ont observé l'inhibition de la croissance d'*E. amylovora in vitro* par des souches antagonistes de *Bacillus*, avec des zones

d'inhibition allant de 18 mm à 53 mm.

Ainsi, les constatations de notre étude sont en accord avec ces travaux précédents, renforçant l'importance des souches de *Bacillus* spp. et *Agrobacterium* spp. dans le contrôle des pathogènes.

Concernant l'activité antifongique vis-à-vis les trois champignons étudiés, les résultats montrent que les souches bactériennes d'*Agrobacterium* sp., *Enterobacter* sp., *Burkholderia* sp. et *Bacillus* sp. se sont révélées particulièrement efficaces en montrant une efficacité élevée de 50% à plus de 85% .

En effet, ces pathogènes fongiques des plantes pourraient être responsables de la destruction massive du rendement des cultures.

Les espèces pathogènes de *Fusarium* spp . d'origine trellurique représentent l'une des maladies les plus destructives affectant les cultures végétales (**Ben Selama et al.,2021**). Ces mycoses provoquent des symptômes de flétrissement vasculaire et de pourriture des racines et des tissus corticaux chez les plantes infectées. Notamment, *F. oxysporum* fsp. *lycopersici* spécifique à la pourriture de tomate et *F. oxysporum* fsp. *albidinis* responsable de la maladie du bayoud chez le palmier dattier (**Lecomte et Edel_hermann, 2018; planchon,2018**).

Le genre *Botryosphaeria* est connu pour sa diversité d'hôtes, Il constitue une menace économique pour les agriculteurs, entraînant des pertes de rendement. Les symptômes caractéristiques des maladies causées par ce genre comprennent la formation de chancres, le dépérissement, la nécrose du bois, la pourriture des fruits, ainsi que d'autres manifestations. En outre, la bactérie *Botryosphaeria* sp. joue un rôle important en tant qu'agent pathogène de la vigne (**Kermia,2016 ,Blundell et al.,2021**).

Nos résultats sont en accord avec ceux obtenus par **Boulahouat et al.,(2022)**, qui ont également montré l'efficacité de l'utilisation des endophytes et des rhizobactéries du genre *Bacillus* isolées à partir de palmiers dattiers pour le biocontrôle de *Fusarium oxysporum* f.sp. *albedinis* en Algérie.

Les résultats de notre étude concordent avec les résultats de **Jha et al., (2011)**, qui ont également observé une activité fongicide de la souche *Enterobacter* BNM 0357 contre *Fusarium solani*, espèce du même genre étudié. Ces observations renforcent l'idée que cette souche spécifique d'*Enterobacter* peut être prometteuse en tant qu'agent de lutte biologique efficace contre les champignons pathogènes.

Lors des tests antifongiques *in vivo* sur les rachis du palmier dattier, les souches des genres *Enterobacter*, *Agrobacterium* et *Chromobacterium* ont démontré leur efficacité en

réduisant les nécroses de moins de 50 % jusqu'à 100% comparé avec le témoin positif qui présente 100% de nécrose provoquée par le champignon *Botryosphaeria* sp.

Une étude similaire menée par Bustamante **et al.** (2022) a montré la capacité d'inhibition de la croissance de *Botryosphaeria* sp. Responsable des maladies du tronc de la vigne par les bactéries endophytes notamment *Bacillus velezensis*, *Pseudomonas* spp. *Serratia* et *plymuthica*.

Ces résultats soulignent l'importance de sélectionner les isolats bactériens appropriés qui présentent des effets antifongiques plus élevés et que ceux-ci pourraient être exploités en traitant les vignes avec des inoculants bactériens vivants et/ou leurs métabolites secondaires.

Afin de garantir l'efficacité du biocontrôle, il est essentiel d'identifier les vulnérabilités dans le cycle de vie des agents pathogènes et de les cibler de manière à perturber le cycle de la maladie. Cette approche a été soulignée dans une étude récente menée par **Lahlali et al.**, (2022). Différents mécanismes peuvent être utilisés par les bactéries endophytes et PGPR pour supprimer les agents phytopathogènes, notamment l'antibiose, la synthèse d'enzymes hydrolytiques, la compétition médiée par les sidérophores pour Fe³⁺, le développement d'une résistance systémique induite et la compétition pour les nutriments et les niches avec les phytopathogènes (**Buragonni, 2021**).

Les tests de potentialité biochimiques ont permis d'identifier quatre souches parmi les dix souches évaluées, à savoir *Agrobacterium* spp. TC1 et TC5, *Rhizobium* sp. XJ3 et *Bacillus* sp. Tf6, qui ont démontré des résultats positifs, lors du test de production de sidérophores. Ces résultats soulignent l'importance cruciale de ces souches dans les résultats significatifs d'antagonisme, mettant en évidence leur rôle clé dans la lutte contre les agents pathogènes.

L'étude menée par (**Amjad, 2023**) apporte une contribution significative à notre compréhension de l'importance des sidérophores dans la suppression des maladies. Les sidérophores permettent la séquestration du fer dans le milieu, le rendant ainsi indisponible pour les agents pathogènes. Cette compétition pour le fer est un mécanisme clé utilisé par les agents de lutte biologique.

Les chercheurs **Yu et al.**,(2011) ont découvert que la souche bactérienne *B.subtilis* CASI5 produit des sidérophores de type catécholate (Bacillibactine), qui agissent sur la croissance de 15 champignons phytopathogènes des genres *Phytophthora* et *fusarium* ralentissent leur croissance jusqu'à 94 %.

Les résultats de test de production de biofilm révèlent que 3 souches des genres *Rhizobium* *Bacillus* et *Burkholderia* sont capables de former des biofilms.

L'étude réalisée par **Malik et al.**,(2021) indique que la formation de biofilm entraîne une

réduction de la colonisation de l'agent pathogène par l'occupation physique du site en formant des assemblages multicellulaires complexes.

Nous avons testé la capacité de production des enzymes hydrolytiques responsables de la perforation, la modification et de la dégradation de la structure de la paroi cellulaire microbienne.

Les résultats ont révélé pour la chitinase toutes les souches ont manifestés un résultat positif ce qui suggère que cette enzyme est responsable de la potentialité antifongique observée.

Ce résultat est en corrépondance avec celui de **Mercado et Lugtenberg, (2014)** qui confirme l'effet de la chitinase comme principale enzyme responsable de la dégradation de la paroi cellulaire fongique et plusieurs exemples d'endophytes chitinolytiques qui protègent contre les maladies des plantes sont connus.

Dans une étude similaire des espèces endophytes et rhizosphérique du genre *Bacillus*, produisent des chitinases qui ciblent l'agent pathogène *Botrytis cinerea* et *Rhizoctonia* sp. Agents de pourriture sur les plantes (**Mercado et Lugtenberg, 2014**).

Les résultats des autres enzymes ont révélé que la souche *Bacillus* sp. PF43 a montré une activité protéasique positive. De plus, *Bacillus* spp. KFR9, TF6, *Agrobacterium* spp. TC1 et TC5 ont été positifs pour la pectinase, tandis que *Agrobacterium* sp. TC5, *Burkholderia* TC3 et *Bacillus* spp. LFR9 et TF6 ont montré une activité positive pour la cellulase. Enfin, *Bacillus* spp. TF6 et PF43, ainsi que *Agrobacterium* spp. TC5 et TC1, ont démontré une activité positive pour l'amylase.

Dans une étude similaire de production des enzymes lytiques, **Ben selama et al.,(2019)** ont démontré que plusieurs bactéries endophytes dont le genre *Bacillus* et *Serratia* étaient capables de produire des enzymes telles que la protéase, la gélatinase, la chitinase, la cellulase, l'amylase, la pectinase .

Au niveau moléculaire, il est intéressant de noter que l'espèce antagoniste *Enterobacter* sp. Possède le gène *ubiC*, qui est responsable de la production d'une enzyme capable de convertir le chorismate en 4-hydroxybenzoate et pyruvate. Cette conversion est significative car le 4-hydroxybenzoate est connu pour avoir une activité antimicrobienne (**jha et al.,2012**)

Des études antérieures ont confirmé que la forte activité antibactérienne des souches de *Bacillus* (*B. subtilis*, *B. amyloliquefaciens*) est associée à la présence des gènes codant pour les lipopeptides de surfactine et de fengycine qui ont démontré une activité inhibitrice contre divers pathogènes bactériens tels que *Ralstonia solanacearum*, *Erwinia amylovora*, *Pseudomonas syringae* pv. *syringae*, *Xanthomonas arboricola* et *Agrobacterium tumefaciens*

(Mora et al., 2015).

L'effet des agents pathogènes sur l'efficacité du biocontrôle est un facteur crucial à considérer lors du choix des stratégies de lutte. La variabilité génétique et la diversité écologique des agents pathogènes les rendent uniques dans leur interaction avec les antagonistes. La durabilité de l'efficacité phytosanitaire dépend de la pression de sélection exercée sur les populations de phytopathogènes et de la capacité d'adaptation des pathogènes aux stratégies de contrôle. **(Bustamante et al., 2022)**

Conclusion

Conclusion et perspectives

Ce travail a été mené dans le cadre de l'étude de l'activité antimicrobienne des bactéries endophytes et rhizosphériques appartenant aux genres *Agrobacterium*, *Chromobacterium*, *Enterobacter*, *Burkholderia*, *Rhizobium*, *Azotobacter* et *Bacillus*.

Les résultats de l'effet antibactérien ont montré une capacité d'inhibition de la croissance des bactéries pathogènes *E. amylovora* EMEA et *A. tumefaciens* C58 observée par le genre *Agrobacterium* avec des zones d'inhibition allant jusqu'à 12,5 mm. De plus, une capacité d'inhibition des champignons phytopathogènes a été bien démontrée par les genres *Agrobacterium*, *Enterobacter*, et *Bacillus* atteignant des pourcentages d'inhibition atteignant jusqu'à 89,6%. L'essai *in situ* sur les rachis a confirmé l'efficacité de ces souches contre le champignon *Botryosphaeria* sp. Avec une réduction des nécroses allant de moins de 50% à 100%.

En outre, des tests de potentialité renforcent l'idée de la suppression de la croissance et de la propagation des agents phytopathogènes par le biais de mécanismes tels que la production d'enzymes hydrolytiques, de sidérophores et la formation de biofilm.

Plusieurs souches ont montré des résultats positifs dans différents tests spécifiques. Les souches les plus prometteuses, telles que *Bacillus* sp. TF6 et *Agrobacterium* sp. TC5, ont montré des performances positives dans plusieurs tests,

En tant que microorganismes bénéfiques présents à l'intérieur des tissus végétaux ou dans la zone environnante des racines, ces bactéries jouent un rôle important dans la protection des plantes contre les maladies. Leur présence favorise une meilleure croissance des plantes, renforce leur système immunitaire et inhibe la croissance des agents pathogènes.

Cette efficacité laisse entrevoir la possibilité d'utiliser ces microorganismes dans la lutte biologique contre les microorganismes phytopathogènes.

A travers ces résultats nous pouvons conclure que l'importance de la plante palmier dattier est due à une relation complémentaire entre la composition chimique de la plante et sa microflore.

Ces résultats ouvrent la voie à de futures recherches et applications dans le domaine de la lutte biologique.

Pour renforcer l'utilisation des souches bactériennes sélectionnées dans la lutte biologique, plusieurs perspectives de recherche peuvent être envisagées :

- Identification moléculaire et séquençage des souches antagonistes.

- Études sur les mécanismes d'action : interactions moléculaires et biochimiques.
- Optimisation des conditions d'application : concentration et environnement.
- Réalisation des tests d'antagonisme *in vitro* et *in situ* sur d'autres agents pathogènes bactériens et fongiques.
- Études de formulation et d'application sur le terrain : stabilité et efficacité
- Études de résistance et de durabilité : évaluer la résistance des agents pathogènes aux souches bactériennes antagonistes.
- Études sur l'impact environnemental : évaluer l'impact des souches bactériennes utilisées en lutte biologique sur l'environnement, notamment en termes de biodiversité et d'écosystèmes.

Références

Bibliographiques

REFERENCE ET BIBLIOGRAPHIQUE

- **Abedinzadeh, M., Etesami, H. & Alikhani, H. A. (2018).** Characterization of rhizosphere and endophytic bacteria from roots of maize (*Zea mays* L.) plant irrigated with wastewater with biotechnological potential in agriculture. *Biotechnology reports*, 20, 1-12.
- **Aimen, W. (2018).** Biodiversité de la flore bactérienne du palmier dattier poussant au sud est Algérien. Effet du climat sur le comportement de cette flore.. Univ. Frères Mentouri Constantine. thèse de doctorat.
- **Amjad, A. (2023).** Contrôle biologique des espèces phytopathogènes fongiques à l'aide de la mycoflore transmise par le sol. Université des sciences et technologies de Sivas Applications. *Enzyme Research*. Volume 2011, Article ID 280696, P, 10.
- **Aldwinckle, HS, Bhaskara Reddy, MV et Norelli, JL (2002).** Évaluation de la lutte contre l'infection par le feu bactérien des fleurs de pommier. Soms et pousses avec des inducteurs SAR, des agents biologiques, un régulateur de croissance, composés de cuivre et autres matériaux. *Acta Horticulturae*, 590, 325-331.
- **Bahriz, H., Bourasb, N. (2020).** Étude de la Maladie du Bayoud, le Comportement Variétal du Palmier Dattier vis-à-vis du *Fusarium oxysporum* fsp. *albedinis* dans la Vallée du MZab. In *Technology and Development* Volume 5 pp. 41_60.
- **Bai, Y., D'aoust, F., Smith, D. L. & Driscoll, B. T. (2002).** Isolation of plant-growth-promoting *Bacillus* strains from soybean root nodules *Canadian Journal of Microbiology* 48, 230- 238.
- **Barthélemy, M. (2019).** Étude de la diversité chimique et biologique d'endophytes de palmiers. Ecole doctorale : Sciences de la Nature et de l'Homme – ED 227. thèse de doctorat .43p
- **Benzohra .I-E, Mégateli.M, Djillali.K, Benouiset.S , Makhloufi.S. (2022).** Épidémiologie de Bayoud du palmier dattier en Algérie : Facteurs de progression et mesures de protection de palmeraies des oasis contaminés. 14 (2) : 68–72.
- **Belaroussi, M-E. (2019).** Étude de la production du palmier dattier (*Phoenix dactylifera* L.) variété Deglet Nour : cas des régions de Oued Mya et Oued , Thèse doct. Univ Kasdi Merbah – Ouargla.
- **Bragger, J.M., Daniel R.M., Coolbear T., Morgan H.W. (1989).** Very stable enzymes from Cabrefiga, J., Bonaterra, A., Montesinos, E., Mechanism of antagonism of *Pseudomonas fluorescens* EPS62e against *Erwinia amylovora*, the causal agent of fire blight. *Int Microbiol*,
- **Blundell R, Arreguin, M., Eskalen , A. (2021).** Évaluation *in vitro* des micro-organismes endophytes, épiphytes et de la sève de la vigne pour une utilisation potentielle dans le contrôle

REFERENCE ET BIBLIOGRAPHIQUE

des agents pathogènes des maladies du tronc de la vigne .phytopathologie méditerranée. 60(3)
535_548

- **Boulahouat, S., Cherif-Silini, H., Silini, A., Chenari Bouket, A., Luptakova, L., Saadaoui, N., Alenezi, F. N., & Belbahri, L. (2022).** Critical Evaluation of Biocontrol Ability of Bayoud Infected Date Palm Phyllospheric *Bacillus* spp. Suggests That *in vitro* Selection Does Not Guarantee Success in Planta. *Agronomy*, 12, 2403
- **Broggini-Schärer, G.A.L., Duffy, B., Holliger, E., Scharer, H.J., Gessler, C. et Patocchi, A. (2005).** Détection de l'incendie agent de lutte biologique contre le mildiou *Bacillus subtilis* BD170 (Biopro®) dans un verger de pommiers suisse. *Journal européen des plantes Pathologie*, 11, 93-100
- **Bustamante, MI ; Elfar, K.; Eskalen, A. (2022)** Évaluation de l'activité antifongique des bactéries endophytes et rhizosphériques contre les agents pathogènes du tronc de la vigne. *In Micro-organismes* .10, 2035.
- **Burrage, S.G.(2021).** Applications des microbes endophytes dans l'agriculture, la biotechnologie, la médecine et au delà. systématique, pathologie, maladies. Centre de publication universitaire, Tunis. P456 Tech., 1 (1): 008-013.
- **Card S., Johnson L., Teasdale S., Caradus J., (2016)** Deciphering endophyte behaviour: the link between endophyte biology and efficacious biological control agents. *FEMS Microbiol. Ecol.* , 92.
- **Chaitanya K -J et Meenu S.(2015).** Rhizobactéries favorisant la croissance des plantes (PGPR) *E3 Journal of Agricultural Research and Development* Vol. 5(2). Pp.
- **Coley-Smith J.R., Verhoeff K., Jarvis W.R (1980).** The biology of Botrytis. Contribution des champignons endophytes à la tolérance aux facteurs adverses (biotiques et abiotiques) des espèces cultivées : isolement des champignons endophytes et étude de leur contribution à la tolérance à la salinité ou à des polluants.
- **Compant, S., Mitter, B., Colli-Mull, J. G., Gangl, H. & Sessitsch, A. (2011).** Endophytes of grapevine flowers, berries, and seeds: identification of cultivable bacteria, comparison with other plant parts, and visualization of niches of colonization. *Microbial ecology*, 62, 188-197 .
- **Daddi Bouhoune M., (2010)** – contribution a l'étude de l'impact de la nappe phréatique et des accumulations gypso-salines sur l'enracinement et la nutrition du palmier dattier dans la cuvette de Ouargla (sud est algérien) Thèse de doctorat. p1 et 52
- **Dakhia', N., Bensalah, M.K., Romani', M., Djoudi', AM., & Belhamra, M. (2013).** État phytosanitaire et diversité variétale du palmier dattier au bas Sahara - Algérie. *Journal algérien*

REFERENCE ET BIBLIOGRAPHIQUE

des régions arides. CRSTRA - Division Bioressources & Université Mohamed Khider - Biskra pp. 5_17.

- **David, B. V., Chandrasehar, G., & Selvam, P. N. (2018).** *Pseudomonas fluorescens*: A plant-growth-promoting rhizobacterium (PGPR) with potential role in biocontrol of pests of crops. , *Crop Improvement through Microbial Biotechnology* ,pp.221_243.
- **De Vos P., Garrity G. M., Jones D., Krieg N. R., Ludwig W., Rainey F. A., Schleifer K. H. and Whitman W. B. (2009).** *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*, 2 ed., The Firmicute. Springer. New York. Volume Three. 63-67
- **Del Barrio-Duque, A., Ley, J., Samad, A., Antonielli, L., Sessitsch, A. & Compant, S. 2019a.** Beneficial endophytic bacteria-*Serendipita indica* interaction for crop enhancement and resistance to phytopathogens. *Frontiers in microbiology* 10, 2888.
- **Doty, SL. 2008.** Enhancing phytoremediation through the use of transgenics and endophytes. *New Phytologist* 2008, 179(2), pp. 318-333.
- **Elazreg ,K-E.2020 .**Endophytes of commercial Cranberry cultivars that control fungal pathogens .
- **Garrido. C ., Lineiro. E., fernandez-Acero. F. J, Cantoral J. M., Carbu, M., and GonzalezRodriguez. V. E.(2012)..**Nouvelles perspectives dans l'étude des agents pathogènes fongiques du fraisier.*Gènes Génomes Génomique* 5 (1), 24-39
- **Gordon, R. E., Haynes, W. c., and Pang, C. H., (1973).**The Genus BACILLUS. *Agricultural Handbook No. 427.*,Washington DC: United States Department of Agriculture.
- **Gouda S, Kerry RG, Das G, Paramithiotis S, Shin HS, Patra JK. 2018.** Revitalization of plant growth promoting rhizobacteria for sustainable development in agriculture. *Microbiol Res.* 206: 131–140.
- **Guettouchi,A.(2017).** Caractérisation Botanique et moléculaire du palmier dattier (*Phoenix dactylifera* L.) de la région de Bou-Sâada..Thèse de doctorat.université Frères MENTOURI Constantine.168p
- **Hakim, S., Naqqash, T., Nawaz, M. S., Laraib, I., Siddique, M. J., Zia, R., & Imran, A. (2021).** Rhizosphere engineering with plant growth-promoting. in *Sustainable Food Systems*.Rev.v5.
- **Hanemian, M., Vasseur, F., Marchadier, E., Gilbault, E., Bresson, J., Gy, I., Vasseur F., Violle C., Enquist B.J., Granier C., Vile D. (2012).**Rôle de la protéine

REFERENCE ET BIBLIOGRAPHIQUE

- CLVI dans la sensibilité d'*Arabidopsis thaliana* à la bactérie phytopathogène *Ralstonia solanacearum*. Thèse de Doctorat en Interactions Plantes-Microorganismes. L'Université Toulouse II - Paul Sabatier. p 190
- **Hardoim P. R., van Overbeek L. S., Berg G., Pirttilä A. M., Compant S., Campisano A., Döring M., Sessitsch A., 2015.** The hidden world within plants: ecological and evolutionary considerations for defining functioning of microbial endophytes. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 79, p. 293–320. [57]
 - **Hardoim PR, van Overbeek LS, van Elsas JD (2008)** Properties of bacterial endophytes and their proposed role in plant growth. *Trends in Microbiol* **16**:463–471.
 - **Iyer, B. & Rajkumar, S. (2017).** Host specificity and plant growth promotion by bacterial endophytes. *Current Research in Microbiology Biotechnology*, 5, 1018-1030.
 - **Jha, CK., Patel, BV., Saraf, M.(2011).** Enterobacter: Rôle dans la promotion de la croissance des plantes. In *Bacteria in Agrobiolgy, Plant Growth Responses* pp 1_28.
 - **Joshi, M., Srivastava, R., Sharma, A. K., and Prakash, A. (2015).** Screening of resistant varieties and antagonistic *Fusarium oxysporum* for biocontrol of Fusarium wilt of chilli. *J. Plant Pathol. Microbiol.*3:5.
 - **Jourdan E., Ongena M.&Thonart P.,(2008).**Caractéristiques moléculaires de l'immunité des plantes induite par les rhizobactéries non pathogènes. *Biotechnol.Agron. Soc. Environ.*, **12**: 437-449
 - **Kara Terki, I. (2014).** Caractérisation et évaluation de la formation de biofilm de souches de staphylocoques isolées de sondes urinaires chez des patients hospitalisés au CHU de Tlemcen. Thèse de doctorat .Univ.Abou Bekr Belkaid, Tlemcen.
 - **Karthika, S., Midhun, S. J., & Jisha, M. S. (2020).** A potential antifungal and growth-promoting bacterium *Bacillus* sp. KTMA4 from tomato rhizosphere. *Microbial Pathogenesis*, 142, 104049.
 - **Khan, M. S., Gao, J., Zhang, M., Chen, X., Moe, S., & Du, Y. (2020).** Isolement et caractérisation de bactéries endophytes favorisant la croissance des plantes *Bacillus stratosphericus* LW-03 de *Lilium wardii*. *3 Biotech*, 10(1), 1-15.
 - **Kandel S. L., Joubert P. M., Doty S. L. (2017).** Bacterial endophyte colonization and distribution within plants. *Microorganisms* 5, p. 77–103.
 - **Khayy, S., Khoulassa, S., Gaboun, F., Abdelwahd, R., Diria, G., Labhilili, M., Iraqi, D., El Guilli, M., Fokar, M., & Mentag, R. (2020).** Projet de séquence du génome de *Fusarium*

REFERENCE ET BIBLIOGRAPHIQUE

- oxysporum f. sp. albedinis Souche Foa 133, l'agent causal de la maladie du Bayoud sur le palmier dattier. *Annonces de ressources en microbiologie* 9 (29), e00462-20.
- **Kobayashi, D. & Palumbo, J. (2000).** Bacterial endophytes and their effects on plants and uses in agriculture. *Microbial endophytes*, 213-250.
 - **Kuhad ,R.C, Gupta R et Singh A. (2011).** Microbial Cellulases and Their Industrial la bactérie phytopathogène *Ralstonia solanacearum*. Thèse de Doctorat en Interactions.
 - **Laroui, S.(2021).** Classification et modélisation de la croissance du champignon *Botrytis cinerea* à partir d'imagerie microscopique : vers l'établissement de liens entre phénotypes et molécules antifongiques.thèse de doctorat. Université Côte d'Azur. p197
 - **Mercadoblanco,J.Lugtenberg,B .(2014).**Applications biotechnologiques des endophytes bactériens microorganisms for agriculture and ecological sustainability. *Frontiers in SustainableFood Systems*, 5, 16.
molécules antifongiques.thèse de doctorat. Université Côte d'Azur. p197.
 - **Ma Y., Rajkumar M.(2016).** Beneficial role of bacterial endophytes in heavy metal phytoremediation. *J. Environ. Manage.*, 174, p. 14–25.
 - **Maheshwari, R., Bhutani, N., & Suneja, P. (2020).** Isolation and characterization of acc deaminase producing endophytic *Bacillus mojavensis* prn2 from pisum sativum. *iranian journal of biotechnology*, 18, 11-20.
 - **Moral, J., MuñozDíez, C., González, N., Trapero, A., and Michailides, T.J. (2010).** Chara cterizatip pathogenicity of *Botryosphaeriaceae* species collected from olive and other hosts in Spain and California *Phytopathology* 100:1340-1351.
 - **Malik, T., Rehman, B. U., Naqvi, S. A. H., Hasnain, A., Umar, B. U. D., Azeem, H., Shahid, M., & Umair, M. (2021).** Biological mediated management of bacterial diseases in crop-plants. *Pak. J. Phytopathol*, Vol. 33(01), 217-232.
 - **Nasraoui , B. (2006).** Les champignons parasites des plantes cultivées, biologie, systématique, pathologie, maladies. Centre de publication universitaire,Tunis. P456
 - **Rajendran, A. (2016).** Diversity of endophytic fungi from the ornamental plant–*Adenium obesum*. *Studies in fungi*, 34p.
 - **Rekis, A.(2021).**Conservation des ressources phytogénétiques en Algérie. Cas des palmiers dattiers cultivés et sub-spontanés (*Phoenix dactylifera* L.).thèse doct. Univ Mohamed Khider Biskra.
 - **Rewatkar A. R., Wadher B. J. (2013).** Staphylococcus aureus and Pseudomonas aeruginosa- Biofilm formation Methods. *IOSR Journal of Pharmacy and Biological Sciences*. Volume 8,

REFERENCE ET BIBLIOGRAPHIQUE

Issue 5 (Nov. – Dec. 2013), PP 36-40.

- **Santoyo G, Moreno-Hagelsieb G, Orozco-Mosqueda M del C, Glick BR. (2016).** Plant growth-promoting bacterial endophytes. *Microbiol Res* 183:92-9
- **Sathiyaseelan, K. (2009).** Study of starch degrading bacteria from kitchen waste soil in the 1376-1381.
- **Singh, A., Mehta, S., Singh, H.B. et Nautiyal, C.S. (2003).** Biocontrol of collar rot disease of betelvine (*Piper betel* L.) caused by *Sclerotium rolfsii* by using rhizosphere competent *Pseudomonas fluorescens* NBRI-N6 and *Pseudomonas fluorescens* NBRI-N. *Current Microbiology*. Vol-47 : 153-158Pp.
- **Soufiane B.(1998).** Isolement à partir de la rhizosphère des conifères de Bactéries et antagonistes aux champignons phytopathogènes. Canada, pp56. d'actinomycètes.
- **Taffet L, Raio A, Holeva MC, Dikhai R, Kouskoussa CO, Cesbron S, Krimi Z.(2020).** Molecular characterization of Algerian *Erwinia amylovora* strains by VNTR analysis and biocontrol efficacy of *Bacillus* spp. and *Pseudomonas brassicacearum* antagonists. *Eur J Plant Pathol* (2020) 156:867-883

Annexes

ANNEXE

Annexe 01 : Solutions

Solution de chlorure de sodium (NaCl) 1M

Chlorure de sodium.....	58,44g
Eau distillée	

Annexe 02 : Milieux pour les tests enzymatiques

Milieu gélose à amidon 1%

Gélose nutritive.....	1000ml
Amidon.....	10g
Milieu pectine agar	
Pectine.....	5g
Extrait de levure.....	5g
Agar.....	20g
Eau istillée.....	1000ml

□ Milieu gélosé à 0,5% de CMC

Gélose nutritive.....	1000ml
CMC.....	5g

Milieu pour les enzymes protéolytiques

Gélose nutritive	1000 ml
Solution de lait écrémé	(7%)

Milieu à base de chitine

Annexe 03 : Milieux pour purification, confrontation

KingB

Peptone	20g
Glycérol.....	10ml
Phosphate dipotassique.....	1.5g
Magnésium sulfate.....	1.5g
Agar	15g
Eau distillée.....	1000ml

ANNEXE

Potato dextrose agar (PDA)

PDA dhésydratée.....39g
Eau distillée1000ml
1000ml

LB

Milieu LB

Bactotryptone10g
Extrait de levure5g
NaCl5g
Agar.....15g
Eau distillée1000ml

Annexe 04: Les indicateurs colorés

Rouge Congo à 0.1%

Rouge Congo0.1g
Eau distillé100ml

Acétate de cuivre à 0,7%

Acétate de cuivre.....7,5g
Eau distillée.....1000ml

- Dissoudre 7,5g de l'acétate de cuivre dans un petite volume d'eau distillée puis compléter

le volume jusqu'à 100ml

ANNEXE

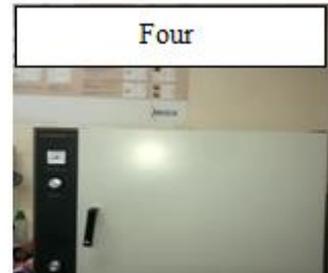
Annexe 05 : appareillage



Autoclave



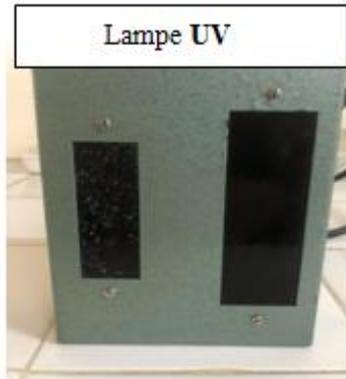
Etuve



Four



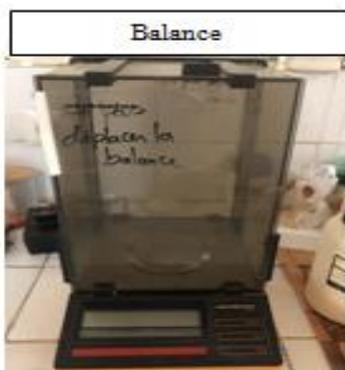
Agitateur



Lampe UV



Spectrophotomètre



Balance



Agitateur incubateur



Micro onde

ANNEXE

Annexe 06 : Matériel non biologique

- ❖ Bec bunsen.
- ❖ Anse de platine.
- ❖ Micropipette.
- ❖ Pipette pasteur.
- ❖ Boîte de Petri.
- ❖ Tube à essai.
- ❖ Pince.
- ❖ Bécher.
- ❖ Lame et lamelle en verre.
- ❖ Portoire
- ❖ Bistouri
- ❖ scalpel

Annexe 07: tableaux et statistiques

Souche pathogène EMEA		Souche pathogène C58	
Souches antagonistes	Moyenne de zone d'inhibition	Souches antagonistes	Moyenne de zone d'inhibition
TCR51	10,5	TCR51	0
PF43	8,5	PF43	0
TC4	0	TC4	0
TF6	0	TF6	0
KFR9	0	KFR9	0
TBR5	0	TBR5	0
ZF3	0	ZF3	0
TF8	0	TF8	0
TF4	0	TF4	0
KF2	0	KF2	0
TC3	3	TC3	0
TC13	0	TC13	0
TC1	0	TC1	0
TC5	12,5	TC5	11,5
XJ3	10	XJ3	11,5

ANNEXE

Statistiques de groupe

	champignon phytopathogène			N	Moyenne	Ecart-type	Erreur standard moyenne
FOA	TCR51	Inhibition %	Tardive	2,00	44,88	1,59	1,13
			Simultanée	2,00	34,38	2,65	1,88
	PF43	Inhibition %	Tardive	2,00	20,00	15,56	11,00
			Simultanée	2,00	43,13	0,88	0,62
	TC4	Inhibition %	Tardive	2,00	44,50	2,12	1,50
			Simultanée	2,00	19,38	16,79	11,88
	TF6	Inhibition %	Tardive	2,00	67,00	2,83	2,00
			Simultanée	2,00	48,13	2,65	1,88
	KFR9	Inhibition %	Tardive	2,00	40,00	0,00	0,00
			Simultanée	2,00	34,38	0,88	0,63
	TBR5	Inhibition %	Tardive	2,00	33,00	2,83	2,00
			Simultanée	2,00	47,50	1,77	1,25
	ZF3	Inhibition %	Tardive	2,00	83,50	7,78	5,50
			Simultanée	2,00	74,38	20,33	14,38
	TF8	Inhibition %	Tardive	2,00	50,50	21,92	15,50
			Simultanée	2,00	29,38	2,65	1,88
	TF4	Inhibition %	Tardive	2,00	44,50	6,36	4,50
			Simultanée	2,00	48,75	10,61	7,50
	KF2	Inhibition %	Tardive	2,00	53,50	14,85	10,50
			Simultanée	2,00	58,13	2,65	1,88
	TC3	Inhibition %	Tardive	2,00	67,50	23,33	16,50
			Simultanée	2,00	26,25	1,77	1,25
	TC13	Inhibition %	Tardive	2,00	49,50	0,71	0,50
			Simultanée	2,00	54,38	34,47	24,38
	TC1	Inhibition %	Tardive	2,00	68,00	16,97	12,00
			Simultanée	2,00	58,75	0,00	0,00
	TC5	Inhibition %	Tardive	2,00	86,50	10,61	7,50
			Simultanée	2,00	70,00	21,21	15,00
	XJ3	Inhibition %	Tardive	2,00	26,50	6,36	4,50
			Simultanée	2,00	41,88	20,33	14,38
G2	TCR51	Inhibition %	Tardive	2,00	44,00	24,51	17,33
			Simultanée	2,00	17,33	0,00	0,00
	PF43	Inhibition %	Tardive	2,00	84,00	3,77	2,67
			Simultanée	2,00	16,67	8,49	6,00
	TC4	Inhibition %	Tardive	2,00	42,67	1,89	1,33
			Simultanée	2,00	43,33	10,37	7,33

ANNEXE

BT	TF6	Inhibition %	Tardive	2,00	53,33	3,77	2,67
			Simultanée	2,00	34,00	2,83	2,00
	KFR9	Inhibition %	Tardive	2,00	45,33	13,20	9,33
			Simultanée	2,00	49,33	30,17	21,33
	TBR5	Inhibition %	Tardive	2,00	38,00	2,83	2,00
			Simultanée	2,00	31,33	0,94	0,67
	ZF3	Inhibition %	Tardive	2,00	76,67	12,26	8,67
			Simultanée	2,00	86,00	8,49	6,00
	TF8	Inhibition %	Tardive	2,00	89,33	0,00	0,00
			Simultanée	2,00	40,00	5,66	4,00
	TF4	Inhibition %	Tardive	2,00	22,00	16,03	11,33
			Simultanée	2,00	44,00	1,89	1,33
	KF2	Inhibition %	Tardive	2,00	51,33	8,49	6,00
			Simultanée	2,00	62,67	11,31	8,00
	TC3	Inhibition %	Tardive	2,00	66,00	17,91	12,67
			Simultanée	2,00	28,67	2,83	2,00
	TC13	Inhibition %	Tardive	2,00	86,00	2,83	2,00
			Simultanée	2,00	41,33	7,54	5,33
	TC1	Inhibition %	Tardive	2,00	70,67	5,66	4,00
			Simultanée	2,00	52,00	3,77	2,67
TC5	Inhibition %	Tardive	2,00	60,00	9,43	6,67	
		Simultanée	2,00	76,67	4,71	3,33	
XJ3	Inhibition %	Tardive	2,00	52,67	31,11	22,00	
		Simultanée	2,00	16,00	9,43	6,67	
TCR51	Inhibition %	Tardive	2,00	41,45	4,65	3,29	
		Simultanée	2,00	33,55	0,93	0,66	
PF43	Inhibition %	Tardive	2,00	42,76	2,79	1,97	
		Simultanée	2,00	36,84	5,58	3,95	
TC4	Inhibition %	Tardive	2,00	50,00			

ANNEXE

NOVA à 1 facteur

Inhibition %

méthode			Somme des carrés	ddl	Moyenne des carrés	F	Signification
Tardive	FOA	Inter- groupes	10513,979	14	750,999	5,487	,001
		Intra- groupes	2053,031	15	136,869		
		Total	12567,010	29			
	G2	Inter- groupes	10782,578	14	770,184	4,260	,004
		Intra- groupes	2712,000	15	180,800		
		Total	13494,578	29			
	BT	Inter- groupes	2812,442	14	200,889	13,286	,000
		Intra- groupes	226,801	15	15,120		
		Total	3039,243	29			
Simultanée	FOA	Inter- groupes	6891,979	14	492,284	2,550	,041
		Intra- groupes	2895,313	15	193,021		
		Total	9787,292	29			
	G2	Inter- groupes	12009,719	14	857,837	8,441	,000
		Intra- groupes	1524,444	15	101,630		
		Total	13534,163	29			
	BT	Inter- groupes	3615,766	14	258,269	10,218	,000
		Intra- groupes	379,155	15	25,277		
		Total	3994,922	29			

Test d'échantillons indépendants

champignon phytopathogène				Test de Levene sur l'égalité des variances		Test-t pour égalité des moyennes						
				F	Sig.	t	ddl	Sig. (bilatérale)	Différence moyenne	Différence écart-type	Intervalle de confiance 95% de la différence	
											Inférieure	Supérieure
FOA	TCR51	Inhibition %	Hypothèse de variances égales			4,80	2,00	0,04	10,50	2,19	1,09	19,91
			Hypothèse de variances inégales			4,80	1,64	0,06	10,50	2,19	-1,22	22,22
3		Inhibition %	Hypothèse de variances égales			-2,10	2,00	0,17	-23,13	11,02	-70,53	24,28
			Hypothèse de variances inégales			-2,10	1,01	0,28	-23,13	11,02	-161,01	114,76
TC4		Inhibition %	Hypothèse de variances égales			2,10	2,00	0,17	25,13	11,97	-26,38	76,63
			Hypothèse de variances inégales			2,10	1,03	0,28	25,13	11,97	-116,29	166,54
TF6		Inhibition %	Hypothèse de variances égales			6,89	2,00	0,02	18,88	2,74	7,08	30,67
			Hypothèse de variances inégales			6,89	1,99	0,02	18,88	2,74	7,03	30,72

ANNEXE

KFR9	Inhibition %	Hypothèse de variances égales	9,00	2,00	0,01	5,63	0,63	2,94	8,31
		Hypothèse de variances inégales	9,00	1,00	0,07	5,63	0,63	-2,32	13,57
TBR5	Inhibition %	Hypothèse de variances égales	-6,15	2,00	0,03	-14,50	2,36	-24,65	-4,35
		Hypothèse de variances inégales	-6,15	1,68	0,04	-14,50	2,36	-26,76	-2,24
ZF3	Inhibition %	Hypothèse de variances égales	0,59	2,00	0,61	9,13	15,39	-57,10	75,35
		Hypothèse de variances inégales	0,59	1,29	0,64	9,13	15,39	-108,36	126,61
TF8	Inhibition %	Hypothèse de variances égales	1,35	2,00	0,31	21,13	15,61	-46,05	88,30
		Hypothèse de variances inégales	1,35	1,03	0,40	21,13	15,61	-164,41	206,66
TF4	Inhibition %	Hypothèse de variances égales	-0,49	2,00	0,68	-4,25	8,75	-41,88	33,38
		Hypothèse de variances inégales	-0,49	1,64	0,68	-4,25	8,75	-51,11	42,61
KF2	Inhibition %	Hypothèse de variances égales	-0,43	2,00	0,71	-4,63	10,67	-50,52	41,27
		Hypothèse de variances inégales	-0,43	1,06	0,74	-4,63	10,67	-122,40	113,15

ANNEXE

	TC3	Inhibition %	Hypothèse de variances égales	2,49	2,00	0,13	41,25	16,55	-29,95	112,45
			Hypothèse de variances inégales	2,49	1,01	0,24	41,25	16,55	-163,45	245,95
	TC13	Inhibition %	Hypothèse de variances égales	-0,20	2,00	0,86	-4,88	24,38	-109,77	100,02
			Hypothèse de variances inégales	-0,20	1,00	0,87	-4,88	24,38	-314,04	304,29
	TC1	Inhibition %	Hypothèse de variances égales	0,77	2,00	0,52	9,25	12,00	-42,38	60,88
			Hypothèse de variances inégales	0,77	1,00	0,58	9,25	12,00	-143,22	161,72
	TC5	Inhibition %	Hypothèse de variances égales	0,98	2,00	0,43	16,50	16,77	-55,66	88,66
			Hypothèse de variances inégales	0,98	1,47	0,46	16,50	16,77	-87,28	120,28
	XJ3	Inhibition %	Hypothèse de variances égales	-1,02	2,00	0,41	-15,38	15,06	-80,19	49,44
			Hypothèse de variances inégales	-1,02	1,19	0,47	-15,38	15,06	-146,86	116,11
G2	TCR51	Inhibition %	Hypothèse de variances égales	1,54	2,00	0,26	26,67	17,33	-47,91	101,25
			Hypothèse de variances inégales	1,54	1,00	0,37	26,67	17,33	-193,57	246,91

ANNEXE

Résultats d'inhibition des nécroses *in vivo* vis-à-vis du champignon *Brotryospheria*

Souche/Répétition	Résultat	Souche/Répétition	Résultat
1-ZF3	-	11-ZF3	+
2-ZF3	+	12-ZF3	-
3-ZF3	-	13-ZF3	-
4-ZF3	+	14-ZF3	-
5-ZF3	+	15-ZF3	+
6-ZF3	+	16-ZF3	-
7-ZF3	-	17-ZF3	-
8-ZF3	-	18-ZF3	-
9-ZF3	-	19-ZF3	+
10-ZF3	-	20-ZF3	-

Souche/Répétition	Résultat	Souche/Répétition	Résultat
1-KF2	+	11-KF2	+
2-KF2	+	12-KF2	+
3-KF2	-	13-KF2	-
4-KF2	+	14-KF2	-
5-KF2	+	15-KF2	+
6-KF2	-	16-KF2	+
7-KF2	+	17-KF2	-
8-KF2	-	18-KF2	-
9-KF2	+	19-KF2	+
10-KF2	-	20-KF2	+

Souche/Répétition	Résultat	Souche/Répétition	Résultat
1-TC5	+	11-TC5	+
2-TC5	+	12-TC5	+
3-TC5	-	13-TC5	-
4-TC5	+	14-TC5	-
5-TC5	+	15-TC5	+
6-TC5	-	16-TC5	+
7-TC5	+	17-TC5	-
8-TC5	-	18-TC5	-
9-TC5	+	19-TC5	+
10-TC5	-	20-TC5	+

Souche/Répétition	Résultat	Souche/Répétition	Résultat
1-TCR51	++	11-TCR51	+
2-TCR51	-	12-TCR51	+
3-TCR51	+	13-TCR51	-

ANNEXE

4-TCR51	++	14-TCR51	+
5-TCR51	+	15-TCR51	+
6-TCR51	-	16-TCR51	+
7-TCR51	+	17-TCR51	-
8-TCR51	-	18-TCR51	-
9-TCR51	++	19-TCR51	+
10-TCR51	-	20-TCR51	+

Souche/Répétition	Résultat	Souche/Répétition	Résultat
1-PF43	++	11-PF43	+
2-PF43	+	12-PF43	+
3-PF43	+	13-PF43	-
4-PF43	++	14-PF43	-
5-PF43	+	15-PF43	+
6-PF43	+	16-PF43	-
7-PF43	-	17-PF43	+
8-PF43	-	18-PF43	-
9-PF43	++	19-PF43	+
10-PF43	+	20-PF43	-

Témoin +/Répétition	Résultat	Témoin +/Répétition	Résultat
1	++	11	+++
2	+++	12	+++
3	+++	13	++
4	+++	14	++
5	+++	15	+++
6	++	16	++
7	+	17	++
8	++	18	+++
9	++	19	+++
10	+++	20	++

Témoin -/Répétition	Résultat	Témoin +/Répétition	Résultat
1	-	11	-
2	-	12	-
3	-	13	-
4	-	14	-
5	-	15	-
6	-	16	-
7	-	17	-
8	-	18	-
9	-	19	-
10	-	20	-