



République algérienne démocratique et populaire

**Ministère de l'enseignement supérieur et de la
recherche scientifique**

Université Saad Dahlab Blida 1

Faculté des sciences de la nature et de la vie

Département de biotechnologie et de l'Agro-Ecologie



Mémoire

En vue de l'obtention du diplôme de Master

Domaine : Sciences de la Nature et de la Vie

Filière : Biotechnologie

Spécialité : Biotechnologie Microbienne

Thème

**Isolement des bactéries associées aux plantes
médicinales et étude de leur éventuel antagonisme
vis-à-vis de certains agents phytopathogènes**

Présenté par :

GUEDOUARI Amina

ALI KHOUDJA Hiba

Soutenu devant le jury :

Président

M^r BERDJA R.

M.C.A

U. Blida 1

Examinatrice

M^{me} OUSERIR S.

M.C.B

U. Blida 1

Promotrice

M^{me} MEKHALDI D.

M.C.B

U. de Laghouat

Année Universitaire 2024/2025

Remerciements

Avant tout, nous adressons nos louanges et nos remerciements les plus sincères à **Allah** Le Tout-Puissant, qui nous a accordé la patience, la force et la volonté nécessaires pour mener à bien ce travail.

Nous tenons à exprimer notre profonde gratitude à Madame **MEKHALDI D.**, notre promotrice, pour sa disponibilité, son encadrement rigoureux, ses conseils avisés et son soutien tout au long de ce travail. Son accompagnement a été précieux à chaque étape de notre projet.

Nos remerciements sincères vont à Monsieur **BERDJA R.**, président du jury, ainsi qu'à Madame **OUSRIR S.**, examinatrice, pour l'honneur qu'ils nous font en évaluant notre mémoire et pour leurs remarques pertinentes et constructives.

Nous remercions chaleureusement Madame **Ihsene** et Madame **Faiza**, ingénieures de laboratoire, pour leur assistance technique, leur disponibilité et leur gentillesse durant la réalisation de notre stage.

Nous exprimons également notre reconnaissance à l'ensemble des **enseignants** du département de Biotechnologie de l'Université de Blida, pour la qualité de leur enseignement, leur accompagnement académique et leur engagement tout au long de notre formation.

À **nos familles** respectives, nous adressons nos remerciements les plus sincères pour leur soutien inconditionnel, leurs encouragements constants, leur patience et leur amour, sans lesquels nous n'aurions pu franchir toutes ces étapes.

Enfin, nous remercions du fond du cœur toutes les personnes ayant contribué, de près ou de loin, à la réalisation de ce modeste travail. Que chacun trouve ici l'expression de notre profonde reconnaissance et de notre respect.





Dédicace

Avant tout, je rends grâce à **Allah**, Le Tout-Miséricordieux, pour m'avoir accompagnée tout au long de ce chemin, pour Sa guidance, Sa protection et la force qu'Il m'a accordée.

Ce modeste travail, je le dédie :

À mon **papa**, que j'aime profondément... Qu'Allah t'accorde Sa miséricorde et t'accueille dans Son paradis, tu restes à jamais dans mon cœur.

À ma douce **mère**, pilier de ma vie, pour son amour inconditionnel, ses prières silencieuses et ses sacrifices innombrables.

À mes sœurs **Razika** et **Ouassila**, pour leur tendresse et leur soutien inestimable.

À mes frères **Nabil**, **Aïssa**, **Toufik**, **Sofiane**, **Fouzi** et leurs **épouses**, pour leur aide, leur présence et leurs encouragements.

À mes **neveux** adorés et à mes trois princesses : **Israa**, **Sahar** et **Shahd**, qui illuminent ma vie par leur innocence et leur joie de vivre.

À toute **ma famille**, pour leur soutien affectueux et leurs paroles réconfortantes.

À mon amie fidèle **Faiza**, pour sa bienveillance, sa présence et son amitié sincère.

À ma binôme **Hiba**, pour son engagement, sa patience et la belle collaboration que nous avons partagée, ainsi qu'à **sa famille** pour leur soutien tout au long de ce parcours.

À toutes les personnes qui ont cru en moi et qui m'ont soutenue de près ou de loin...

Cette dédicace vous est dédiée, avec tout mon cœur.

Amina





Dédicace

Tout d'abord « الحمد لله »

À ceux qui m'ont façonnée sans éclat, mais avec grandeur, à ceux dont la présence fut silence, mais jamais absence, à ceux qui ont cru en moi lorsque mes propres doutes faisaient vaciller ma route
— **ma mère et mon père.**

À mes frères **Amine, Ridha et Zakaria**, compagnons d'un voyage semé d'efforts et d'espoir,

Votre persévérance transforme la fatigue en victoire.

Dans chaque difficulté, vous avez semé la patience,

Dans chaque instant d'épuisement, la promesse d'un renouveau. Je vous dédie ce succès, fruit
d'un chemin partagé,

Car c'est ensemble que nous transformons les rêves en réalité.

À **mes professeurs**, pour leur savoir et leur inspiration.

Et à **moi-même** — non par orgueil, mais en reconnaissance d'avoir tenu bon quand tout me
disait d'abandonner.

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



Hiba

Résumé

Isolement des bactéries associées aux plantes médicinales et étude de leur éventuel antagonisme vis-à-vis de certains agents phytopathogènes

Ce mémoire s'inscrit dans une démarche de valorisation des bactéries bénéfiques associées aux plantes médicinales, en particulier celles isolées de la rhizosphère et des tissus internes (bactéries endophytes) d'*Origanum* sp., afin d'évaluer leur potentiel de biocontrôle contre *Fusarium oxysporum* f.sp. *albedinis* (Foa), un agent pathogène redouté. Vingt isolats bactériens ont été obtenus et caractérisés à travers des observations morphologiques, la coloration de Gram, révélant une prédominance de bactéries à Gram positif (74 % des isolats), et la mise en évidence de la capacité de sporulation chez 74 % d'entre eux. Les tests d'hypersensibilité sur feuilles de tabac n'ont montré aucun symptôme de nécrose ni de chlorose, ce qui témoigne de l'innocuité de ces souches vis-à-vis des plantes. L'activité antagoniste a été évaluée *in vitro* par la méthode de confrontation directe sur gélose LPGa, où les zones d'inhibition mesurées ont permis d'identifier plusieurs souches actives, notamment ORER1 à ORER4, ORS8 à ORS11 et ORS14, présentant des taux d'inhibition compris entre 42,28 % et 56,91 % contre la souche pathogène FB26 de Foa. Ces résultats préliminaires suggèrent un potentiel prometteur pour l'utilisation de ces bactéries comme agents de biocontrôle écologiquement sûrs.

Mots clés : Bactéries endophytes, PGPR, *Origanum* sp., *Fusarium oxysporum* f.sp. *albedinis*, antagonisme, biocontrôle.

Abstract

Isolation of bacteria associated with medicinal plants and study of their potential antagonism against certain phytopathogenic agents

This research aims to valorize beneficial bacteria associated with medicinal plants, particularly those isolated from the rhizosphere and internal tissues (endophytic bacteria) of *Origanum* sp., in order to evaluate their biocontrol potential against *Fusarium oxysporum* f.sp. *albedinis* (Foa), a highly damaging plant pathogen. Twenty bacterial isolates were obtained and characterized through morphological observations and Gram staining, which revealed a predominance of Gram-positive bacteria (74% of the isolates), as well as the ability to sporulate in 74% of them. Hypersensitivity tests on tobacco leaves showed no signs of necrosis or chlorosis, indicating the non-pathogenic nature of these strains toward plants. Antagonistic activity was assessed *in vitro* using the dual culture method on LPGA medium, where inhibition zone measurements identified several active strains, including ORER1 to ORER4, ORS8 to ORS11, and ORS14, exhibiting inhibition rates ranging from 42.28% to 56.91% against the FB26 strain of Foa. These preliminary results suggest a promising potential for the use of these bacteria as environmentally safe biocontrol agents.

Keywords: Endophytic bacteria, PGPR, *Origanum* sp., *Fusarium oxysporum* f.sp. *albedinis*, antagonism, biocontrol.

الملخص

عزل البكتيريا المرتبطة بالنباتات الطبية ودراسة قدرتها المحتملة على مقاومة بعض العوامل الممرضة للنباتات

يندرج هذا العمل ضمن مقاربة تهدف إلى تثمين البكتيريا المفيدة المرتبطة بالنباتات الطبية، لا سيما تلك المعزولة من ريزوسفير ونسيج نبات *Origanum sp.*، وذلك من أجل تقييم قدرتها على مكافحة الحيوية ضد فطر *Fusarium oxysporum f.sp. albedinis* (Foa) وهو عامل ممرض خطير يصيب النخيل. تم الحصول على عشرين عزلة بكتيرية، وتمت دراستها من خلال الملاحظات المورفولوجية وصبغة غرام، التي كشفت عن هيمنة البكتيريا موجبة الغرام (بنسبة 74% من العزلات)، بالإضافة إلى قدرة 74% منها على إنتاج الأبواغ. لم تُظهر اختبارات فرط التحسس على أوراق التبغ أي أعراض نخر أو اصفرار، مما يدل على عدم سُمية هذه العزلات للنباتات. تم تقييم النشاط التضادي في الزجاج باستخدام طريقة المواجهة المباشرة على وسط LPGA، حيث أظهرت قياسات مناطق التثبيط أن عدة عزلات كانت فعالة، خاصة ORER1 إلى ORER4 و ORS8 إلى ORS11 وORS14، بنسبة تثبيط تراوحت بين 42.28% و56.91%. ضد السلالة الفطرية FB26 من فطر Foa. وتشير هذه النتائج الأولية إلى أن هذه البكتيريا قد تشكل عوامل مكافحة حيوية واعدة وآمنة بيئيًا.

الكلمات المفتاحية: البكتيريا الداخلية، البكتيريا المحفزة لنمو النبات (PGPR)، *Origanum sp.*، *Fusarium oxysporum f.sp. albedinis*، التثبيط، مكافحة الحيوية.

Liste des abréviations

PGPR	<i>Plant Growth-Promoting Rhizobacteria</i> (Rhizobactéries promotrices de la croissance des plantes)
AHL	Acyl-Homoserine Lactone
AIA	Acide Indole-3-Acétique
JA	Acide Jasmonique
SA	Acide Salicylique
ET	Éthylène
GAs	Gibbérellines
SAR	<i>Systemic Acquired Resistance</i> (Résistance Systémique Acquisée)
ISR	<i>Induced Systemic Resistance</i> (Résistance Systémique Induite)
QQ	Quorum Quenching
PR	<i>Pathogenesis-Related</i> (Protéines Liées à la Pathogénèse)
DAPG	2,4-Diacetylphloroglucinol
LPGA	Levure Peptone Glucose Agar
PDA	<i>Potato Dextrose Agar</i>
Foa	<i>Fusarium oxysporum</i> f.sp. <i>albedinis</i>
HR	<i>Hypersensitive Response</i> (reaction hypersensible)
ORER	Origan Endophyte Root (code attribué aux isolats endophytes)
ORS	Origan Rhizosphere (code attribué aux isolats rhizosphériques)
ADN	Acide Désoxyribonucléique
G	Grossissement

Liste des figures

Figure 1. Actions des bactéries endophytes sur la santé de la plante hôte	7
Figure 2. Représentation schématique des mécanismes directs et indirects d'action employés par les PGPR dans la promotion de la croissance et la protection des plantes	11
Figure 3. La souche <i>FB26</i> de <i>Fusarium oxysporum f.sp. albedinis</i> utilisée dans notre étude.	16
Figure 4. Aspect morphologique de la plante de l'origan collectée à l'état spontané.	17
Figure 5. Site d'échantillonnage (Google Earth).....	18
Figure 6. Étapes de préparation des dilutions pour l'isolement des bactéries endophytes à partir des racines de l'origan.	19
Figure 7. La série de suspension-dilution du sol pour l'isolement bactérien.	20
Figure 8. Étapes de la coloration de Gram pour l'identification de bactéries.	22
Figure 9. Étapes de la coloration au vert de malachite pour la mise en évidence des endospores bactériennes.....	23
Figure 10. Test d'hypersensibilité sur feuille de tabac.....	24
Figure 11. Mise en place du test d'antagonisme in vitro.....	25
Figure 12. Aspect des boîtes d'ensemencement après une semaine d'incubation.	29
Figure 13. Aspect cultural de quelques isolats purifiés.....	29
Figure 14. Observation microscopique des frottis après la coloration de Gram des isolats (G×1000).....	31
Figure 15. Observation microscopique des frottis après la coloration au vert de malachite des isolats (G×1000).....	32
Figure 16. Feuilles de tabac après injection des isolats : absence de nécrose, témoignant de la non-phytopathogénécité.	34
Figure 17. Résultats du pouvoir antagoniste in vitro des isolats vis-à-vis de la souche <i>FB26 de Foa</i>	35
Figure 18. Taux d'inhibition (%) des isolats rhizosphériques vis-à-vis de la souche pathogène <i>FB26 de Foa</i> en confrontation directe in vitro.	36
Figure 19. Taux d'inhibition (%) des isolats endophytes vis-à-vis de la souche pathogène <i>FB26 de Foa</i> en confrontation directe in vitro.	36

Liste des tableaux

Tableau 1. Les principales classes chimiques et leurs fonctions.....	4
Tableau 2. Microflore endophyte et PGPR associée aux plantes médicinales : diversité et fonctions biologiques.	6
Tableau 3. Observations macroscopiques des souches endophytes isolées.....	30
Tableau 4. Observations macroscopiques des souches rhizosphériques isolées.....	30
Tableau 5. Caractéristiques microscopiques des isolats endophytes obtenus.....	32
Tableau 6. Caractéristiques microscopiques des isolats rhizosphériques obtenus.....	33

Table des matières

Remerciements

Dédicace

Résumé

Abstract

ملخص

Liste des abréviations

Liste des figures

Liste des tableaux

INTRODUCTION..... 1

Chapitre 1. Revue bibliographique

1. LES PLANTES MEDICINALES..... 4

1.1. Définition et importance traditionnelle et moderne 4

1.2. Composition chimique et métabolites secondaires 4

1.3. Facteurs influençant la composition chimique 5

1.4. Activité biologique et potentiel antimicrobien 5

1.5. Microflore associée aux plantes médicinales..... 6

2. LES ENDOPHYTES 7

2.1. Définition des endophytes 7

2.2. Mécanismes d'action des bactéries endophytes..... 7

2.2.1. Mécanismes d'action directs 8

2.2.1.1. Production de métabolites antimicrobiens 8

2.2.1.2. Production d'enzymes hydrolytiques..... 8

2.2.1.3. Compétition pour les nutriments et l'espace 8

2.2.1.4. Perturbation des signaux de communication des pathogènes 9

2.2.2. Mécanismes d'action indirects 9

2.2.2.1. Résistance systémique acquise et modulation hormonale 9

3. LES RHIZOBACTERIES PROMOTRICES DE LA CROISSANCE DES PLANTES (PGPR)	10
3.1. Définition des PGPR.....	10
3.2. Mécanismes d'action des PGPR	10
3.2.1. Mécanismes directs	11
3.2.1.1. Fixation biologique de l'azote.....	11
3.2.1.2. Solubilisation du phosphate	11
3.2.1.3. Production d'hormones végétales	12
3.2.2. Mécanismes indirects	12
3.2.2.1. Antibiose	12
3.2.2.2. Lyse enzymatique	13
3.2.2.3. Induction de Résistance Systémique (ISR)	13

Chapitre 2. Matériel et méthodes

1. PRODUITS CHIMIQUES ET MILIEUX DE CULTURE	15
1.1. Produits chimiques.....	15
1.2. Milieux de culture	15
2. MATERIEL BIOLOGIQUE	15
2.1. Souche fongique de l'agent pathogène	15
2.2. Matériel végétal	16
3. ÉCHANTILLONNAGE.....	18
4. ISOLEMENT, PURIFICATION ET CONSERVATION DES BACTERIES.....	19
4.1. Isolement des bactéries endophytes	19
4.1.1. Préparation des dilutions	19
4.1.2. Mise en culture.....	20
4.2. Isolement des rhizobactéries	20
4.2.1. Préparation des dilutions	20
4.2.2. Mise en culture.....	20
4.3. Purification et conservation des isolats bactériens.....	21
5. IDENTIFICATION DES ISOLATS	21
5.1. Examen macroscopique	21
5.2. Examen microscopique.....	21
5.2.1. Coloration de Gram.....	21
5.2.2. Coloration au vert de malachite	23
5.3. Test d'hypersensibilité sur tabac.....	24

6. TEST D'ANTAGONISME IN VITRO DES ISOLATS OBTENUS VIS-A-VIS DE LA SOUCHE	
PHYTOPATHOGENE	25
6.1. Mise en place du test.....	25
6.2. Calcul de l'inhibition de la croissance mycélienne	26

Chapitre 3. Résultats et discussion

1. ISOLEMENT ET CARACTERISATION DES BACTERIES ASSOCIEES A L'ORIGAN.....	28
1.1. Résultats de l'isolement des bactéries endophytes et rhizosphériques	28
1.2. Identification des isolats	29
1.2.1. Description macroscopique des isolats	29
1.2.2. Description microscopique des isolats	31
1.2.2.1. Coloration de Gram.....	31
1.2.2.2. Coloration au vert de malachite	31
1.2.3. Résultats du test d'hypersensibilité sur tabac	33
2. RESULTATS DE L'ACTIVITE ANTAGONISTE IN VITRO DES ISOLATS	34
3. DISCUSSION GENERALE.....	37
CONCLUSION	41
REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES.....	42
ANNEXES	

Introduction

« Il n'existe pas de problèmes dans la nature, mais seulement des solutions, car l'état naturel est un état adaptatif donnant naissance à un système cohérent. »

— **René Dubos**

Introduction

Les plantes médicinales constituent depuis des millénaires une ressource précieuse pour les sociétés humaines. Utilisées en phytothérapie traditionnelle pour traiter un large éventail de maladies, elles représentent aujourd'hui une source majeure de principes actifs naturels utilisés dans la fabrication de médicaments modernes, cosmétiques et produits agrochimiques. On estime qu'environ 80 % de la population mondiale recourt aux plantes médicinales pour ses soins de santé primaires (OMS, 2013 ; Tewari *et al.*, 2021). Cette richesse thérapeutique repose non seulement sur la diversité des métabolites secondaires produits par les plantes (phénols, terpénoïdes, alcaloïdes, etc.), mais aussi sur l'interaction étroite qu'elles entretiennent avec une microflore spécifique, notamment des bactéries symbiotiques qui colonisent leurs tissus internes et leur rhizosphère (Pang *et al.*, 2021).

Parmi ces plantes médicinales, *Origanum* sp., appartenant à la famille des *Lamiaceae*, est largement reconnue pour ses propriétés antimicrobiennes, antioxydantes et anti-inflammatoires, principalement attribuées à sa teneur en huiles essentielles telles que le carvacrol et le thymol (Burt, 2004 ; Marchese *et al.*, 2016). Ces composés bioactifs agissent directement contre divers pathogènes bactériens et fongiques. Cependant, les interactions d'*Origanum* sp. avec les microorganismes bénéfiques, en particulier les bactéries endophytes et rhizosphériques, restent encore peu explorées malgré leur importance écologique et fonctionnelle.

Les plantes, en effet, ne sont pas des organismes isolés mais sont des systèmes biologiques complexes qui interagissent étroitement avec l'ensemble des communautés microbiennes qui leur sont associées. Ces associations englobent les microorganismes présents dans la rhizosphère, l'endosphère racinaire, la phyllosphère et l'endosphère foliaire, formant ainsi un microbiome végétal dont la compréhension des fonctions et des interactions bénéfiques est essentielle (Hacquard et Schadt, 2015). Parmi ces microorganismes, les bactéries endophytes, qui colonisent les tissus internes sans causer de dommages, et les PGPR, *Plant Growth-Promoting Rhizobacteria* présentes dans la rhizosphère, sont particulièrement intéressantes pour l'agriculture durable. Elles sont capables de stimuler la croissance des plantes *via* plusieurs mécanismes : la solubilisation du phosphate, la fixation de l'azote, la production d'auxines (comme l'AIA), de sidérophores, ou encore l'induction de résistances systémiques (Lugtenberg et Kamilova, 2009 ; Santoyo *et al.*, 2016).

Un autre rôle clé de ces bactéries réside dans leur capacité à protéger les plantes contre les agents phytopathogènes. Cette action de biocontrôle peut être directe : par la production de métabolites antimicrobiens diffusibles, d'enzymes lytiques, ou *via* la compétition pour les nutriments et les niches écologiques : ou indirecte, en activant les mécanismes de défense de la plante hôte (Compant *et al.*, 2005 ; Glick, 2012). Ces propriétés font des bactéries endophytes et PGPR des candidats prometteurs pour remplacer partiellement ou totalement les pesticides chimiques, dont l'usage excessif a provoqué des déséquilibres environnementaux et favorisé l'émergence de résistances chez de nombreux pathogènes (Aktar *et al.*, 2009).

Dans ce contexte, la recherche actuelle s'oriente vers l'isolement, la caractérisation et la valorisation des bactéries bénéfiques associées aux plantes comme alternative écologique aux intrants chimiques. Si de nombreuses études ont porté sur les bactéries associées aux plantes cultivées (maïs, blé, tomate, etc.), les plantes médicinales endémiques ou spontanées comme *Origanum* sp., restent largement sous-explorées, alors qu'elles pourraient constituer un réservoir important de souches microbiennes d'intérêt agronomique (Ghosh *et al.*, 2024).

La recherche de solutions alternatives aux produits phytosanitaires de synthèse est aujourd'hui un enjeu majeur pour une agriculture durable. Parmi les stratégies prometteuses, l'utilisation de bactéries bénéfiques capables de limiter le développement des agents pathogènes suscite un intérêt croissant. Toutefois, les ressources microbiennes associées aux plantes médicinales spontanées, comme *Origanum* sp., restent peu valorisées, malgré leur potentiel biologique. Ces plantes pourraient héberger des bactéries endophytes et rhizosphériques dotées de capacités d'antagonisme naturelles, encore inexploitées. La problématique spécifique de ce travail consiste donc à déterminer si certaines de ces bactéries, isolées à partir d'*Origanum* sp., présentent un effet inhibiteur *in vitro* contre des champignons phytopathogènes, notamment *Fusarium oxysporum* f.sp. *albedinis*, agent causal du bayoud du palmier dattier.

Ainsi, ce travail vise à isoler, caractériser et évaluer le potentiel antagoniste de bactéries endophytes et PGPR associées à *Origanum* sp., contre une souche phytopathogène de *Fusarium oxysporum*, dans l'objectif de contribuer au développement de solutions biologiques innovantes pour la protection des cultures.

Chapitre 1.

Revue bibliographique

Chapitre 1. Revue bibliographique

1. Les plantes médicinales

1.1. Définition et importance traditionnelle et moderne

Les plantes médicinales désignent toute espèce végétale contenant des substances actives utilisées dans la prévention ou le traitement des maladies humaines ou animales. Elles occupent une place centrale dans les systèmes de santé traditionnels depuis des millénaires (médecine chinoise, phytothérapie européenne). Aujourd'hui, près de 80 % de la population mondiale utilise encore les plantes médicinales pour les soins de santé primaires, en particulier dans les pays en développement. Ces plantes représentent également une source majeure pour l'industrie pharmaceutique moderne, puisque plus de 25 % des médicaments actuels sont dérivés directement ou indirectement de composés naturels extraits de plantes (Newman et Cragg, 2020). L'intérêt contemporain pour les produits naturels redonne un rôle clé à ces ressources végétales dans la recherche biomédicale et la protection des cultures.

1.2. Composition chimique et métabolites secondaires

Les plantes médicinales produisent une grande diversité de métabolites secondaires, non essentiels à leur survie immédiate, mais jouant un rôle écologique, défensif ou attractif. Ces métabolites sont classés en grandes familles chimiques : alcaloïdes, flavonoïdes, phénols, saponines, tanins, terpènes, et huiles essentielles. Chaque composé possède des propriétés biologiques spécifiques : antibactérienne, antivirale, antifongique, anti-inflammatoire, antioxydante, etc. (Tableau 1) (Batiha *et al.*, 2020).

Tableau 1. Les principales classes chimiques et leurs fonctions (Ogunmefun, 2018).

Classe	Exemples	Propriétés biologiques principales
Alcaloïdes	Morphine, caféine	Analgésique, stimulant du système nerveux
Flavonoïdes	Quercétine, Catéchine, flavones	Anticoagulantes, anti-inflammatoires et aphrodisiaques
Saponines	Glycosides	Immunostimulant, antifongique, anticancéreux
Tanins	Aflavines, la daidzéine, la génistéine et la glycitéine	Antiseptique, Antimicrobien, Antioxydant, astringent

1.3. Facteurs influençant la composition chimique

La biosynthèse des métabolites secondaires chez les plantes médicinales est fortement influencée par des facteurs endogènes et exogènes. Le génotype de la plante détermine la capacité à produire certains métabolites, mais l'environnement joue un rôle clé dans leur quantité. Le stress hydrique, la salinité, la lumière, la température, ainsi que la composition du sol peuvent moduler l'expression des voies métaboliques secondaires. Par exemple, une étude sur *Origanum vulgare* a montré que la concentration en huiles essentielles était plus élevée dans des conditions de sécheresse modérée. Les méthodes de culture (agriculture biologique ou conventionnelle) et les techniques post-récolte (séchage, stockage) peuvent aussi altérer la composition chimique (Li *et al.*, 2020).

1.4. Activité biologique et potentiel antimicrobien

Les plantes médicinales sont des réservoirs de métabolites secondaires qui possèdent une large gamme d'activités biologiques, dont un potentiel antimicrobien particulièrement pertinent dans la lutte contre les pathogènes. Des extraits de plantes telles que l'ail (*Allium sativum*), l'origan (*Origanum vulgare*) et le thym (*Thymus vulgaris*) ont montré une efficacité notable contre des bactéries pathogènes telles que *Pseudomonas*, *Lactobacillus* spp., et *Pneumococcus*, responsables de diverses maladies. Ces propriétés antimicrobiennes sont dues à divers mécanismes d'action, notamment la perturbation des membranes cellulaires, l'inhibition de certaines enzymes cruciales et l'interférence avec l'ADN microbien (Álvarez-Martínez *et al.*, 2021).

L'ail (*Allium sativum*), par exemple, est riche en composés sulfurés, tels que l'allicine, qui lui confèrent des propriétés antibactériennes puissantes. Selon une étude de Magryś *et al.* (2021), l'allicine a montré une inhibition significative de *Pseudomonas aeruginosa*. De même, l'origan, riche en phénols comme le carvacrol et le thymol, a prouvé son efficacité contre une gamme de bactéries phytopathogènes et fongiques, comme l'a souligné une étude de Fournomiti *et al.* (2015).

Ces activités antimicrobiennes font des plantes médicinales une source potentielle de biopesticides naturels, représentant une alternative plus écologique et durable aux pesticides chimiques. Une étude de Mangalagiri *et al.* (2021) a démontré que l'extrait d'arbre à thé (*Melaleuca alternifolia*) possédait également un fort pouvoir antimicrobien contre des bactéries phytopathogènes, ouvrant la voie à des solutions biotechnologiques pour protéger les cultures sans recourir à des produits chimiques nocifs pour l'environnement.

1.5. Microflore associée aux plantes médicinales

Les plantes médicinales hébergent une microflore complexe qui inclut des bactéries endophytes et rhizosphériques. Ces microorganismes vivent en symbiose avec la plante et contribuent à sa croissance, sa santé et sa capacité de défense. Certains endophytes peuvent produire les mêmes métabolites que la plante hôte, ou induire leur production *via* des mécanismes de signalisation moléculaire. Ils agissent également comme agents de biocontrôle en inhibant des agents pathogènes grâce à la production de composés antimicrobiens ou par compétition (Tableau 2) (Castronovo, *et al.*, 2021 ; Semenzato et Fani, 2024).

Tableau 2. Microflore endophyte et PGPR associée aux plantes médicinales : diversité et fonctions biologiques.

Plante Médicinale	Bactéries endophytes et PGPR	Rôle des Micro-organismes	Référence
<i>Origanum syriacum</i>	Endophytes : <i>Bacillus</i> .	Stimulation de la croissance, fixation de l'azote.	Semenzato et Fani, 2024
<i>Aloe Vera</i>	Endophytes : <i>Pseudomonas fulva</i> , <i>Enterobacter cloacae</i> .	Activité antibactérienne et antifongique, propriétés antioxydantes.	Semenzato et Fani, 2024
<i>Ocimum basilicum</i>	PGPR : <i>Azotobacter chroococcum</i> , <i>Pseudomonas putida</i> .	Induction de la production de composés antimicrobiens, amélioration de la croissance.	Semenzato et Fani, 2024
<i>Withania somnifera</i>	Endophytes : <i>Bacillus amyloliquefaciens</i> , <i>Pseudomonas fluorescens</i> .	Amélioration de la tolérance au stress, production de phytohormones.	Semenzato et Fani, 2024
<i>Gossypium sp.</i>	Endophytes: <i>Bacillus altitudinis</i> , <i>Bacillus velezensis</i> , <i>Pseudomonas</i> .	Stimulation de la croissance.	Li <i>et al.</i> , 2023
<i>Alkanna tinctoria</i>	Endophytes : <i>Pseudomonas</i> , <i>Xanthomonas</i> , <i>Variovorax</i> , <i>Bacillus</i> , <i>Pantoea</i> , et <i>Stenotrophomonas</i>	Propriétés antibactériennes et antitumorales, favorisant la cicatrisation des plaies et la croissance des plantes.	Li <i>et al.</i> , 2023
<i>Glycyrrhiza uralensis</i>	Endophytes : <i>Bacillus atrophaeus</i> et <i>Bacillus mojavensis</i> .	Résistance à la maladie du flétrissement verticillien et à d'autres phytopathogènes.	Li <i>et al.</i> , 2023
<i>Glycyrrhiza glabra</i> L.	PGPR : <i>Azotobacter</i> sp.	Induction de l'activité de défense enzymatique antioxydante en présence de salinité.	Kumar <i>et al.</i> , 2022
<i>Dalbergia sissoo</i> Roxb.	PGPR : <i>Bradyrhizobium</i> et <i>Glomus Fasciculatum</i>	Augmentation de la croissance, du poids sec et de la nodulation des plantules, ainsi qu'une amélioration de l'efficacité de la fixation de l'azote chez les plantules.	Kumar <i>et al.</i> , 2022

2. Les endophytes

2.1. Définition des endophytes

Les endophytes sont des microorganismes (bactéries ou champignons) qui vivent à l'intérieur des tissus végétaux sans causer de symptômes apparents de maladies. Ils établissent différents types d'interactions avec leurs hôtes allant de la commensalité à la symbiose mutualiste. Selon Khare *et al.* (2018), « les endophytes colonisent les tissus végétaux de manière intercellulaire et/ou intracellulaire, influençant la croissance de la plante, sa défense contre les pathogènes, et sa tolérance aux stress environnementaux ».

D'après Adama (2020), les bactéries endophytes sont également capables de produire des substances bénéfiques pour la plante, telles que des enzymes hydrolytiques, des métabolites secondaires antimicrobiens, ou encore de favoriser la solubilisation de nutriments comme le phosphate.

Parmi les genres bactériens les plus fréquemment isolés figurent *Bacillus*, *Pseudomonas*, *Enterobacter*, *Streptomyces*, et *Burkholderia*, qui présentent des interactions bénéfiques avec leurs plantes hôtes (Afzal *et al.*, 2019).

2.2. Mécanismes d'action des bactéries endophytes

Les bactéries endophytes exercent leurs effets bénéfiques sur les plantes par deux grands types de mécanismes : directs et indirects (Figure 1).

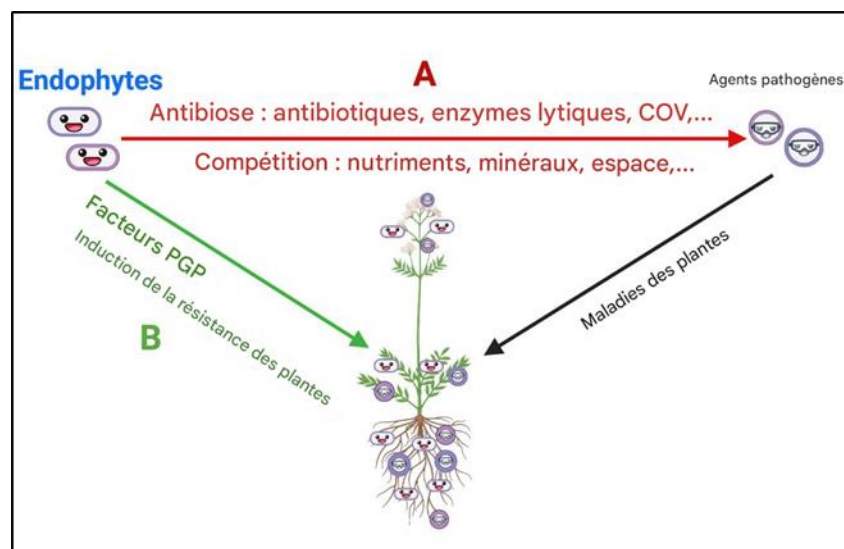


Figure 1. Actions des bactéries endophytes sur la santé de la plante hôte (Castronovo *et al.*, 2021)

(A) Effets directs sur les agents pathogènes : compétition au niveau des niches (colonisation) et production de composés antimicrobiens. (B) Effets indirects : induction de la réponse de défense de la plante hôte et promotion de la croissance végétale.

2.2.1. Mécanismes d'action directs

Ces mécanismes agissent directement sur la plante ou son environnement immédiat pour favoriser sa croissance :

2.2.1.1. Production de métabolites antimicrobiens

Les bactéries endophytes produisent une variété de composés bioactifs (antibiotiques, lipopeptides, phénazines, etc.) qui ciblent directement les agents pathogènes en perturbant leurs membranes cellulaires, en inhibant la synthèse d'ADN ou en interférant avec leur métabolisme (Khare *et al.*, 2018 ; Adama, 2020).

2.2.1.2. Production d'enzymes hydrolytiques

Certaines bactéries endophytes sécrètent des enzymes dégradant les parois cellulaires des champignons ou bactéries pathogènes, comme (Compant *et al.*, 2020) :

- Les chitinases : ciblent la chitine, composant principal des parois fongiques.
- Les β -1,3-glucanases : dégradent les glucanes fongiques.
- Les protéases : dégradent les protéines de structure du pathogène.

La libération de ces enzymes dans les tissus végétaux colonisés par les endophytes limite ainsi l'établissement des pathogènes en dégradant leur barrière protectrice et en les rendant vulnérables aux défenses végétales (Compant *et al.*, 2020).

2.2.1.3. Compétition pour les nutriments et l'espace

Les endophytes colonisent précocement les niches écologiques à l'intérieur de la plante et compétitionnent avec les pathogènes pour les nutriments essentiels, limitent l'accès aux ressources vitales nécessaires aux pathogènes, comme : le fer (Fe^{3+}), les sucres simples (glucose, fructose), les acides aminés et l'oxygène (Compant *et al.*, 2020).

Les bactéries endophytes limitent la prolifération des phytopathogènes par deux stratégies principales (Compant *et al.*, 2020) :

- **Séquestration des nutriments** : elles produisent des sidérophores et consomment rapidement les ressources (fer, sucres, acides aminés), privant ainsi les pathogènes de nutriments essentiels.
- **Occupation de l'espace** : elles colonisent activement les tissus végétaux (apoplaste, espaces intercellulaires), formant parfois des biofilms, ce qui empêche l'implantation physique des agents pathogènes.

2.2.1.4. Perturbation des signaux de communication des pathogènes (quorum quenching)

Le quorum quenching (QQ) est un mécanisme direct par lequel les bactéries endophytes bloquent la communication entre cellules des agents phytopathogènes, perturbant ainsi leur coordination pour exprimer des facteurs de virulence (biofilms, toxines, enzymes). Pour cela, deux principales stratégies sont impliquées (Paul *et al.*, 2024) :

- Dégradation enzymatique des signaux (comme les acyl-homoserine lactones, AHLs) par des enzymes telles que les lactonases ou acylases.
- Production d'analogues de signaux qui bloquent les récepteurs de quorum sensing sans activer les réponses pathogènes.

Ce mécanisme n'élimine pas nécessairement les pathogènes, mais réduit leur capacité à nuire, limitant ainsi le développement de résistances (Paul *et al.*, 2024).

2.2.2. Mécanismes d'action indirects

Ces mécanismes ne stimulent pas directement la croissance, mais « protègent la plante » contre les agents pathogènes ou le stress.

2.2.2.1. Résistance systémique acquise et modulation hormonale

a. La Résistance systémique acquise (SAR)

La SAR (*Systemic Acquired resistance*) est un mécanisme de défense préventif activé par les microorganismes bénéfiques. Elle prépare la plante à une réponse immunitaire plus efficace face aux attaques futures en stimulant ses défenses sans provoquer de stress excessif (Yu *et al.*, 2022).

b. Modulation des voies de signalisation hormonale

Selon Yu *et al.* (2022), la SAR repose sur une modulation hormonale, notamment :

- **L'acide salicylique (SA)** : impliqué dans la résistance aux pathogènes biotrophes.
- **L'acide jasmonique (JA) et l'éthylène (ET)** : favorisent la défense contre les nécrotrophes et insectes.
- **Le crosstalk hormonal** : interaction et régulation entre les voies SA et JA/ET pour optimiser la réponse immunitaire.

c. Activation des gènes de défense et enzymes antimicrobiennes

Les microorganismes bénéfiques stimulent l'expression des gènes PR qui codent pour des enzymes de défense (Yu *et al.*, 2022) :

- **Chitinases** : dégradent la chitine des champignons pathogènes.
- **β -1,3-glucanases** : hydrolysent les glucanes des parois fongiques.
- **Peroxydases** : renforcent la réponse oxydative aux stress biotiques.
- **Protéines PR1, PR2, PR5** : contribuent à une résistance accrue contre les infections.

3. Les rhizobactéries promotrices de la croissance des plantes (PGPR)

3.1. Définition des PGPR

Les rhizobactéries promotrices de la croissance des plantes, ou PGPR (*Plant Growth-Promoting Rhizobacteria*), sont un groupe de bactéries bénéfiques qui colonisent la rhizosphère, la zone du sol autour des racines des plantes, et établissent des interactions symbiotiques ou associatives avec les plantes. Ces bactéries favorisent la croissance des plantes en améliorant divers aspects de leur physiologie et de leur santé (Zhang *et al.*, 2023).

Les PGPR appartiennent à une grande diversité de genres bactériens, tels que *Pseudomonas*, *Bacillus*, *Rhizobium*, *Azospirillum*, et *Enterobacter*. Leur capacité à interagir avec une large gamme d'espèces végétales et à améliorer leur tolérance aux conditions environnementales défavorables a fait d'elles un sujet d'intérêt croissant dans les domaines de la microbiologie et de la biotechnologie végétale (Khoso *et al.*, 2023). En effet, ces bactéries jouent un rôle crucial dans la gestion du stress abiotiques et dans la stimulation des mécanismes de défense des plantes (Chieb et Gachomo, 2023).

3.2. Mécanismes d'action des PGPR

Les PGPR sont reconnues pour leurs capacités à favoriser la croissance des plantes et à protéger celles-ci contre les agents pathogènes par le biais de plusieurs mécanismes directs et indirects. Ces mécanismes, souvent complémentaires, assurent une protection efficace et durable des cultures dans des contextes agroécologiques variés (Wang *et al.*, 2021).

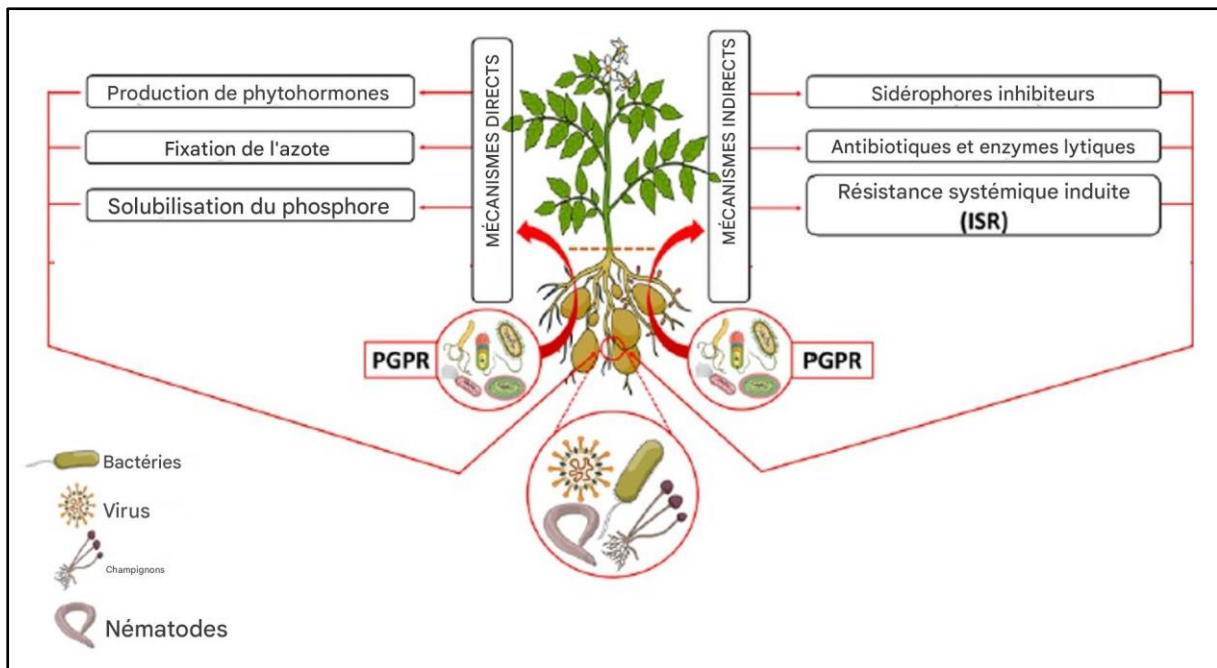


Figure 2. Représentation schématique des mécanismes d'action directs et indirects employés par les PGPR dans la promotion de la croissance et la protection des plantes (Mashabela *et al.*, 2022).

3.2.1. Mécanismes directs

Les mécanismes directs correspondent aux actions exercées directement par les PGPR sur les agents pathogènes ou sur leur environnement immédiat. Ils comprennent :

3.2.1.1. Fixation biologique de l'azote

Certains PGPR sont capables de fixer l'azote atmosphérique, le rendant disponible pour les plantes. Selon Goswami *et al.* (2016), on distingue :

- Les bactéries symbiotiques comme les *Rhizobium* formant des nodules sur les racines des légumineuses.
- Les bactéries libres (ex. *Azospirillum*, *Azotobacter*, *Bacillus*, *Paenibacillus*) qui vivent dans la rhizosphère et fixent l'azote sans former de structures spécialisées. Certaines souches peuvent fixer jusqu'à 20–30 kg d'azote/ha/an.

3.2.1.2. Solubilisation du phosphate

Les PGPR transforment le phosphate insoluble du sol (ex. : tricalcium phosphate, roches phosphatées) en formes solubles assimilables par la plante, principalement *via* la sécrétion d'acides organiques comme l'acide gluconique, oxalique ou citrique. Les genres *Bacillus* et *Pseudomonas* sont parmi les plus efficaces (Goswami *et al.*, 2016).

3.2.1.3. Production d'hormones végétales

Les bactéries rhizosphériques sont capables de produire plusieurs types de phytohormones qui influencent directement la croissance et le développement des plantes. Parmi les principales hormones produites, on retrouve (Goswami *et al.*, 2016) :

- **Acide indole-3-acétique (AIA)** : produit par la majorité des PGPR, stimule l'élongation cellulaire, la formation des racines latérales et des poils absorbants.
- **Cytokinines** : favorisent la division cellulaire, la croissance des pousses, le développement racinaire et retardent la sénescence.
- **Gibbérellines** : favorisent la germination, l'élongation des tiges et la floraison. Des souches de *Bacillus*, *Azospirillum* ou *Rhizobium* sont connues pour leur production de GAs.

3.2.2. Mécanismes indirects

Les mécanismes indirects impliquent la stimulation des défenses naturelles de la plante par les PGPR, améliorant sa résistance face aux infections.

3.2.2.1. Antibiose

L'antibiose est un mécanisme clé par lequel les PGPR inhibent les agents pathogènes *via* la production d'antibiotiques, des molécules capables de détruire ou de stopper la croissance d'autres micro-organismes à très faibles concentrations. Ces antibiotiques agissent en ciblant divers processus cellulaires des pathogènes, notamment la synthèse de la paroi cellulaire, les structures membranaires, ou encore les complexes d'initiation de la traduction au niveau de la petite sous-unité ribosomique (Jeyanthi et Kanimozhi, 2018).

Parmi les antibiotiques produits par les PGPR, on peut citer (Jeyanthi et Kanimozhi, 2018 ; Wang *et al.*, 2021) :

- Le 2,4-diacétylphloroglucinol (DAPG), synthétisé par *Pseudomonas* spp.
- La phénazine, également produite par *Pseudomonas* spp.
- La bacillomycine D, issue de *Bacillus* spp.
- La mycosubtiline, produite par *Bacillus* spp.

Ces composés ont démontré une forte activité antagoniste *in vitro* contre divers champignons phytopathogènes (Wang *et al.*, 2021).

3.2.2.2. Lyse enzymatique

Les PGPR peuvent inhiber les pathogènes fongiques en produisant des enzymes hydrolytiques capables de dégrader leurs parois cellulaires. Parmi ces enzymes figurent les chitinases, les glucanases, les cellulases et les protéases. Ces activités enzymatiques participent directement à la lyse des structures fongiques, réduisant leur capacité d'infection (Jeyanthi et Kanimozhi, 2018).

3.2.2.3. Induction de Résistance Systémique (ISR)

Certains PGPR déclenchent chez les plantes un état de défense renforcée appelé résistance systémique induite (ISR : *Induced Systemic Resistance*). Cette réponse immunitaire active permet à la plante de mieux résister à une grande variété de pathogènes, en mobilisant ses propres mécanismes de défense avant même l'infection (Wang *et al.*, 2021).

Chapitre 2.

Matériel et Méthodes

Chapitre 2. Matériel et méthodes

Ce travail vise principalement à isoler, caractériser et identifier les bactéries endophytes et rhizosphériques associées à l'origan (*Origanum* sp.), ainsi qu'à évaluer leur activité antagoniste *in vitro* contre des agents phytopathogènes d'intérêt agronomique, en vue de contribuer au développement de stratégies de biocontrôle écologiquement durables. Notre étude a été réalisée au sein du Laboratoire PFE de la Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie, Département de Biotechnologie et Agro-Ecologie, Université Blida 1. Le travail a été mené sur une durée de trois mois, entre mars et juin 2025.

1. Produits chimiques et milieux de culture

1.1. Produits chimiques

L'ensemble des produits chimiques utilisés au cours de cette étude est détaillé dans l'annexe 01.

1.2. Milieux de culture

Les différents milieux de culture employés durant les expérimentations, accompagnés de leur composition respective, sont présentés dans l'annexe 02.

2. Matériel biologique

2.1. Souche fongique de l'agent pathogène

Une souche fongique phytopathogène de *Fusarium oxysporum* f.sp. *albidinis* (Foa FB26) a été utilisée dans notre étude (Figure 3). Elle appartient à la collection du laboratoire de mycologie du département de Biotechnologie, Faculté SNV, Université Blida 1. Cette souche a été isolée à partir d'un spécimen de palmier dattier (*Phoenix dactylifera* L.) présentant des symptômes typiques de la fusariose vasculaire, communément appelée maladie du Bayoud.



Figure 3. La souche FB26 de *Fusarium oxysporum* f.sp. *albedinis* utilisée dans notre étude.

2.2. Matériel végétal

Nous avons procédé à un isolement des bactéries endophytes et de potentiels PGPR à partir des plants et de la rhizosphère de l'origan (*Origanum* sp.). Le genre "*Origanum*", appartenant à la famille des *Lamiaceae*, regroupe plusieurs espèces médicinales bien connues, dont la classification taxonomique a été étudiée en détail sur les plans morphologique et phylogénétique. La classification taxonomique du genre "*Origanum*" est la suivante (Ietswaart, 1980 ; Tripathy *et al.*, 2017) :

- **Règne :** *Plantae*
- **Embranchement :** *Tracheophyta*
- **Classe :** *Magnoliopsida*
- **Ordre :** *Lamiales*
- **Famille :** *Lamiaceae* (syn. *Labiatae*)
- **Sous-famille :** *Nepetoideae*
- **Tribu :** *Mentheae* (ou parfois *Saturejeae* selon certaines classifications historiques)
- **Genre :** *Origanum* L.

Ce genre est proche d'autres genres comme *Thymus*, *Thymbra*, *Satureja* et *Micromeria* (Eleftheria *et al.*, 2022). Une révision taxonomique complète par Ietswaart, (1980) a divisé le genre *Origanum* en 10 sections botaniques, incluant par exemple les sections *Amaracus*, *Anatolicon*, *Majorana*, *Chilocalyx*, *Origanum*, etc.

Cette classification repose sur une combinaison de données morphologiques (formes de calices, bractées, corolles) et, dans des études plus récentes, sur des analyses phylogénétiques basées sur l'ADN nucléaire et chloroplastique (Tripathy *et al.*, 2017 ; Eleftheria *et al.*, 2022).

Origanum est une plante herbacée vivace, érigée, couverte de poils. Elle atteint entre 15 cm et 60 cm de hauteur. Ses feuilles sont pétiolées, larges, ovales, obtuses, subdentées, arrondies à la base, et vertes des deux côtés (Figure 4). Les inflorescences sont des panicules corymbiformes portant des épis cylindriques ou oblongs. Les bractées sont ovales, colorées, plus longues que le calice. Les fleurs sont aromatiques et dégagent une odeur intense (Lindley, 1838).

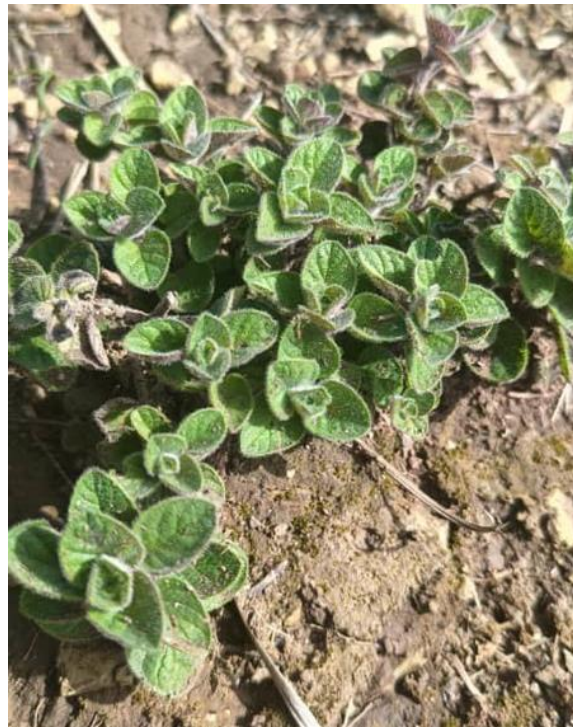


Figure 4. Aspect morphologique de la plante de l'origan collectée à l'état spontané.

Le genre *Origanum*, appartenant à la famille des *Lamiaceae*, regroupe des plantes aromatiques et médicinales largement répandues autour du bassin méditerranéen, en Eurasie et en Afrique du Nord. Ces plantes sont réputées pour leur riche composition en huiles essentielles, notamment en carvacrol et thymol, deux monoterpènes phénoliques aux puissantes propriétés antimicrobiennes, antioxydantes et anti-inflammatoires. Utilisées depuis l'Antiquité en médecine traditionnelle, les espèces du genre *Origanum* présentent un large spectre d'activités biologiques, allant de l'action antibactérienne et antifongique à des effets antitumoraux, antiparasitaires et antiviraux. Elles sont également employées comme

conservateurs naturels et agents aromatiques dans l'alimentation. Cette diversité d'applications découle de leur composition chimique complexe et variable, influencée par des facteurs génétiques et environnementaux (Beltrán et Esteban, 2016).

3. Échantillonnage

Les échantillons de racines de l'origan ainsi que du sol rhizosphérique associé ont été collectés le 28 février 2025 dans une zone naturelle faiblement anthropisée, située à 6,36 km de la commune d'Ouled Slama (Bougara, wilaya de Blida), à proximité de l'arboretum d'El Merdja, à une altitude de 731 m (Figure 5). Le site présente un climat méditerranéen subhumide, caractérisé par des hivers doux et humides et des étés chauds et secs. Les échantillons d'origan ont été prélevés au stade phénologique herbacé, correspondant à la phase végétative active de la plante, afin de garantir une représentativité optimale des communautés microbiennes associées.

Les prélèvements ont été réalisés à l'aide de matériel stérile (gants, pinces, ciseaux, spatule), puis placés dans des sachets plastiques, étiquetés et conservés à 4 °C durant le transport jusqu'au laboratoire. Seuls les échantillons de racines et de sol ont été retenus pour l'isolement des bactéries endophytes et rhizosphériques.

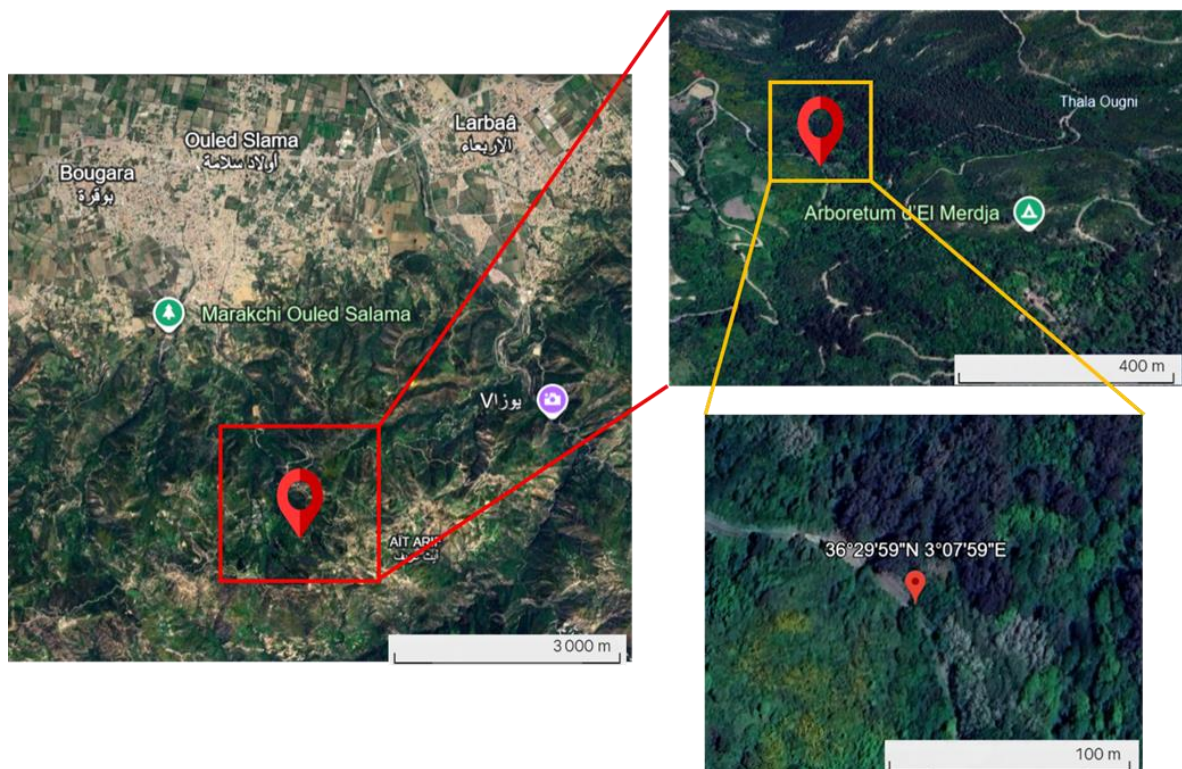


Figure 5. Site d'échantillonnage (Google Earth).

4. Isolement, purification et conservation des bactéries

4.1. Isolement des bactéries endophytes

4.1.1. Préparation des dilutions

L'isolement des bactéries endophytes a été réalisé à partir de racines saines d'origan fraîchement collectées, transportées dans des sacs en plastique et conservées au frais (Figure 6.A). Après un nettoyage à l'eau du robinet pour éliminer les particules résiduelles, les racines ont été désinfectées selon le protocole de Fávoro *et al.*, (2012) : immersion dans du éthanol à 70 % pendant 1 minute, suivie d'un traitement à l'hypochlorite de sodium à 2 % pendant 5 minutes, puis cinq rinçages à l'eau distillée stérile et un séchage sur papier filtre (Figure 6.B). L'efficacité de cette étape a été contrôlée par ensemencement de 0,1 ml du dernier bain de rinçage sur le milieu LPGA, incubé à 30 °C pendant 24 heures ; toute croissance microbienne a été considérée comme une contamination, et les isolats présentant un profil similaire à ces contaminants ont été exclus des analyses.

Suite à la désinfection, les racines ont été broyées de manière aseptique à l'aide d'un mortier et d'un pilon stériles (Figure 6.C). Ensuite, 1 g de cette macération a été transféré dans 90 ml d'eau distillée stérile afin de constituer la suspension mère. Cette dernière a été soumise à des dilutions en série décimales, allant de 10^{-1} à 10^{-4} (Figure 6.D), selon le protocole décrit par Pettipher *et al.* (2005).

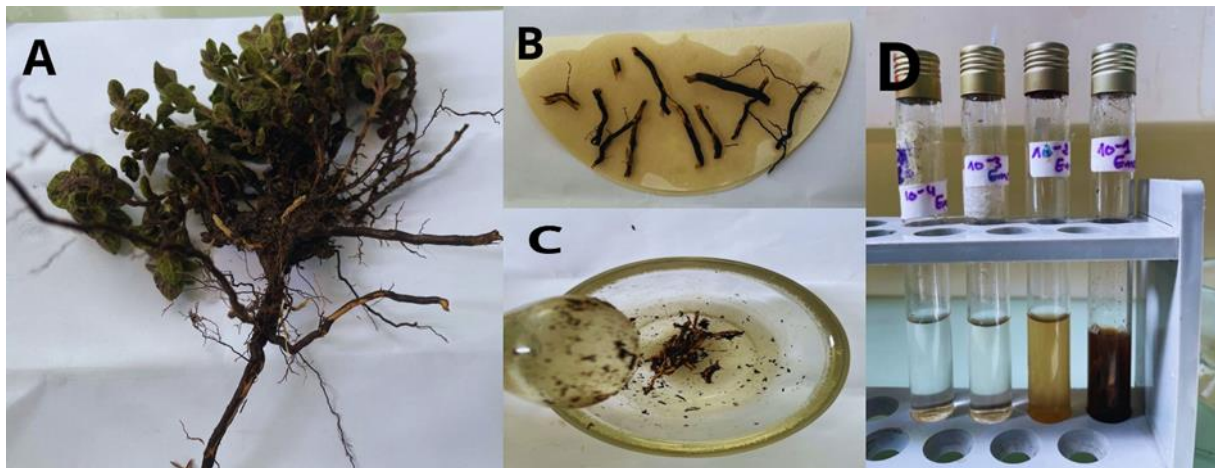


Figure 6. Étapes de préparation des dilutions pour l'isolement des bactéries endophytes à partir des racines de l'origan.

(A) Plante entière d'origan fraîchement récoltée. (B) Racine nettoyée, découpée en fragments stériles. (C) Macération des fragments racinaires. (D) Série de dilutions décimales préparées pour l'ensemencement sur milieux de culture.

4.1.2. Mise en culture

Des aliquotes de 0,1 ml prélevés dans les trois dernières dilutions ont été réparties sur des boîtes de Pétri contenant du milieu LPGA solidifié et refroidi. L'ensemencement a été réalisé à l'aide d'une pipette Pasteur incurvée, en étalant délicatement la suspension afin d'assurer une distribution homogène sur la surface du milieu (Pettipher *et al.*, 2005). Les plaques ont ensuite été incubées à 30 °C pendant une semaine.

4.2. Isolement des rhizobactéries

4.2.1. Préparation des dilutions

Après le prélèvement de l'échantillon de sol, celui-ci a été soumis à un séchage à l'air libre, puis tamisé afin d'éliminer les débris grossiers avant d'entamer la phase d'isolement.

Les bactéries rhizosphériques ont été isolées à partir de 1 g de sol sec en utilisant la méthode classique de dilution en série. L'échantillon a été suspendu dans 9 ml d'eau distillée stérile, puis homogénéisé pendant 15 minutes à l'aide d'un agitateur, afin d'assurer une répartition uniforme des microorganismes dans la suspension. Cette étape est essentielle pour faciliter l'isolement de bactéries individuelles. La suspension obtenue a ensuite été soumise à une série de dilutions décimales successives allant de 10^{-1} à 10^{-6} (Figure 7) (Murat, 2024).



Figure 7. La série de suspension-dilution du sol pour l'isolement bactérien.

4.2.2. Mise en culture

Les quatre dernières dilutions (10^{-3} , 10^{-4} , 10^{-5} et 10^{-6}) ont été ensemencées sur des boîtes de Pétri contenant du milieu LPGA solidifié et préalablement refroidi. L'ensemencement a été réalisé à l'aide d'une pipette Pasteur incurvée, en étalant délicatement 0,1 ml de suspension sur la surface du milieu, de manière à assurer une répartition homogène

des cellules bactériennes (Pettipher *et al.*, 2005). Les boîtes ont été incubées à 30 °C pendant une semaine afin de permettre la croissance des colonies bactériennes.

4.3. Purification et conservation des isolats bactériens

Après l'incubation, les colonies bactériennes présentant des morphologies distinctes ont été sélectionnées pour purification. Chaque colonie a été repiquée par stries d'épuisement sur des boîtes de Pétri contenant du milieu LPGA frais, dans le but d'obtenir des cultures pures. Après incubation à 30°C pendant 24 à 48 h, les isolats obtenus ont été ensuite conservés à 4°C pour d'autres utilisations ultérieures.

5. Identification des isolats

5.1. Examen macroscopique

L'examen macroscopique a été réalisé sur les colonies pures cultivées sur milieu solide. Les caractéristiques morphologiques observées comprenaient la forme, la taille, l'élévation, l'aspect, la couleur, la consistance et la translucidité. Ces observations permettent une première orientation taxonomique et une sélection des isolats pour des analyses plus poussées (Erkmen, 2021).

5.2. Examen microscopique

L'examen microscopique constitue une étape essentielle dans l'identification préliminaire des bactéries. Il permet d'observer la morphologie cellulaire, l'arrangement des cellules, la présence éventuelle de spores, ainsi que la réaction aux colorations spécifiques. Parmi ces colorations, la coloration de Gram est la plus couramment utilisée pour distinguer les bactéries à paroi Gram-positif ou Gram-négatif (Beveridge, 2000), tandis que la coloration au vert de malachite permet la mise en évidence des endospores, notamment chez les genres sporulants comme *Bacillus*. Ces observations sont réalisées au microscope optique à immersion, après préparation et fixation des frottis bactériens sur lame (Bartholomew et Mittwer, 1949).

5.2.1. Coloration de Gram

La coloration de Gram est l'une des techniques les plus fondamentales et largement utilisées en microbiologie pour différencier les bactéries selon la structure de leur paroi cellulaire. Développée par Hans Christian Gram en 1884, cette méthode repose sur la capacité des cellules bactériennes à retenir un colorant violet cristal après un traitement à l'alcool (Beveridge, 2000).

Les bactéries sont classées en deux grands groupes : les Gram positives, qui conservent la coloration violette, et les Gram négatives, qui apparaissent rouges ou roses après contre-coloration à la fuchsine. Cette différence repose principalement sur la structure de la paroi cellulaire : les bactéries Gram positives possèdent une paroi épaisse riche en peptidoglycane, tandis que les Gram négatives ont une paroi plus mince, complétée par une membrane externe contenant des lipopolysaccharides (Beveridge, 2000).

La coloration de Gram suit une série d'étapes précises permettant de distinguer les deux types de bactéries (Paray *et al.*, 2023) :

- **Préparation du frottis** : un frottis bactérien est réalisé sur une lame de verre, puis fixé par passage à la flamme pour assurer l'adhérence des cellules.
- **Coloration primaire** : la lame est recouverte de cristal violet pendant environ 1 minute, puis rincée à l'eau. Ce colorant pénètre toutes les cellules bactériennes.
- **Mordantage** : une solution d'iode de Lugol est appliquée pendant 1 minute. L'iode forme un complexe insoluble avec le cristal violet dans les cellules. La lame est ensuite rincée à l'eau.
- **Décoloration** : la lame est traitée par un alcool (éthanol à 95%) pendant 10 à 20 secondes (Figure 8.B). Cette étape est cruciale, car elle dissout la membrane externe des Gram négatives et déshydrate la paroi des Gram positives. Elle est immédiatement suivie d'un rinçage rapide à l'eau.
- **Contre-coloration** : la lame est ensuite colorée avec de la fuchsine pendant 1 minute afin de colorer les bactéries ayant perdu la coloration violette. Un dernier rinçage est effectué, suivi d'un séchage doux à l'aide de papier absorbant (Figure 8.C)
- **Observation microscopique** : la lame est observée à l'aide d'un microscope optique en immersion à l'objectif $\times 100$, permettant de différencier les cellules Gram positives (violette) des Gram négatives (roses/rouges).

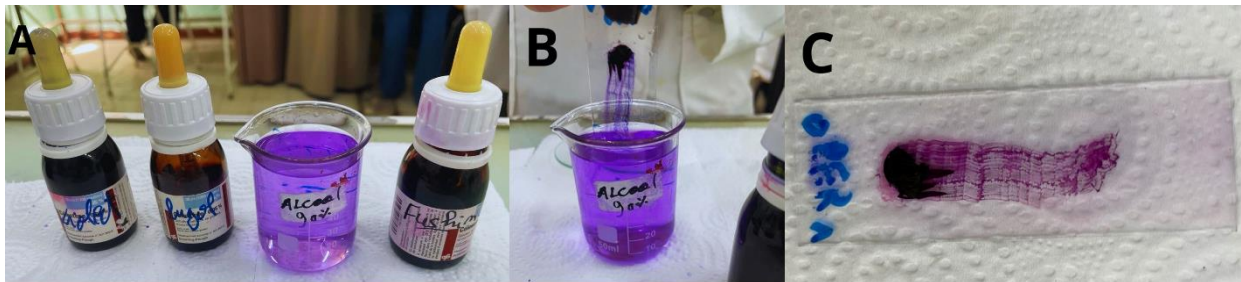


Figure 8. Étapes de la coloration de Gram pour l'identification de bactéries.

(A) Réactifs utilisés : cristal violet, lugol, alcool à 95 %, fuchsine. (B) Étape de décoloration à l'alcool. (C) Frottis après coloration.

5.2.2. Coloration au vert de malachite

La technique de coloration au vert de malachite, développée par Schaeffer et Fulton en 1933, est une méthode différentielle classique utilisée pour la mise en évidence des spores bactériennes. Elle repose sur la capacité du vert de malachite à pénétrer les structures résistantes des spores sous l'effet de la chaleur (Bartholomew et Mittwer, 1949).

La procédure débute par la préparation d'un frottis à partir d'une culture bactérienne, étalé soigneusement sur une lame propre. Ce frottis est ensuite fixé par passage rapide à la flamme afin d'assurer une bonne adhésion des cellules à la lame (Figure 9.A). Une fois la fixation achevée, on applique une solution aqueuse de vert de malachite à 5 % sur l'ensemble du frottis (Figure 9.B).

La lame est alors exposée à la vapeur d'eau pendant une dizaine de minutes (Figure 9.C). Cette étape de chauffage est essentielle, car elle permet d'assouplir la paroi épaisse des spores, facilitant ainsi la pénétration du colorant. Après le chauffage, le frottis est rincé délicatement à l'eau du robinet pour éliminer l'excès de colorant retenu par les structures non sporulées.

Une contre-coloration est ensuite réalisée à l'aide de la fuchsine (Figure 9.D), appliquée pendant une trentaine de secondes. Ce colorant secondaire permet de colorer les cellules végétatives qui n'ont pas retenu le vert de malachite. L'observation microscopique se fait à l'objectif $\times 100$ à immersion, sous lumière directe. Les spores apparaissent en vert, tandis que les cellules végétatives se distinguent en rose.

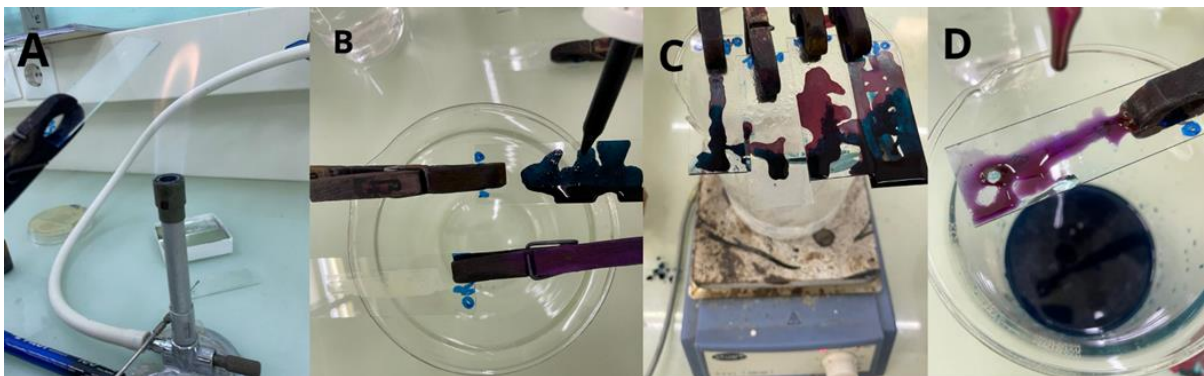


Figure 9. Étapes de la coloration au vert de malachite pour la mise en évidence des endospores bactériennes.

(A) Fixation de l'échantillon par la chaleur. (B) Application du vert malachite. (C) Chauffage des lames pour favoriser la pénétration du colorant. (D) Contre-coloration à la fuchsine.

5.3. Test d'hypersensibilité sur tabac

Le test de la réaction d'hypersensibilité (HR, pour *Hypersensitive Response*) sur les feuilles de tabac (*Nicotiana tabacum*) constitue une méthode classique en biologie végétale pour analyser les interactions entre les plantes et les agents pathogènes. Il est particulièrement utilisé pour évaluer les mécanismes de défense impliqués dans la résistance des plantes aux maladies (Snaiki *et al.*, 2005).

Dans le cadre de ce travail, la méthode a été mise en œuvre en injectant une suspension bactérienne dense, préparée à partir de cultures d'isolats bactériens âgées de 24 à 48 heures. L'injection est réalisée manuellement dans l'espace intercellulaire du limbe foliaire, sur la face inférieure des feuilles de tabac (Figure 10). Un témoin négatif est réalisé en injectant de l'eau distillée selon le même protocole (Oulebsir-Mohandkaci *et al.*, 2017).

L'évaluation du test repose sur l'observation visuelle des zones inoculées. En présence d'une réaction positive, celles-ci deviennent translucides et humides, puis se dessèchent progressivement, prenant une teinte brun clair à beige au bout de 24 heures.

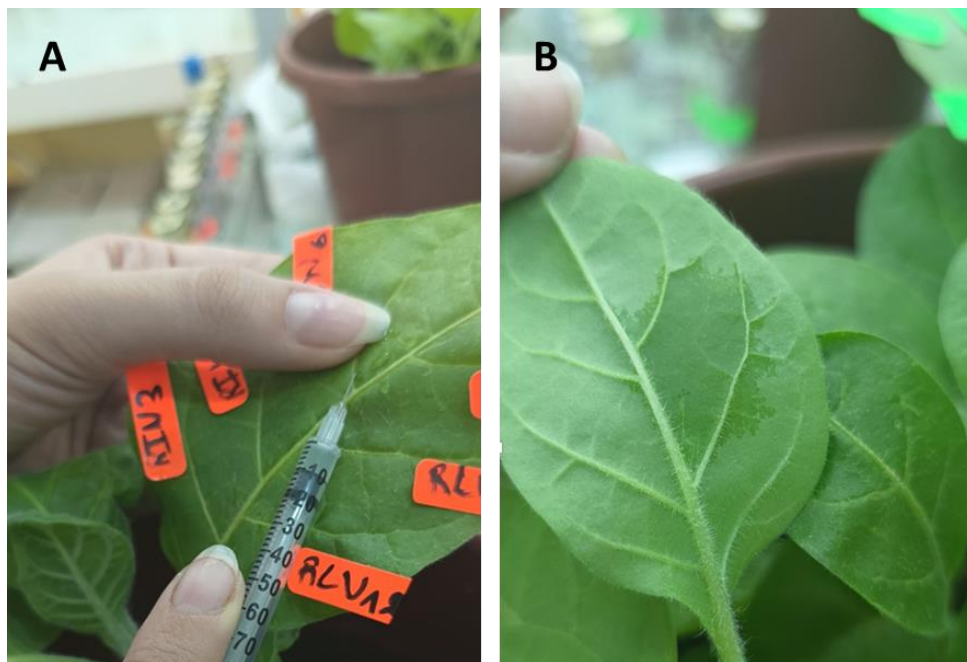


Figure 10. Test d'hypersensibilité sur feuille de tabac.

- (A) Inoculation de la suspension bactérienne sur la face inférieure de la feuille à l'aide d'une seringue. (B) Infiltration de la suspension bactérienne dans le limbe foliaire.

6. Test d'antagonisme *in vitro* des isolats obtenus vis-à-vis de la souche phytopathogène

6.1. Mise en place du test

L'évaluation *in vitro* de l'activité antagoniste des isolats bactériens constitue une étape essentielle pour identifier les souches potentiellement efficaces dans la lutte biologique contre les agents phytopathogènes. Dans cette étude, une série de tests *in vitro* a été réalisée, permettant de mesurer la capacité des bactéries isolées à inhiber la croissance mycélienne du champignon phytopathogène (Rios-Velasco *et al.*, 2016). Afin d'évaluer le potentiel antagoniste des isolats bactériens obtenus, une confrontation *in vitro* a été réalisée contre la souche phytopathogène FB26 de Foa.

La méthode utilisée consistait à placer un disque mycélien de 5 mm de diamètre du champignon phytopathogène au centre d'une boîte de Pétri contenant du milieu LPGA. Les isolats bactériens ont été ensuite déposés aux quatre points cardinaux de la boîte, à l'aide d'une anse, sous forme de dépôts de crème bactérienne (Figure 11.A). Les témoins des champignons ont été cultivés seuls dans des conditions identiques (Figure 11.B), c'est-à-dire à 28 °C pendant 7 jours. Chaque traitement a été répété trois fois.

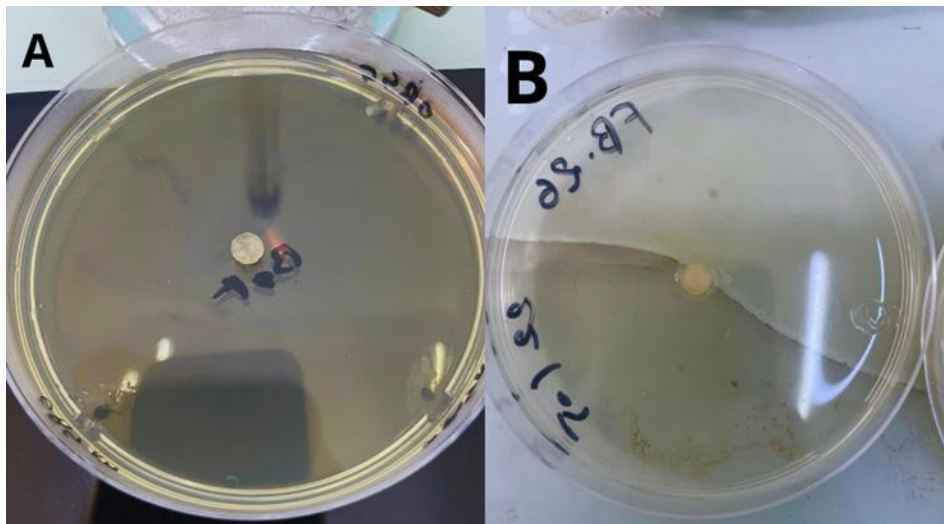


Figure 11. Mise en place du test d'antagonisme *in vitro*.

(A) Inoculation du champignon au centre et des bactéries aux quatre points cardinaux. (B) Témoin : champignon cultivé seul.

6.2. Calcul de l'inhibition de la croissance mycélienne

L'activité antagoniste des isolats bactériens vis-à-vis de la souche phytopathogène a été quantifiée en mesurant la zone de croissance mycélienne après 7 jours d'incubation. L'inhibition de la croissance mycélienne a été déterminée à l'aide de la formule suivante (Ahmed *et al.*, 2007) :

$$I (\%) = \frac{R-r}{R} \times 100 , \text{ dont :}$$

- **I (%)** : taux d'inhibition de la croissance mycélienne.
- **R** : rayon de la colonie fongique dans le témoin (sans bactérie).
- **r** : rayon de la colonie fongique en direction de la bactérie.

Cette méthode permet d'évaluer l'effet inhibiteur potentiel des bactéries en comparant la croissance du champignon en présence ou en absence d'interaction avec un antagoniste. Une inhibition élevée (supérieur ou égal à 20%) indique une interaction antagoniste marquée. La moyenne des trois répétitions a été utilisée pour chaque isolat testé.

Chapitre 3.

Résultats et discussion

Chapitre 3. Résultats et discussion

L'objectif principal de ce travail était d'isoler et de caractériser les bactéries endophytes et PGPR associées à l'origan (*Origanum* sp.), ainsi que d'évaluer leur potentiel antagoniste vis-à-vis d'une souche phytopathogène. Les résultats obtenus sont présentés et discutés en mettant en relation les observations expérimentales avec les données issues de la littérature scientifique. Cette section met en évidence la diversité bactérienne associée à la plante médicinale étudiée, les caractéristiques fonctionnelles des isolats, ainsi que leur capacité à inhiber la croissance de l'agent phytopathogène testé. Les implications de ces résultats dans une perspective de biocontrôle et de promotion de la croissance des plantes seront également abordées.

1. Isolement et caractérisation des bactéries associées à l'origan

1.1. Résultats de l'isolement des bactéries endophytes et rhizosphériques

L'isolement des bactéries associées à l'origan a été réalisé à partir des racines de la plante pour les endophytes, et du sol rhizosphérique pour les rhizobactéries.

Pour vérifier l'efficacité de la désinfection de surface des racines avant l'isolement des endophytes, la solution du dernier rinçage a été mise en culture sur le même milieu. Aucune croissance bactérienne n'a été observée, confirmant ainsi l'absence de contamination externe (Figure 12.A).

Un total de 20 isolats a été sélectionnés, dont 6 endophytes (notés ORER1 à ORER6) et 14 rhizosphériques (notés ORS1 à ORS14), en se basant sur la diversité morphologique apparente des colonies (Figure 12.B, C).

Les colonies présentant une morphologie distincte ont été repiquées par stries sur de nouvelles boîtes contenant le milieu LPGA afin d'obtenir des cultures pures (Figure 13). Ces repiquages ont été incubés à 30 °C pendant 24 à 48 h. Une fois la pureté confirmée, les isolats ont été conservés à 4 °C pour des utilisations ultérieures.

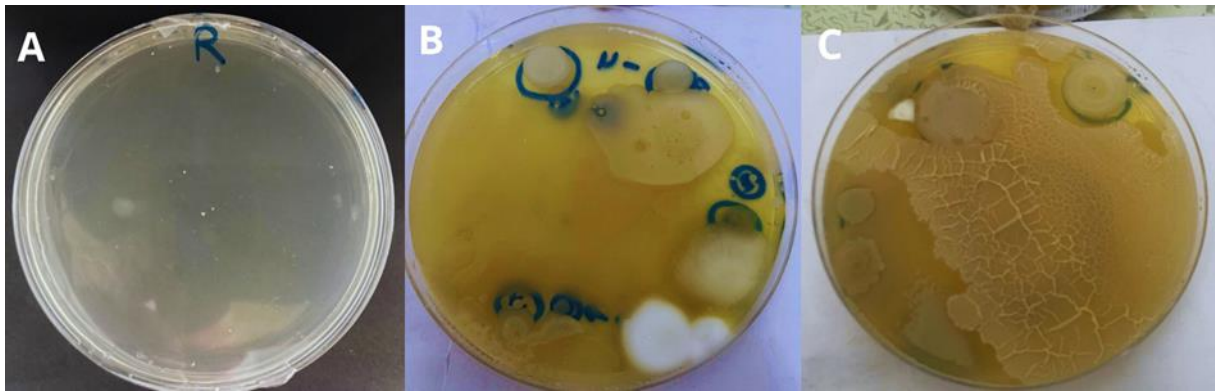


Figure 12. Aspect des boîtes d'ensemencement après une semaine d'incubation.

(A) Eau du dernier rinçage, (B) ensemencement de la dilution 10^{-4} , (C) ensemencement de la dilution 10^{-6} .

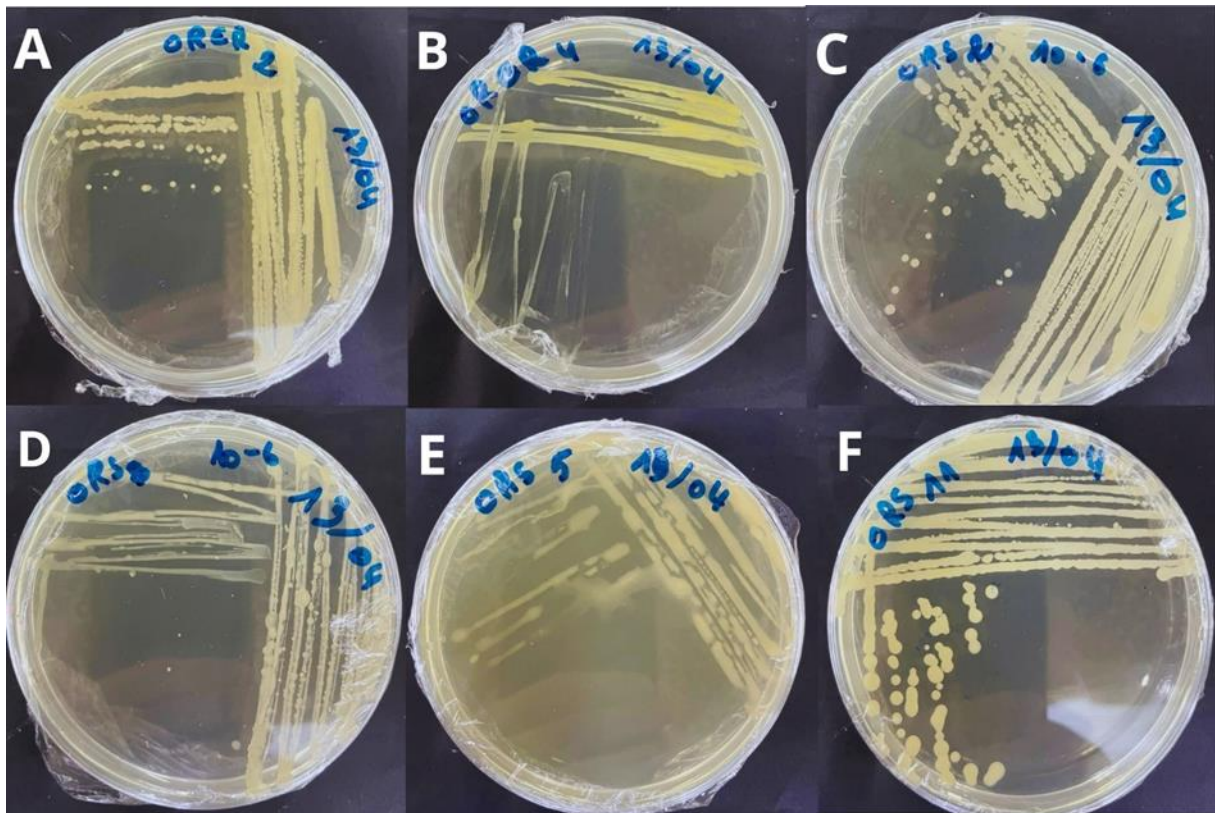


Figure 13. Aspect cultural de quelques isolats purifiés.

(A) ORER2, (B) ORER4, (C) ORS2, (D) ORS3, (E) ORS5, (F) ORS11.

1.2. Identification des isolats

1.2.1. Description macroscopique des isolats

La majorité des isolats obtenus à partir de l'origan présentent des caractéristiques macroscopiques relativement homogènes. La couleur crème est prédominante, bien que quelques isolats soient jaunes ou blanches. La forme circulaire, l'élévation élevée, l'aspect brillant, la consistance crémeuse, l'opacité, ainsi qu'une odeur forte sont les critères les plus fréquemment observés. Ces éléments indiquent une certaine uniformité morphologique entre

les souches, bien qu'une diversité reste notable, notamment dans la couleur et la forme des colonies.

Les données détaillées pour l'ensemble des isolats endophytes (ORER) et rhizosphériques (ORS) sont présentées dans les Tableaux 3 et 4.

Tableau 3. Observations macroscopiques des souches endophytes isolées.

Code	Couleur	Taille	Aspect	Forme	Élévation	Consistance	Opacité	Odeur
ORER1	Jaune	Moyenne	Brillant	Circulaire	Élevée	Crémeuse	Translucide	Forte
ORER2	Crème	Grande	Brillant	Circulaire	Élevée	Crémeuse	Opaque	Forte
ORER3	Jaune	Grande	Brillant	Irrégulière	Élevée	Crémeuse	Opaque	Forte
ORER4	Jaune	Petite	Brillant	Irrégulière	Élevée	Crémeuse	Opaque	Forte
ORER5	Crème	Grande	Mat	Irrégulière	Élevée	Crémeuse	Opaque	Forte
ORER6	Crème	Moyenne	Brillant	Irrégulière	Élevée	Crémeuse	Opaque	Forte

Tableau 4. Observations macroscopiques des souches rhizosphériques isolées.

Code	Couleur	Taille	Aspect	Forme	Élévation	Consistance	Opacité	Odeur
ORS1	Crème	Grande	Brillant	Circulaire	Élevée	Crémeuse	Opaque	Forte
ORS2	Crème	Grande	Brillant	Circulaire	Élevée	Crémeuse	Opaque	Forte
ORS3	Crème	Grande	Mat	Irrégulière	Élevée	Crémeuse	Opaque	Forte
ORS4	Crème	Grande	Brillant	Irrégulière	Élevée	Crémeuse	Opaque	Forte
ORS5	Crème	Grande	Brillant	Irrégulière	Élevée	Crémeuse	Opaque	Forte
ORS6	Crème	Grande	Brillant	Circulaire	Élevée	Crémeuse	Opaque	Forte
ORS7	Blanche	Grande	Brillant	Circulaire	Élevée	Grasse	Opaque	Forte
ORS8	Crème	Grande	Brillant	Circulaire	Élevée	Crémeuse	Translucide	Forte
ORS9	Blanche	Grande	Brillant	Circulaire	Élevée	Grasse	Opaque	Forte
ORS10	Blanche	Petite	Brillant	Circulaire	Élevée	Grasse	Opaque	Forte
ORS11	Blanche	Petite	Brillant	Circulaire	Élevée	Grasse	Opaque	Forte
ORS12	Crème	Grande	Brillant	Circulaire	Élevée	Crémeuse	Opaque	Forte
ORS13	Crème	Moyenne	Brillant	Circulaire	Élevée	Crémeuse	Opaque	Forte
ORS14	Blanche	Petite	Brillant	Circulaire	Élevée	Crémeuse	Opaque	Forte

1.2.2. Description microscopique des isolats

Afin de mieux caractériser les isolats bactériens, une observation microscopique a été réalisée après deux types de colorations : la coloration de Gram, qui permet de distinguer les bactéries Gram-positives et Gram-négatives selon la structure de leur paroi, et la coloration au vert de malachite, spécifique pour la mise en évidence des spores et endospores. Ces observations ont permis de classer les isolats selon leur forme cellulaire, leur type de regroupement et leur capacité sporulante.

1.2.2.1. Coloration de Gram

Les résultats de la coloration de Gram ont montré que la majorité des isolats sont Gram positifs, ce qui indique une paroi épaisse riche en peptidoglycane. Quelques isolats, comme ORER1, ORER4, ORS1, ORS10 et ORS13, se sont révélés Gram négatifs, ce qui suggère une structure de paroi différente, typique des bactéries à double membrane (Figure 14).

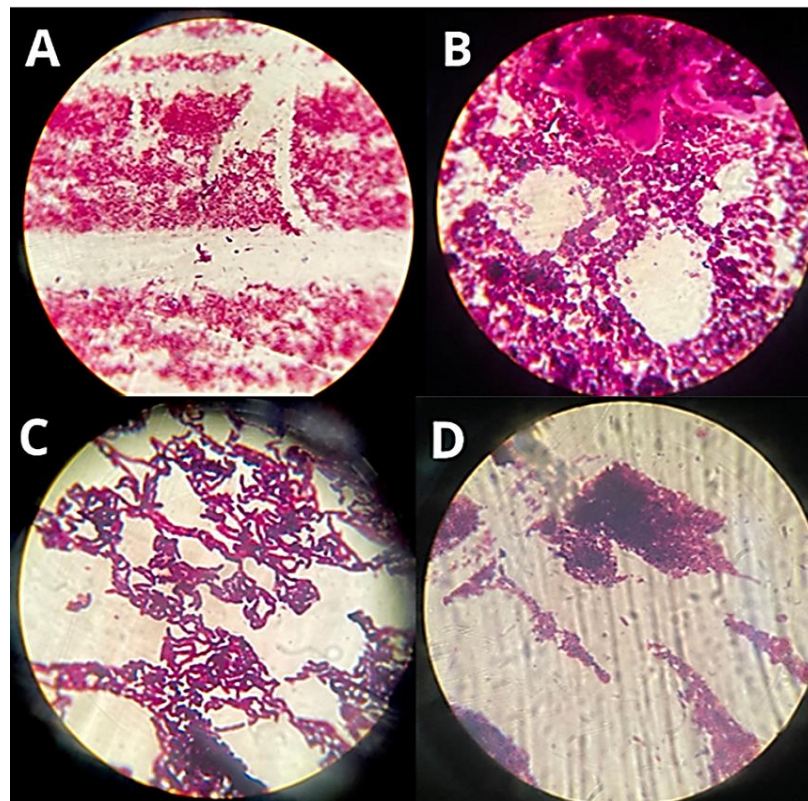


Figure 14. Observation microscopique des frottis après la coloration de Gram des isolats (G×1000).

(A) ORS10 (Gram -), (B) ORS13 (Gram -), (C) ORS14 (Gram +), (D) ORER6 (Gram +).

1.2.2.2. Coloration au vert de malachite

Cette coloration a révélé la présence de spores ou d'endospores chez plusieurs isolats (Figure 15), notamment chez ORER2, ORER3, ORER5 et la majorité des isolats

rhizosphériques. Ce pouvoir sporulant peut refléter une capacité à survivre dans des conditions environnementales stressantes, caractéristique importante chez certaines bactéries bénéfiques.

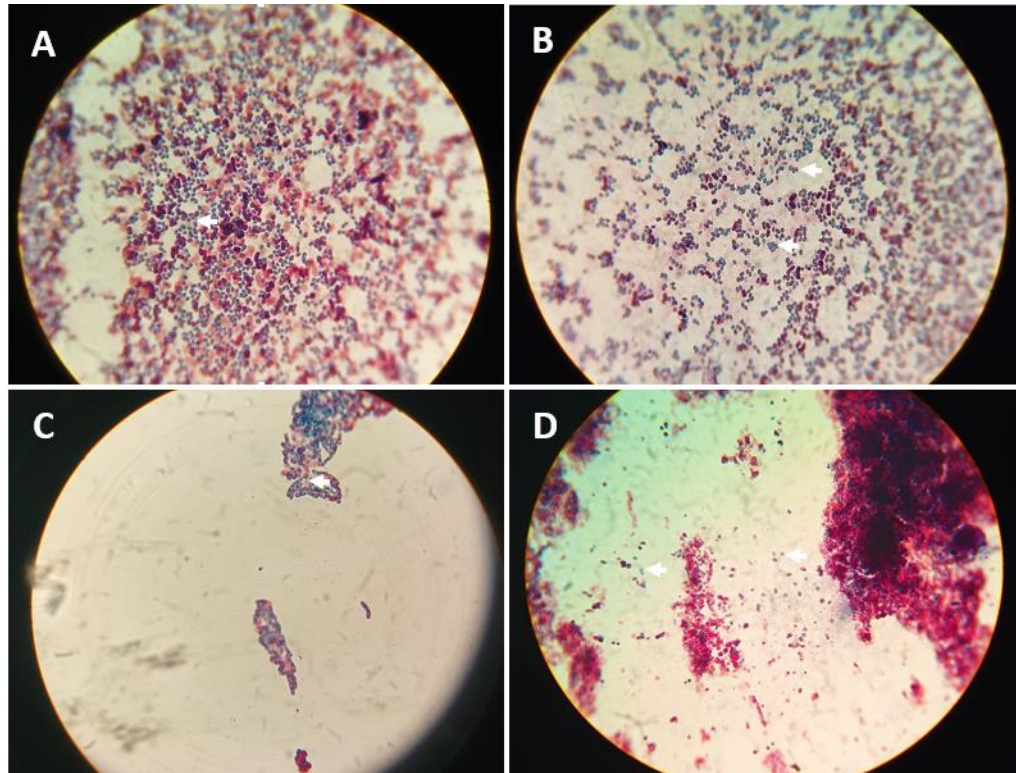


Figure 15. Observation microscopique des frottis après la coloration au vert de malachite des isolats (G×1000).

(A) ORS7, (B) ORS8, (C) ORER5, (D) ORER9.

Les résultats des observations microscopiques des 19 isolats, obtenus après les colorations de Gram et au vert de malachite, sont regroupés dans les tableaux 5 et 6. Ces données incluent la capacité sporulante, le type de paroi, la forme cellulaire et le mode de regroupement bactérien.

Tableau 5. Caractéristiques microscopiques des isolats endophytes obtenus.

Codes	Coloration au vert de malachite	Coloration de Gram	Forme cellulaire	Type de regroupement
ORER1	/	-	Fusifforme	Non regroupées
ORER2	Présence des spores	+	Bacille	Non regroupées
ORER3	Présence des spores et endospores	+	Bacille	Non regroupées
ORER4	/	-	Cocci	Non regroupées
ORER5	Présence des spores	+	Bacille (petites bacilles)	Non regroupées
ORER6	Présence des spores	+	Coccobacille	Non regroupées

Tableau 6. Caractéristiques microscopiques des isolats rhizosphériques obtenus.

Codes	Coloration au vert de malachite	Coloration de Gram	Forme cellulaire	Type de regroupement
ORS1	/	-	Coccobacille	Non regroupées
ORS2	Présence des spores et endospores	+	Cocci	En grappe
ORS3	Présence des spores	+	Cocci	Non regroupées
ORS4	Présence des spores	+	Bacille	Non regroupées
ORS5	Présence des spores	+	Cocci	Non regroupées
ORS6	Présence des spores	+	Bacille	Non regroupées
ORS7	Présence des spores	+	Bacille	Non regroupées
ORS8	Présence des spores	+	Bacille	Non regroupées
ORS9	Présence des endospores	+	Bacille	Non regroupées
ORS10	/	-	Bacille	Non regroupées
ORS11	Présence des endospores	+	Cocci	Non regroupées
ORS13	/	-	Coccobacille	Non regroupées
ORS14	Présence des spores	+	Coccobacille	En chaîne

1.2.3. Résultats du test d'hypersensibilité sur tabac

Les résultats obtenus suite à l'injection des suspensions bactériennes sur les feuilles de tabac ont montré que l'ensemble des isolats testés, qu'ils soient endophytes ou rhizosphériques, n'ont induit aucune réaction d'hypersensibilité (Figure 16). Les zones d'injection sont demeurées intactes, sans signes visibles de nécrose, de décoloration ou d'altération tissulaire, contrairement aux symptômes caractéristiques d'une réponse HR positive (zones translucides ou brunâtres, dessèchement localisé).

Ces observations indiquent que toutes les souches sélectionnées sont non phytopathogènes, ce qui représente un critère essentiel pour leur usage potentiel en tant qu'agents bénéfiques en agriculture. L'absence de réaction d'hypersensibilité suggère que ces isolats ne sont pas reconnus comme pathogènes pour la plante et peuvent donc être utilisés en toute sécurité dans des stratégies de biocontrôle ou de stimulation de la croissance des plantes.

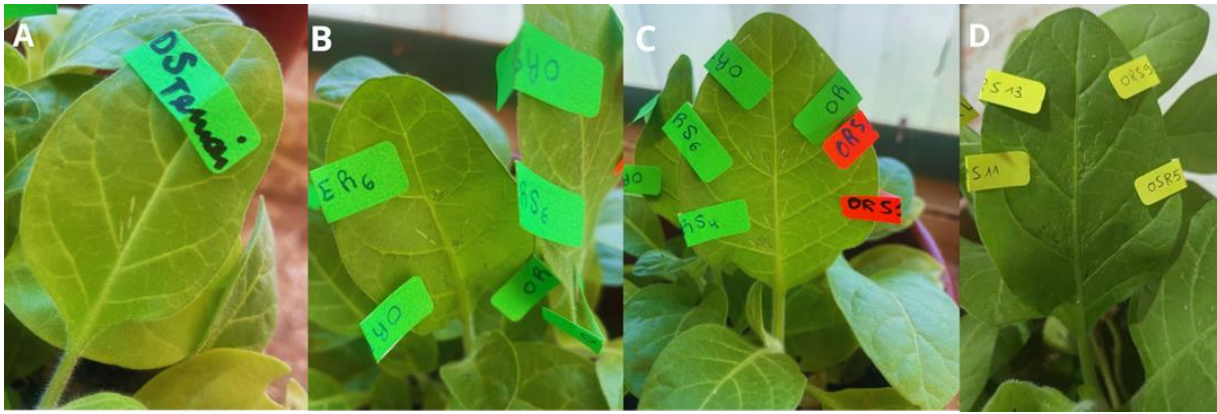


Figure 16. Feuilles de tabac après injection des isolats : absence de nécrose, témoignant de la non-phytopathogénécité.

(A) Témoin, (B) ORER3,4,5,6, (C) ORS1,2,3,4,6,7, (D) ORS5,9,11,13.

2. Résultats de l'activité antagoniste *in vitro* des isolats

L'évaluation de l'activité antagoniste des isolats bactériens a été réalisée *in vitro* contre la souche phytopathogène FB26, en mesurant les zones d'inhibition formées autour des colonies sur gélose. Ce test permet de détecter la capacité des bactéries à produire des composés antimicrobiens inhibant la croissance du pathogène.

Les zones d'inhibition ont été mesurées en centimètres (cm), et chaque test a été effectué en triplicat pour assurer la reproductibilité des résultats. Le témoin (absence de bactérie antagoniste) a présenté une croissance homogène du pathogène, avec un diamètre de colonie autour de 4 à 4,2 cm, ce qui représente la croissance maximale sans interférence.

Les résultats montrent que certains isolats exercent une inhibition marquée de la croissance de FB26. En particulier, les isolats ORS8 (1,80 cm), ORS9 (1,77 cm), ORS10 (1,83 cm) et ORS11 (1,93 cm) ont montré les plus fortes activités antagonistes (Figure 17.D), traduisant une capacité notable à limiter le développement du pathogène. À l'inverse, les isolats ORER5 (3,37 cm), ORS2 (3,17 cm) et ORS5 (3,40 cm) ont généré des zones proches de celles du témoin (Figure 17.B), indiquant une activité antagoniste faible ou nulle.

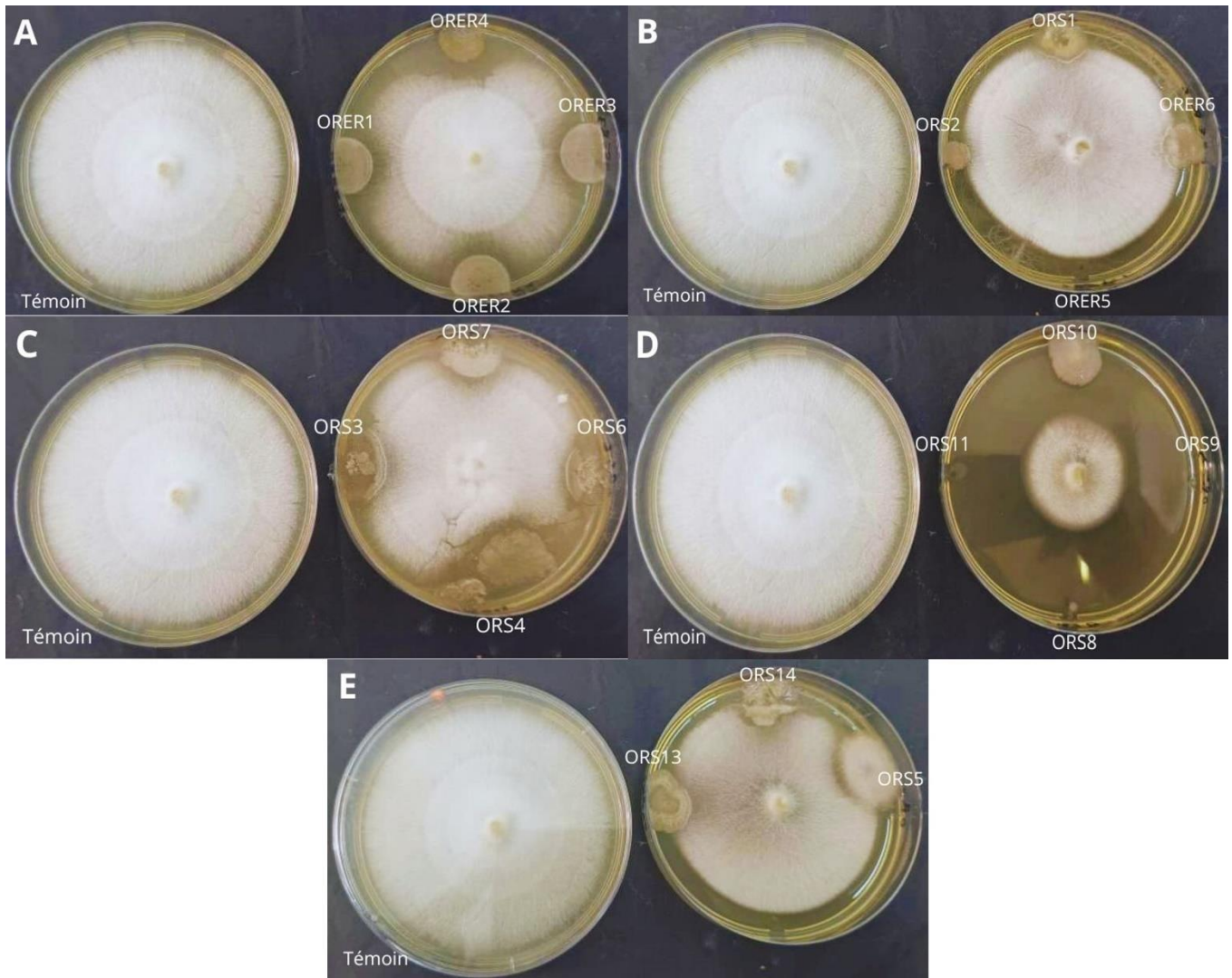


Figure 17. Résultats du pouvoir antagoniste in vitro des isolats vis-à-vis de la souche FB26 de Foa.

Certains isolats rhizosphériques tels que ORS8, ORS9, ORS10 ou ORS11 ont montré des taux d'inhibition élevés, dépassant 50 %, suggérant un fort potentiel antifongique. Du côté des isolats endophytes, certains comme ORER1, ORER2, ORER3 ou ORER4 ont également montré une activité intéressante, bien que légèrement inférieure à 50 % (Figure 19). En revanche, d'autres isolats se sont révélés peu efficaces, avec des pourcentages d'inhibition inférieurs à 30 %, ce qui indique une variabilité notable de l'activité antagoniste selon l'origine et le type d'isolat (Figure 18).

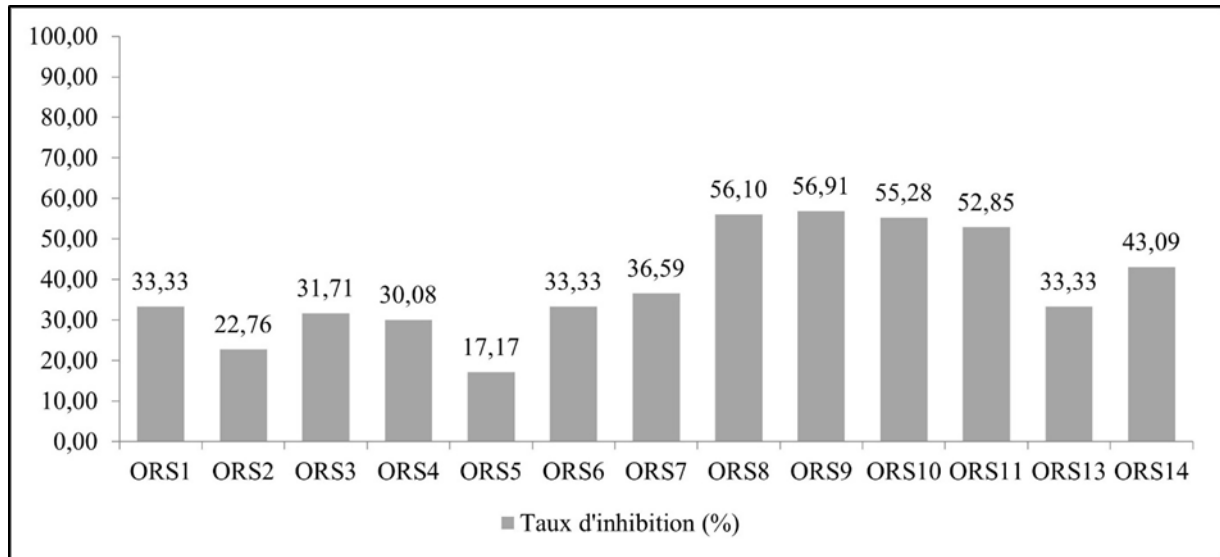


Figure 18. Taux d'inhibition (%) des isolats rhizosphériques vis-à-vis de la souche pathogène FB26 de Foa en confrontation directe *in vitro*.

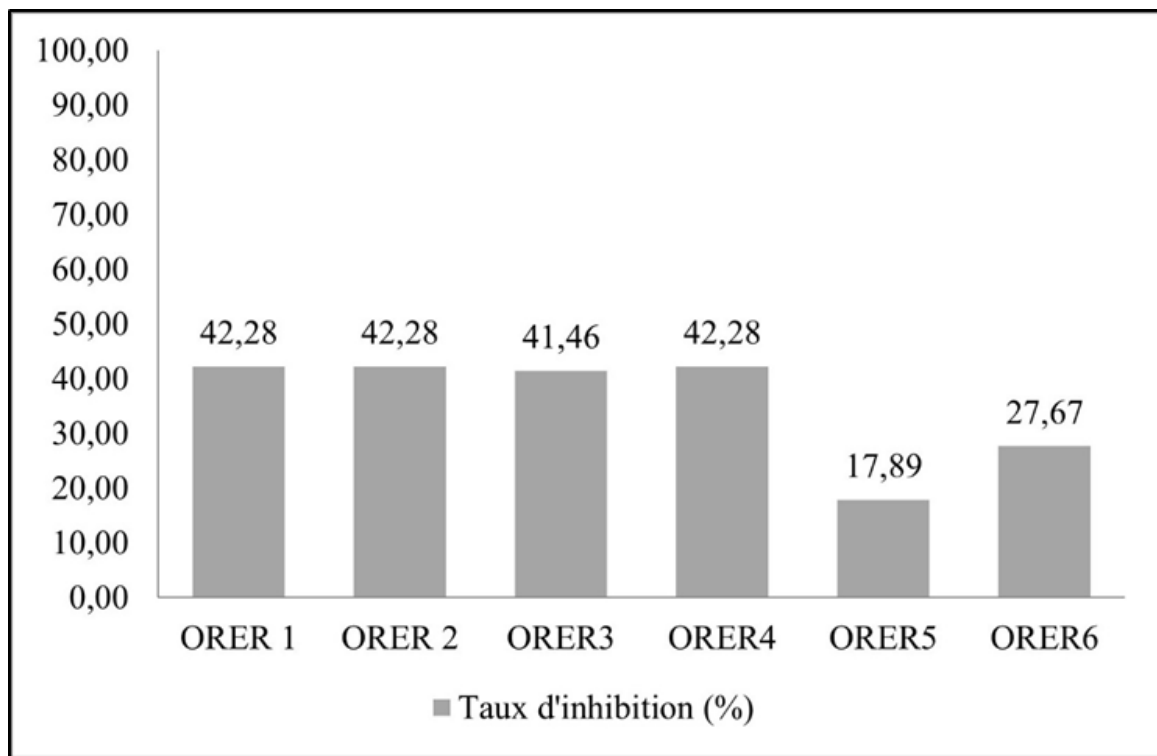


Figure 19. Taux d'inhibition (%) des isolats endophytes vis-à-vis de la souche pathogène FB26 de Foa en confrontation directe *in vitro*.

3. Discussion générale

Dans cette étude, nous avons isolé, caractérisé et évalué le potentiel antagoniste de plusieurs bactéries associées à l'origan (*Origanum* sp.). L'étude menée sur les bactéries endophytes et rhizosphériques associées à cette plante médicinale a permis de mettre en évidence une diversité microbienne significative et fonctionnellement intéressante pour des applications de biocontrôle. L'isolement à partir des racines stérilisées en surface et du sol rhizosphérique a conduit à la sélection de 20 isolats distincts, dont 6 endophytes (ORER1 à ORER6) et 14 rhizosphériques (ORS1 à ORS14), caractérisées par des morphotypes variés. La réussite de la désinfection de surface, confirmée par l'absence de croissance dans la dernière eau de rinçage, valide la nature endophyte des souches racinaires. Ce résultat est cohérent avec d'autres travaux ayant démontré la fiabilité de cette méthode pour distinguer les endophytes véritables des contaminants externes, et confirme que les plantes médicinales, en raison de leur richesse en composés phytochimiques, constituent des niches écologiques favorables au développement de bactéries endophytes et rhizosphériques aux fonctions multiples (Rustamova *et al.*, 2020).

L'étude morphologique des colonies a révélé une diversité importante, avec des colonies de forme circulaire pour la majorité, mais aussi des formes irrégulières comme celles observées pour ORER3, ORER4, ORER5, ORER6, ORS3, ORS4 et ORS5. Les couleurs variaient du crémeux au blanc mat, avec quelques isolats jaune pâle (ORER1, ORER3 et ORER4), et des variations de texture allant de lisse à rugueux. Ces résultats sont cohérents avec ceux rapportés dans la littérature, où des genres tels que *Bacillus*, *Pseudomonas*, *Enterobacter* ou encore *Stenotrophomonas* sont fréquemment rencontrés chez des endophytes et des PGPR associés aux plantes médicinales (Laslo *et al.*, 2012 ; Rustamova *et al.*, 2020).

La coloration de Gram a révélé une majorité de bactéries Gram positives, dont plusieurs sporulantes identifiées par la coloration au vert de malachite, notamment ORER2, ORER3, ORER5, ORS4 et ORS9, ce qui laisse penser à une forte dominance de *Bacillus* spp., réputés pour leur capacité à produire des spores, des antibiotiques et à tolérer des conditions environnementales difficiles (Baek *et al.*, 2025 ; Abdelmoteleb *et al.*, 2023). Toutefois, certains isolats Gram-négatif comme ORER1, ORER4, ORS1, ORS10 ou ORS13 pourraient correspondre à des genres comme *Pseudomonas* ou *Serratia*, souvent décrits dans les rhizosphères et connus pour leur capacité à produire des métabolites antimicrobiens diffusibles (Compant *et al.*, 2005).

L'essai d'hypersensibilité sur tabac a permis de confirmer l'innocuité des isolats sélectionnés vis-à-vis des plantes. Aucun des isolats n'a provoqué de nécrose, ni de réaction d'hypersensibilité, ce qui indique qu'elles ne sont pas perçues comme pathogènes par la plante hôte. Ce résultat est d'autant plus important qu'il constitue un critère de sélection essentiel pour l'utilisation de ces bactéries en tant que biopesticides ou biofertilisants (Lugtenberg et Kamilova, 2009). L'absence de pathogénicité observée chez tous les isolats testés dans notre étude est en accord avec les travaux de Parkunan *et al.* (2011), qui ont évalué l'effet d'un mélange de *Bacillus subtilis* A13 et *B. amyloliquefaciens* IN937a sur la croissance du tabac cultivé. Les auteurs ont rapporté que ce mélange n'induisait aucun symptôme phytotoxique (chlorose ou nécrose foliaire) ni altération de la croissance, contrairement à l'inducteur chimique de résistance acibenzolar-S-méthyl (ASM), qui a causé une réduction significative de la biomasse foliaire et racinaire ainsi que l'apparition de symptômes phytotoxiques à toutes les concentrations testées. Cela souligne le potentiel des PGPR du genre *Bacillus* comme alternatives biologiques sûres pour l'induction de résistance systémique sans effet délétère sur les plantes hôtes.

L'essai d'antagonisme réalisé *in vitro* contre la souche pathogène FB26 de Foa a révélé des résultats très encourageants. Plusieurs isolats ont montré une activité inhibitrice importante, avec des halos de plus de 1,5 cm. Notamment, les isolats ORS8, ORS9, ORS10 et ORS11 qui ont exercé une forte inhibition, suggérant la production de composés antimicrobiens efficaces. Ces résultats rejoignent ceux de Bastas., (2020) qui, dans son étude sur la gestion d'*Erwinia amylovora* par des biopesticides potentiels *in vitro* et *in vivo*, a testé 20 matériaux végétaux pour leur efficacité antimicrobienne contre le feu bactérien, observant des zones d'inhibition pouvant atteindre 27 mm pour certains extraits, comme la cannelle et le thym, démontrant ainsi le fort potentiel de certaines substances végétales contre l'agent pathogène. De même, une étude menée par Mohamad *et al.* (2020) a mis en évidence le rôle bénéfique des populations bactériennes endophytes associées à la plante médicinale *Thymus vulgaris*. Leurs travaux ont non seulement montré que ces endophytes pouvaient atténuer le stress salin, mais également qu'ils conféraient une résistance significative contre *Fusarium oxysporum*, confirmant ainsi que les plantes médicinales abritent des souches microbiennes bénéfiques ayant un potentiel considérable pour la lutte biologique. À l'inverse, certains isolats comme ORER5, ORS2 ou ORS5 ont montré peu ou pas d'effet inhibiteur, ce qui pourrait s'expliquer par un faible potentiel de production de molécules bioactives ou une incompatibilité physiologique avec le pathogène testé.

Globalement, cette étude confirme que l'origan héberge une microflore bénéfique riche et fonctionnelle. L'association étroite entre la plante et ces bactéries n'est pas anodine : elle semble favoriser le recrutement de microorganismes capables de protéger leur hôte contre les agents pathogènes, tout en contribuant potentiellement à sa croissance *via* des mécanismes directs ou indirects. Les isolats les plus prometteuses (ORS8, ORS9, ORS10 et ORS11) pourront faire l'objet d'analyses moléculaires pour identifier leur genre et espèce avec précision, puis être testées en conditions de serre ou de champ. Une étude plus approfondie des mécanismes d'action (production de lipopeptides, sidérophores, enzymes hydrolytiques, etc.) permettrait également de mieux comprendre leur rôle dans la suppression des pathogènes. En conclusion, ces résultats illustrent le potentiel sous-exploité des plantes médicinales comme réservoirs de bactéries utiles en agriculture durable, notamment dans la lutte biologique contre les maladies des plantes.

Conclusion

Conclusion

La présente étude menée sur l'isolement et la caractérisation des bactéries associées aux plantes médicinales, notamment celles présentes dans la rhizosphère et les tissus internes (bactéries endophytes), a pour objectif d'évaluer leur potentiel antagoniste vis-à-vis d'une souche phytopathogène de *Fusarium oxysporum* f.sp. *albedinis*. Ce travail vise à identifier des souches microbiennes présentant des propriétés de biocontrôle, susceptibles d'être utilisées comme alternatives durables aux produits phytosanitaires chimiques dans la protection des cultures.

Les observations microscopiques et macroscopiques des souches bactériennes endophytes et PGPR ont permis d'identifier 20 isolats bactériens, caractérisés notamment par leur morphologie, leur type de Gram et leur capacité de sporulation. Par ailleurs, les tests d'hypersensibilité réalisés sur les plants de tabac n'ont révélé aucun symptôme de nécrose ni signe de toxicité, ce qui atteste de la sécurité biologique des isolats testés. Ce critère est fondamental, car il confirme que ces bactéries ne représentent pas de risque pour les plantes cultivées, ouvrant ainsi la voie à leur intégration dans des stratégies de biocontrôle respectueuses de l'environnement.

L'évaluation du pouvoir antagoniste des isolats endophytes et rhizosphériques contre la souche pathogène FB26 de Foa, sur la base du calcul des taux d'inhibition, a révélé que les isolats ORER5, ORER6, ORS1, ORS2, ORS3, ORS4, ORS5, ORS6, ORS7 et ORS13 présentent une faible activité inhibitrice. En revanche, les isolats ORER1, ORER2, ORER3, ORER4, ORS8, ORS9, ORS10, ORS11 et ORS14 ont démontré un fort potentiel antagoniste.

Cependant, malgré les résultats prometteurs obtenus en conditions *in vitro*, il est impératif de poursuivre les recherches. Des expérimentations en conditions de serre et en plein champ sont nécessaires afin de valider l'efficacité de ces souches dans des environnements agronomiques réels. En parallèle, une caractérisation moléculaire approfondie, reposant sur les outils de biologie moléculaire et de génomique (PCR, séquençage, métagénomique), permettrait de mieux comprendre les mécanismes d'action en jeu, d'identifier les gènes d'intérêt, et d'optimiser l'utilisation de ces bactéries dans des formulations biologiques stables et performantes. Par ailleurs, il serait pertinent d'évaluer l'efficacité des souches les plus prometteuses contre d'autres agents phytopathogènes présentant un intérêt agronomique, afin de mieux cerner leur potentiel biocontrôle.

Références Bibliographiques

Références Bibliographiques

Abdelmoteleb, A., Moreno-Ramírez, L., Valdez-Salas, B., Seleiman, M. F., El-Hendawy, S., Aldhuwaib, K. J., Alotaibi, M et González-Mendoza, D., (2023). New *Bacillus subtilis* Strains Isolated from *Prosopis glandulosa* Rhizosphere for Suppressing *Fusarium Spp.* and Enhancing Growth of *Gossypium hirsutum* L. *Biology*, 12(1), 73.

Adama, O., (2020). Isolement et sélection de bactéries endophytes natives du cacaoyer (*Theobroma cacao* L.) efficaces dans le biocontrôle de *Phytophthora spp.* Thèse de doctorat, Université Jean Lorougnon Guédé, Côte d'Ivoire.

Afzal, I., Shinwari, Z. K., Sikandar, S et Shahzad, S. (2019). Plant beneficial endophytic bacteria Mechanisms, diversity, host range and genetic determinants. *Microbiological Research*, 221, 36-49. Récupéré sur <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0944501318304592>

Ahmed, I. H., Labuschagne, a. N et L, K. (2007). Screening rhizobacteria for biological control of *Fusarium* root and Crown root of sorghum in Ethiopia. *Biological Control*, 40(1), 97-106.

Aktar, M. W., Sengupta, D and Chowdhury, A. (2009). Impact of pesticides use in agriculture: their benefits and hazards. *Interdisciplinary Toxicology*, 2(1), 1-12.

Álvarez-Martínez, F., Barrajon-Catalán, E et Herranz-López, M. (2021). Antibacterial plant compounds, extracts and essential oils an updated review on their effects and putative mechanisms of action. *Phytomedicine*, 90. Récupéré sur <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0944711321001690>

Baek, B., Park, Y. H., Jeon, J.-M., Shim, H.-Y., Lee, E.-K., Hong, M.-J., Bae, Y.-W., An, J.-H., Shin, I.-C et Jung, H. S., (2025). Optimizing MALDI-TOF Mass Spectrometry for the Identification of *Bacillus cereus*: The Impact of Sporulation and Cultivation Time. *International Journal of Molecular Sciences*, 26(9), 4355.

Bartholomew, J. W et Mittwer, T., (1949). A Simplified Bacterial Spore Stain. *Stain Technology*, 25(3), 153–156.

Bastas, K. K., (2020). Management of *Erwinia amylovora* by Potential Bio-Pesticides in vitro and in vivo Conditions. *Turkish Journal of Agriculture - Food Science and Technology*, 8(1), 38-45. Récupéré sur https://www.researchgate.net/publication/347605466_Management_of_Erwinia_amylovora_by_Potential_Bio-Pesticides_in_vitro_and_in_vivo_Conditions

Batiha, G. E.-S., Beshbishy, A. M., Wasef, L. G., Elewa, Y. H., Al-Sagan, A. A., El-Hack, M. E., Abd-Elhakim Y, M, et Devkota, H. P., (2020). Chemical constituents and pharmacological activities of garlic (*Allium sativum* L.). *Nutrients*, 12(3), 872. Récupéré sur <https://pmc.ncbi.nlm.nih.gov/articles/PMC7146530/>

Beltrán, J. M et Esteban, M. Á., (2016). Properties and applications of plants of *Origanum* sp. Genus. SM J Biol, 2(1), 1006.

Beveridge, T., (2000). Use of the Gram stain in microbiology. Biotechnic & Histochemistry, 76(3), 111–118. Récupéré sur <https://www.tandfonline.com/doi/epdf/10.1080/bih.76.3.111.118?needAccess=true>

Burt, S., (2004). Essential oils: their antibacterial properties and potential applications in foods – a review. International Journal of Food Microbiology, 94(3), 223–253. Récupéré sur <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0168160504001680?via%3Dihub>

Castronovo, L. M., Vassallo, A., Mengoni, A., Miceli, E., Bogani, P., Firenzuoli, F., Renato F et Maggini, V., (2021). Medicinal Plants and Their Bacterial Microbiota: A Review on Antimicrobial Compounds Production for Plant and Human Health. Pathogens, 10(2). Récupéré sur <https://pmc.ncbi.nlm.nih.gov/articles/PMC7911374/>

Chieb, M et Gachomo, E. W., (2023). The role of plant growth-promoting rhizobacteria in plant drought stress management. BMC Plant Biology, 23(407). Récupéré sur <https://bmcpantbiol.biomedcentral.com/articles/10.1186/s12870-023-04403-8>

Compant, S., Cambon, M. C., Vacher, C., Mitter, B., Samad, A et Sessitsch, A., (2020). The plant endosphere world - bacterial life within plants. Environmental Microbiology, 23(4), 1812-1829. Récupéré sur <https://enviromicro-journals.onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/1462-2920.15240>

Compant, S., Duffy, B., Nowak, J., Clément, C et Barka, E. A., (2005). Use of Plant Growth-Promoting Bacteria for Biocontrol of Plant Diseases: Principles, Mechanisms of Action, and Future Prospects. Applied and Environmental Microbiology, 71(9), 4951–4959.

Eleftheria, A., Moysis, M., Zacharias, K et Nikos, P., (2022). Phylogenetic relationships of *Origanum taxa* (Lamiaceae) from Greece: Initial insights from molecular and morphological data. Botanica Serbica, 46(1), 71-83. Récupéré sur <https://doiserbia.nb.rs/Article.aspx?ID=1821-21582201071A>

Erkmen, O., (2021). Cultural characteristics of bacteria. Laboratory Practices in Microbiology, 135-141.

Fávaro, L. C., Sebastianes, F. L et Araújo, W. L., (2012). *Epicoccum nigrum* P16, a Sugarcane Endophyte, Produces Antifungal Compounds and Induces Root Growth. PLoS ONE, 7(6). Récupéré sur <https://journals.plos.org/plosone/article?id=10.1371/journal.pone.0036826>

Fournomiti, M., Kimbaris, A., Mantzourani, I., Plessas, S., Theodoridou, I., Papaemmanouil, V., Ioannis K, Maria P., Elisavet, S., Eugenia, E, B et Alexopoulos, A., (2015). Antimicrobial activity of essential oils of cultivated oregano (*Origanum vulgare*), sage (*Salvia officinalis*), and thyme (*Thymus vulgaris*) against clinical isolates of *Escherichia*

coli, *Klebsiella oxytoca*, and *Klebsiella pneumoniae*. Microbial Ecology in Health & Disease, 26(10). Récupéré sur <https://pmc.ncbi.nlm.nih.gov/articles/PMC4400296/>

Ghosh, A., Acharya, R., Shaw, S et Gangopadhyay, D., (2024). Plant Growth-Promoting Rhizobacteria (PGPR): A Potential Alternative Tool for Sustainable Agriculture. Dans IntechOpen (Éd.), Updates on Rhizobacteria. Récupéré sur <https://www.intechopen.com/chapters/1162394>

Glick, B. R., (2012). Plant Growth-Promoting Bacteria: Mechanisms and Applications. Scientifica. Récupéré sur <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24278762/>

Goswami, D., Thakker, J. N et Dhandhukia, P. C., (2016). Portraying mechanics of plant growth promoting rhizobacteria (PGPR): A review. Cogent Food & Agriculture, 2(1). Récupéré sur <https://www.tandfonline.com/doi/full/10.1080/23311932.2015.1127500>

Hacquard, S et Schadt, C. W., (2015). Towards a holistic understanding of the beneficial interactions across the Populus microbiome. New Phytologist, 205(4), 1424–1430.

Ietswaart, J., (1980). A taxonomic revision of the genus *Origanum* (Labiatae). Leiden Botanical Series, 4(1), 1-153. Récupéré sur <https://repository.naturalis.nl/pub/508224>

Jeyanthi, V et Kanimozhi, S., (2018). Plant Growth Promoting Rhizobacteria (PGPR). Prospective and Mechanisms: A Review. Journal of Pure and Applied Microbiology, 12(2), 733-749.

Khare, E., Mishra, J et Arora, N. K., (2018). Multifaceted Interactions Between Endophytes and Plant: Developments and Prospects. Frontiers in Microbiology, 9. Récupéré sur <https://www.frontiersin.org/journals/microbiology/articles/10.3389/fmicb.2018.02732/full>

Khoso, M. A., Wagan, S., Alam, I., Hussain, A., Ali, Q., Saha, S., Tika R P., Hakim M et Liu, F., (2023). Impact of plant growth-promoting rhizobacteria (PGPR) on plant growth and stress management. Current Research in Microbial Sciences, 11. Récupéré sur <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S2667064X23002087>

Kumar, R., Swapnil, P., Meena, M., Selpair, S et Yadav, B. G., (2022). Plant Growth-Promoting Rhizobacteria (PGPR) Approaches to Alleviate Abiotic Stresses for Enhancement of Growth and Development of Medicinal Plants. Sustainability, 14(23). Récupéré sur <https://www.mdpi.com/2071-1050/14/23/15514>

Laslo, É., György, É., Mara, G., Tamás, É., Ábrahám, B et Lányi, S., (2012). Screening of plant growth promoting rhizobacteria as potential microbial inoculants. Crop Protection, 40, 43–48.

Li, Y., Kong, D., Fu, Y., Sussman, M. R et Wu, H., (2020). The effect of developmental and environmental factors on secondary metabolites in medicinal plants. Plant Physiology and Biochemistry, 148, 80-89. Récupéré sur <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0981942820300061>

Li, Z., Xiong, K., Wen, W., Li, L et Xu, D., (2023). Functional Endophytes Regulating Plant Secondary Metabolism: Current Status, Prospects and Applications. *International Journal of Molecular Sciences*, 24(2), 1153. Récupéré sur <https://pmc.ncbi.nlm.nih.gov/articles/PMC9867233/>

Lindley, J., (1838). *Flora medica: a botanical account of all the more important plants used in medicine, in different parts of the world.* (O. B. Longman, Éd.) London.

Lugtenberg, B et Kamilova, F., (2009). Plant-Growth-Promoting Rhizobacteria. *Annual Review of Microbiology*, 63, 541-556. Récupéré sur <https://www.annualreviews.org/content/journals/10.1146/annurev.micro.62.081307.162918>

Magryś, A., Olender, A et Tchórzewska, D., (2021). Antibacterial properties of *Allium sativum* L. against the most emerging multidrug-resistant bacteria and its synergy with antibiotics. *Archives of Microbiology*, 203(5), 2257–2268. Récupéré sur <https://pmc.ncbi.nlm.nih.gov/articles/PMC8205873/>

Mangalagiri, N. P., Panditi, S. K et Jeevigunta, N. L. (2021). Antimicrobial activity of essential plant oils and their major components. *Heliyon*, 7(4), e06835. Récupéré sur <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S2405844021009385>

Marchese, A., Orhan, I. E., Daglia, M., Barbieri, R., Lorenzo, A. D., Nabavi, S. F., Gortzi, O., Izadi, M et Nabavi, S. M., (2016). Antibacterial and antifungal activities of thymol: a brief review of the literature. *Food Chemistry*, 210, 402–414.

Mashabela, M. D., Piater, L. A., Dubery, I. A., Tugizimana, F et Mhlongo, M. I., (2022). Rhizosphere Tripartite Interactions and PGPR-Mediated Metabolic Reprogramming towards ISR and Plant Priming: A Metabolomics Review. *Biology*, 11(3). Récupéré sur <https://www.mdpi.com/2079-7737/11/3/346>

Mohamad, O. A., Ma, J.-B., Liu, Y.-H., Zhang, D., Hua, S., Bhute, S., Hedlund, B. P., Li, W.-J et Li, L., (2020). Beneficial Endophytic Bacterial Populations Associated with Medicinal Plant *Thymus vulgaris* Alleviate Salt Stress and Confer Resistance to *Fusarium oxysporum*. *Frontiers in Plant Science*, 11, 47. Récupéré sur <https://www.frontiersin.org/journals/plant-science/articles/10.3389/fpls.2020.00047/full>

Murat, G., (2024). Identification of Plant Growth Promoting Rhizobacteria (PGPR) Isolated from Lavender (*Lavandula angustifolia* L.) and Determination of Their Antifungal Activity Against *Fusarium oxysporum*. *ISPEC Journal of Agricultural Sciences*, 8(4), 945-963. Récupéré sur <https://zenodo.org/records/13358537>

Newman, D. J et Cragg, G. M., (2020). Natural Products as Sources of New Drugs over the Nearly Four Decades from 01/1981 to 09/2019. *Natural Products*, 83(3), 707-803. Récupéré sur <https://pubs.acs.org/doi/10.1021/acs.jnatprod.9b01285>

Ogunmefun, O. T., (2018). Phytochemicals—God's Endowment of Curative Power in Plants. Phytochemicals - Source of Antioxidants and Role in Disease Prevention. Récupéré sur <https://www.intechopen.com/chapters/61539>

OMS., (2013). Stratégie de l'OMS pour la médecine traditionnelle 2014–2023. Genève: Organisation mondiale de la Santé.

Oulebsir-Mohandkaci, H., Selami, S., Belaid, M et Benzina, F., (2017). Détection de *Pseudomonas savastanoi* agent causal de la tuberculose de l'olivier dans trois régions centre d'Algérie. Évaluation de l'effet antagoniste de quelques substances végétales bioactives. Dans U. M. Boumerdes (Éd.), 1st International Congress on Biotechnologies for Sustainable Development. Boumerdes, Algérie.

Pang, Z., Chen, J., Wang, T., Gao, C., Li, Z., Guo, L., Xu, J et Cheng, Y., (2021). Linking Plant Secondary Metabolites and Plant Microbiomes: A Review. *Frontiers in Plant Science*, 12.

Paray, A. A., Singh, D. M., Mir, M. A et kaur, D. A., (2023). Gram staining: a brief review. *International Journal of Research and Review*, 10(9), 336-341. Récupéré sur https://www.researchgate.net/publication/373979703_Gram_Staining_A_Brief_Review

Parkunan, V., Johnson, C. S et Eisenback, J., (2011). Influence of acibenzolar-S-methyl and mixture of *Bacillus* species on growth and vigor of cultivated tobacco. *Tobacco Science*, 48, 7–14. Récupéré sur https://www.researchgate.net/publication/233786544_Influence_of_acibenzolar-S-methyl_and_mixture_of_bacillus_species_on_growth_and_vigor_of_cultivated_tobacco

Paul, E., Sharma, C., Chaturvedi, P et Bhatnagar, P., (2024). Quorum quenching activity of endophytic *Bacillus* sp. *EBS9* from *Tecomella undulata* and its biocontrol applications. *Current Research in Microbial Sciences*, 7. Récupéré sur <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S2666517424000907>

Pettipher, G. L., Jay, J. M et H, W. H., (2005). Microbiological techniques. *Encyclopedia of Analytical Science* (2nd Edition).

Rios-Velasco, C., Caro-Cisneros, J., Berlanga-Reyes, D., Ruíz-Cisneros, M., Ornelas-Paz, J., Salas-Marina, M et Guerrero-Prieto, V. V.-P., (2016). Identification and antagonistic activity in vitro of *Bacillus* spp. and *Trichoderma* spp. isolates against common phytopathogenic fungi. *Revista Mexicana de Fitopatología*, 34(1), 84-99. Récupéré sur <https://rmf.smf.org.mx/RevistaMexicana/articulo-hdoi.php?clave=RMF1611-5>

Rustamova, N., Wubulikasimu, A., Mukhamedov, N., Gao, Y., Egamberdieva, D et Yili, A., (2020). Endophytic Bacteria Associated with Medicinal Plant *Vernonia anthelmintica*: Diversity and Characterization. *Current Microbiology*, 77(5), 723-731.

Santoyo, G., Moreno-Hagelsieb, G., Orozco-Mosqueda, M. d et Glick, B. R., (2016). Plant growth-promoting bacterial endophytes. *Microbiological Research*, 183, 92-99.

Récupéré sur
<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S094450131530029X?via%3Dihub>

Semenzato, G et Fani, R., (2024). Endophytic bacteria: a sustainable strategy for enhancing medicinal plant cultivation and preserving microbial diversity. *Front. Microbiol*, 15. Récupéré sur
<https://www.frontiersin.org/journals/microbiology/articles/10.3389/fmicb.2024.1477465/full>

Snaiki, J., Nadif, A et Ouhssine, M., (2005). Détection de deux pathotypes d'*Erwinia* causant la maladie de la pourriture molle sur la betterave à sucre dans la plaine du Gharb au Maroc. *Bulletin OEPP*, 35, 537-540.

Tewari, D., Atanasov, A. G., Semwal, P et Wang, D., (2021). Natural products and their applications. *Current Research in Biotechnology*, 3, 82-83.

Tripathy, B., Satyanarayana, S., Kayamkani, A. K et Raja, K., (2017). An Updated Review on Traditional Uses, Taxonomy, Phytochemistry, Pharmacology and Toxicology of *Origanum majorana*. *International Journal of Pharma Research and Health Sciences*, 5(4), 1717-23. Récupéré sur
https://www.researchgate.net/publication/343652829_An_Updated_Review_on_Traditional_Uses_Taxonomy_Phytochemistry_Pharmacology_and_Toxicology_of_Origanum_majorana

Wang, H., Liu, R., You, M. P., Barbetti, M. J et Chen, Y., (2021). Pathogen Biocontrol Using Plant Growth-Promoting Bacteria (PGPR): Role of Bacterial Diversity. *Microorganisms*, 9(9). Récupéré sur <https://pmc.ncbi.nlm.nih.gov/articles/PMC8470069/>

Yu, Y., Gui, Y., Li, Z., Jiang, C., Guo, J et Niu, D., (2022). Induced Systemic Resistance for Improving Plant Immunity by Beneficial Microbes. *Plants*, 11(3). Récupéré sur <https://www.mdpi.com/2223-7747/11/3/386>

Zhang, N., Wang, Z., Shao, J., Xu, Z., Liu, Y., Xun, W., Miao Y, Qirong S, et Zhang, R., (2023). Biocontrol mechanisms of *Bacillus*: Improving the efficiency of green agriculture. *Microbial Biotechnology*, 16(12), 2250-2263. Récupéré sur <https://enviromicro-journals.onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1111/1751-7915.14348>

Annexes

Annexes

Annexes 1.

Les produits chimiques utilisés, Préparation des solutions

Eau distillée

Éthanol à 95%

Hypochlorite de sodium à 2 %

Cristal violet

Lugol

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

- Vert malachite 0,5 g
- Eau distillée 100 ml

Solution de Fuchsine (solution alcoolique à 2,5% (poids / volume))

- Safranine..... 2,5 g
- Éthanol à 95% 100 ml

Annexes 2.**Composition des milieux de culture****Levure Peptone Glucose Agar (LPGA)**

Pour 1 litre de milieu :

- Extrait de levure 5 g
- Peptone 5 g
- Glucose 10 g
- Agar 20g

Potato Dextrose Agar (PDA)

Pour 1 litre de milieu :

- Pommes de terre 200g
- Glucose 20 g
- Agar 20 g



République algérienne démocratique et populaire

Ministère de l'enseignement supérieur et de la
recherche scientifique

Université Saad Dahlab Blida 1

Faculté des sciences de la nature et de la vie

Département de biotechnologie et de l'Agro-Écologie



Mémoire

En vue de l'obtention du diplôme de Master

Domaine : Sciences de la Nature et de la Vie

Filière : Biotechnologie

Spécialité : Biotechnologie Microbienne

Thème

**Isolement des bactéries associées aux plantes
médicinales et étude de leur éventuel antagonisme
vis-à-vis de certains agents phytopathogènes**

Présenté par :

GUEDOUARI Amina

ALI KHOUDJA Hiba

Soutenu devant le jury :

Président

M^r BERDJA R.

M.C.A

U. Blida 1

Examinatrice

M^{me} OUSERIR S.

M.C.B

U. Blida 1

Promotrice

M^{me} MEKHALDI D.

M.C.B

U. de Laghouat

Mekhaldi D.

BENSAD F

Année Universitaire 2024/2025