

**REPUBLIQUE ALGERIENNE DEMOCRATIQUE ET POPULAIRE**  
**MINISTRE DE L'ENSEIGNEMENT SUPERIEURE ET DE LA RECHERCHE**  
**SCIENTIFIQUE**  
**UNIVERSITE BLIDA 1**

*Faculté Des Sciences de la Nature et de la Vie*  
*Département De Biotechnologies*

*Mémoire en vue de l'obtention du Diplôme de Master académique en Sciences de la*  
*Nature et de la Vie*

Spécialité : Phytoprotection Durable.

*Thème*

Recherche et identification des bactéries endophytes antagonistes de  
*Fusarium oxysporum* f.sp. *albedinis* agent pathogène du bayoud sur le  
palmier dattier (*Phoenix dactilifera* L).

*Présent par :*

**M<sup>elle</sup> ZAKARIA Hanane**

*Devant le jury compose de :*

<b>M<sup>eme</sup> ALLAL L.</b>	<b>Professeur</b>	<b>U. BLIDA I</b>	<b>Présidente</b>
<b>M<sup>eme</sup> KRIMI Z.</b>	<b>Professeur</b>	<b>U. BLIDA I</b>	<b>Promotrice</b>
<b>M<sup>eme</sup> AIT-SAADI N.</b>	<b>Maitre Assistante</b>	<b>U. BLIDA I</b>	<b>Examinatrice</b>
<b>M<sup>elle</sup> TAFIFET L.</b>	<b>Maitre Assistante</b>	<b>U. BLIDA I</b>	<b>Examinatrice</b>

## **DEDICACE**

*A Djahida, ma mère et mon amie. A cette femme qui m'a beaucoup donnée et qui a peu reçu. Je dédie ce modeste mémoire en témoignage de mon amour et ma reconnaissance, je la remercie d'être ma mère grâce, à elle j'ai reçu une éducation dont je suis fière. A cette femme qui m'a appris le capital d'un Homme est son honneur.*

*A Mohammed, mon père, je dédie ce travail pour lui témoigner de mon amour, de mon respect et de mon admiration. A cet homme qui a beaucoup souffert pour nous vivons dignement.*

*Je vous offre ce modeste travail en témoignage de tous les sacrifices et l'immense tendresse dont vous m'avez comblé.*

*Devant toi maman et toi papa je m'incline amoureusement.*

*Puisse dieu tout puissant vous garder et vous procurer santé et bonheur.*

*Je dédie aussi ce travail*

*A ma chère tante et deuxième maman Chérifa.*

*A mon cher frère Yacine*

*A ma grand-mère qui m'a toujours aimé et comblé par ces bénédictions, que Dieu le tout-puissant la protège et la garde pour nous.*

*A ma chère tante et sœur Mimi.*

*A mon cher oncle Sidahmed.*

*A mes chers cousins et cousines.*

*A toute ma famille maternelle et paternelle.*

*A mes chers amis Kahina, Samia, Imene, Islam, Hassiba et Asma.*

*A toute la promo de Phytoprotection Durable.*

*Hanane*

## **REMERCIEMENT**

*Avant tout, nous remercions ALLAH de nous avoir donné le courage, la patience et la chance d'étudier et suivre, le chemin de la science.*

*J'adresse mes remerciement les plus sincères à ma promotrice Pr. KRIMI Z. qui a guidé et surveillé le déroulement et l'exécution du travail de ce mémoire en me prodiguant tout aide possible, et me consacrant beaucoup de son temps précieux, à qui je dois exprimer mon respect et ma reconnaissance.*

*Je tiens à exprimer ma très grande considération et mon profond respect reconnaissance à madame ALLAL L. Professeur au département de Biotechnologie de l'université de Blida I pour l'honneur qu'elle me fait en présidant le jury de ce mémoire.*

*Mes sincères remerciements vont à madame AIT-SAADI N. pour avoir accepté d'examiner ce modeste travail.*

*Mes vifs remerciements à mademoiselle TAFIFET L. A pour avoir accepté d'examiner ce modeste travail et pour ces précieux aides et conseils.*

*Je ne saurai assez remercier madame AMMAME S. la responsable du laboratoire de phytopathologie pour son aide et ses encouragements ainsi que tous les membres du laboratoire de phytopathologie.*

*Enfin, j'adresse mes sincères remerciements à mes chères parents et que ce travail soit témoignage de ma reconnaissance et de mon amour, ma tante Chérifa, mon frère, ma famille et tous mes proches et amis, qui m'ont aidé et toujours soutenu et encouragé au cours de la réalisation de ce mémoire.*

**Hanane**

## Liste des abréviations

F.o.a	<i>Fusarium oxysporum</i> f. sp. <i>albedenis</i>
LPGA	Levure Peptone Glucose Agar
PDA	Potato Dextrose Agar
Az	Elazouzia
DN	Deglet Nour
MD	Mech Degla
H	Elhorra
BQ	Bentaqbala
TK	Takerbouchet
UV	Ultra-Violet

## Listes des figures

<b>Figure 1:</b>	Figure schématique représentant les parties aériennes et souterraines du palmier dattier.....	07
<b>Figure 2:</b>	L'aspect plombé des folioles.....	10
<b>Figure 3:</b>	Dessèchement progressif des folioles du bas vers le haut.....	10
<b>Figure 4:</b>	Stade final de la maladie = dépérissement de l'arbre.....	10
<b>Figure 5:</b>	Méthode de dépôt des explants pour la technique d'antagonisme par confrontation directe en co-culture.....	26
<b>Figure 6:</b>	Méthode de dépôt pour le test de l'effet des inhibiteurs non volatiles produits par les antagonistes.....	28
<b>Figure 7:</b>	Schéma représentatif de la méthode de calcul de pourcentage d'inhibition pour la première méthode.....	29
<b>Figure 8:</b>	Schéma représentatif de la méthode de calcul du pourcentage d'inhibition pour la deuxième méthode.....	30
<b>Figure 9:</b>	Résultats des isolats endophytes bactériens isolées sur les différentes variétés de palmier-dattier.....	35
<b>Figure 10:</b>	Effet des isolats bactériens endophytes du palmier dattier à l'égard du F.o.a par confrontation directe en boîte de Pétri.....	40
<b>Figure 11:</b>	Effet des isolats endophytes du palmier dattier à l'égard du F.o.a par utilisation des filtrats bactériens.....	41
<b>Figure 12:</b>	Taux d'inhibition des isolats après les deux traitements vis-à-vis le F.o.a.....	39
<b>Figure 13:</b>	Réaction d'hypersensibilité sur feuille du tabac après une semaine d'inoculation (T : témoin).....	42
<b>Figure 14:</b>	Réaction au test catalase.....	43
<b>Figure 15:</b>	Résultat de l'activité Cytochrome oxydase (A : positif, B : négative).....	44
<b>Figure 16:</b>	Résultat du test d'oxydation/fermentation.....	44

## Liste des tableaux

<b>Tableau 01</b>	Fréquence des principaux ravageurs et maladies du palmier dattier en Algérie d'après.....	08
<b>Tableau 02</b>	Exemples de quelques bactéries endophytes.....	18
<b>Tableau 03</b>	Variétés de palmier-dattier utilisées pour l'isolement des bactéries endophytes.....	24
<b>Tableau 04</b>	Les caractères culturels des trente-deux isolats endophytes cultivés sur milieu LPGA.....	36
<b>Tableau 05</b>	Dénombrement des isolats des variétés étudiées.....	37
<b>Tableau 06</b>	Dénombrement des isolats à effet antagoniste positif.....	37
<b>Tableau 07</b>	Comparaison du taux d'inhibition des deux méthodes utilisées pour le test d'antagonisme.....	38
<b>Tableau 08</b>	Caractéristiques biochimiques des isolats bactériens endophytes étudiées.....	45
<b>Tableau 09</b>	Résultats de coloration de Gram.....	43
<b>Tableau 10</b>	Résultats de la caractérisation macroscopique et microscopique des 11 isolats bactériens endophytes.....	47

## ***SOMMAIRE***

Dédicace	
Remerciements	
Liste des abréviations	
Liste des figures	
Liste des tableaux	
Sommaire	
Résumé	
Abstract	
الملخص	
Introduction.....	1
Chapitre I: Synthèse bibliographique .....	4
1. Le palmier dattier .....	5
2. Contraintes de la culture du palmier dattier .....	8
3. Les bactéries endophytes.....	15
Chapitre II: Matériel et méthodes.....	24
1.Objectif de l'étude.....	23
2.Lieu de l'étude.....	23
3.Echantillonnage.....	23
4.Technique de préparation des échantillons racinaires à analyser.....	24
5.Isolement des endophytes.....	24
6.Purification et conservation des souches.....	25
7.Essais d'antagonisme <i>in-vitro</i> à l'égard du <i>Fusariumoxysporum</i> f.sp. <i>albedinis</i> agent du bayoud (F.o.a.).....	25
8. Tests d'identification des bactéries endophytes isolées et sélectionnées.....	30
Chapitre III: Résultats et discussion.....	33
Résultats.....	35
1. Les caractères cultureux des isolats sur milieu LPGA.....	35
2. Antagonisme <i>in-vitro</i> .....	37
3. Réaction au tabac.....	42
4. Caractérisation biochimique.....	42
2.Discution .....	48
Conclusion et perspective .....	52

Références bibliographiques.....54

Annexe

Table des matières

## Résumé

### **Recherche et identification des bactéries endophytes antagonistes de *Fusarium oxysporum* f. sp. *Albedenis* agent pathogène du bayoud sur le palmier dattier (*Phoenix dactilifera* L).**

Notre travail a porté sur l'étude de la biodiversité des bactéries endophytes du palmier dattier et leur interaction avec une souche pathogène de *Fusarium oxysporum* f. sp. *albedenis* (F.o.a). L'isolement des bactéries a été réalisé à partir de cinq variétés résistantes au bayoud : Mech Deglat, Benteqbala, Elhorra, Elazouzia et Takerboucht et une variété très sensible Deglet Nour.

Les résultats des isollements ont révélé que certaines bactéries endophytes isolées des différentes variétés présentent des ressemblances morphologiques alors que d'autres sont différentes morphologiquement. La caractérisation macroscopique a permis de différencier l'ensemble des isolats endophytes dans 32 types morphologiques différents qui ont par la suite subi les tests d'antagonisme *in-vitro* vis-à-vis de *Fusarium oxysporum* f. sp. *albedenis*.

Le test d'antagonisme a été mené selon deux protocoles, premièrement, par dépôt en co-culture simultanée de l'endophyte et du F.o.a et par effet des inhibiteurs non volatiles produits par les antagonistes (micro-filtrats bactériens) en second lieu. La première technique a permis de montrer que 34,37% des isolats ont eu un effet antagoniste avec une diversité de l'action se manifestant sous forme de zones d'inhibitions de tailles variables. Un total de 11 souches affiche un taux d'inhibition supérieur à 20%. Ces mêmes souches testées par la seconde méthode par l'utilisation des microfiltrats révèlent un taux de 63,63% des isolats endophytes présentant un taux d'inhibition supérieur à 20%.

L'étude des caractères biochimiques des souches antagonistes à travers le test de coloration de Gram, la recherche des enzymes de type oxydase et catalase, le test de fluorescence sur le milieu King B et le type respiratoire, nous a permis de mettre en évidence le genre *Bacillus* spp. et un autre genre apparenté. Le genre *Bacillus* représente un groupe hétérogène de bactéries et regroupe des espèces endophytes largement décrites pour leurs diverses activités biologiques.

**Mots clés :** Palmier-dattier, *Fusarium oxysporum* f. sp. *albedenis*, bactérie endophyte, antagoniste.

## Abstract

### Search and identification of endophytic antagonist bacteria of *Fusarium oxysporum* f. sp. *Albedenis* pathogen agent of bayoud on date palm (*Phoenix dactilifera* L).

Our work has focused on the study of the biodiversity of endophytic bacteria of the date palm, and their interaction with a pathogenic strain of *Fusarium oxysporum* f. sp. *albedenis* (F.o.a). Isolation of bacteria was made from 5 bayoud resistant varieties: Mech Deglat, Benteqbala, Elhorra, Elazouzia and Takerboucht and a sensitive one, which is the Deglet Nour variety.

The result of the isolates revealed that some endophytic bacteria isolated from different varieties have morphological similarities while others are morphologically different. The macroscopic characterization brought different endophytic isolates in 32 different morphotypes and have subsequently undergone the antagonism *in-vitro* tests towards *Fusarium oxysporum* f. sp. *Albedenis*.

The antagonism test was conducted according to two protocols, the first with deposition simultaneous co-culture of endophyte and F.o.a, and by no volatiles inhibitors products by the antagonists (bacterial micro-filtrats) in the second. The first technique permitted to show that 34,37% of isolats had a antagonism effect with diverse action demonstrate in the forme of inhibitions zone with variable size. The totals of 11 stains show the inhibition rate superior at 20%. The same stains tested by the second method by using the microfiltrats show the rate of 63,63% of endophytic isolats present the inhibition rate is superior at 20%.

The study of biochemistry pathogenic strains through the Gram stain test, looking for oxidase enzymes and catalase, the fluorescence test on the culture media King B and respiratory type, permit us to investigate the *Bacillus* spp kinds. And another kind appears. *Bacillus* kinds represent a heterogene group of bacteria regroupe the endophytic species widely describe for here diverse biologic activity.

**Keywords:** Date palm, *Fusarium oxysporum* f. sp. *Albedenis*, endophytic antagonist bacteria.

## ملخص

بحث و تعريف البكتيريا الداخلية العدائية *Fusarium oxysporum f. sp. Albedenis* عامل ممرض لليبوس للنخيل

(*Phoenix dactylifera L*)

ركز عملنا على دراسة تنوع البيولوجي للبكتيريات الداخلية للنخيل وتفاعلها مع سلالة *Fusarium oxysporum f. sp.* ، تم عدل البكتيريات من خمس أصناف مقاومة لليبوس مشدقلة, بن تكبالة, الحرة, العزوزية و تكربوشة و أخرى جد حساسة من صنف دقلة نور.

نتائج العزل كشفت أن بعض البكتيريات المعزولة من مختلف الأصناف لديها تشابه من حيث تشكل مع أن البكتيريات الأخرى تختلف تماما في الشكل, سمح الوصف بجمع البكتيريات المعزولة في اثنين و ثلاثين نمط شكلي مختلف ليخضعوا في التالي إلى اختبار التضاد مع الفطر الممرض *Fusarium oxysporum f. sp. albedenis*.

أجري اختبار العداء وفقا لطريقتين مختلفتين, الأولى بوضع العزل و , في نفس الوقت ، و الثانية بتأثير المثبطات الغير المتطابرة التي تنتجها الخصوم (الرشح الدقيق للبكتيريا ) ,

سمحت التقنية الأولى بمعرفة أن 34,37 من العزل له تأثير عدائي مع مجموعة من الإجراءات التي تتجلى علي في مناطق تثبيط ذات أحجام مختلفة, مجموعة احد عشر عزل أظهرت معدل تثبيط يفوق 20 و أجريت على نفس هذه العزلات الطريقة الثانية باستعمال الرشح الدقيق حيث كشفت المعدل 63,63 من العزلات الداخلية التي أظهرت معدل تثبيط يفوت 20 .

دراسة المميزات البيوكيماوية للعزلات العدائية من خلال اختبار صبغة غرام ، بحث عن الإنزيمات أكسيداز و كتلاز، و نوع التنفس و اختار الفلورة في الوسط King B سمح لنا بتسليط الضوء *Bacillus spp* و نوع آخر دي صلة. نوع *Bacillus* يمثل مجموعة متنوعة و غير متجانسة, و يتضمن انواع داخلية مختلفة تم وصفها على نطاق واسع لمختلف أنشطتها البيولوجية.

كلمات البحث: النخيل, *Fusarium oxysporum f. sp. albedenis*, البكتيريات الداخلية العدائية.

# *Introduction*

Le palmier dattier (*Phoenix dactylifera* L) constitue l'élément fondamental de l'écosystème oasien. L'importance économique de la production du dattier est loin d'être négligeable. Les palmeraies permettent la subsistance d'une population dont les moyens d'existence reposent entièrement sur l'exploitation de la datte qui constitue l'aliment de base des populations des régions sahariennes.

La culture du palmier dattier n'a cessé de se dégrader au Maghreb et ceci dès le début du XIX<sup>ème</sup> siècle à cause d'une maladie vasculaire appelée communément « bayoud », dont l'agent causal est un champignon *Fusarium oxysporum* f. sp. *albedenis* (F.o.a). Cette maladie a causé des pertes considérables dans les oasis du sud Marocain et du sud-ouest Algérien où elle a détruit environ 20 millions d'arbres (Anonyme 2000 ; Sedra, 2003). Des travaux ont rapporté que tous les cultures Nord-africaines de haute qualité dattière comme par exemple : Mejhoul, Bou Feggous, DegletNour,... etc. sont sensibles à cette maladie. Au Maroc, la variété Mejhoul a subi des pertes considérables à cause de sa grande sensibilité à l'égard du « bayoud », parallèlement, en Algérie, la variété DegletNour destinée essentiellement à l'exportation et classée comme l'une des meilleurs cultivars commerciaux à l'échelle mondiale est actuellement menacée par le « bayoud ». Les riches palmeraies de l'est Algérien où la variété DegletNour occupe 45% du verger phoenicicole sont actuellement menacées par le « bayoud (Abed *et al.*, 2006).

Les stratégies de lutte utilisées contre les maladies vasculaires causées par les pathogènes sont très limitées ou quasi inexistantes (El hassani *et al.*, 2007). En ce qui concerne la lutte contre le bayoud, plusieurs stratégies ont été déployées. La lutte chimique par éradication du F.o.a à l'aide de fumigants (bromure de méthyle et chloropicrine) est efficace, cependant, cette méthode ne peut pas être envisagée à cause du cout élevé des traitements, du risque de pollution oasien et de la difficulté de détruire la totalité du parasite qui peut vivre dans une profondeur avoisinant un mètre dans le sol (Sedra, 2003).

L'utilisation des éléments de la flore endophyte, mais également les substances naturelles dans la lutte biologique contre d'autres pathogènes du palmier et le pathogène majeur, *Fusarium oxysporum* f.sp *albedinis* est une alternative à la lutte chimique et aux conséquences désastreuses sur l'environnement qu'elle répercute (Neji, 2012).

Pour cela, l'étude des endophytes, présente un grand intérêt écologique, biologique et économique car ces habitants des tissus de la plante jouent un rôle essentiel dans la protection et la préservation des cultures (Ben Chobba *et al.*, 2013).

L'objectif de ce travail s'inscrit dans le cadre du développement de nouvelles stratégies de lutte contre la fusariose vasculaire du palmier dattier. Il repose sur l'isolement des bactéries endophytes de cinq variétés de palmier dattiers résistantes au bayoud et une variété très sensible et d'évaluer *in-vitro* leur pouvoir antagoniste vis-à-vis du *fusarium oxysporum* f.sp *albedinis*.

# *Synthèse bibliographique*

### 1. Le palmier dattier

#### 1.1. Importance et aire de répartition du palmier dattier

Le palmier dattier est l'arbre fruitier par excellence du désert saharien où il joue à la fois un rôle économique grâce à la production des dattes qui constituent la base de l'alimentation humaine et animale et un rôle écologique puisqu'il confère sa structure à l'oasis. En effet, il protège du vent et de l'avancée du désert tout en créant sous son couvert un microclimat favorable au développement de nombreuses cultures annexes (Fernandez *et al* ; 1995).

Le palmier dattier croit dans presque toutes les zones arides entre le 2<sup>ème</sup> et le 39<sup>ème</sup> degré de latitude Nord qui sont représentées par le Sahara et le large sud du proche orient (sud de l'Irak, Jordanie) (Elhadrami et Elhadrami, 2009). Les zones les plus favorables sont comprises entre 24° et 34° de latitude (Maroc, Algérie, Tunisie, Libye, Egypte, Irak, etc...). Aux Etats-Unis, la culture s'étend du 33° au 35° parallèle. Il faut noter que des surfaces négligeables de dattiers dans l'hémisphère sud (Australie, Amérique du sud ...) existent également. Le palmier dattier offre de larges possibilités d'adaptation. C'est une espèce thermophile ayant une activité qui se manifeste à partir d'une température de + 7° à + 10°C selon les cultivars et les conditions climatiques locales. La température de 10°C est généralement considérée comme le zéro de végétation (Munier, 1973).

#### 1.2. Importance économique du palmier dattier en Algérie

La production des dattes génère une importante activité commerciale et constitue une source de devise appréciables pour les pays producteurs, cette production est principalement localisée dans les régions arides du Nord de l'Afrique (Egypte, Algérie, Libye, Maroc, Tunisie, Soudan) et du sud-ouest de l'Asie (Iran, Irak, Pakistan, Oman, Yémen, Qatar, Bahreïn, Jordanie, Arabie-Saoudite, Emirats-arabe-unis) (F.O.A 2008).

La production mondiale de dattes varie autour de 7 millions de tonnes par année, elle a plus que doublé depuis les années 1980 (F.O.A 2008).

En 1995, la production annuelle des dattes en Algérie a été estimée à 180 000 tonnes dont 44% est représenté par la variété DegletNour. Avec cette production, l'Algérie a occupé le premier rang au Maghreb et le huitième rang mondial (Sedra, 2003). En 2002, l'Algérie occupe le septième rang mondial avec une production de 370 000 tonnes (Anonyme, 2003). En 2008, la production annuelle des dattes atteint 500 000 tonnes ce qui classe l'Algérie au premier rang au Maghreb et sixième rang mondial. Entre les années 2003 où la production a été de 437 000 tonnes et en 2008 où celle-ci est passée à 500 000 tonnes ; on note une

augmentation de 63 000 tonnes, ce qui présente une expansion annuelle d'environ 14%. Malgré cette augmentation, le tonnage de dattes exporté reste insuffisant. En effet ce tonnage qui atteignait les 30 000 tonnes durant les années 1960 a chuté à moins de 10 000 tonnes entre les années 1990-2000 pour atteindre au niveau de 13 350 tonnes en 2007 (Belgedj, 2009). L'Algérie exporte seulement 2% de sa production de dattes, soit 12 000 tonnes sur 600 000.

### 1.3. Données botaniques et écologiques du palmier dattier

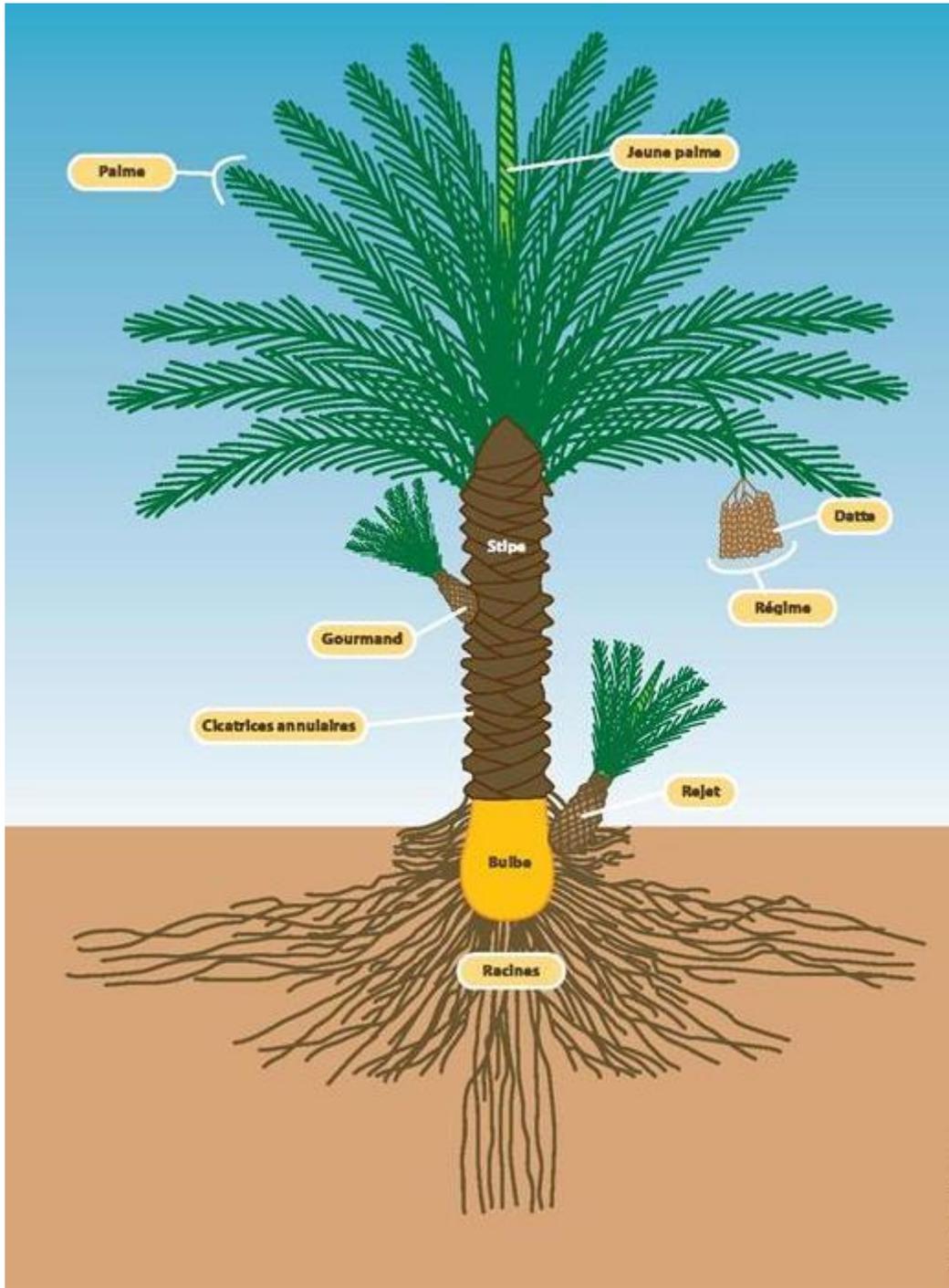
Le palmier dattier a été dénommé *Phoenix dactylifera* par Linné en 1734. Le nom générique *Phoenix* dérive du mot *Phoinix* que les grecs attribuent au dattier car ils considèrent ce dernier comme l'arbre des Phéniciens (Munier, 1973). L'épithète spécifique *dactylifera* (Grs. Dactulos = doigt + fera = porter) caractérise la forme du fruit qui rappelle celui d'un doigt (Munier, 1973; Djerbi, 1993).

### 1.4. Systématique et description du palmier dattier

Le palmier dattier fait partie de la classe des monocotylédones, la classification donnée par Djerbi, (1994) est la suivante :

Groupe	Spadiciflores
Embranchement	Angiospermes
Classe	Monocotylédones
Ordre	Palmales
Famille	Palmacées
Tribu	Phoenicées
Genre	<i>Phoenix</i>
Espèce	<i>Phoenix dactylifera</i> L.

Le palmier dattier *Phoenix dactylifera* L. est une plante angiosperme monocotylédone pérenne, son tronc ou stipe cylindrique est non ramifié, il peut atteindre 30 mètres de hauteur (Elhadrami et Elhadrami, 2009). Le tronc porte une couronne de feuilles appelées palmes, ces dernières sont pennées et mesurent 4 à 7 m de longueur, elles comportent deux parties ; le pétiole entouré à sa base par un feutrage est une gaine très développée, le limbe est constitué de folioles dont les deux tiers supérieurs sont épineux à la base (Figure 01).



**Figure 01 :** Figure schématique représentant les parties aériennes et souterraines du palmier dattier (Munier, 1973).

Le palmier dattier est une plante dioïque, les inflorescences mâles et femelles appelées spadices sont enveloppées d'une grande bractée membraneuse ou spathe, l'inflorescence résulte du développement des bourgeons axillaires qui sont situés à la base de palmes au niveau de la couronne (Munier, 1973 ; Hugard, 1978).

## Chapitre I : Synthèse bibliographique

Les inflorescences mâles sont plus courtes que celles des femelles (Hugard, 1978). Les fleurs mâles possèdent six étamines, alors que la fleur femelle comporte trois carpelles indépendantes dont un seul se développe pour former le fruit (Munier, 1973 ; Hugard, 1978).

La pollinisation du palmier dattier se fait habituellement par le vent (anémophile). Dans les régions phoenicicoles, le nombre de pieds mâles est volontairement réduit pour limiter ainsi la pollinisation naturelle par le vent. De ce fait, dans les zones de productions, c'est l'homme qui effectue une pollinisation manuelle.

Les fruits du palmier dattier ou dattes sont regroupées en régime, ce sont des baies à chair sucrée dont la couleur d'abord orange vire au brun à maturité.

### 2. Contraintes de la culture du palmier dattier

La culture du palmier dattier est soumise à des contraintes abiotiques comme la sécheresse, la salinité et la désertification ainsi que par des contraintes biotiques comme l'attaque par les ravageurs animaux et par les champignons phytopathogènes. Les ravageurs et les organismes phytopathogènes les plus redoutables sur cette espèce végétale sont présentés dans le tableau 01.

**Tableau 01 : Fréquence des principaux ravageurs et maladies du palmier dattier en Algérie d'après (Bounaga et Djerbi , 1990 ; Sedra, 2003).**

Noms communs	Agents causaux	Fréquence
<b>Ravageurs</b>		
Pyrale ou ver de datte	<i>Ectomyeloisceratoniae</i>	+++
Cochenille blanche	<i>Parlatoriablanchardii</i>	+++
Boufaroua ou acariose des dattes	<i>Oligonichusfrasiaticus</i>	+++
Cochenille rouge	<i>Phoenicococcusmaritte</i>	+/-
Le foreur des palmes	<i>Apatemonachus</i>	+/-
<b>Organismes phytopathogènes</b>		
Bayoud ou fusariose vasculaire	<i>Fusarium oxysporumf.sp.albedinis</i>	+++
Le Khemadj ou pourriture des inflorescences	<i>Mauginiellascattae</i>	++
La pourriture du cœur ou blaât	<i>Phytophthora sp</i>	+

### **2.1. La fusariose du palmier dattier ou « bayoud »**

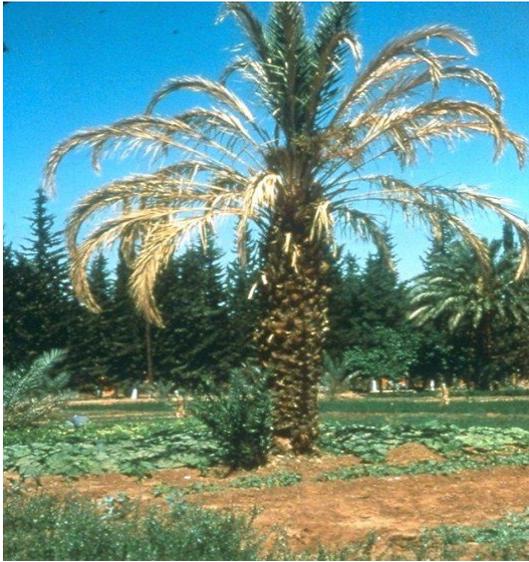
Le bayoud est une fusariose vasculaire du palmier dattier, c'est une maladie fongique, causée par le champignon appelé *Fusarium oxysporum* f.sp. *albedinis* ( F.o.a.), elle constitue la maladie la plus grave du palmier dattier.

#### **2.1.1. Origine et distribution géographique du bayoud**

Le bayoud est très répandu sur le palmier dattier au Maroc et en Algérie, il est apparu au Maroc dans les vallées du Draa au Nord de Zagora vers 1870, puis il s'est introduit en Algérie par les oasis frontalières de Beni Ounif en 1898, Béchar et Beni Abbès en 1908 pour atteindre les régions de Touat, Gourara et du Tidikelt. Le bayoud a atteint par la suite les oasis orientales et occidentales (Toutain, 1965) ensuite Metlili en 1950, Ghardaia en 1978 où des opérations d'éradication ont été menées. La propagation du bayoud du sud-ouest vers le sud-est constitue une menace pour les oasis des Zibans (Biskra, Tougourt) et ceux de la frontière tunisienne (Djerbi, 1982).

#### **2.1.2. Symptômes du bayoud**

Les premiers symptômes de la maladie apparaissent sur une ou plusieurs palmes de la couronne moyenne, leurs folioles prennent un aspect plombé (Figure 02), se dessèchent progressivement de bas en haut et se replient vers le rachis (Figure 03). Ce dessèchement se poursuit de l'autre côté de la palme en progressant cette fois-ci de haut en bas ; la palme complètement desséchée prend alors une couleur blanchâtre, d'où le nom arabe de « bayoud » qui signifie blanc. Une longue nécrose brune longitudinale parcourt le rachis de la palme atteinte (Djerbi, 1990 ; Sedra, 2003). Elle correspond au passage du mycélium dans les vaisseaux du rachis. Rapidement, d'autres palmes souvent proches des premières présentent les mêmes symptômes. A un stade avancé de la maladie, les palmes atteintes meurent et restent pendantes le long du stipe (Figure 04). La maladie progresse vers les palmes du centre pour atteindre le cœur de l'arbre qui meurt quand le mycélium atteint le bourgeon terminal. L'évolution de la maladie est plus au moins rapide, de quelques mois à plusieurs années (Djerbi, 1990).



**Figure 02 :** L'aspect plombé des folioles (Djerbi, 1988)



**Figure 03 :** Dessèchement progressif des folioles du bas vers le haut (Dakhia, 2013)



**Figure 04 :** Stade final de la maladie = dépérissement de l'arbre (Djerbi, 1988)

### 2.1.3. L'agent causal du bayoud, position taxonomique et caractères morphologiques et biologiques

Le parasite responsable du bayoud a été isolé pour la première fois en 1921 mais identifié seulement en 1934 par Malençon, il s'agit d'un champignon appelé *Fusarium oxysporum* f.sp. *albedinis* (F.o.a.)

·  
Systématique du F.o.a selon Alexopoulos et Blackwell, (1996).

Règne:	<i>Fungi (Mycota)</i>
Division :	<i>Ascomycota</i>
Classe :	<i>Hypocreomycetidae</i> (Sordariomycetes)
Ordre :	<i>Moniliales</i>
Famille:	<i>Tuberculariaceae</i>
Genre :	<i>Fusarium</i>
Espèce :	<i>Fusarium oxysporum</i>
Sous-espèce :	<i>Fusarium oxysporum</i> f.sp. <i>albedinis</i>

Le F.o.a. est un champignon tellurique dont la température de croissance optimale *in vitro* est comprise entre 21°C et 27.5°C, sa croissance reste importante entre 18°C et 32°C mais elle s'arrête à 7°C et 37°C. Il produit sur milieu PDA un mycélium ras, fin, clair et frisé. Habituellement des sporodochies de couleur rose saumon, se forment le long des hyphes mycéliens (Bounaga, 1975).

### 2.1.4. Mode d'infection du palmier par le *Fusarium oxysporum* f.sp. *albedinis*

Les chlamydospores du *Fusarium oxysporum* f. sp. *albedinis* germent dès que les conditions sont favorables et pénètrent directement par les racines du palmier pour se loger dans les faisceaux ligneux. La progression du champignon est ascendante et se réalise à la fois par le mycélium et par les microconidies. Le champignon fructifie, libère des conidies qui sont entraînées par le courant de la sève jusqu'au niveau des cloisons transversales des vaisseaux où elles sont arrêtées. Les conidies germent et donnent des filaments mycéliens qui traversent la cloison. Le mycélium poursuit son développement et forme de nouvelles microconidies qui sont entraînées à leur tour jusqu'à la cloison suivante; le phénomène se poursuit ainsi jusqu'à ce que le bourgeon terminal soit atteint entraînant ainsi la mort du palmier dattier (Djerbi 1983). Après la mort du palmier dattier, le mycélium continue à se

développer dans le parenchyme de l'arbre et forme de nombreuses chlamydospores (Kettout *et al* 2006).

### **2.2. Stratégies de lutte contre la maladie du bayoud**

Les moyens de lutte contre le bayoud s'apparentent à ceux qui sont préconisés contre les autres fusarioses. Ils se limitent à des mesures prophylactiques et à des méthodes de lutte culturales, chimiques, génétiques et biologiques.

#### **2.2.1. Les mesures prophylactiques**

Ces mesures visent principalement à éviter ou à retarder l'introduction du *Fusarium oxysporum* f.sp. *albedinis* dans les régions saines par la sensibilité des producteurs et par des contrôles phytosanitaires (Louvet.,1991). Elle consiste à l'interdiction du transport de terre et l'utilisation des rejets provenant des zones contaminées (Rhouma, 1996). En effet l'OEPP/EPPO (1997), recommande aux pays phoenicicoles d'interdire l'importation du matériel en provenance des pays infectés comme: le matériel végétal du palmier dattier (rejets, feuilles), le sol et les végétaux destinés à la plantation (avec racines et boutures) accompagnés de terre et des végétaux destinés à la plantation de henné (*Lawsonia inermis*).

Dans le cas de détection précoce d'un nouveau foyer de Bayoud dans une zone saine, l'éradication est le moyen de lutte utilisé. En effet, après la délimitation du foyer avec une marge de sécurité suffisante, les arbres sont arrachés et incinérés sur place, le sol est, par la suite, stérilisé à la chloropicrine. Cette technique a été améliorée par l'utilisation d'un mélange de bromure de méthyle et de chloropicrine. Ces dernières années l'utilisation de la chloropicrine fut totalement interdite, vu son danger et sa faible efficacité. En effet, le bromure de méthyle possède une forte capacité de pénétration dans le sol et lui assure une bonne stérilisation (Frederix et Den Brader, 1989). La zone ainsi traitée est clôturée et reste interdite à la culture pendant une longue période. Mais cette méthode est très chère, polluante et son efficacité n'est pas garantie. Malgré ces inconvénients, elle reste la seule méthode appliquée, surtout en Algérie.

#### **2.2.2. La lutte culturale**

Les pratiques culturales permettent de diminuer l'activité du pathogène dans le sol et de favoriser les défenses naturelles du palmier en agissant sur les fumures dans les parcelles contaminées (El Hadrami *et al.*, 2005). La multiplication à partir de semis peut constituer une méthode de lutte indirecte contre la fusariose vasculaire du palmier dattier, car elle permet l'obtention de clones résistants à la maladie et produisent des dattes de bonne qualité (Ferry *et al.* ; 1998). Aussi, le recours à la multiplication végétative par rejet peut être pratiqué par le

biais de la culture *in-vitro*, en particulier s'il s'agit de régénérer des palmeraies bayoudées (Ouamane *et al.*, 2008)

### **2.2.3. La lutte chimique**

Cette méthode consiste à utiliser des fongicides systémiques à action endothérapique et certains fumigants à action éradiquante, c'est ainsi que les fongicides systémiques qui se sont révélés efficaces *in-vitro* ont des effets délétères pour le sol (Bounaga, 1980). La désinfection des sols par les fumigants comme le bromure de méthyle a été envisagée pour l'éradication des premiers foyers de bayoud à El Goléa (Fredericks et Denbrader, 1988). Cette méthode est écartée, du fait que les possibilités pratiques d'utilisation de fongicides systématiques dans le cas des trachéomycoses sont très limitées. En plus, ces produits sont peu stables dans le sol et risquent de favoriser la sélection des souches résistantes (El Hadrami *et al.*, 2005). En les utilisant d'une façon répétitive et pendant de longues années, ces produits chimiques risquent de nuire à l'environnement.

### **2.2.4. La lutte génétique**

Cette lutte vise à sélectionner des cultivars et des clones résistants à la fusariose vasculaire et de bonne qualité et va de pair avec la multiplication rapide du matériel sélectionné par la culture *in-vitro* (Djerbi, 1982). La sélection de palmiers se fera par deux approches : parmi les populations naturelles ou parmi celles issues de croisements contrôlés. C'est ainsi que la première approche a permis de sélectionner parmi 2,7 millions de palmiers au Maroc, 2337 têtes de clones dont 1057 ont été installées à Zagara et Errachidia (Maroc). Le même programme réalisé en Algérie a permis de sélectionner des centaines de cultivars installés à Adrar (Djerbi, 1990). Cette méthode reste la seule efficace pour lutter contre la fusariose vasculaire, mais dans le cas du dattier, la sélection n'est pas facile, en plus, la plupart des variétés sélectionnées résistantes produisent des dattes de faible qualité (Sedra et Maslouhy, 1995).

### **2.2.5. La lutte biologique contre le Bayoud**

La lutte contre le bayoud nécessite la mise en œuvre d'une stratégie, aussi bien préventive que curative, de contrôle du champignon et la protection des vergers.

#### **2.2.5.1. Compostage**

Les caractéristiques biologiques du *Fusarium oxysporum* f.sp. *albedinis* et de son hôte le palmier dattier (*Phoenix dactylifera* L.), rendent toute tentative de lutte très difficile. L'existence dans la nature de sols résistants à la fusariose vasculaire des dattiers et l'isolement

des micro-organismes qui ont montré un effet antagoniste *in vitro* et *in vivo* vis-à-vis du *Fusarium oxysporum* f.sp. *albedinis* ont fait l'objet de quelques études en Algérie et au Maroc (Sedra et Maslohy 1995). Cette stratégie de lutte est très intéressante mais, elle reste sans application sur le terrain. Ces dernières années, le monde a accordé une place prépondérante à la qualité de l'environnement, à la pérennité des ressources naturelles et surtout à la réduction de l'utilisation des substances chimiques. Ceci a conduit la communauté scientifique à se tourner vers la possibilité d'utiliser de façon rationnelle des composts. Ainsi, plusieurs recherches sont consacrées à la valorisation des composts en tant qu'outil de protection des cultures (Veeken *et al.*, 2005). Des composts issus de divers déchets qu'ils soient agricoles, industriels ou ménagers, ont montré leurs capacités à protéger les cultures contre de nombreux ennemis tels que des adventices, des insectes, des mollusques, des nématodes, des champignons, des bactéries et des virus. Dans les études de Chakroune *et al.* (2005), Chakroune (2006) et Hakkou *et al.* (2011), il a été montré que le compostage des sous-produits du palmier dattier contaminés par *Fusarium oxysporum* f.sp. *albedinis* engendre un compost mûr, stable et hygiénisé ayant des caractéristiques physicochimiques et agronomiques intéressantes. L'ajout du compost des sous-produits du palmier dattier apporte un effet suppressif à la maladie du bayoud. Donc, en plus des économies de la tourbe, le compost offre la possibilité de fournir au substrat un pouvoir suppressif à l'encontre du *Fusarium oxysporum* f.sp. *albedinis*, et produit ainsi des plantes saines et vigoureuses. L'effet suppressif observé est d'origine biologique puisque l'autoclavage entraîne sa disparition. Les antagonistes identifiés sont constitués principalement des genres *Aspergillus*, *Penicillium* et *Bacillus*. Les travaux de Chakroune (2006) et de Chakroune *et al.* (2008), ont montré aussi que le compost des sous-produits du palmier dattier pourrait être un moyen de contrôle biologique efficace, capable de limiter la propagation de la maladie et de lutter contre la sévérité de la fusariose vasculaire dans les palmeraies des oasis de l'Afrique du nord. L'apport de ce compost aux sols contaminés par *Fusarium oxysporum* f.sp. *albedinis* pourrait diminuer considérablement la population de ce champignon par des mécanismes biologiques respectant l'écosystème oasien tout en œuvrant à la décontamination des sols oasiens à moyen et/ou à long terme. Donc, l'utilisation de ce compost dans les systèmes de production agricole oasienne peut fournir un moyen de recyclage de tous les déchets agricoles, réduire les coûts de production des cultures végétales en diminuant les pertes associées aux maladies, réduire l'utilisation des produits chimiques et produire des aliments exempts de résidus chimiques.

### 2.2.5.2. Mycorhization

La mycorhization du palmier dattier constitue un axe important, puisqu'elle s'intéresse aussi bien à l'aspect physiologique de la plante (croissance et production) qu'à l'aspect phytopathologique (contribution à la lutte contre le Bayoud). En effet, la mycorhization est l'élément biologique utilisé par les plantes, en symbiose avec les champignons, pour le renforcement de la résistance aux agents pathogènes du sol (Abohatem *et al*, 2011) et aux stress hydriques et salins (Duddridge *et al*, 1980). D'après Stoun *et al* (2000), l'effet de l'endomycorhization par *Glomus intraradices* sur la croissance du palmier dattier et sur la résistance de ce dernier aux attaques du *Fusarium oxysporum* f.sp. *albedinis* sur différents substrats a montré une amélioration de la croissance des plantules d'environ 26%. La présence de l'agent pathogène a provoqué une chute de la biomasse de 82,5% avec un taux de mortalité de 100%, alors que la présence du mycorhize a fait baisser ce taux de mortalité à 55%, et la mycorhization améliore la croissance de la partie aérienne en augmentant la surface de photosynthèse (le nombre de feuilles, la longueur, la biomasse verte) et par conséquent plus d'éléments nutritifs que le champignon mycorhizien peut utiliser. La mycorhization a montré aussi un effet protecteur contre les attaques du Foa. observé, chez le palmier dattier mycorhizé et infecté par le même agent pathogène. Cette réaction s'est manifestée par le développement des microfibrilles enveloppant les hyphes pathogènes provoquant ainsi leur dégénérescence. Ceci a été déjà montré en indiquant que l'influence des mycorhizes à vésicules et à arbuscules reste limitée aux sites de leur localisation dans la racine (Oihabi, 1991).

## 3. Les bactéries endophytes

### 3.1. Définition, origine, caractéristiques, localisation et colonisation des tissus végétaux

L'origine étymologique du mot « endophyte » provient du grec « endo » qui signifie « dedans » et « phyton », « plante », à l'intérieur de la plante. Les endophytes sont des microorganismes (bactéries et champignons) qui peuvent coloniser et survivre à l'intérieur des tissus d'une plante apparemment saine. Ils accomplissent tout ou partie de leur cycle de vie à l'intérieur d'une plante de manière symbiotique (endosymbiote), c'est-à-dire avec un bénéfice mutuel pour les deux organismes ou sans conséquences négatives pour la plante.

L'endophyte et son hôte entretiennent ce qu'on appelle parfois des interactions durables (Bacon et White, 2000), contrairement aux épiphytes qui se développent à la surface externe.. Les endophytes fongiques sont trouvés particulièrement dans presque toutes les parties de la plante (Stone *et al.*, 2000).

Les endophytes vivent dans les tissus de la plante sans lui apporter de préjudice et bénéficient d'autres avantages en plus de la résidence (Germaine *et al.*, 2004). La plupart des bactéries endophytes proviennent de la rhizosphère (Muyzer *et al.* 1993). Elle peuvent être isolées à partir des tissus des surfaces désinfectées de la plante ou extraites des tissus internes (Lodewyckx *et al.*, 2002).

Les bactéries endophytes appartenant aux groupes des Gram positif ou à Gram négatif ont été isolées à partir de plusieurs types d'espèces végétales (Kobayashi et Palumbo, 2002). Elles présentent l'aptitude de coloniser les racines de façon intense et manifestent des aptitudes importantes en stimulation de la croissance des plantes, notamment chez les plantes cultivées (Kloepper *et al.* ; 1986)

Les endophytes entrent dans les tissus végétaux principalement par la zone racinaire. Cependant, les parties aériennes des plantes, comme les fleurs, les tiges et les cotylédons, peuvent également être des voies d'entrées aux bactéries (Germaine *et al.*, 2004). Plus précisément, la pénétration se produit dans les tissus au moment de la germination et l'émission des racelles, des racines et des stomates (Smalla *et al.*, 1993). Les bactéries endophytes se localisent soit aux points d'entrées ou peuvent de propager de façon systémique dans toute la plante (Paulitz et Belanger, 2001). Ces micro-organismes peuvent résider à l'intérieur de la cellule végétale, dans l'espace intercellulaire (Muyzer *et al.*, 1993) ou dans le système vasculaire (Germaine *et al.*, 2006). Elles adhèrent aux cellules de la plante par des filaments, montrant ainsi qu'il existe une compatibilité structurale entre l'endophyte et les parois des cellules végétales (Bowen, 1979).

La capacité des bactéries endophytes d'infecter et coloniser les racines ou d'autres types d'organes de la plante comme les semences, les tubercules, les racines, les nodules, les tiges, les feuilles et les fruits, peut être considérée comme étant un facteur majeur qui détermine l'efficacité de ce bio-inoculum aussi bien sur l'amélioration de la production des plantes que sur leur protection contre les agents pathogènes. Ces bactéries peuvent infecter et coloniser l'intérieur des tissus de diverses plantes y compris les légumineuses et y prospérer en tant qu'endophytes naturels des racines, des tiges, des xylèmes, des feuilles et des fruits (Welbaum *et al.*, 2004).

L'infection et la colonisation de la plante hôte par les bactéries endophytes se réalisent d'une manière passive, enzymatique ou spécifiée. L'infection passive et enzymatique constitue les principales voies empruntées par ces endophytes (Reddy *et al.* , 1995). La pénétration passive a eu lieu au niveau des craquelures que provoque l'émergence des racines latérales ou secondaires, de la zone d'élongation des racines et des espaces intercellulaires

entre les cellules corticales et épidermiques (Chaintreuil *et al.*, 2000). L'infection enzymatique se réalise souvent, après une dégradation cellulosique localisée au niveau de la surface racinaire (Chaintreuil *et al.*, 2000).

Des variations significatives de densités cellulaires des endophytes indigènes et introduits ont été rapportées dans la bibliographie. Ces variations sont attribuées à la plante source, à son âge, au type de tissu, au moment de l'échantillonnage, et à l'environnement (Gagne *et al.*, 1997). Généralement, les populations bactériennes sont plus élevées dans les racines et faibles dans les tiges et les feuilles (Leben et Schmitthenner, 1968). Les endophytes sont protégés des stress environnementaux et des compétitions microbiennes par leurs plantes hôtes ; ils ont été isolés des fleurs, des tiges, des fruits, des racines, des feuilles, des semences et des ovaires de différentes espèces végétales (Mano *et al.*, 2007).

### **3.2. La diversité des bactéries endophytes**

L'identification des endophytes s'est appuyée principalement sur les méthodes de culture de base (Sturz et Matheson., 1996). Toutefois, en raison des exigences culturelles inconnues de nombreux microorganismes, l'analyse d'une population de culture indépendante conduit à une détermination moins fiable de la diversité microbienne (Tholozan *et al.*, 1999).

La diversité des endophytes bactériens cultivables est liée non seulement à la variété des espèces végétales colonisées, mais aussi par rapport aux nombreux taxons impliqués, c'est ainsi que leur taxonomie reste encore mal cernée (Thakore, 2006). Cependant, la plupart de ces bactéries identifiées jusqu'à présent font partie des genres ; *Enterobacter*, *Pseudomonas*, *Bukholderia*, *Bacillus* et *Azospirillum* (Tableau 02) (Tila *et al.*, 2005). Par ailleurs, certaines souches appartenant aux genres bactériens telluriques se sont dévoilées expérimentalement comme des agents efficaces dans le cadre de lutte biologique (Hildebrand *et al.*, 1988).

### **3.3. Interaction endophyte-hôte et les associations bénéfiques liées aux endophytes.**

Les endophytes possèdent différents modes de vie, donnant différentes interactions variables d'un endophyte à un autre et d'un hôte à un autre. Ces interactions dépendent des facteurs abiotiques, des interactions avec d'autres espèces, de la géographie et de la phylogénie (Saikkonen *et al.*, 1998).

Les interactions entre la plante hôte et le microorganisme qu'elle héberge dans ses tissus sont très variées, allant d'un simple commensalisme (Deckert *et al.* 2001) à la relation mutualistique puis du commensalisme au parasitisme de manière continue (Johnson, *et al.*, 1997 ; Redman, *et al.* 2002). Il est probable que les endophytes peuvent devenir parasites sous certaines conditions et *vice versa* (Schulz et Boyle, 2005). Cependant, ces microorganismes

sont différents des parasites dont le rôle principal est d'engendrer des maladies et de réduire l'aptitude et la résistance de leurs plantes hôtes (Karl-Heinz *et al.*, 2006).

Le commensalisme et le mutualisme représentent les étapes équilibrées d'interactions des plantes-microorganismes. Le commensalisme est bénéfique pour l'endophyte qui perçoit un abri et une provision d'éléments nutritifs et que sa présence à l'intérieur d'un tissu hôte ne provoque aucun dérangement. Le mutualisme, par contre, est défini comme une interaction bénéfique pour les deux partenaires. En plus des avantages pour l'endophyte, le mutualisme est fréquemment considéré comme des résultats encouragés par l'hôte car la plante perçoit aussi des éléments nutritifs et des molécules de défense contre les phytopathogènes (Waller *et al.*, 2005).

**Tableau 02 :** Exemples de quelques bactéries endophytes (Waller *et al.*, 2005).

<b>Bactéries endophytes</b>	<b>Plantes hôtes</b>	<b>Organe(s) colonisé(s)</b>
<b><i>Azospirillum</i></b> <i>A. amazonense</i> <i>A. brasilense</i> <i>A. lipoferum</i>	<i>Saccharum officina</i> Blé, Sorgho, Mai Blé, Sorgho, Mais	Racine, tige et feuille Racine et tige Racine et tige
<b><i>Bacillus</i></b> <i>Bacillus sp.</i> <i>B. endophyticus sp.</i> <i>Beijerinckiaindica</i>	Cotonnier, epinette et raisin <i>Gossypium sp.</i> Petits pois, canne à sucre	Racine, tige et feuille Racine Racine
<b><i>Burkholderia</i></b> <i>Burkholderia sp.</i> <i>B. cepacia</i> <i>B. tropicalis</i> <i>B. brasilensis</i>	<i>Vitis vinifera</i> <i>Lupinus luteus</i> , mais <i>ananas comosus</i> L. Banane	Racine, tige et feuille Racine, xylème Tige et fruit Tige
<b><i>Hebaspirillum</i></b> <i>H. seropedicae</i> <i>H. rurisubalcans</i>	Canne à sucre, riz, sorgho, banane Banane et <i>ananas comosus</i>	Racine, xylème, feuille et fruit Racine, tige, feuille et fruit
<b><i>Pseudomonas</i> spPsJN</b>	<i>Vitis vinifera</i>	Racine
<b><i>Serratia</i></b> <i>Serratia phymuthica</i> <i>Serratia marcescens</i>	<i>Cucumis sativa</i> L. <i>Oriza sativa</i> L.	Racine Racine

Les effets bénéfiques pour la plante peuvent résulter d'une provision améliorée d'éléments nutritifs apportés par l'endophyte. Par exemple, la symbiose entre les mycorhizes et les arbres est la plus étudiée dans l'interaction de plantes-microorganismes MFA (Mycorhize Fongique Arbusculaire) (Harrison, 2005).

En plus de l'approvisionnement en éléments nutritifs et minéraux, les endophytes peuvent améliorer aussi la tolérance aux stress abiotiques et biotiques. Comme exemple chez les endophytes des feuilles, l'espèce *Curvularia*, par exemple, confère à la plante *Dichanthelium* une adaptation à la chaleur extrême (Redman *et al.*, 2002). Ils peuvent aussi conférer une tolérance à la sécheresse (West, 1994) et une amélioration de la croissance végétative (Potter *et al.* 1979). De plus, les symbiotes peuvent augmenter la résistance contre les pathogènes. Ceci est observé chez les racines (Colditz *et al.* 2005), c'est aussi le cas des divers Ascomycetes, endophytes des feuilles (Arnold *et al.* 2003).

Un rapport récent a montré l'évidence de régulation de réponses de la défense systémique par les endophytes: les Basidiomycetes endophytes de la racine de *Piriformosporaindica* rehaussent la résistance de l'orge non seulement à la nécrotrophie des racines parasitées, mais aussi au caractère biotrophique de *Graminisblumeria* pathogène (WALLER *et al.* 2005). Par exemple, les endophytes isolés chez des plantes brésiliennes ont montré une production d'acide guignardique, un nouveau métabolite secondaire (Rodrigues *et al.*, 2001), produit par une espèce appartenant au genre *Guinardiasp.* Ce genre a été aussi isolé dans les feuilles de *Citrusroostocks* (Wellington *et al.*, 2001). Un champignon endophyte, *Colletotrichumsp.* isolé des feuilles de l'*Artemisiaannua* produit l'acide 6-isoprènylindole-3-carboxylique (Hong *et al.*, 2000), un nouveau métabolite secondaire.

Les plantes possèdent un vaste arsenal inductible et constitutif de mécanisme de défense contre les agents pathogènes. Les obstacles structurels qui se renforcent rapidement lors du processus d'infection par dépôts de cire, de lignine, de cellulose, de composés phénoliques et de protéines de la paroi cellulaire sont le type le plus performant de défense (Clay et Schrdl, 2002). Il a été démontré que les populations endophytes assurent un meilleur rendement par l'élimination du pathogène comme ce qui a été démontré lors d'une attaque par la production d'antibiotiques et de molécules de défense (Strobel et Daizy, 2003).

### 3.3.1. La promotion de la croissance

Les bactéries endophytes présentent plusieurs mécanismes par lesquels elles peuvent promouvoir la croissance et la santé des plantes. Elles diffèrent des souches de lutte biologique du fait qu'elles ne constituent pas forcément un obstacle au développement des

agents phytopathogènes, mais, elles augmentent la croissance de la plante grâce à l'amélioration de l'apport en nutriments et en minéraux (Kobayashi et Palumbo, 2000). Au cours des dix dernières années ; l'intérêt vis-à-vis des microorganismes endophytes s'est accru, car leur présence profite aux plantes hôtes en produisant des substances promotrices de croissance et en activant les mécanismes de défense chez la plante par la production d'antibiotiques ou d'éliciteurs (Gimenez *et al.*, 2007) et peuvent également fournir des vitamines indispensables aux plantes (Lee *et al.*, 2004). En outre, d'autres effets bénéfiques sur la croissance des plantes ont été attribués aux endophytes et incluent l'ajustement osmotique, la régulation stomatique, la modification de la morphologie des racines et l'absorption accrue des minéraux (Pirttila *et al.*, 2004).

Les bactéries endophytes stimulent la croissance des plantes par un certain nombre de mécanismes. Il s'agit notamment de la production de l'acide indole acétique (Verma *et al.*, 2001) et la production des sidérophores (Wakelin *et al.*, 2004). Des travaux ont montré que chez les bactéries rhizosphériques, la présence d'endophytes bactériens chez les plantes génère une activité de promotion de la croissance, cette activité est le résultat de la promotion de phytohormones, des enzymes impliquées dans le métabolisme régulateur de la croissance, tels que l'éthylène, l'acide 1-aminocyclopropane- le 1-carboxylique (ACC) deaminase, les auxines, l'acétoïne, le 2,3-butanediol et les cytokinines (Compant *et al.*, 2005). Par ailleurs, l'amélioration de la croissance des plantes peut se faire *via* la fixation de l'azote, mécanisme connu sous le terme de diazotrophie (Kuklinsky-Sobral *et al.*, 2004).

### **3.3.2. Protection contre les microorganismes pathogènes**

Comme les bactéries endophytes sont en contact intime avec la plante, elles constituent un choix attractif comme agents de biocontrôle. Elles sont utilisées pour protéger la plante contre les infections par les agents pathogènes (Welbaum *et al.*, 2004). L'interaction entre la plante et les bactéries endophytes est à l'origine d'une résistance systémique qui fait suite à l'induction ou à la préparation des mécanismes de défense (Van Loon *et al.*, 2006).

Les endophytes ont une efficacité comme agents de lutte biologique, cette efficacité est tributaire de nombreux facteurs. Ces facteurs comprennent : la spécificité d'hôte, la dynamique des populations et le mode de colonisation de l'hôte, la capacité de se déplacer dans les tissus de l'hôte et la capacité d'induire la résistance systémique (Backman *et al.*, 1997).

Elles représentent une source importante de composés biologiquement actifs contre les organismes phytopathogènes (Strobel, 2003). En plus de l'antagonisme direct contre les

organismes pathogènes, ces bactéries bénéfiques peuvent induire une forme de résistance systémique chez les plantes. Cette induction est généralement due aux lipopolysaccharides (LPS) de la membrane externe des bactéries Gram négatives, mais, d'autres molécules comme les sidérophores et l'acide salicylique sont aussi considérés comme des molécules candidates. Les LPS induisent une série de gènes protecteurs parmi eux, ceux, qui codent pour les protéines liées à la pathogenèse (PR) (Sturz *et al.*, 1999).

Ces activités sont la conséquence de synthèses microbiennes de diverses substances à effet létal ou inhibiteur des microorganismes phytopathogènes. Il s'agit surtout de métabolites à effet antibiotique ou toxique. Parmi ces substances, nous notons principalement les antibiotiques et autres produits volatiles (Thomashow, 1991).

Certaines bactéries induisent une résistance systémique chez les plantes. Ainsi, *Pseudomonas putida* et *Serratia marcescens* entraînent une résistance chez le concombre (*Cucumis sativus*) contre le flétrissement causé par *Furarium oxysporum* f.sp. *cucumerinum* (Liu *et al.*, 1995).

### 3.3.3. La tolérance aux stress abiotiques

Un certain nombre de bactéries peuvent également favoriser la croissance des plantes et les protéger contre des stress abiotiques, ce qui a donné lieu à une recherche active dans le domaine des bactéries améliorant la croissance végétale appelées PGPBs « Plant Growth Promoting Bacteria ». Différentes familles de bactéries, y compris les *Rhizobium*, *Bacillus*, *Pseudomonas* et *Burkholderia* peuvent améliorer la croissance des légumineuses et des cultures dans des conditions de stress abiotiques (Yildirim et Taylor, 2005; Barassi *et al.*, 2006 ; Egamberdieva et Kucharova, 2009). L'accumulation de l'acide aminé libre proline chez la plante est provoquée par le stress engendré par la sécheresse. L'amélioration de la tolérance au stress abiotique du maïs lors de la co-inoculation de *Rhizobium* et *Pseudomonas* est accompagnée par une augmentation des niveaux de proline, une diminution des fuites d'électrolytes et par le maintien de la teneur en eau des feuilles (Bano et Fatima, 2009). Les contraintes environnementales peuvent être la cause de la production d'éthylène hormonal chez les plantes, qui se traduit par des réactions d'inhibition de la croissance et du stress. Habituellement, l'éthylène est formé dans les plantes à partir du précurseur acide 1-aminocyclopropane-1-carboxylate (ACC). Certaines bactéries produisent des ACC désaminases, qui dégradent l'ACC, réduisant ainsi la formation d'éthylène dans les plantes. C'est de cette manière qu'*Achromobacter piechaudii* induit une tolérance systémique contre la sécheresse et le sel et favorise la croissance des plantes (Glick, 2007).

# *Matériels et méthodes*

## 1. Objectif de l'étude

Cette étude s'intéresse aux bactéries endophytes de six variétés de palmiers dattier ; cinq résistantes au bayoud et une variété très sensible. Les échantillons racinaires ont été collectés par l'étudiante Melle Chaouch dans la région de Biskra et de Ghardaïa dans le cadre de la préparation de son mémoire de Mastère 2.

Pour mener cette étude, nous avons procédé aux étapes suivantes :

- 1-Prélèvement d'échantillons racinaires (étape faite par Chaouch 2015)
- 2-Isolement des bactéries endophytes à partir des racines de palmier dattier (étape faite par Chaouch 2015 en même temps que l'isolement des champignons endophytes)
- 3-Purification des bactéries isolées pour obtenir des clones purs
- 4-Essais d'antagonisme *in-vitro* à l'égard du *Fusarium oxysporum* f.sp .*albedinis* agent du bayoud
- 5-Identification des endophytes antagonistes par des tests biologiques et biochimiques

## 2. Lieu de l'étude

Toutes les manipulations ont été menées au niveau du laboratoire de phytobactériologie de l'université Saad Dahlab Blida 1.

## 3. Echantillonnage

La collecte des échantillons a été effectuée à partir de racines de palmier dattier d'apparence saine (sans symptômes de bayoud) sur les deux types de variétés (sensibles et résistantes). Les racines prélevées sont jeunes, fraîches et de couleur blanche. Les échantillons sont prélevés à l'aide de scalpels stériles à une distance de 20 et 30 cm et à une profondeur entre 15 et 30 cm autour du tronc pour chaque prélèvement. La pioche servant pour le prélèvement est stérilisée à l'alcool 90° par flamage. Les échantillons sont transportés aseptiquement dans des flacons stériles et conservés au frais à 4° C avant leur utilisation. Les échantillons ont été pris à partir de cinq variétés résistantes au bayoud et une variété très sensible au bayoud (Tableau 03).

**Tableau 03 : Variétés de palmier-dattier utilisées pour l'isolement des bactéries endophytes.**

<b>Variété</b>	Résistance/sensibilité au bayoud	<b>Code</b>
MechDegla	Résistante	<b>MD</b>
Bentqbal	Résistante	<b>Bq</b>
Elhora	Résistante	<b>H</b>
El azouzia	Résistante	<b>AZ</b>
Takarboucht	Résistante	<b>TK</b>
DegletNour	Très sensible	<b>DN</b>

#### **4. Technique de préparation des échantillons racinaires à analyser**

La surface des racines collectées a été désinfectée selon la méthode décrite par Franken et Andrade, (2014). Un lavage des racines sous l'eau courante a été effectué afin d'éliminer les particules du sol et la sélection des sections de racines à désinfecter. Ainsi, les racines âgées et nécrosées sont éliminées. L'étape de désinfection a été réalisée sous conditions stériles en utilisant des flacons stériles, des bistouris et des pinces préalablement stérilisés au four Pasteur. Les racines sont trempées dans de l'éthanol à 70° pendant 1 mn puis transférées dans une solution d'hypochlorite de calcium  $\text{Ca}(\text{ClO})_2$  à 2,5% pendant 10-15 mn. Les racines subissent par la suite 6 lavages successifs à l'eau distillée stérile toutes les 1 mn et dans différents contenants stériles pour éliminer l'excès d'alcool et de  $\text{Ca}(\text{ClO})_2$ . Les fragments racinaires sont par la suite récupérés et séchés sur du papier buvard stérile avant d'être découpés puis transférés sur le milieu d'isolement.

#### **5. Isolement des endophytes**

L'isolement est réalisé sur le milieu LPGA (Levure Peptone Glucose Agar) à pH=7. Les racines sont découpées en petits fragments entre 2 et 3 mm de longueur sur du papier stérile en utilisant une pince et un scalpel stériles. Les extrémités des racines sont écartées et quatre à cinq fragments racinaires par boîte sont déposés sur le milieu de culture puis incubés à 28°C.

## 6. Purification et conservation des souches

Les isolats obtenus ont subi des séries de purifications sur le milieu de culture LPGA afin de s'assurer de leur pureté pour les tests ultérieurs. La purification est une opération nécessaire afin d'obtenir des clones purs pour l'ensemble des organismes utilisés pour cette étude ; bactéries endophytes isolées et la souche du champignon *Fusarium oxysporum* f.sp. *albedinis*. La souche de Foa a été conservée puis manipulée sous forme de souches pures sur le milieu PDA après plusieurs purifications successives en boîtes de pétri. Le milieu de culture PDA est préparé à partir d'un bouillon à base de pomme de terre, stérilisé à l'autoclave pendant 15 minutes à 120°C, ensuite coulé dans des boîtes de pétri de 9 cm sous forme d'une couche plus ou moins épaisse (Johnston et Booth, 1982).

La purification du F.o.a est réalisée après plusieurs repiquages par transplantation successives des disques mycéliens dans des boîtes de pétri contenant le milieu PDA, suivie par une étape d'incubation à 28-30°C jusqu'à l'obtention d'une souche pure.

Concernant les souches bactériennes, la méthode consiste à faire des étalements sectoriels dans une boîte de pétri avec une culture bactérienne âgée de chaque souche à l'aide d'une anse stérile et à raison de trois secteurs par boîte contenant le milieu LPGA à pH=7, suivie par une étape d'incubation à 28-30°C.

Les isolats bactériens purifiés retenus, sont conservés sur le milieu LPGA en tubes inclinés à 4 °C, pour subir par la suite une série de tests de caractérisation biologique et biochimique pour une éventuelle détermination du genre de bactéries isolées.

## 7. Essais d'antagonisme *in-vitro* à l'égard du *Fusarium oxysporum* f.sp. *albedinis* agent du bayoud (F.o.a.)

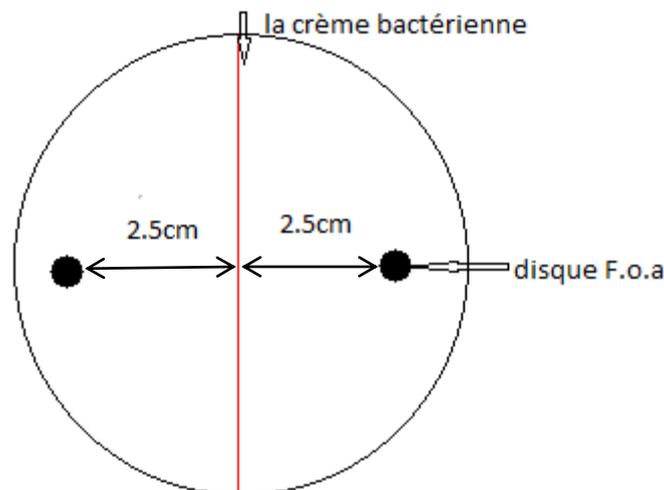
Après purification des isolats obtenus, nous avons testé leur pouvoir antagoniste vis-à-vis d'une souche pathogène de *Fusarium oxysporum* f.sp. *albedinis* faisant partie de la collection du laboratoire de phytopathologie. Nous avons opté pour deux méthodes de test d'antagonisme. En premier lieu, nous avons utilisé la méthode de confrontation appelée également "technique des cultures opposées". Pour la seconde technique nous avons évalué l'inhibition par l'utilisation des filtrats bactériens.

### 7.1. Technique de confrontation par contact direct du champignon et de la bactérie en boîte de Pétri

Cette technique consiste à déposer dans une même boîte de pétri deux explants; l'antagoniste et le pathogène. À l'aide d'une anse stérile, une colonie bactérienne des souches endophytes à tester pour leur pouvoir antifongique est raclée. Cette dernière est ensemencée sous forme d'une strie rectiligne au centre de la boîte (Figure 05). La bactérie ensemencée provient d'une culture pure âgée de 48 heures. Les disques mycéliens du champignon sont issus du pourtour d'une culture pure âgée de 7 jours après les avoir découpés à l'aide d'une emporte-pièce stérile (Landa et *al.*, 1997). Ces explants mycéliens de 5 mm sont mis de part et d'autre de la strie et à 2,5 cm de chaque côté de la bactérie à tester. Les repiquages des explants et l'ensemencement de la bactérie sont effectués en même temps (Benhamou et Chet, 1996 ; Landa et *al.*, 1997).

Les témoins négatifs sont représentés par des boîtes de pétri contenant uniquement la culture du champignon phytopathogène. Pour chaque champignon et pour chaque culture bactérienne, l'essai de confrontation est répété trois fois.

Les boîtes de pétri sont par la suite entourées avec le parafilm le long du bord pour éviter les contaminations. Enfin, les boîtes sont incubées à l'obscurité pendant 5 à 6 jours à une température de 28-30°C.



**Figure 05 :** Méthode de dépôt des explants pour la technique d'antagonisme par confrontation directe en co-culture.

## **7.2. Test de confrontation par effet des inhibiteurs non volatiles produits par les antagonistes**

La deuxième méthode consiste à préparer un microfiltrat bactérien. Il s'agit de la méthode de confrontation par effet des inhibiteurs non volatiles produits par les antagonistes. Cette technique est utilisée du fait que l'activité antagoniste des organismes biopesticides est souvent associée à la production de métabolites secondaires. Les biopesticides microbiens montrent plusieurs avantages en comparaison avec les produits phytosanitaires de synthèse, ils ont une action spécifique vis-à-vis des ravageurs. Ils ne sont pas toxiques et se dégradent plus rapidement dans l'environnement (Thakore, 2006).

Pour évaluer l'implication des métabolites toxiques dans l'activité antagoniste des souches endophytes, l'effet de l'application de filtrats des antagonistes bactériennes cultivés sur le milieu LPGA a été évalué *in vitro* à l'égard du champignon phytopathogène *F.o.a* (Dennis et Webster, 1971).

### **7.2.1 Préparation des suspensions bactériennes, culture et microfiltration**

Sous une hotte à flux laminaire et dans des conditions d'aseptie générale, nous avons préparé des suspensions des souches antagonistes en raclant à l'aide d'une anse stérile une colonie provenant d'une culture bactérienne d'une souche pure âgée de 48 heures cultivée sur le milieu PDA.

Ensuite, chaque colonie a été déposée dans un tube et cela pour chaque isolat endophyte. Chaque tube à essai contient 5 ml d'un bouillon nutritif de milieu de culture LPG.

Une étape d'incubation combinée à une agitation des tubes qui contiennent les suspensions bactériennes suit, et cela, pendant 24h. Le dispositif d'agitation est placé sur un agitateur et sur la paillasse à l'obscurité et à la température du laboratoire. L'agitation et l'obscurité incitent les bactéries à produire des métabolites secondaires.

### **7.2.2 Microfiltration des suspensions**

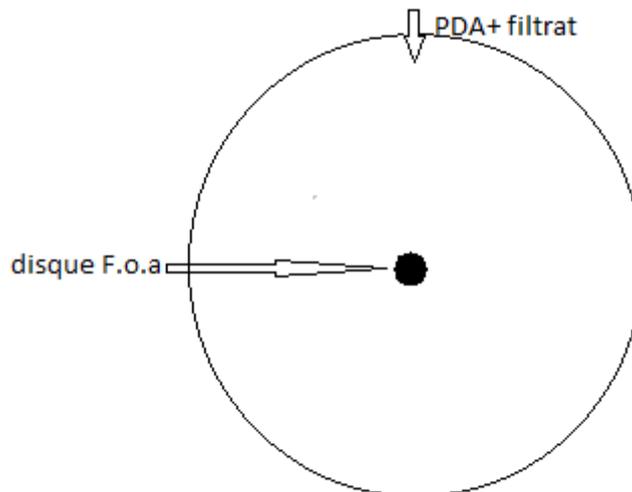
Après incubation et à l'aide d'une seringue stérile le contenu des tubes est recueilli dans des eppendorfs stériles en réalisant par la suite une filtration par le biais d'un filtre millipore

de dimension des pores de 0.2µm. Chaque souche est filtrée indépendamment des autres et en utilisant à chaque fois un nouveau filtre millipore stérile.

### 7.2.3. Utilisation des filtrats bactériens pour le test d'antagonisme

Afin de réaliser le test d'antagonisme, nous avons prélevé à l'aide d'une micropipette stérile un volume de 1ml de chaque microfiltrat. Ce volume est additionné à 9ml de milieu PDA préalablement préparé, stérilisé et maintenu en surfusion (non encore solidifié). Le mélange (PDA et filtrat de chaque bactérie) est coulé sous la hotte dans des boîtes de pétri stériles.

Le repiquage des disques mycéliens est réalisé juste après solidification du milieu (Figure 06). Les témoins négatifs contiennent le disque mycélien ensemencé au centre de la boîte du milieu PDA. L'incubation se fait à 28-30°C pendant 7 jours. L'essai est répété 3 fois pour chaque filtrat bactérien. L'activité antifongique a été déterminée en mesurant à l'aide d'une règle en métal la croissance radiale du pathogène estimée en millimètres.



**Figure 06 :** Méthode de dépôt pour le test de l'effet des inhibiteurs non volatiles produits par les antagonistes

### 7.3. Calcul du pourcentage d'inhibition

Pour le calcul du pourcentage d'inhibition (taux d'inhibition) dans le cas de la culture simultanée (co-culture), nous avons utilisé la formule suivante (Figure 07) (Macià-Vicente et al., 2008) :

$$\% = 100 (r1-r2) / r1$$

Et pour la deuxième méthode, nous avons utilisé cette formule (Figure 08) (Dennis et Weber.,1971) :

$$\% = 100(R-r) / R$$

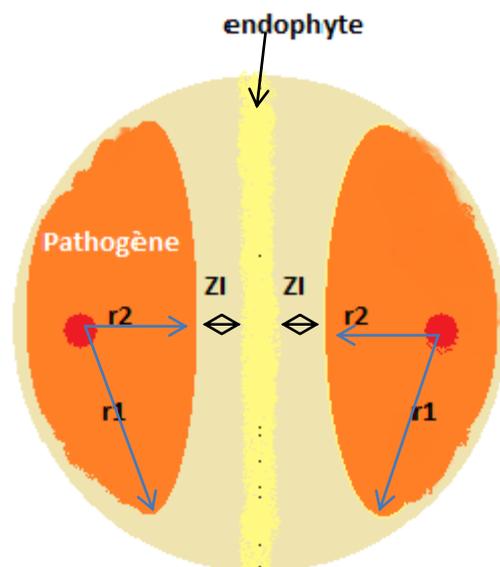
**R** : le rayon du témoin

**r** : le rayon du pathogène en présence du filtrat

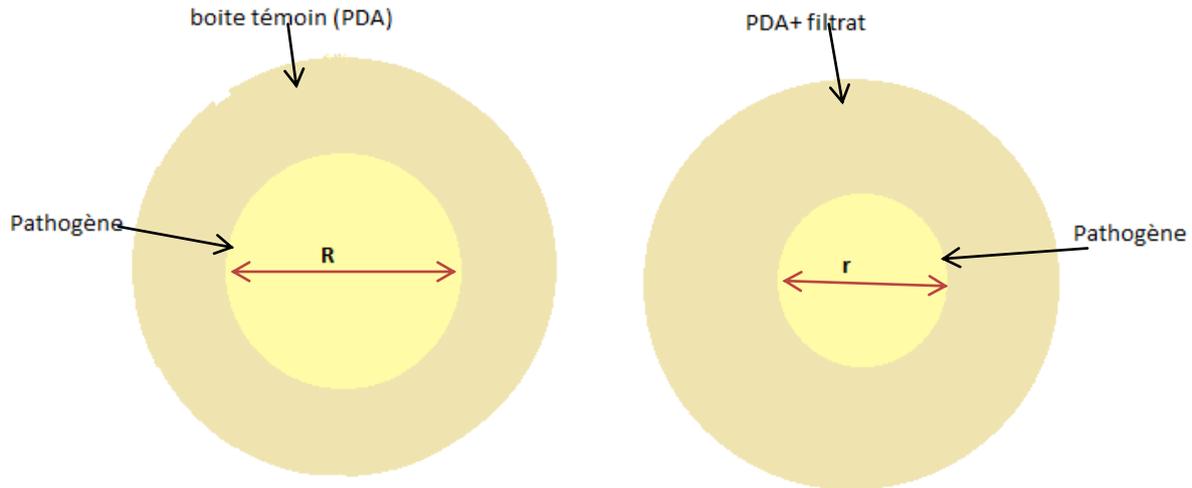
**r1** : petit rayon de la croissance mycélienne

**r2** : grand rayon de la croissance mycélienne

**IZ** : Zone d'inhibition



**Figure 07** : Schéma représentatif de la méthode de calcul de pourcentage d'inhibition pour la première méthode



**Figure 08 :** Schéma représentatif de la méthode de calcul du pourcentage d'inhibition pour la deuxième méthode

## 8. Tests d'identification des bactéries endophytes isolées et sélectionnées

### 8.1. Caractères cultureux sur milieu LPGA

Les isolats endophytes ont été mis en culture sur milieu LPGA dans des conditions de température de 28°C à l'étuve. Après 24h à 48h d'incubation, naissent des colonies bactériennes, ces dernières ont été décrites sur la base des caractères macroscopiques ; couleur, diamètre, relief, aspect et contour des colonies (Schaad *et al.*, 2001).

### 8.2. Test d'hypersensibilité sur le tabac (*Nicotiana tabacum var. Xanthi*)

Le test d'hypersensibilité sur le tabac permet de mettre en évidence le pouvoir pathogène d'une bactérie par le dessèchement ou nécrose des zones d'inoculation (Jones et Geider, 2001).

Les bactéries endophytes isolées sont testées pour leur pouvoir nécrogène, celles qui seraient pathogènes ne seront pas par conséquent sélectionnées, car, elles ne peuvent pas être utilisées pour le test d'antagonisme si elles présentent des caractères de pathogénicité.

Ce test se réalise par infiltration sous épidermique d'une suspension bactérienne d'une culture bactérienne jeune de 24 à 48 heures sur le limbe foliaire du tabac. La suspension infiltrée

d'une densité optique (DO) égale à 0,2 - 0,3, correspond à une concentration cellulaire bactérienne de  $10^7$  à  $10^8$ cfu/ml (Mabagala et Saettler, 1992).

Le témoin négatif consiste à faire infiltrer de l'eau distillée stérile au niveau du limbe foliaire du tabac. Pour le témoin positif, nous avons utilisé une souche pathogène d'*Erwinia amylovora* de la collection du laboratoire. Le test est considéré positif s'il apparaît au bout de 48-72 h, une plage nécrotique correspondant à la zone infiltrée, et il est négatif si aucune réaction n'est observée. Chaque isolat est inoculé sur une feuille, par conséquent, un plant peut servir pour plusieurs souches du moment que la réaction nécrotique est locale.

### 8.3. Tests biochimiques

#### 8.3.1. Coloration de la paroi des bactéries

La coloration de la paroi des bactéries a été réalisée selon la méthode de la coloration de Gram décrite par (Hildebrand *et al.*, 1988) et selon la technique du test KOH décrite par George et al ., (1983).

##### 8.3.1.1. La coloration de Gram

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

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

### **8.3.1.2. Le test au KOH**

Le test du KOH peut être utilisé en cas de doute sur les résultats d'une coloration de Gram. Il se base sur le fait que la paroi des bactéries à Gram négatif est lysée par le KOH alors que la paroi des bactéries à Gram positif n'est pas détruite. Chez les bactéries à Gram négatif, la lyse de la paroi libère l'ADN qui formera une substance visqueuse au contact du KOH.

Le test se réalise de manière extrêmement simple et rapide. Les cultures à examiner doivent être âgées de moins de 48 heures. Avec une effilure de pipette Pasteur, on prélève un fragment de la colonie bactérienne qui est placée dans deux gouttes d'une solution de KOH à 3%. Après avoir homogénéisé la culture dans le KOH durant 15 à 30 secondes, l'effilure de la pipette est retirée lentement du liquide.

Lorsque la bactérie est à Gram négatif, il se forme un filament visqueux bien visible. Pour une bactérie à Gram positif, la formation du filament n'est pas observée (George *et al.*, 1983).

### **8.3.2. Test de fluorescence sur milieu B de King**

Les colonies bactériennes ciblées sont prélevées individuellement et repiquées sur le KB. La production de pigments fluorescents est notée par la présence d'une couleur verdâtre diffusible sur le milieu gélosé King B, la fluorescence est visible sous lumière UV.

Le test est positif s'il y'a apparition de fluorescence allant du vert au bleu. Il est négatif en absence de fluorescence (Schaad *et al.*, 2001).

### **8.3.3. Test d'oxydase**

Le test oxydase permet de mettre en évidence la présence de l'enzyme cytochrome C oxydase. Nous avons utilisé une goutte de réactif de N, N, diméthylparaphénylène diamine sur un papier buvard stérile, pour réaliser une émulsion immédiate à l'aide d'une pipette pasteur sur le buvard imbibé. Le test est considéré positif si une couleur rose violacée apparaît, Le test est négatif en l'absence de coloration (Klement *et al.*, 1990).

#### **8.3.4. Test catalase**

Le test catalase sert à démontrer si la bactérie possède l'enzyme catalase servant à décomposer le peroxyde d'oxygène ( $H_2O_2$ ). Sur une lame en verre stérile, une goutte de peroxyde d'hydrogène (3%) est déposée à l'aide d'une pipette pasteur stérile. Les isolats bactériens âgés de 24 heures sont déposés dans la solution de peroxyde d'hydrogène à l'aide d'une pipette pasteur stérile. Après 2 minutes, la présence de bulles révèle le dégagement d'oxygène et par conséquent une réaction positive (Dickey, 1988).

#### **8.3.5. Fermentation du glucose (oxydation /fermentation)**

Une culture bactérienne âgée de 24 heures estensemencée sur le milieu Hugh and Leifson (Hugh et Leifson, 1953). Ce milieu semi solide est utilisé pour différencier entre la voie fermentative et la voie oxydative des bactéries antagonistes (Schaad *et al*, 1988).

Pour le test de fermentation, une couche d'environ 1 cm d'huile de vaseline stérile est additionnée à la surface du tube à l'aide d'une seringue et un filtre stérile pour éviter tout contact avec l'air.

Pour le test d'oxydation, seulement les bouchons des tubes à essai ne sont pas serrés puis, sont incubés pendant 48 à 72 heures à 27°C.

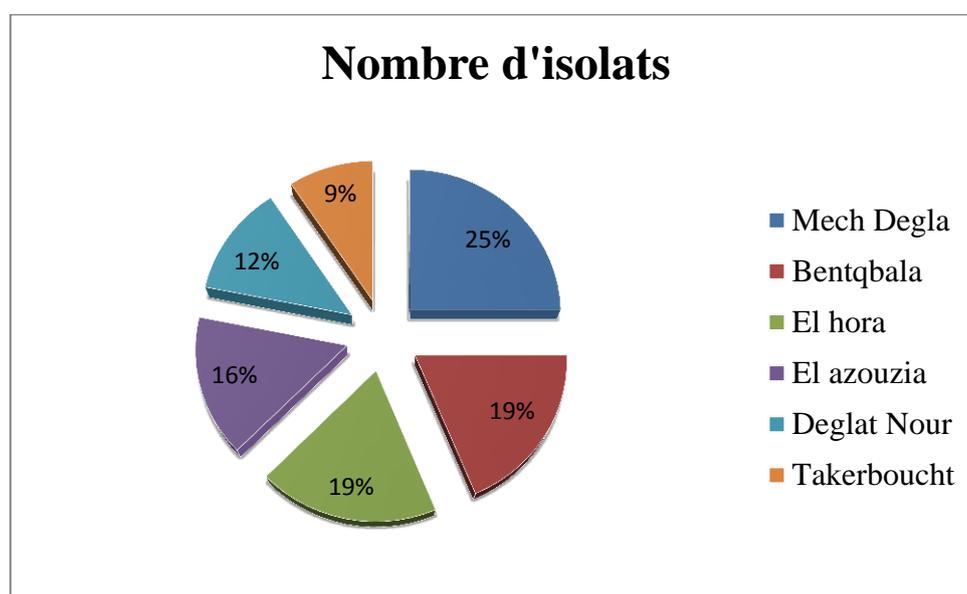
La présence d'une coloration jaunâtre indique la fermentation du glucose par la bactérie. Une réaction négative ne cause aucun changement de couleur et le milieu reste bleu.

# *Résultats et discussion*

### Résultats

#### 1. Les caractères cultureux des isolats sur milieu LPGA

À partir des six variétés de palmier dattier, nous avons isolé et purifié sur le milieu LPGA un total de 32 isolats bactériens (Figure 09). Les colonies bactériennes obtenues après 24-48h d'incubation ont été décrites sur la base des caractères cultureux suivants : le diamètre, la couleur, l'aspect et le contour, détaillés dans le tableau 04.



**Figure 09: Résultats des isolats endophytes bactériens isolées sur les différentes variétés de palmier-dattier.**

Sur un total de 32 isolats obtenus, 25% proviennent de la variété MechDegla, 19% à partir de deux variétés Bentqkala et El hora, 16% à partir de la variété Elazouzia, 12% à partir de la variété DeglatNour et 9% à partir de la variété Takarboucht. A partir des variétés de palmier dattier étudiées, nous avons isolé des bactéries endophytes qui présentent équitablement des valeurs rapprochées. Le dénombrement des isolats des variétés étudiées par variété est détaillé dans le tableau 05.

**Tableau 04 : Les caractères cultureux des trente-deux isolats endophytes cultivés sur milieu LPG**

Variété	Isolats	Couleur	Diamètre	Contour	Aspect
MechDegla	MD1	Crème	1.5	Régulier	Lisse
	MD2	Blanc Crème	2	Irrégulier	Crémeux
	MD3	Blanche	1.5	Régulier	Muqueux
	MD4	Blanc Crème	2	Irrégulier	Crémeux
	MD5	Jaune	1	Régulier	Muqueux
	MD6	Blanc Crème	2	Irrégulier	Crémeux
	MD7	Jaune Claire	2	Régulier	Lisse
	MD7.1	Beige	2	Irrégulier	Crémeux
Bentaqbala	Bq1	Blanc Crème	2	Irrégulier	Crémeux
	Bq1.1	Beige	3	Irrégulier	Crémeux
	Bq2	Blanche	2	Régulier	Lisse
	Bq3	Jaune Luisante	2	Régulier	Lisse
	Bq4	Blanc Cassé	2	Régulier	Muqueux
	Bq5	Jaune Claire	3	Régulier	Lisse
El hora	H1	Rouge	2	Régulier	Muqueux
	H1.1	Rouge Foncé	1	Régulier	Muqueux
	H2	Blanc Cassé	3	Régulier	Muqueux
	H3	Jaune	1	Régulier	Lisse
	H4	Blanc Crème	1	Régulier	Lisse
	H5	Jaune Foncé	2	Régulier	Muqueux
El azouzia	Az1	Jaune Claire	3	Régulier	Farineux
	Az2	Beige	2	Irrégulier	Crémeux
	Az3	Rouge	3	Régulier	Muqueux
	Az4	Blanc Cassé	3	Régulier	Muqueux
	Az4.1	Beige	3	Irrégulier	Crémeux
DeglatNour	DN1	Blanc Crème	1	Régulier	Lisse
	DN2	Jaune	2	Régulier	Lisse
	DN4	Beige	1	Irrégulier	Crémeux
	DN5	Blanche	3	Régulier	Lisse
Takerboucht	TK1	Beige	2	Régulier	Muqueux
	TK3	Beige	2	Irrégulier	Crémeux
	TK4	Blanc Cassé	3	Régulier	Muqueux

**Tableau 05 : Dénombrement des isolats des variétés étudiées**

Variété	Nombre de colonies	Code des isolats
MechDegla	8	MD1, MD2, MD3, MD4 MD5 MD6 MD7 MD7.1
Bentqbala	6	Bq1, Bq1.1, Bq2, Bq3, Bq4, Bq5
El hora	6	H1, H1.1, H2, H3, H4, H5
El azouzia	5	Az1, Az2, Az3, Az4, Az4.1
DeglatNour	4	DN1, DN2, DN4, DN5
Takerboucht	3	TK1, TK3, TK4

## 2. Antagonisme *in-vitro*

Après purification des isolats obtenus (32 isolats), nous avons testé leur pouvoir antagoniste vis-à-vis d'une souche pathogène de *Fusarium oxysporum* f.sp *albedinis*. En premier lieu, nous avons utilisé la méthode de confrontation appelée également "technique des cultures opposées". Pour la seconde technique, nous avons évalué l'inhibition par l'utilisation des filtrats bactériens, mais uniquement les isolats qui ont donné un résultat positif lors de la première méthode (11 isolats) (Tableau 06).

**Tableau 06 : Dénombrement des isolats à effet antagoniste positif**

Variété	Nombre de colonies/total et taux en %	Code des isolats
MechDegla	4/8 (50%)	MD <sub>2</sub> MD <sub>4</sub> MD <sub>6</sub> MD <sub>7.1</sub>
Bentqbala	1/6 (16.67%)	Bq <sub>1</sub>
El hora	1/6 (16.67%)	H <sub>4</sub>
El azouzia	2/5 (40%)	Az <sub>2</sub> Az <sub>4.1</sub>
DeglatNour	2/4 (50%)	DN <sub>1</sub> DN <sub>4</sub>
Takerboucht	1/3 (33.33%)	TK <sub>3</sub>

Les isolats ont montré différentes réactions vis-à-vis du F.o.a, les résultats obtenus se présentent de diverses manières pour les deux méthodes de test d'antagonisme utilisées (Figure 10) et (Figure 11).

### 2.1. Inhibition par dépôt simultané (co-culture)

A partir des 32 isolats, 11(34,37%) isolats ont un effet antagoniste contre le F.o.a, et les valeurs du taux d'inhibition sont variables. La valeur du taux d'inhibition la plus élevée est de 43,33% elle est induite par l'isolat MD<sub>6</sub> de la variété Mech Degla, suivie par l'isolat MD<sub>7.1</sub> de la même variété avec un taux de 40,37%. Comparativement, les autres taux varient de 33% à 39% alors que le taux le plus faible est enregistré par l'isolat H<sub>4</sub> avec une valeur de 27,5% (Tableau 07) et (Figure 10).

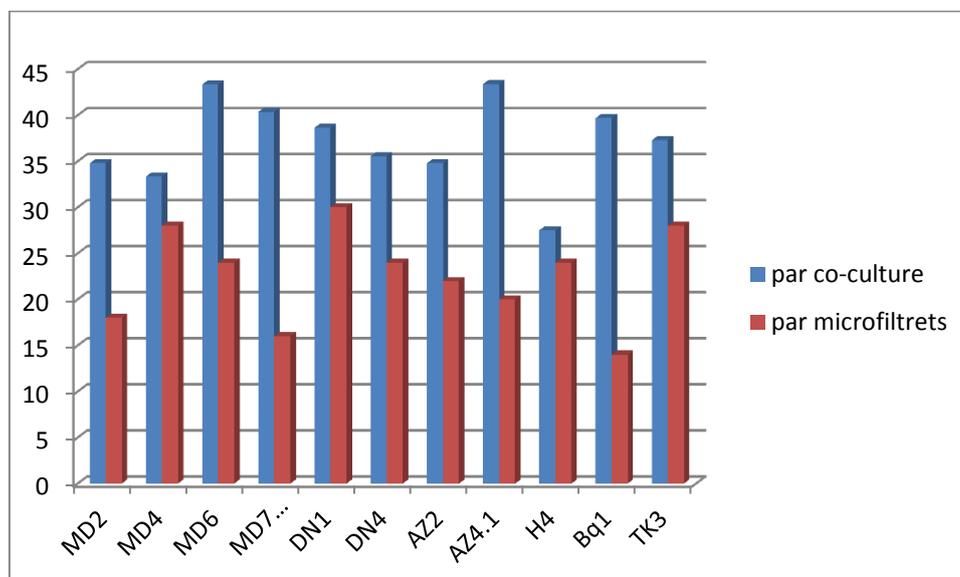
### 2.2. Inhibition par utilisation des filtrats bactériens

Cette technique a été testée sur les 11 isolats qui ont montré un résultat positif lors du premier test d'antagonisme et les valeurs des taux d'inhibitions sont variables. La valeur la plus élevée correspond à 30%, elle est induite par l'isolat DN<sub>1</sub> de la variété Deglet Nour et la plus faible affiche un taux de 14%, elle est enregistrée par l'isolat Bq<sub>1</sub> de la variété Benteqbala (Tableau 07) et (Figure 11).

**Tableau 07 : Comparaison du taux d'inhibition des deux méthodes utilisées pour le test d'antagonisme**

Souches	Interaction	Par co-culture %	Après microfiltration %
MD <sub>2</sub>	F.o.a/MD <sub>2</sub>	<b>34.78</b>	<b>18</b>
MD <sub>4</sub>	F.o.a/MD <sub>4</sub>	<b>33.33</b>	<b>28</b>
MD <sub>6</sub>	F.o.a/MD <sub>6</sub>	<b>43.33</b>	<b>24</b>
MD <sub>7.1</sub>	F.o.a/MD <sub>7.1</sub>	<b>40.37</b>	<b>16</b>
DN <sub>1</sub>	F.o.a/DN <sub>1</sub>	<b>38.63</b>	<b>30</b>
DN <sub>4</sub>	F.o.a/DN <sub>4</sub>	<b>35.56</b>	<b>24</b>
Az <sub>2</sub>	F.o.a/Az <sub>2</sub>	<b>34.78</b>	<b>22</b>
Az <sub>4.1</sub>	F.o.a/Az <sub>4.1</sub>	<b>42.39</b>	<b>20</b>
H <sub>4</sub>	F.o.a/H <sub>4</sub>	<b>27.5</b>	<b>24</b>
Bq <sub>1</sub>	F.o.a/Bq <sub>1</sub>	<b>39.68</b>	<b>14</b>
TK <sub>3</sub>	F.o.a/TK <sub>3</sub>	<b>37.28</b>	<b>28</b>

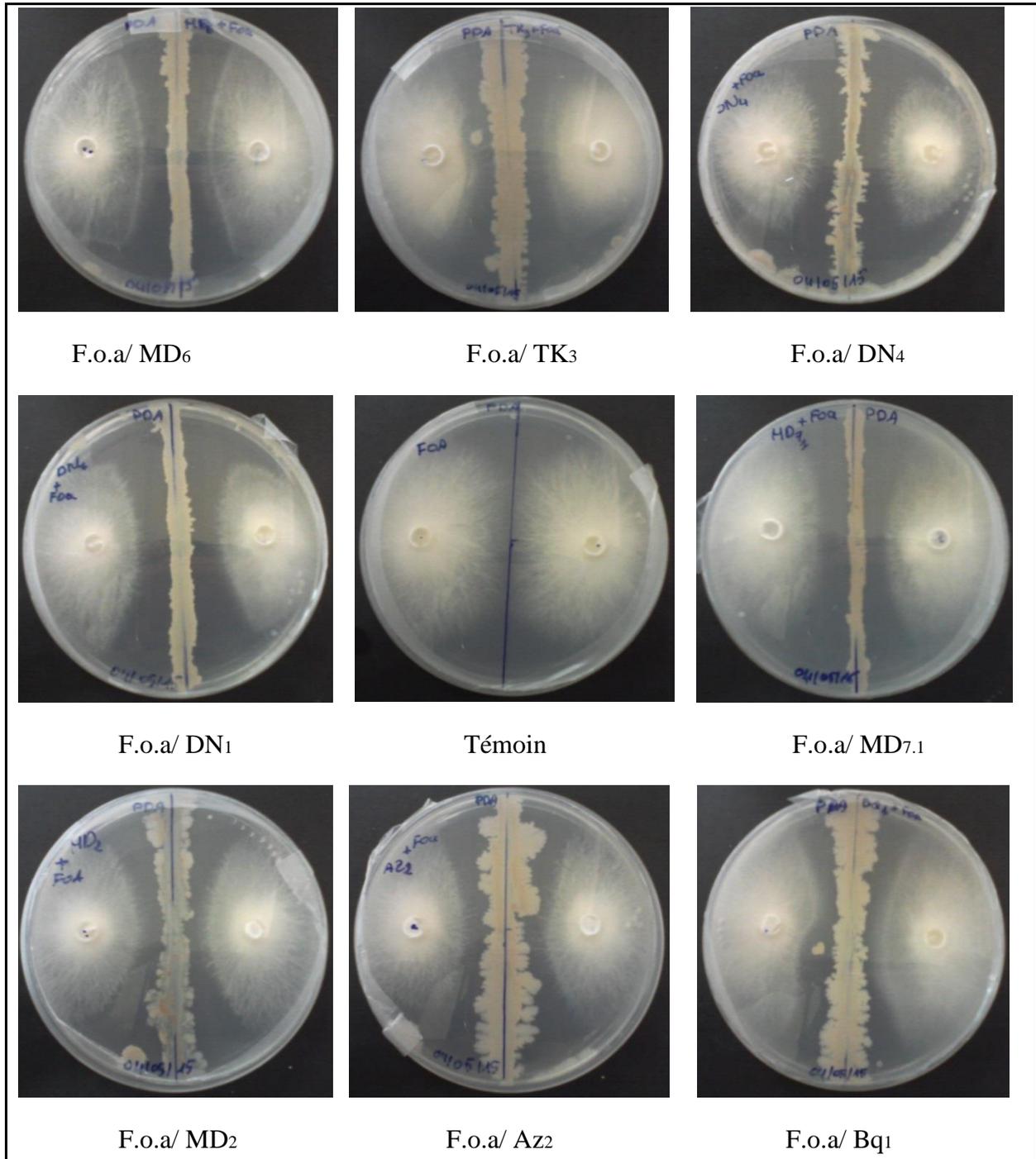
Concernant la première méthode du dépôt simultané (co-culture), les résultats montrent que 100% des isolats endophytes qui ont un effet positif (11 souches) ont présenté un taux d'inhibition important (supérieur à 20%). Cependant, lors de l'essai de la deuxième méthode d'inhibition par l'utilisation des filtrats bactériens, 63,63% des isolats endophytes présentent un taux d'inhibition supérieur à 20% (Figure 12).



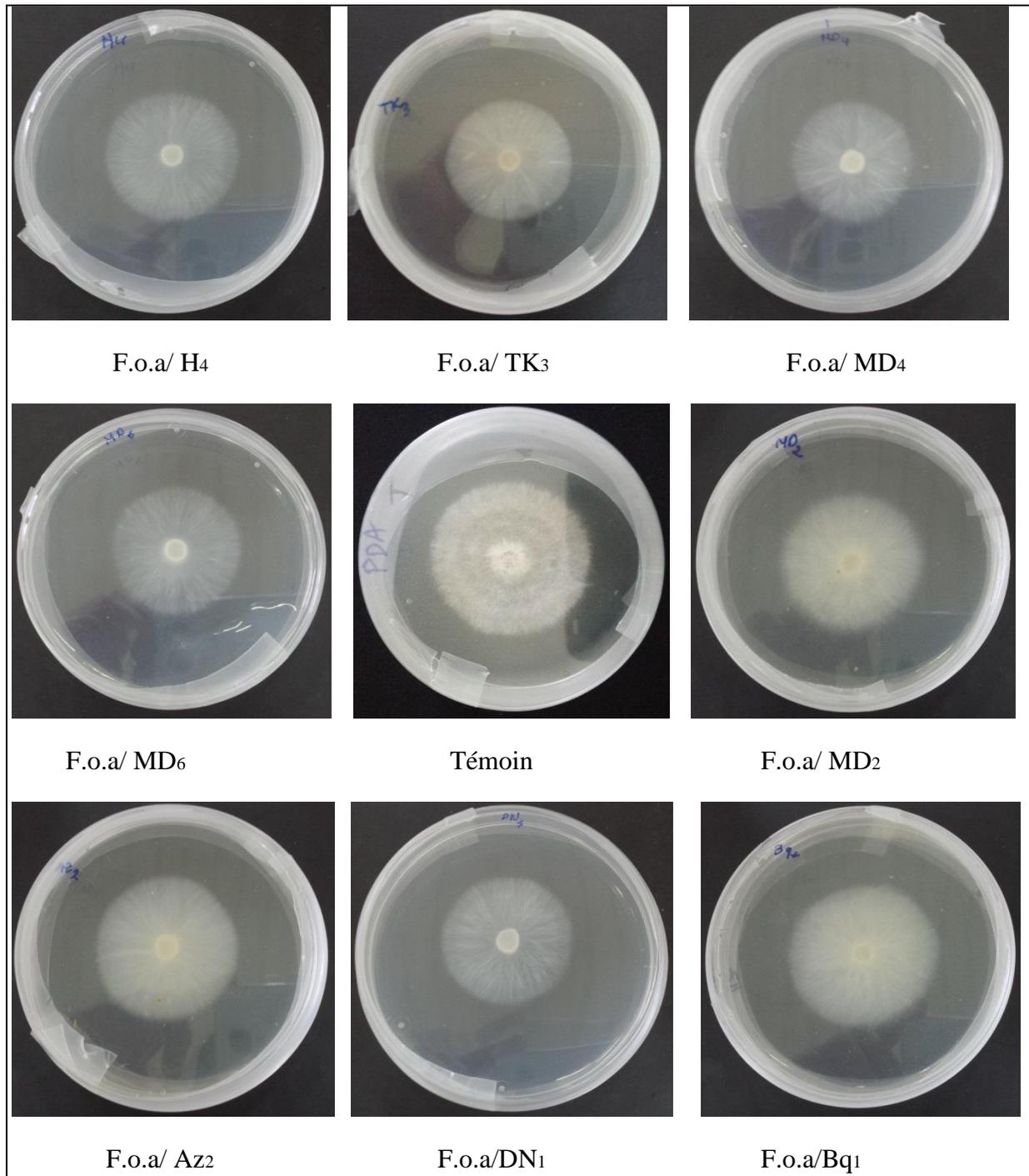
**Figure 12 :** Taux d'inhibition des isolats après les deux traitements vis-à-vis le F.o.a.

Les isolats MD2, MD7.1, AZ4.1 et Bq1 montrent un taux d'inhibition inférieur à 20% lors de la méthode par microfiltrats, par contre, leurs taux sont supérieurs à 30% pour la méthode de co-culture.

Il semble par conséquent que la méthode de culture simultanée de l'endophyte/organisme phytopathogène soit plus efficace par rapport à la technique d'évaluation par les produits de métabolisme (microfiltration). Ce résultat peut être expliqué par le fait que la bactérie vivante et active métaboliquement, présente un effet antagoniste important alors qu'une fois filtrée, il y'a une perte de son activité antagoniste.



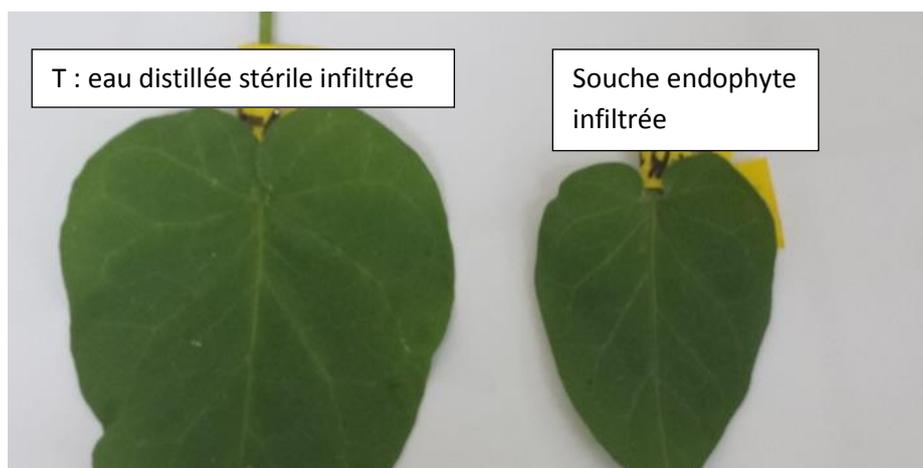
**Figure 10 :** Effet des isolats bactériens endophytes du palmier dattier à l'égard du F.o.a par confrontation directe en boîte de Pétri après 5 jours.



**Figure 11 :** Effet des isolats endophytes du palmier dattier à l'égard du F.o.a par utilisation des filtrats bactériens après 5 jours.

### 3. Réaction au tabac

La réaction d'hypersensibilité donne une indication sur la présence de gènes de pathogénie chez les bactéries isolées. Les résultats sont obtenus après 15 jours, les 11(100%) souches ont montré une réaction négative comme celle du témoin (eau distillée stérile), donc pas d'effet pathogène enregistré (Figure13).



**Figure 13 :** Réaction d'hypersensibilité sur feuille du tabac après une semaine d'inoculation (T : témoin).

### 4. Caractérisation biochimique

#### Fluorescence sur le milieu King B

Le test de fluorescence sur King B est négatif pour tous les isolats (Tableau 08). Les souches ne produisent pas de pigments fluorescents lorsqu'ils sont visualisés sous une lampe à UV.

#### La coloration de Gram et Test du KOH

Les 11 isolats sont de couleur violette après coloration donc ce sont des Gram positives et sous le microscope optique elles apparaissent sous différentes formes (bâtonnets, Cocci et coccobacille) (Tableau 09).

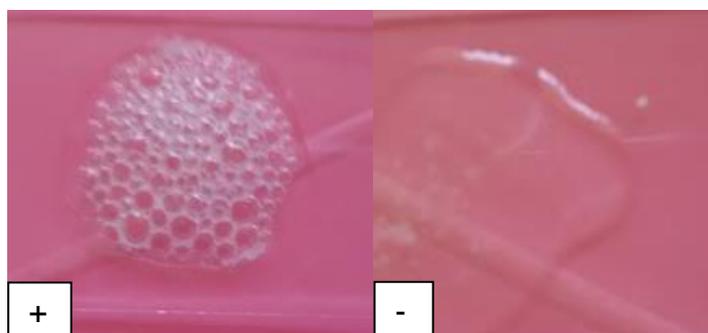
Le test du KOH a confirmé les résultats de la coloration de Gram, toutes les souches sont à Gram positives.

**Tableau 09 : Résultats de coloration de Gram.**

Type de souche	Nombre de souches (%)	Total	
Bâtonnet Gram+	7 (63,63%)	7	11
Bâtonnet Gram-	0 (0%)		
Cocci Gram+	1 (9,09%)	1	
Cocci Gram-	0 (0%)		
Coccobacille Gram+	3 (27,27%)	3	
Coccobacille Gram-	0 (0%)		

### Activité catalase

Le test de la catalase a montré que 90,90% des isolats sont catalase positive. La réaction montre un dégagement de bulles après le dépôt du peroxyde d'hydrogène (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) sur la colonie de l'isolat endophyte (Figure 14). Cependant, 9.09% des isolats sont catalase négative (Tableau 08).



**Figure 14 : Réaction au test catalase.**

### Activité cytochrome oxydase

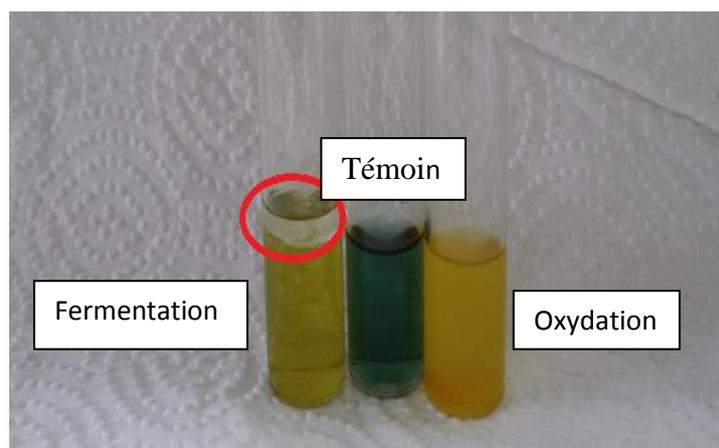
L'étalement des isolats sur le disque de papier buvard stérile et la révélation par le réactif Oxalate de diméthylparaphénylène-diamine est resté incolore sur 45,45% des isolats, ce qui signifie que le test oxydase est négatif. Cependant, 54,54% des isolats, produisent une coloration bleu-violette en présence du réactif ce qui signifie que le test oxydase est positif (Tableau 08).



**Figure 15** : Résultat de l'activité Cytochrome oxydase (A : positif, B : négative).

### Type respiratoire : oxydation /fermentation

Le test d'oxydation est positif pour l'ensemble des isolats (90,90%), le test fermentation est positif pour 54,54% des isolats. Par conséquent, 45,45% des isolats assurent les deux types de métabolisme ; oxydatif et fermentatif (Tableau 08).



**Figure 16** : Résultat du test d'oxydation/fermentation.

**Tableau 08** : Caractéristiques biochimiques des isolats bactériens endophytes étudiées.

Isolats	Test d'hyper sensibilité	Fluorescence sur milieu King B	Test de catalase	Test d'oxydase	Test d'oxydation	Test de fermentation	Coloration de Gram	Test de KOH
<b>MD2</b>	-	-	+	-	+	-	+	+
<b>MD4</b>	-	-	+	-	+	-	+	+
<b>MD6</b>	-	-	+	+	-	+	+	+
<b>MD7.1</b>	-	-	+	+	+	-	+	+
<b>DN1</b>	-	-	+	+	+	+	+	+
<b>DN4</b>	-	-	+	+	+	+	+	+
<b>Az2</b>	-	-	+	+	+	+	+	+
<b>Az4.1</b>	-	-	+	+	+	+	+	+
<b>H4</b>	-	-	-	-	+	-	+	+
<b>Bq1</b>	-	-	+	-	+	+	+	+
<b>TK3</b>	-	-	+	-	+	-	+	+

D'après les tests biochimiques (coloration de Gram, catalase, oxydase, test de fluorescence sur le milieu King B, oxydation/fermentation) (Tableau 10), nous pouvons seulement supposer des hypothèses concernant l'identification du genre bactérien des endophytes isolés. Par contre, pour identifier jusqu'au rang de l'espèce, des tests moléculaires seront nécessaires.

Les isolats Bq<sub>1</sub>, DN<sub>1</sub>, DN<sub>4</sub>, MD<sub>7.1</sub>, AZ<sub>2</sub> MD<sub>4</sub> et MD<sub>2</sub> seraient probablement du genre *Bacillus*. : Le genre *Bacillus* représente un groupe hétérogène de bactéries en forme de bâtonnets droit ou légèrement incurvés, à gram positif, aérobie ou anaérobie facultative, mais certaines espèces peuvent être anaérobies strictes (De Vos et al., 2009). Ces bactéries se présentent isolées, en paires ou en chaînettes. Elles sont catalase positive, capable de croître sur des milieux ordinaires comme exemple la gélose nutritive (De Vos et al., 2009). La morphologie de leurs colonies est très variable entre et au sein des espèces. Nos résultats concordent avec ceux des auteurs cités ci-dessus, du fait des réponses biochimiques et de l'hétérogénéité des formes microscopiques des isolats et les caractères macroscopiques des colonies obtenues.

Les isolats MD<sub>6</sub>, TK<sub>3</sub> et AZ<sub>4.1</sub> ont presque les mêmes caractères du genre *Bacillus* mais leur forme est en coccobacille donc on suppose qu'ils seraient probablement des *Bacillus*.

Par contre, l'isolat H<sub>4</sub> présente les mêmes caractères macroscopiques que les isolats précédents mais les caractères biochimiques sont complètement différents. Ce résultat nous amène à supposer qu'il s'agit d'un autre genre de bactéries à Gram +, qui sont également hébergés par les plantes avec lesquelles elles entretiennent une interaction de type endophytique.

Tableau 10 : Résultats de la caractérisation macroscopique et microscopique des 11 isolats bactériens endophytes

Isolats	Etude microscopique					Etude macroscopique			
	Test de catalase	Test d'oxydase	Test d'oxydation	Test de fermentation	Gram	Couleur	Diamètre Mm	Contour	Aspect
MD2	+	-	+	-	Bacille+	Blanc Crème	2	Irrégulier	Crémeux
MD4	+	-	+	-	Bacille+	Blanc Crème	2	Irrégulier	Crémeux
MD7.1	+	+	+	-	Bacille+	Beige	2	Irrégulier	Crémeux
Bq1	+	-	+	+	Bacille+	Blanc Crème	2	Irrégulier	Crémeux
DN4	+	+	+	+	Bacille+	Beige	1	Irrégulier	Crémeux
AZ2	+	+	+	+	Bacille+	Beige	2	Irrégulier	Crémeux
DN1	+	+	+	+	Bacille+	Blanc Crème	1	Régulier	Lisse
AZ4.1	+	+	+	+	Coccobacille+	Beige	3	Irrégulier	Crémeux
TK3	+	-	+	-	Coccobacille+	Beige	2	Irrégulier	Crémeux
MD6	+	+	-	+	Coccobacille+	Blanc Crème	2	Irrégulier	Crémeux
H4	-	-	+	-	Cocci+	Blanc Crème	1	Régulier	Lisse

### Discussion

L'étude entreprise dans le présent travail a pour but d'analyser les bactéries endophytes du palmier dattier, étudier leurs pouvoir antagoniste *in-vitro* à l'égard du l'agent causal du bayoud *Fusarium oxysporum* f.sp. *albediniset* l'identification biochimique des souches qui ont donné un résultat antagoniste positif. Il ressort de cette étude que les bactéries endophytes hébergées par les variétés de palmier dattier sont toute à Gram+ mais, elles présentent une diversité des caractères biochimiques et microscopiques.

Un total de 32 isolats bactériens différents ont été isolés à partir des tissus racinaires, la sélection de ces isolats s'est faite sur la base de leur antagonisme vis-à-vis du F.o.a par la méthode de confrontation directe ou co-culture en boîte de Pétri. Parmi les 32 isolats, 34,37% (11 isolats) qui ont eu un effet d'antagonisme positif et 100% de ces isolats ont donné un taux d'inhibition supérieur à 20%. Pour confirmer la capacité d'antagonisme de ces 11 isolats, nous avons opté pour une deuxième méthode : la méthode de confrontation par effet des inhibiteurs non volatiles produits par les antagonistes. Cette dernière méthode a donné des résultats d'antagonisme positifs et a confirmé la précédente, mais, seulement 63,63% des isolats ont révélé un taux d'inhibition supérieur à 20%. Cependant, la méthode de confrontation directe a montré une forte activité antagoniste des 11 isolats différents par rapport à la méthode de confrontation par effet des inhibiteurs non volatiles produits par les antagonistes. D'après Dennis & Webster (1971), l'efficacité du mode d'action lors d'une confrontation directe est supérieure au mode d'action des inhibiteurs non volatiles. En effet, il ressort de ces deux tests que nous sommes en présence d'endophytes bactériens qui se manifestent plus efficacement lors de leur confrontation directe, tandis que leur action est réduite lors de l'utilisation de leurs métabolites. Ces résultats signalent par conséquent l'existence de souches bactériennes actives envers le F.o.a, cette activité diffère d'une souche à une autre. La bibliographie rapporte que ces endophytes agissent par sécrétion de substances antifongiques qui diffusent dans le milieu de culture et inhibent la croissance du F.o.a, cette interaction est appelée antibiose elle caractérise les microorganismes en général et particulièrement dans notre cas les endophytes(Cheng *et al.*, 2001).

L'antagonisme microbien, lié à la production de métabolites ayant des propriétés antibiotiques, est également un mécanisme par lequel les bactéries rhizosphériques protègent les plantes contre les microorganismes phytopathogènes (van Loon, 2007; Mazurier *et al.*, 2009).

L'identification de ces isolats endophytes (les 11 souches) a été faite en premier par leur caractérisation morphologique, en se basant sur les traits culturels ; couleur, diamètre, contour, et aspect. Cette dernière étude a montré une ressemblance dans ces caractères, il est important de rappeler que ces traits culturels sont insuffisants pour l'identification, la caractérisation morphologique est une étape qui reste nécessaire pour différencier ces organismes, car elle donne une indication sur la variation entre les isolats des bactéries endophytes (Becker *et al.* , 1985).

L'observation microscopique de la coloration de Gram, met en évidence une caractéristique structurale des parois bactériennes. La coloration de Gram effectuée sur les onze isolats, a permis de les classer en Gram positifs. Zinniel *et al.* (2002) indiquent une présence à proportions égales entre les bactéries endophytes à Gram positif et ceux à Gram négatif.

En complément de cette étude morphologique, il était nécessaire de procéder à l'étude biochimique pour ces bactéries endophytes. La caractérisation biochimique des onze isolats endophytes antagonistes a révélé une légère diversité métabolique de ces endophytes.

Sur les onze isolats des bactéries endophytes à Gram positif, sept isolats ont été caractérisés en tant que membres du genre *Bacillus* ssp., du fait qu'ils possèdent les caractéristiques morphologiques des colonies et les caractéristiques biochimiques du genre *Bacillus* spp. (Bacilles de grande taille, catalase positive, aéro/anaérobie facultatifs). Cependant, trois isolats manifestent les mêmes caractéristiques biochimiques mais leur structure se présente sous forme de coccobacilles, on peut supposer qu'ils appartiennent aussi au genre *Bacillus* ou bien à un autre genre apparenté.

Le genre *Bacillus* représente un groupe hétérogène de bactéries en forme de bâtonnets droit ou légèrement incurvés, à gram positif, aérobies ou anaérobies facultatives, mais certaines espèces peuvent être anaérobies strictes. Elles sont capables de former des endospores résistantes à différentes conditions telles que la température, les radiations, les désinfections et la dessiccation (De Vos *et al.*, 2009).

Ces bactéries se présentent isolées, en paires ou en chainettes. Elles sont catalase positive, capable de croître sur des milieux ordinaires comme exemple la gélose nutritive. La morphologie de leurs colonies est très variable entre les espèces d'un même genre et au sein des souches appartenant à une même espèce. La composition du milieu de culture et les

conditions d'incubation influent sur cette morphologie. Mais, malgré cette diversité, les colonies du genre *Bacillus* ne sont pas difficiles à identifier (De Vos *et al.* ; 2009).

Les espèces du genre de *Bacillus* possèdent une diversité physiologique et métabolique importante et des capacités qui leur permettent de survivre dans des habitats extrêmes, elles peuvent être thermophiles, psychrophiles, acidophiles, alcalophiles, halotolérants ou halophiles (Awais *et al.* , 2007).

Le genre *Bacillus* est parmi les microorganismes les plus abondants et omniprésents dans la nature (Bron *et al.* , 1999), son principal habitat est le sol surtout pour les espèces saprophytes où elles jouent un rôle important dans les cycles biogéochimiques du carbone et de l'azote où le matériel végétal et les exsudats racinaires représentent des sources importantes de nutriments organiques (Dahl, 1999). Ce genre a également été signalé dans des environnements extrêmes comme les déserts, l'antarctique et les habitats hypersalins. Par conséquent, la caractéristique la plus importante de ce genre réside dans le fait qu'il peut être hébergé dans plusieurs niches écologiques en raison de sa capacité de former des endospores (Priest, 1993). Bien que les Haloarchaea soient mieux adaptées aux salinités élevées, les *Bacillus* halophiles et halotolérants sont largement répartis dans différents environnements salins et hypersalins (McGenity *et al.* , 2000).

De nombreux *Bacillus* halotolérants ont été décrits, ils peuvent croître entre 0 à 10% (p/v) de NaCl comme *Bacillus luteolus* (Shi *et al.*, 2011) et *Bacillus sahariensis* (Lee *et al.* , 2006). Aussi, d'autres espèces peuvent croître entre 0 à 25%(p/v) de NaCl comme la souche isolée du lac d'El Goléa et qui a été affiliée au genre *Bacillus* (KloucheKhelil, 2013). Il serait par conséquent intéressant d'étudier le comportement des souches endophytes isolées par rapport à leur tolérance à la salinité et aux températures extrêmes du fait du lieu géographique de la plante hôte qui est le palmier dattier à partir duquel les prélèvements ont été effectués (Biskra et Ghardaia).

Grace à son omniprésence dans la nature ainsi que sa diversité métabolique et génétique, le genre *Bacillus* se classe en tête dans les activités de production de différents enzymes, substances antimicrobiennes et des insecticides (Bron *et al.* , 1999). Le genre *Bacillus* est devenu très exploité dans plusieurs applications biotechnologiques (Priest., 1993). Son action envers les champignons peut se manifester aussi soit par une inhibition de la

germination des spores, ce phénomène est connu sous le nom de mycostase soit par une lyse du mycélium des champignons; c'est la mycolyse. Cette activité est due à la présence de substances inhibitrices libérées dans le sol, en particulier ; les antibiotiques. La mycostasie est influencée par plusieurs facteurs notamment: le type de sol, les facteurs chimiques, physiques et biologiques d'un sol, espèces de champignons, apport de substances nutritives et organiques. Le pouvoir mycolytique est aussi présent chez les bactéries, notamment chez les espèces appartenant aux genres *Bacillus* (Curl et Truelove 1986). Parmi les bactéries endophytes, plusieurs genres sont considérés maintenant comme des producteurs d'antibiotiques ou d'enzymes hydrolytiques. Elles appartiennent généralement aux genres *Bacillus* (Podile et Prakash 1996 ; Nielsen et Sorensen 1997,)

Des espèces d'endophytes du genre *Bacillus* (*B. amyloliquefaciens*; *B. pumilus* , *B. subtilis* *B. cereus*) ont été testés à l'égard du F.o.a , ces souches ont un effet antagoniste sur le F.o.a mais cet effet, differt d'une espèce à une autre. Les espèces *B. pumilus*, *B. cereus* ont donné des taux d'inhibition supérieurs à 70% par contre, les espèces *B. amyloliquefaciens* et *B. subtilis*. ont donné des taux inférieurs à 25% (El Hassani *et al.* , 2006).

Les variétés de palmier dattier analysées pour la présence et l'activité antagoniste des bactéries endophytes ont montré qu'elles ne présentent pas les mêmes proportions. La variété Mech Degla comporte un taux de 50% d'isolats efficaces. En seconde position se classe la variété El azouzia avec 40% d'isolats, ensuite, Takarboucht à 33,33%, par contre, les variétés Bentaqbala et El hora manifestent les plus faibles taux (16,67%). En comparant les taux précédents des variétés résistantes au bayoud à celui de la variété DegletNour sensible au F.o.a, nous remarquons que cette dernière héberge également des bactéries endophytes antagonistes envers le F.o.a. à un taux de 50%.

Les variétés du palmier dattier résistantes au F.o.a hébergent dans leurs racines des bactéries endophytes qui ont un effet d'antagonisme vis-à-vis du F.o.a. Les travaux de Neji (2012), ont mis en évidence une flore bactérienne endophyte associée au compartiment racinaire de la plante saine, ces espèces peuvent servir ultérieurement d'indicateurs de bonne santé du palmier. Ces mêmes travaux ont mis en évidence des activités d'antagonisme une souche endophyte d'*Arthrobactera gilis* à l'égard du pathogène majeur du palmier dattier, *Fusarium oxysporum* fsp *albedinis*.

# *Conclusion*

L'étude entreprise dans le présent travail nous a permis en premier lieu de constater une diversité de bactéries endophytes isolées des différentes variétés de palmier dattier. Un total de 32 isolats différents a été recensé à la fois des variétés résistantes et de la variété sensible.

Deux méthodes de tests d'antagonisme *in-vitro* ont été adoptées pour étudier l'activité des isolats endophytes vis-à-vis du *Fusarium oxysporum* f. sp. *albedinis* (F.o.a). Les résultats révèlent différentes réactions des isolats. Parallèlement, la méthode de détermination de l'antagonisme présente une influence sur le taux d'inhibition lors de la co-culture. Les taux d'inhibition les plus élevés sont représentés par ceux des souches MD<sub>6</sub>, MD<sub>7.1</sub> et Az<sub>4.1</sub> isolées de la variété Mech Deglat et Elazouzia.

Les bactéries isolées ont été identifiées et caractérisées par des méthodes biologiques et biochimiques. Un nombre important de souches isolées non antagonistes a été éliminé, celles montrant une réaction d'antagonisme ont été retenues. Les résultats obtenus ont montré que sur un total de 32 isolats bactériens, nous avons décelé seulement 34,37% de bactéries antagonistes. La totalité des isolats bactériens se sont révélés non pathogènes par le test d'hypersensibilité sur le tabac. L'utilisation de quelques méthodes biochimiques basées sur la coloration de Gram, le test oxydase, le test catalase, le test de fluorescence sur le milieu King B et le type respiratoire, nous a par la suite permis d'orienter le diagnostic en supposant que la plupart des bactéries appartiennent au genre *Bacillus*, et que ce genre regroupe des espèces endophytes largement décrites pour leurs diverses activités biologiques.

Les résultats obtenus par cette étude sont préliminaires et basés sur des techniques de laboratoire classiques, ils ouvrent des perspectives futures notamment pour :

- étudier d'une manière plus approfondie dans un but d'identification moléculaire ces isolats et déterminer l'espèce
- tester ces bactériens pour des rôles divers dans la résistance de la plante contre les divers types de stress biotique et abiotique ou la stimulation de la croissance du palmier dattier.

*Références  
bibliographiques*

- ❖ **Arnold, A.E., Mejia, L.C., Kylo, D., Rojas, E.I., Maynard, Z., Robbins, N. and Herre, E.A., 2003.** Fungal endophytes limit pathogen damage in a tropical tree. *Proceedings of the National Academy of Science of the U.S.A*, 100: pp 15649-15654.
- ❖ **Alexopoulos, C.J., Mims, C.W and Blackwell, M., 1996 .**Introductory mycology. Wiley, New York, USA.
- ❖ **Anonyme. 200.** Statistiques agricoles : Superficies et productions. Ministère de awamia, 15 : 37-45.
- ❖ **Backman, L., Robins-Wahlin, T.B., Lundin, A., Ginovart, N., Farde, L., 1997.** Cognitive deficits in Huntington’s disease are predicted by dopaminergic PET markers and brain volumes. *Brain* 120, 2207–2217.
- ❖ **Bacon, C. W., and J. F. White. 2000.** Microbial endophytes. Marcel Dekker Inc., New York, N.Y.
- ❖ **Belguedj M., 2009.** Evaluation du sous-secteur des dattes en Algérie. INRAA El-Harrach.
- ❖ **Benhamou N. and Chet I., 1996.** Parasitism of sclerotia of *Sclerotium rolfsii* by *Trichoderma harzianum*:ultrastructural and cytochemical aspects of the interaction. *Phytopathology* **86**, p. 405–416.
- ❖ **Boddey R. M. and Dobereiner J. 1982.** Association *Azospirillum* and other diazotrophs with tropical gramineae. In: International congress of soil science, 12, New Delhi , India. Non-symbiotic nitrogen fixation and organic matter in the Tropic , p. 28-47.
- ❖ **Bounaga N., 1975.** Germination de microconidies et macroconidies de *Fusarium oxysporum* f. sp. *Albedenis* Bull. Sco. Hist. Nat. Afr. Nord, 66 :39-44
- ❖ **Bowen, H.J.M., 1979.** Environmental Chemistry of the Elements. Academic Press, London, UK, 333 pp.
- ❖ **Chaintereuil, C., Girand, E., Prin, Y., Loruin, J., Dreyfus, B., 2000.** Photosynthetic bradyrhizobia are naturel endophytes of the african wildrice *oryza breviligulata*. *Appl. Environ. Microbia* 66: pp 5437-5447.
- ❖ **Chakroune K., 2006.** Valorisation des sous-produits organiques du palmier dattier par compostage. Contribution à la lutte contre la fusariose vasculaire (Bayoud). Thèse de Doctorat, Faculté des Sciences, Université Mohammed Premier-Oujda. 136-140.

- ❖ **Chakroune, K., Bouakka, M., Hakkou, A., 2005.** Incidence de l'aération sur le traitement par compostage des sous produits du palmier dattier contaminés par *Fusarium oxysporum f.sp. albedinis*. *Can.J. Microbiol.* 51 : 69-77.
- ❖ **Chakroune, K., M. Bouakka, R. Lahlali, A. Hakkou, 2008.** Suppressive Effect of Mature Compost of Date Palm Byproducts on *Fusarium oxysporum f.sp. albedinis*. *Plant Pathology Journal*.
- ❖ **Dennis C. et Webster J., 1971.** Antagonistic properties of species group of *Trichoderma* II. Production of non-volatile antibiotics. *Trans Br Mycol Soc* 57: 25-39
- dialysis. *Nephrol. Dial. Transpl.*, 1995, 10 (1) : 114-116.
- ❖ **Dickey R. S. Kelman A., 1988.** In plant pathogenic bacteria, laboratory guide for identification , Shaad (Ed) N.W.APS.Minnesotc.USA, 158p.
- ❖ **Djerbi M., 1994.** Précis De Phoéniculture. Ed. Fao, Rome: 192p
- ❖ **Djerbi, M., 1982 .** Bayoud disease in North Africa: history, distribution, diagnosis and control. *Date palm Journal*, 1 (2): 153-97.
- ❖ **Djerbi, M., 1983.** Diseases of the date palm (phoenix dactylifera L.).F.A.O. Regional Project for Palm and Dates Research Centre in the Near East and North Africa. 106 p.
- ❖ **Djerbi, M., 1988.** Les maladie des palmiers dattiers : Le Bayoud (15-36). Rapport de Projet Régional de lutte contre le Bayoud (RAB/84/018). Djerbi, M., 1990. Méthodes de diagnostic du bayoudh du palmier dattier. *Bulletin OEPP/EPPO Bulletin*, 20: 607-613.
- ❖ **Duddridge J.A., Malibatia A.S., Read .J., 1980.** Structure and function of mycorrhizal rhizomorphs with special reference to their role in water transport. *Nature*, 287, 834-836.
- ❖ **Duddridge J.A., Malibatia A.S., Read .J., 1980.** Structure and function of mycorrhizal rhizomorphs with special reference to their role in water transport. *Nature*, 287, 834-836.
- ❖ **El Hassani, M., J'aity, F., Dihazi, A., Ait Barka, E., Daayf, F., and El Hadrami I., 2004.** Enhancement of defense responses against Bayoud disease by treatment of date palm seedling with an hypoaggressive *Fusarium oxysporum f.sp. albedinis* isolate *journal of Phytopathology*, 152: pp 182-189.
- ❖ **Elhadrami, A., El Idrissi-tourane, A., Elhassni, M., Daayf, F., Elhadrami I., 2005.** Toxine-based *in-vitro* selected and its potential application to date palm for resistance to the bayoud *fusarium* wilts. *A review.C.R.Biol*, 328: pp 732-744.

- ❖ **Elhadrami, I., et Elhadrami, a.,2009.** Breeding date palm. Univ. Marrakech. Pp 191-195.
- ❖ **Eriksson, O.E. (ed.), 2006.** Outline of Ascomycota - 2006. *Myconet* **12**, 27 Feb 2006: 1-82.
- ❖ **FAO. 2008.** Date palm production. [www.fao.org/docrep/t0681E//t0681E00.htm](http://www.fao.org/docrep/t0681E//t0681E00.htm).
- ❖ **Fernandez D., Lourd M., Ouiten M., Tantaoui A. et Geige J., 1995.** Le bayoud du palmier dattier : une maladie qui menace la phoeniciculture. *Phytoma, la défense des végétaux*, (469) : 36-39.
- ❖ **Ferry M., Bouguedoura N. et El Hadrami I., 1998.** Patrimoine génétique et techniques de propagation in vitro pour le développement de la culture du palmier dattier. *Sécheresse*, 9 (2) : 139-146.  
flavonoid glycosides and procyanidin composition of Deglet Noor dates (*Phoenix dactylifera*). *J. Agric .food chem.*54: 2405-2411.
- ❖ **Franken, P., Andrade, D., 2014.** Isolation and characterization of fungal root endophytes Training School, Endophytes in Biotechnology and agriculture, pp 2-3.
- ❖ **Frederix, M.J.J., Den Brader, K., 1989.** Résultats des essais de désinfection des sols contenant des échantillons de *Fusarium oxysporum f.sp. albedinis*. FAO/PNUD/RAB /88/024. Ghardaia, Algérie.
- ❖ **Gagne S, C Richard, H Roussean and H Antoun. 1987.** Xylem-residing bacteria in alfalfa roots. *Can. J. Microbiol.* 33:996 – 1000.
- ❖ **Geoge, M., Carlone, Manuel, J., Valodez and John, M. 1983.** Methods for distingurishing Gram + from Gram-. *Baderia Journal Of Cilincal Microbiology* :pp 1157-1159.
- ❖ **Germaine K, Liu X, Cabellos G, Hogan J, Ryan D & Dowling DN .2006.** Bacterial endophyte-enhanced phyto-remediation of the organochlorine herbicide 2,4-dichlorophenoxyacetic acid. *FEMS Microbiol Ecol* **57**: 302–310.
- ❖ **Germaine, K., Keogh, E., Garcia-Cabellos, G., Borremans, B., van der Lelie, D., Barac, T., Oeyen, L., Vangronsveld, J., Moore, F.P., Moore, E.R.B., Campbell, C.D., Ryan, D., and Dowling, D.N. 2004.** Colinisation of poplar trees by gfp expressing bacterial endophytes. *FEMS Microbiology Ecology* **48**: 109– 118.
- ❖ **Gininez, K.J., X.M. Liu, G.G. Cabellos, J.P. Hogan, D. Ryan, and D.N. Dowling., 2007.** Bacterial endophyte-enhanced phytoremediation of the organochlorine herbicide. *FEMS Microbiol. Ecol.* **57** : 302-310

- ❖ **Hadrami, I., 2010.** Development de nouvelles strategies de lutte contre le bayoud la potentialisation des reactions de defence du palmier dattier au moyen de Stifenia. In : Fédérique A-B, Biotec. Du palmier dattier. Paris Ed.IRD :261p.
  - ❖ **Hakkou A., Khadija Chakroune, Mohammed Bouakka, Faiza Souna, Lurdes Cotxarrera; Marie Isabel Trillas. 2011.** Effect of nitrogen sources on the composting of date palm (*Phoenix dactylifera*) by-products infected by *Fusarium oxysporum f.sp. albedinis*. *Advances in Environmental Biology*. 2011, 5(7) : 1638-1646
  - ❖ **Hildebrand D.C., Schroth M.N, Sand D.,1988.** In plant pathologic bacteria, laboratory guide for identification , in Schaad (Ed) N.W.APS. *Minnesotc.* USA, 158p.
  - ❖ **Hong Y. J., Tomas-Barberan F. A., Kader A. A. and Mitchell, A. E. 2000.** The
  - ❖ **Hugh R., Leifson E., 1953.** The taxonomic significance of fermentation versus oxidative metabolism of carbohydrates by various Gram negative bacteria. *J.Bacterial*, 2<sup>nd</sup> edition. Pp. 44-81.
  - ❖ **Johnson and Booth,1983.** Plant pathologists. Pocket Book CMI.2<sup>nd</sup> ed common wealth mycological institute , kew , surey , England .439p.
  - ❖ **Kettout, A., Azouaoui, T., Rahmania, F., 2006.** Effet des extraits de feuilles de pâlmiier dattier sur la production de phytotoxines et sur la croissance de *Fusarium oxysporum f.sp. albedinis* agent causale du bayoud. *Revue des Région Arides*, Numéro spécial : pp 1136-1137.
  - ❖ **Khan, AL., Hussain, J., Al-Harrasi, A., Al-Rawahi, A., Lee, IJ.,2013.** Endophytic fungi: resource for gibberellins and crop abiotic stress resistance. *Crit Rev Biotechnolo*, 35: pp 62-74.
  - ❖ **Kloepper, J. W., Scher, F. M. ,Labiret, E. M., and Tipping, B. 1986.** Emergence promoting rhizobacteria:descriptions and implications for agriculture. Pp 155-164.
  - ❖ **Kobayashi DY, Palumbo JD 2000.** Bacterial endophytes and their effects on plants and uses in agriculture. In: Bacon CW, White JF (eds) *Microbial endophytes*. Dekker, New York, pp 199–236.
- L’agriculture et du développement rural. Série A, 5-6 p.

- ❖ **Landa B.B., Hervas A., Bettiol I. W. and Jimenez –Diaz R. M., 1997.** Antagonistic Activity of Bacteria from the Chickpea Rhizosphere Against *Fusarium oxysporum* f.sp. *ciceri*. *Phytoparasitica*, 25(4):305-318.
- ❖ **Leben C, Daft GC, Schmitthenner AF. 1968.** Bacterial blight of soybeans: population levels of *Pseudomonas glycinea* in relation to symptom development. *Phytopathology* 58:1143–1146.
- ❖ **-Lee K.W., Kim Y.J., Lee H.J. and Lee C.Y. 2004.** Cocoa has more phenolic phytochemicals and a higher antioxidant capacity than teas and red wine. *Food chem.* 51 :7292-7295.
- ❖ **Lodewyckx C, Vangronsveld J, Porteous F, Moore ERB, Taghavi S, Mezgeay M, van der Lelie D 2002.** Endophytic bacteria and their potential applications. *Crit Rev Plant Sci* 21:583–606.
- ❖ **Louvet, J., 1991.** Que devons-nous faire pour lutter contre le Bayoud? *Physiologie des arbres et Arbustes en zones arides et semi arides: Groupes d'Etudes d'Arbre*, Paris-France, 337–346.
- ❖ **Macià-Vicente, J.G., Jansson, H.B., Abdullah, S.K., Descals, E., Salinas, J., Lopez-Llorca, L.V. 2008.** Fungal root endophytes from natural vegetation in Mediterranean environments with special reference of *Fusarium* spp. *FEMS Microbiology Ecology*, 64: pp 90-105.
- ❖ **Mano Y, Omori F 2007** Breeding for flooding tolerant maize using “teosinte” as a germplasm resource. *Plant Root* 1: 17–21.
- ❖ **Munier P., 1973.** Le Palmier Dattier. *Techniques Agricoles Et Productions Tropicales* Ed. Larousse, Paris: 221p.
- ❖ **Muyzer, G., De Waal, E.C., and Uitterlinden, A.G. 1993.** Profiling of complex microbial populations by denaturing gradient gel electrophoresis analysis of polymerase chain reaction-amplified genes coding for 16S rRNA. *Appl. Environ. Microbiol.* 59: 695-700.
- ❖ **Neji Gharsallah, 2012**
- ❖ **Oihabi A., 1991.** Etude de l'influence des mycorhizes à V.A. sur le Bayoud et la nutrition du palmier dattier. Thèse de Doctorat, Université Cady Ayad Marrakech Maroc
- ❖ **Ouamane, A.T., Lahmadi, S., Lakhdari, F., 2008.** Comportement des vitro-plants de palmier dattier, variété Medjhouf, dans la région du Souf. *Recueil des résumés : Colloque International sur l'aridoculture, CRSTRA-Biskra-Algérie*, 132p.

- ❖ **Paulitz, T.C. and Bélanger, R.R. 2001.** Biological control in greenhouse systems. *Annu. Rev. Phytopathol.* 39:103-133.
- ❖ **Reddy, K.J., Wang, L. and Gloss, S.P. 1995.** Solubility and mobility of copper, zinc and lead in acidic environments. *Plant and Soil.* 171, 53-58.
- ❖ **Rodriguez, R.J., Henson, J., Van Volkenburgh, E., Hoy, M., Wright, L., Beckwith, F., Kim YO Redman, RS., 2008.** Stress tolerance in plants via habitat-adapted symbiosis. *ISME Journal*, 2: pp 404-416.
- ❖ **Sedra My.H., 2003.** Le Palmier Dattier base de la mise en valeur des oasis au Maroc : Techniques phoenicicoles et Création d'oasis, INRA-Editions, Division de l'Information et de la Communication, Marrakech, Maroc, 265 p.
- ❖ **Sedra, My H., Maslouhy, My A., 1995.** La fusariose vasculaire du palmier dattier (Bayoud). II. Action inhibitrice des filtrats de culture de six microorganismes antagonistes isolés des sols de la palmeraie de Marrakech sur le développement in vitro de *Fusarium oxysporum* f. sp. *albedinis*. *Al Awamia*, 90: 1–8.
- ❖ **Sedra, My.H. 2003.** Le bayoud du palmier dattier en Afrique du nord, FAO, RNE/SNEA-Tunis. Edition FAO sur la protection des plantes. Imprimerie Signes, Tunis, Tunisie, 125p.
- ❖ **Sedra, My.H., 1995.** Problèmes phytosanitaires du palmier dattier en Mauritanie et propositions de moyens de lutte. Rapport de mission d'expertise effectuée en Mauritanie du 8 au 16 juin 1995. Réseau de recherche & développement du palmier dattier (BI, FIAD, FADES, ACSAD /Syrie. Cité par Sedra,
- ❖ **Sedra, My.H., Bah, N., 1993.** La fusariose vasculaire du palmier dattier. Développement saprophytique et comportement du *Fusarium oxysporum* f.sp. *albedinis* des différents sols de palmeraies. *Al Awamia*; 82 : 53-70.
- ❖ **Smalla K, Wieland G, Buchner A, Zock A, Parzy J, Roskot N, Heuer H, Berg G 2001.** Bulk and rhizosphere soil bacterial communities studied by denaturing gradient gel electrophoresis: plant dependent enrichment and seasonal shifts. *Appl Environ Microbiol* 67:4742–4751
- ❖ **Stone JK, Bacon CW, White JF 2000.** An overview of endophytic microbes: endophytism defined. In: Bacon CW, White JF (eds) *Microbial endophytes*. Dekker, New York, pp 3–30.
- ❖ **Strobel, G., and Daizy, B., 2003.** Bioprospecting for microbial endophytes and their natural products. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 67: pp 491-502.

- ❖ **Strobel, G., Daizy, B., Castillou and Harper, J ., 2004.** Natural products from endophytic microorganisms. *J Nat Prod*, 67: pp 257-268.
- ❖ **Sturz A.V., Christie B.R., Mathson B. G., Arsenault W. J. and Buchanan N.A. (1999).** Endophytic bacterial communities in the periderm of potato tubers and their potential to improve resistance to soil-borne plant pathogens. *Plant Pathology* , 48, 360-369.
- ❖ **Sturz AV and BG Matheson. 1996.** Populations of endophytic bacteria which influence host-resistance to Erwinia-induced bacterial soft rot in potato tubers. *Plant Soil* 184:265-271.
- ❖ **Sturz AV, BR Christie, BG Matheson and J Nowak. 1999.** Biodiversity of endophytic bacteria which colonize red clover nodules, roots, stems and foliage and their influence on host growth. *Biol. Fertil. Soils* 25:13 – 19.
- ❖ **Thakore Y, 2006** The biopesticide marked for global agriculture use. *Industrial Biothechnology* .(3): 194-208.
- ❖ **Thomashow, LS. 1991.** Molecular basis of antibiosis mediated by rhizosphere *Pseudomonas*, In: plant growth promoting rhizobacteria-progress and prospect. *Bulletin IOBC/WPRS/XIV*. 8: 109-115.
- ❖ **Tilak K. V. B. R ., Ranganayaki N., Pal K. K., De R., Saxena A. K., Nautiyal C. S., Mittal S. , Tripathi A. K. and Johri B. N. (2005).** Diversity of plant growth and soil health supporting bacteria. *Curr. Sci.* 89: 136-150.
- ❖ **Toutain, G., 1965.** Note sur l'épidémiologie du Bayoud en Afrique du Nord. *Al*
- ❖ **Van Loon L.C. 2007.** Plant responses to plant growth promoting rhizobacteria. *European Journal of Plant Pathology*, in press.
- ❖ **Van Loon L.C., Rep M. and pieterse C.M.J., 2006.** Significance of inducible defence related proteins in infected plant. *Annual Review of Phytopathology* 44: 135-162.
- ❖ **Veeken, A.H.M., Blok, W.J., Curci, F., Coenen, G.C.M., Termorshuizen, A.J., Hamelers, H.V.M., 2005.** Improving quality of composted biowaste to enhance disease suppressiveness of compost-amended, peat-based potting mixes. *Soil Biology & Biochemistry*, 37: 2131-2140.

- ❖ **Verma S.C., Ladha J.K., Tripathi A.k, 2001** Evaluation of plant growth promoting and colonization ability of endophytic diazotrophs from deep water rice. *J Biotechnol* 91: 127-141.
- ❖ **Waller, F., Ghisalberti, E., Flematti, G., Marra, R., Lorito, M., Sivasithamparam, K., 2005.** The endophytic fungus reprograms barley to salt-stress tolerance, disease resistance, and higher yield. *Proceedings of the national Academy of Sciences USA*, 102: pp 13386-13391.
- ❖ **Welbaum G., Sturz A. V., Dong Z. and Nowak J., (2004)** Fertilizing soil microorganism to improve productivity of agroecosystems. *Critical Review*. In plant science 23:175-193.
- ❖ **Ziniel P., Denise K., Lambercht N., Harris B., Feng Z., Kuczmarski D., Higley P., Crol A., Alahari I., Raul A., Barleta G., Vidaveri A.K., 2002.** Isolation and characterization of endophytic Colonizing Bacteria from agronomic crops and prairie plants.

# *Annexes*

## **Annexes**

### **Composition des milieux de culture**

#### **Milieu LPGA**

Extrait de levure	5g/l
Bactopeptone	5g/l
Glucose	10g/l
Agar	17g/l
pH	7-7,2

#### **Milieu PDA (Johnson& booth, 1983)**

Pomme de terre	200g
D-glucose	20g/l
Agar	20g/l
Eau distillée	1 Litre
pH	6,5

#### **Milieu B de King (King et al., 1954)**

Peptone	20g/l
Glycerol	15 ml/l
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	1,5G/l
MgSO <sub>4</sub>	1,5g/l
Agar	15g/l
pH	7

**Tous les milieux autoclavés pendant 20mn à 120°C.**



## *Tables de matières*

Dédicace	
Remerciements	
Liste des abréviations	
Liste des figures	
Liste des tableaux	
Table de matière	
Résumé	
Abstract	
المخلص	
Introduction.....	1
Chapitre I: Synthèse bibliographique .....	4
1. Le palmier dattier .....	5
1.1. Importance et aire de répartition du palmier dattier .....	5
1.2. Importance économique du palmier dattier en Algérie .....	5
1.3. Données botaniques et écologiques du palmier dattier .....	6
1.4. Systématique et description du palmier dattier.....	6
2. Contraintes de la culture du palmier dattier .....	8
2.1. La fusariose du palmier dattier ou « bayoud » .....	9
2.1.1. Origine et distribution géographique du bayoud.....	9
2.1.2. Symptômes du bayoud .....	9
2.1.3. L'agent causal du bayoud, position taxonomique et caractères morphologiques et biologiques .....	11
2.1.4. Mode d'infection du palmier par le <i>Fusariumoxysporum</i> f.sp. <i>albedinis</i> .....	11
2.2. Stratégies de lutte contre la maladie du bayoud .....	11
2.2.1. Les mesures prophylactiques.....	12
2.2.2. La lutte culturale.....	12
2.2.3. La lutte chimique.....	13
2.2.4. La lutte génétique .....	13
2.2.5. La lutte biologique contre le Bayoud .....	13
3. Les bactéries endophytes.....	15
3.1. Définition, origine, caractéristiques, localisation et colonisation des tissus végétaux .....	15

3.2. La diversité des bactéries endophytes .....	17
3.3. Interaction endophyte-hôte et les associations bénéfiques liées aux endophytes.....	17
3.3.1. La promotion de la croissance .....	20
3.3.2. Protection contre les microorganismes pathogènes.....	20
Chapitre II: Matériel et méthodes.....	24
1. Objectif de l'étude .....	23
2. Lieu de l'étude.....	23
3. Echantillonnage.....	23
4. Technique de préparation des échantillons racinaires à analyser .....	24
5. Isolement des endophytes.....	24
6. Purification et conservation des souches.....	25
7. Essais d'antagonisme <i>in-vitro</i> à l'égard du <i>Fusarium oxysporum</i> f.sp. <i>albedinis</i> agent du bayoud (F.o.a.).....	25
7.1. Technique de confrontation par contact direct du champignon et de la bactérie en boîte de Pétri.....	26
7.2. Test de confrontation par effet des inhibiteurs non volatiles produits par les antagonistes ..	27
7.2.1 Préparation des suspensions bactériennes, culture et microfiltration.....	27
7.2.2 Microfiltration des suspensions.....	27
7.2.3. Utilisation des filtrats bactériens pour le test d'antagonisme.....	28
7.3. Calcul du pourcentage d'inhibition .....	28
8. Tests d'identification des bactéries endophytes isolées et sélectionnées.....	30
8.1. Caractères cultureux sur milieu LPGA.....	30
8.2. Test d'hypersensibilité sur le tabac ( <i>Nicotiana tabacum</i> var. <i>Xanthi</i> ).....	30
8.3. Tests biochimiques .....	31
8.3.1. Coloration de la paroi des bactéries.....	31
8.3.2. Test de fluorescence sur milieu B de King.....	32
8.3.3. Test d'oxydase.....	32
8.3.4. Test catalase.....	32
8.3.5. Fermentation du glucose (oxydation /fermentation).....	33
Chapitre III: Résultats et discussion.....	33
Résultats .....	35
1. Les caractères cultureux des isolats sur milieu LPGA .....	35
2. Antagonisme <i>in-vitro</i> .....	37
2.1. Inhibition par dépôt simultané (co-culture).....	38
2.2. Inhibition par utilisation des filtrats bactériens .....	38
3. Réaction au tabac.....	42

4. Caractérisation biochimique.....	42
Fluorescence sur le milieu King B .....	42
La coloration de Gram et Test du KOH .....	42
Activité catalase .....	43
Activité cytochrome oxydase .....	43
Type respiratoire : oxydation /fermentation .....	44
2.Discution .....	48
Conclusion et perspective .....	52
Références bibliographiques.....	54
Annexe	
Table des matières	