

**République Algérienne Démocratique et Populaire**  
**Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la recherche Scientifique**



**Université de Blida 1-Saad DAHLAB**  
**Faculté Des Sciences De La Nature Et De La Vie**  
**Département De Biotechnologie**

Mémoire de fin d'études en vue de l'obtention du diplôme de Master  
Académique

**Option : Biotechnologie Microbienne**

**Thème :**

Lutte biologique contre la fusariose vasculaire du plamier dattier  
par rhizobactéries endophytiques : cas des Pseudomonas  
fluorescents

Réalisé par : *Mlle.*Zerrouk Lamia

*Mlle.* Rahmoune Aicha

**Soutenu devant les membres de jury :**

Mme Ammad .F

MCA

Présidente

Mme Toua.D

MAA

Examinatrice

Mme Benoussaid .N

MCA

Promotrice

2022/2023

## REMERCIEMENT :

Nous exprimons tout d'abord, nos profonds remerciements et louanges Allah le tout puissant qui nous a guidé sur le droit chemin et nous a donné la santé, le courage et la volonté pour achever ce modeste travail

Nos vifs remerciements et notre profonde gratitude s'adressent à notre promotrice **Mme Benoussaid Nacera** d'avoir nous accordé sa confiance ses compétences, ses précieux conseils, sa disponibilité et sa gentillesse à notre égard ont contribué au bon déroulement de ce travail. Vous avez nous honoré d'avoir accepté de prendre en charge notre direction dans ce travail avec bienveillance et rigueur. Nous teignons également à vous remercier pour vos remarques constructive

Nos vifs remerciements s'adressent également aux membres de jury pour avoir accepté d'évaluer ce travail **Mme. Ammad Faiza** pour l'honneur qu'elle nous a fait d'avoir acceptée de présider le jury et **Mme. Toua Dalila** pour l'honneur qu'elle nous a accordé en examinant ce modeste travail.

Un énorme merci à l'ingénieur de laboratoire phytobactériologie Mme Salma à sa sympathie, sa patience qu'on a pu effectuer notre partie expérimentale dans des bonnes conditions.

Nous exprimons également notre gratitude à tous les enseignants qui ont contribué à notre formation universitaire.

Un grand merci à nos familles, à nos parents pour leur soutien, leurs encouragements et leur patience durant ces années d'études.

Enfin, merci à toutes les personnes qui ont contribué de près ou de loin à la réalisation de ce travail.

## Dédicace :

Je dédie ce mémoire :

À ma très chère maman **Farida** .Quoi je fasse ou que je dise, je ne se saurai point te remercier comme il se doit. Ton affection me couvre, ta bienveillance me guide et ta présence à mes côtés a toujours été ma source de force pour affronter les différents obstacles

À mon très cher PAPA **Rabah**. Mon inspiration tu as toujours été à mes côtés pour me soutenir et m'encourager pour que je puisse atteindre mes objectifs. Que ce travail traduit ma gratitude et mon affection

À La mémoire de ma grand mère : **Fatma** Tu as été la bénédiction qui illumine nos chemins et la joie qui nous unit

À mes très chères sœurs : **Halima , Meriem, Fatma zohra** qui m'ont toujours encouragé au cours de la réalisation de ce mémoire , je vous dédie ce modeste travail en témoignage de l'amour que je ressens pour vous trois

À mes très chers frères : Aïlle et Mohamed et leur femme : safia, rania Et bien sûr je dédie ce travail à mon oncle : Rabah et sa marie Hamida

À tous la famille Zerrouk

À ma chère binôme et sœur aïcha et à toutes sa famille celle qui a participé à cette réussite pour son soutien, son aide et son support dans les moments difficiles

À mes meilleure amies et mes copines Fati , Inese qui ont partagée avec moi les moments d'émotions lors de la réalisation en souvenir de très bon moment passé ensemble

À nos petits poussins de famille :Anfel , khadija ,Manel ,aytam ,Firase , Inese , Adam Ibrahim

Les amis de travail Rania, Kenza, Amina, Manel, Yasmine, et Fayza

À tous ceux qui ont contribué de près ou de loin pour ce projet soit possible

A toute la promotion de biotechnologie microbienne 2022 /2022.

Lamia

## **Dédicace :**

Avec l'aide de Dieu Tout-Puissant, et avec l'aide de tous mes proches, j'ai pu atteindre ce jour et terminer cet humble travail que je leur dédie avec ces paroles de remerciements accompagnés d'yeux remplis de larmes.

À mes chers parents Fadila et Djilali, aucune dévotion ne peut exprimer mes sentiments sincères, pour leur patience sans bornes dans tous mes cas, pour leur aide dans ma chute, pour leurs encouragements disciplinés et pour leur poursuite perpétuelle de mon succès. Un témoignage de mon amour profond et de mon respect pour leur grand sacrifice.

Quoi que je fasse je ne pourrais leur rendre ce qu'ils ont fait pour moi, si je suis arrivée là c'est bien grâce à eux que Dieu les bénisse, et leur accorde longue vie et les protège

Ma chère grand-mère Aicha, ma deuxième mère, source intarissable de tendresse. Que Dieu vous garde et vous protège pour nous, vous qui vivez aux premiers rangs de mon cœur.

A mes frères Zakaria et Abdo et mes sœurs Amina et Khadija, mes jumelles, qui ont toujours été un grand soutien dans ma vie qui ne peut s'exprimer par aucun mot

Mes oncles Sadek, Mohammed et Kamal, qui se sont efforcés de m'aider du mieux qu'ils pouvaient.

Mon amie Lamia et mon binôme à chaque instant que j'ai passé et vécu cette année.

Les amies de mon chemin, Inès et Fatima, Rawnek et Yasmine, les gardiennes de mes secrets, les compagnes de mes jours bons et difficiles, le trésor de ma vie que tout le monde n'a pas.

Mes deux oncles, Saber et Anas, sont mes deux frères, qui ont toujours facilité mon travail.

Mes petits poussins, Hajar, Imad, Rabah et Ramy. La raison de mon rire dans les moments de tristesse.

Les amis de travail Rania, Kenza, Amina, Manel, Yasmine, Ahlem, Amira, et Fayza

À tous ceux qui ont contribué de près ou de loin pour ce projet soit possible

A toute la promotion de biotechnologie microbienne 2022 /2023

Aicha

## Résumé

### Lutte biologique contre la fusariose vasculaire du palmier dattier par rhizobactéries endophytiques : cas des *Pseudomonas* fluorescents

Le palmier dattier est cultivé comme un arbre fruitier dans les régions chaudes arides et semi-arides. Cette espèce est contrainte à de nombreuses conditions biotiques et abiotiques adverses. Les principales maladies du palmier dattier sont les maladies d'origine fongique. La lutte biologique par introduction des microorganismes antagonistes (*Pseudomonas* spp fluorescents) s'avère une voie très prometteuse dans le contrôle des maladies fongiques de palmier dattier.

Notre présent travail a pour but d'identifier des souches de *Pseudomonas* spp. fluorescents isolées de l'endophytosphère du palmier dattier et d'évaluer leur activité antagoniste *in vitro* et *in situ* vis à vis de quelques germes phytopathogènes.

Les résultats de l'identification selon les tests de Fluorescence, de Gram, de Catalase et les tests de LOPAT, nous a permis de retenir vingt souches dans leur ensemble présentant des caractéristiques de *Pseudomonas* spp. fluorescents saprophytes pouvant se regrouper dans le sous-groupe Vb de *Pseudomonas* fluorescents.

Le résultat de l'activité antagoniste *in vitro* des dix souches sur vingt sélectionnées des différentes régions (Taghit, Kenadsa et Taghit) ont été criblées vis-à-vis deux bactéries cibles à savoir *Agrobacterium tumefaciens* (C5.83) et *Erwinia amylovora* (EMEA) sur deux milieux différents (King B et LPGA) par la technique de confrontation directe. Une deuxième confrontation antifongique a été effectuée vis-à-vis de deux formes de *Fusarium oxysporum* (*lini* et *albedinis*) et *Botriosphaeria dothidae* sur milieu PDA par deux méthode de confrontation : déphasée et simultanée.

Les résultats de l'activité antagoniste *in situ* des trois souches de *Pseudomonas* spp. fluorescents (TBR51, TRR5, BF6) vis-à-vis de *Botriosphaeria dothidae* ont été sélectionnées.

Les résultats obtenus montrent une forte réduction des symptômes de la maladie de petites nécroses au niveau du site d'inculcation à de taux d'infection ne dépassant pas 20%, comparé au témoin positif qui a montré un développement de nécroses sur toute la surface de confrontation 100% .

**Mots clés :** *Pseudomonas* spp fluorescents, endophytes, palmier dattier, antagonisme, *Agrobacterium tumefaciens*, *Erwinia amylovora*, *Fusarium oxysporum*, *Botriosphaeria dothidae*

## **Abstract**

### **Biological control of vascular fusariosis of date palm by endophytic rhizobacteria: case of fluorescent *Pseudomonas***

The date palm is grown as a fruit tree in hot arid and semi-arid regions. This species is constrained by many adverse biotic and abiotic conditions. The main date palm diseases are diseases of fungal origin. Biological control by introducing antagonistic microorganisms (fluorescent *Pseudomonas* spp) is a very promising way to control date palm fungal diseases.

Our present work aims to identify strains of *Pseudomonas* spp. Fluorescents isolated from the endophytosphere of the date palm and to evaluate their antagonistic activity in vitro and in situ against the opinion of some phytopathogenic germs.

The results of the identification according to the tests of Fluorescence, Gram, catalase and the tests of LOPAT, enabled us to retain twenty strains as a whole presenting characteristics of *Pseudomonas* spp. Vb of *Pseudomonas fluorescens*.

The result of the in vitro antagonistic activity of Ten strains out of twenty selected from the different regions (Taghit, Kenadsa and Taghit) were screened against two target bacteria, namely *Agrobacterium tumefaciens* (C5.83) and *Erwinia amylovora* (EMEA ) on two different backgrounds (King B and LPGA) using the direct confrontation technique. A second antifungal confrontation was carried out against two forms of *Fusarium oxysporum* (lini and albedinis) and *Botriosphaeria dothidae* on PDA medium by two confrontation methods: phase-shifted and simultaneous.

The results of the in situ antagonistic activity of the three strains of *Pseudomonas* spp. Fluorescents (TBR51, TRR5, BF6) against *Botriosphaeria dothidae* were selected. The results obtained show a strong reduction in the symptoms of the disease from small necroses at the site of indictment to infection rate not exceeding 20%, compared to the positive control which showed development of necroses over the entire surface of confrontation 100%.

**Key words:** Fluorescent *Pseudomonas* spp, endophytes, date palm, antagonism, *Agrobacterium tumefaciens*, *Erwinia amylovora*, *Fusarium oxysporum*, *Botriosphaeria dothida*

## المكافحة البيولوجية ضد ذبول الفيوزاريوم الوعائي لنخيل التمر بواسطة البكتيريا الجذرية الداخلية: **Pseudomonas** حالة بكتيريا

يزرع نخيل التمر على شكل شجرة فاكهة في المناطق الحارة الجافة وشبه القاحلة. هذا النوع مقيد بالعديد من الظروف الحيوية وغير الحيوية المعاكسة. أمراض نخيل التمر الرئيسية هي أمراض فطرية المنشأ. تعتبر مكافحة البيولوجية عن طريق إدخال الكائنات الحية الدقيقة المضادة (الفلورية *Pseudomonas spp*) طريقة واعدة للغاية للسيطرة على الأمراض الفطرية لنخيل التمر.

يهدف عملنا الحالي إلى التعرف على سلالات *Pseudomonas spp*. تم عزل الفلورسنت من الغلاف الداخلي لنخيل التمر وتقييم نشاطها المضاد في المختبر وفي الموقع ضد رأي بعض الجراثيم المسببة للأمراض النباتية.

إن نتائج التحديد وفقاً لاختبارات التآلق، الجرام، الكاتلاز واختبارات LOPAT، مكنتنا من الاحتفاظ بعشرين سلالة ككل لتقديم خصائص *Pseudomonas spp. Vb* من *Pseudomonas fluorescens*.

تم فحص نتيجة النشاط المضاد في المختبر لعشر سلالات من أصل عشرين تم اختيارها من مناطق مختلفة (تاغيت، كينادسا، تاغيت) ضد نوعين من البكتيريا المستهدفة، وهما *Erwinia* و *Agrobacterium tumefaciens* (C5.83) و *amylovora* (EMEA) على نوعين مختلفين. الخلفيات (King B و LPGA) باستخدام تقنية المواجهة المباشرة. تم إجراء مواجهة ثانية ضد الفطريات ضد شكلين من *Fusarium oxysporum lini* و *albedinis* و *Botriosphaeria dothidae* على وسط PDA بطريقتين من المواجهة: التحول الطوري والمتزامن.

نتائج النشاط المضاد في الموقع للسلالات الثلاثة من *Pseudomonas spp*. تم اختيار الفلورية (TBR5، TRR5، BF6) ضد *Botriosphaeria dothidae*. أظهرت النتائج التي تم الحصول عليها انخفاضاً قوياً في أعراض المرض من نخر صغير في موقع الاتهام إلى معدل إصابة لا يتجاوز 20 درجة مئوية، مقارنة بالتحكم الإيجابي الذي أظهر تطور نخر على كامل سطح المواجهة 100 درجة.

الكلمات المفتاحية: الفلورسنت *Pseudomonas spp*، النباتات الداخلية، نخيل التمر، التضاد، *Agrobacterium tumefaciens*، *Erwinia amylovora*، *Fusarium oxysporum*، *Botriosphaeria dothidae*

## Liste des figures

<b>Figure 01 :</b> Palmier dattier (Al-Snafi et Thuwaini, 2023).....	<b>04</b>
<b>Figure 02 :</b> Propagation de la maladie du Bayoud en Afrique du Nord et en Algérie. <b>A)</b> Localisation des sites d'échantillonnage. <b>B)</b> Symptômes de la maladie du bayoud sur des palmiers infectés (Boulahouat et al., 2022).....	<b>10</b>
<b>Figure 03 :</b> Mécanismes multiples employés par les endophytes et leurs métabolites dans la gestion des maladies des plantes (Yandong et al., 2022).....	<b>20</b>
<b>Figure 04 :</b> Palmier dattier de la station expérimentale de l'université Blida 01.....	<b>23</b>
<b>Figure 05 :</b> Repiquage des souches de <i>Pseudomonas</i> spp.fluorescents par étalement sur milieu King B.....	<b>24</b>
<b>Figure 06 :</b> Des tubes contenant le milieu Mueller Arginine (ADH 5%) inoculés et recouverts d'une couche de vaseline .....	<b>27</b>
<b>Figure 07 :</b> Infiltration surface du limbe foliaire des jeunes plantules de <i>Nicotiana tabaccum</i> var xantipar la suspension bactérienne.....	<b>28</b>
<b>Figure 08 :</b> Dépôt des spots bactériennes à l'aide d'une micropipette dans des boîtes de pétri contenant le milieu LPGA et 4le milieu King B.....	<b>30</b>
<b>Figure 09 :</b> Pulvérisation les suspensions bactériennes des deux souches pathogènes testée en spray sur les spots des bactéries antagonistes.....	<b>30</b>
<b>Figure 10 :</b> Méthode de confrontation directe en boite de pétrie entre les souches de <i>Pseudomonas</i> spp .fluorescents et les champignons phytopathogènes.....	<b>33</b>
<b>Figure 11 :</b> Ensemencement d'une souche de <i>Pseudomonas</i> spp .fluorescents sous forme de deux stries en parallèles.....	<b>33</b>
<b>Figure 12 :</b> Transplantation d'un disque fongique au centre de boite de pétrie contient la souche de <i>Pseudomonas</i> spp.fluorescents après incubation de 24h.....	<b>34</b>
<b>Figure 13 :</b> les étapes de test d'antagonisme in situ.....	<b>36</b>
<b>Figure 14 :</b> Les fluorescences des isolats bactériens sous UV (350-400nm).....	<b>39</b>



<b>Figure 15 :</b> Le test de potasse indicateur de Gram : La formation d'un filament mucoïde confirmele négatif.....	Gram 39
<b>Figure 16 :</b> Résultat positive pour les souches testées de catalase.....	40
<b>Figure 17 :</b> Résultat de la production de levane sucrase sur les souches de <i>Pseudomonas</i> spp.fluorescents.....	40
<b>Figure 18 :</b> Résultat positive pour les souches testées d'oxydase.....	41..
<b>Figure 19 :</b> Résultat négative pour les souches testées de pictinase.....	41
<b>Figure 20:</b> Résultat positive pour les souches testées après l'ajoute de tampon PH4.....	42
<b>Figure 21 :</b> Résultat négative pour les souches testées de tabac.....	42
<b>Figure 22 :</b> Phénomènes inattendus représentés par une croissance importante des spots bactériens pour chaque antagoniste sur le milieu King B.....	45
<b>Figure 23 :</b> l'activité antagoniste de souche TBR51 contre les souches cible ( <i>Agrobacterium.t</i> [C5.83] et <i>Erwinia.a</i> [EMEA]).....	45
<b>Figure 24 :</b> l'activité antagoniste de différentes souches antagonistes contre la souche cible <i>Erwinia.a</i> [EMEA].....	47
<b>Figure 25 :</b> l'activité antagoniste de différentes souches antagonistes contre la souche cible <i>Agrobacterium.t</i> [C5.83].....	47
<b>Figure 26:</b> activité antifongique des souches antagonistes contre le champignon phytopatogène <i>Fusariumo xysporum f sp albedinis</i> (F.o.a) sur le milieu PDA. ....	49
<b>Figure 27 :</b> Résultats de l'activité antifongique contre le champignon phytopatogène <i>Fusariumo xysporum f sp albedinis</i> (F.o.a) ( <b>courbe de pourcentage originale</b> ).....	49
<b>Figure 28 :</b> activité antifongique des souches antagonistes contre le champignon phytopatogène <i>Fusariumo xysporum f sp Lini</i> (F.o.ln) sur le milieu PDA.....	50
<b>Figure 29 :</b> Résultats de l'activité antifongique contre le champignon phytopatogène <i>Fusariumo xysporum f sp Lini</i> (F.o.ln) ( <b>courbe de pourcentage originale</b> ).....	50
<b>Figure 30 :</b> activité antifongique des souches antagonistes contre le champignon phytopatogène <i>Botriosphaeria Dothidae</i> ( <i>B.s.d</i> ) sur le milieu PDA.....	51

**Figure 31:** Résultats de l'activité antifongique contre le champignon phytopatogène *Botriosphaeria Dothidae (B.s.d)* (courbe de pourcentage originale).....51

**Figure 32:** Activité antifongique des souches antagonistes contre le champignon phytopatogène *Botriosphaeria dothidae* *in vivo*.....52

**Figure 33 :** Résultats de l'activité antifongique contre le champignon phytopatogène *Botriosphaeria dothidae* *in situ* (courbe de pourcentage originale)..... 53

## Liste des tableaux

<b>Tableau 01</b> : Répartition de production de dattes par wilaya ( <b>Sidaoui, 2018</b> ).....	<b>5</b>
<b>Tableau 02</b> : Exemples de certains phytoravageurs et agents pathogènes sur le palmier dattier.....	<b>8</b>
<b>Tableau 03</b> : Caractéristiques les codes des vingt souches bactériennes de <i>Pseudomonas</i> spp.fluorescents utilisées.....	<b>22</b>
<b>Tableau 04</b> : Quelques Caractéristiques morphologiques et biochimiques des 20 souches testées .....	<b>38</b>
<b>Tableau 05</b> : Spectre de réponse d'identification selon les tests LOPAT.....	<b>43</b>
<b>Tableau 06</b> : Diamètres d'inhibition de chaque souche vis-à-vis de <i>Fusariumo xysporum f sp albedinis</i> (F.o.a) sur le milieu PDA.....	<b>65</b>
<b>Tableau 07</b> : Diamètres d'inhibition de chaque souche vis-à-vis de <i>Fusarium oxysporum f sp Lini</i> (F.o.ln) sur le milieu PDA. ....	<b>65</b>
<b>Tableau 08</b> : Diamètres d'inhibition de chaque souche vis-à-vis de <i>Botriosphaeria Dothidae</i> ( <i>B.s.d</i> ) sur le milieu PDA.....	<b>65</b>

## Liste des abréviations

**C5.83:** *Agrobacterium tumefaciens*

**EMEA:** *Erwinia amylovora*

**F.o.a:** *Fusarium oxysporum*f.sp. *albedinis*

**F.o.In:** *Fusarium oxysporum*f.sp. *lini*

**B.s.d :** *Botriosphaeria Dothidae*

**UV:** Ultraviolet

**PDA:** Potato dextrose agar

**PGPR:** Plant Growth Promoting Rhizobacteria

**LOPAT :** levane, oxydase, pectinase, arginine dihydrolase, hypersensibilité au Tabac

## Sommaire

**Remerciement**

**Dédicaces**

**Résumé**

**Liste des figures**

**Liste des tableaux**

**Liste des abréviations**

**Introduction** ..... 01

### **Partie I : Synthèses bibliographique**

**I .Généralité sur le palmier dattier** .....03

**I .1** Importance économique ..... 04

**II. Les contraintes abiotiques et biotiques qui limitent la culture de palmier dattier** .....05

2.1 Les contraintes abiotiques .....05

2.1.1 La salinité .....06

2.1.2 La sécheresse .....06

2.1.3 La désertification .....07

2.2 Les contraintes biotiques .....07

**2.2.1Généralité sur la maladie de Bayoud et son agent causal** .....10

**2.2.2Généralité sur la maladie de pourriture et de rachis de palmier dattier**.....12

**III .Moyens de lutte**.....13

3.1Les mesures prophylactiques .....13

3.2Les techniques culturales .....13

3.3Lutte chimique.....14

3.4La lutte génétique .....14

3.5La lutte biologique .....14

**La lutte biologique par les *Pseudomonase* spp. Fluorescents** .....15

**4.1 La lutte biologique**.....15

4.2 Les microorganismes utilisables dans la lutte biologique.....	15
4.3 Effets bénéfiques de <i>Pseudomonas</i> spp fluorescents endophytiques sur l'hôte.....	18
4.3.1 Action direct.....	19
4.3.2 Action indirects.....	20

## **Partie II: Matériel et méthodes**

<b>1. Matériel</b> .....	21
1.1 Matériel non biologiques. ....	21
1.2 Matériel biologiques .....	21
1.2.1 Les souches bactériennes antagonistes .....	21
1.2.2 Les souches bactériennes pathogènes.....	22
1.2.3 Les souches fongiques phytopathogènes .....	23
<b>1.3 Matériel végétales</b> .....	23
<b>2. Méthodes</b> .....	24
2.1 Purification des souches bactériennes .....	24
2.2 Conservation des souches .....	24
2.3 Identification des souches .....	24
2.3.1 Caractères cultureux.....	24
2.3.2 Caractérisation physiologique et biochimique.....	25
<b>2.2.2.1 Test de la fluorescence</b> .....	<b>25</b>
<b>2.3.2.2 Coloration de Gram</b> .....	<b>26</b>
<b>2.2.2.3 Test de KOH</b> .....	<b>26</b>
<b>2.2.2.4 Test de catalase</b> .....	<b>26</b>
<b>2.2.2.5 Test de Levane sucrase</b> .....	<b>26</b>
<b>2.2.2.6 Test d'oxydase</b> .....	<b>26</b>
<b>2.2.2.7 Activité Pécinolytique</b> .....	<b>28</b>
<b>2.2.2.8 Test d'arginine dihydrolase</b> .....	<b>28</b>
<b>2.2.2.9 Test hypersensibilité de tabac</b> .....	<b>29</b>

**2.4 Evaluation du pouvoir antagoniste des souches sélectionnées in vitro et in vivo .....30**

**2.4.1 Pouvoir antagoniste in vitro.....30**

**2.4.1.1 La confrontation bactérie- bactérie .....30**

**2.4.1.2 La confrontation bactérie-Champignon .....31**

**2.4.2 Pouvoir antagoniste in vivo.....34**

**2.4.2.1 Préparation des fragments.....34**

**2.4.2.2 La désinfection .....34**

**2.4.2.3 L'essai .....35**

**2.4.2.4 Lecture des résultats .....35**

**Partie III : Résultats et discussion**

**1 Identification préliminaire des souches *Pseudomonas* spp. Fluorescents endophytiques .....37**

**1.1 Caractères culturels.....37**

**1.2 Caractérisation physiologiques et biochimique des isolats .....38**

**1.2.1 Test de la fluorescence .....39**

**1.2.2 Test de Gram.....39**

**1.2.3 Test de catalase.....40**

**1.2.4 Test de Levane sucrase.....40**

**1.2.5 Test d'oxydase .....41**

**1.2.6 Test de Pectinase .....41**

**1.2.7 Test d'arginine dihydrolase .....42**

**1.2.8 Test d'hypersensibilité sur Tabac .....42**

**1.3 Identification phénotypique des isolats.....43**

**1.4 Sélection des souches de *Pseudomonas* spp. fluorescents antagonistes in vitro.....44**

**1.4.1 Confrontation bactérie/ bactérie.....44**

**1.4.1.1 Sur milieu KB .....44**

**1.4.1.2 Sur milieu LPGA .....46**

<b>1.4.1</b>	<b>Les résultats de la confrontation bactérie /champignon .....</b>	<b>48</b>
<b>1.5</b>	<b>Sélection des souches de <i>Pseudomonas</i> spp.fluorescents antagonistes <i>in vivo</i>.....</b>	<b>52</b>
	<b>Discussion.....</b>	<b>54</b>
	<b>Conclusion.....</b>	<b>61</b>
	<b>Référence bibliographique .....</b>	<b>63</b>



## Introduction

La culture du palmier dattier joue un rôle très important dans l'agriculture et l'économie des régions désertiques. Le palmier dattier (*Phoenix dactylifera* L.) est la principale culture fruitière du désert dans les régions arides et le pilier des écosystèmes oasiens. Sur le plan socio-économique, la datte constitue la principale production des régions saharienne (**Boulahouat et al., 2022**). En effet, les fruits du palmier dattier sont de riches sources de nutriments essentiels, des vitamines, des minéraux et des fibres alimentaires, avec de nombreux avantages potentiels pour la santé (**Harkat et al., 2022**).

Néanmoins, la culture du palmier dattier est confrontée à plusieurs contraintes d'ordre abiotique (sécheresse, stress salin) et biotiques qui correspondent aux ravageurs du palmier dattier (**Benlarbi, 2019**). La plus redoutable et la plus dévastatrice dans l'Afrique du nord étant la fusariose vasculaire, maladie cryptogamique, appelée communément "bayoud" dont l'agent causal est un champignon tellurique : *Fusarium oxysporum* f. sp. *albedinis* (**Sahouli, 2021**). Elle est répandue surtout au Maroc et dans une grande partie des palmeraies de l'Algérie (**Bouhlali, 2020**). Ainsi une autre maladie d'origine fongique dont l'agent causal est une famille de champignons nommé « la famille *Botryosphaeriaceae* » responsable de la maladie du rachis et de pourriture des inflorescences de palmier dattier.

A ce jour, Les moyens préconisés contre les maladies fongiques sont la lutte chimique (utilisation de fongicides, éradication et incinération du palmier, désinfestation du sol par solarisation et fumigation). Malheureusement, le contrôle chimique affecte le microbiote bénéfique du sol et peut s'accumuler dans la chaîne alimentaire (**De Lamo et al., 2022**). Les fongicides ont des effets négatifs sur l'environnement et la santé humaine et peuvent favoriser le développement de nouvelles souches résistantes de champignons (**Khan et al., 2018**).

Pour cette raison l'utilisation de la lutte biologique reste la méthode la plus efficace. L'utilisation des micro-organismes est l'une des méthodes de lutte biologique les plus prometteuses pour supprimer les maladies des plantes. De nouvelles approches impliquent l'utilisation de bactéries favorisant la croissance des plantes (PGPB), classées comme celles associées à la surface des racines des plantes, appelées rhizobactéries, et celles qui vivent à l'intérieur des tissus végétaux, appelées endophytes (**Slama et al., 2019 ; Slama et al., 2021**) parmi ces bactéries : *Pseudomonas* spp. fluorescents .

Les *Pseudomonas* spp. fluorescents sont des bactéries appartenant au groupe de PGPR (Plant Growth Promoting Rhizobactéria), constituent un groupe important de micro-organismes rhizosphériques qui sont écologiquement très importants pour la promotion de la croissance des plantes et les propriétés de biocontrôle (Salman, 2010 ; Suresh et al., 2021). Les *Pseudomonas* spp. fluorescents endophytes, sont connue comme des agents actifs de biocontrôle. Ils possèdent des applications utiles dans la promotion de la croissance des plantes, la biotechnologie, la bioremédiation et le biocontrôle (Chellaiah, 2018 ; Ghadamgahi et al., 2021 ; Sah et al., 2021). Les bactéries appartenant à ce groupe stimulent la croissance des plantes grâce à plusieurs mécanismes tels que l'augmentation de la disponibilité et de l'absorption des nutriments minéraux par la dissolution du phosphate, la croissance des racines par la production de phytohormones ou en augmentant la tolérance au stress abiotique (Giles et al., 2014 ; Höfte, 2021 ; Pandey et Gupta, 2021 ; Kaur et al., 2022). Ils peuvent également être appliqués comme biofongicide. De plus, ces agents biologiques peuvent également augmenter la résistance aux maladies (Damiri et al., 2019).

Notre étude a pour objectif de lutte biologique contre les maladies phytopatogènes du palmier dattier par rhizobactéries endophytiques : cas des *Pseudomonas* fluorescents présenté par suivant :

- L'identification et caractérisation des souches de *Pseudomonas* spp fluorescents isolées de l'endophytosphère du palmier dattier.
- L'évaluation de leur potentiel antagoniste vis-à-vis de quelques agents phytopatogènes *Fusarium oxysporum* (*Fusarium oxysporum*f.sp. *lini* et *Fusarium oxysporum*f.sp. *albedinis*) *in vitro* et contre le *Botriosphaeria dothidae* *in vivo*.



**Partie I : Synthèse bibliographique**

## I. Généralité sur le palmier dattier

Le palmier dattier est l'un des arbres fruitiers le plus anciennement cultivé de la péninsule arabique. Les preuves les plus anciens en Mésopotamie (Irak actuellement) montrent que sa culture se pratiquait datant de 4000 à 5000 avant JC (**Castillo et al., 2023**). Le palmier dattier a été dénommé *Phoenix dactylifera L.* par Linné en 1734. L'étymologie du mot "Phœnix" est dérivé de nom de Dattier chez les Grecs qui signifie violet ou rouge (fruit), "dactylifera" est un groupe du mot grec dactylus, qui signifie «doigt» et du mot latin «ferous», qui signifie «portant» désigne les grappes de fruits produites par cette plante (**Al-Alawi et al., 2017 ; Ait El Mokhtar, 2020**). Dans les langages conversationnels, les dattes sont connues sous le nom de nakhl, palmier dattier, Sugar Palm, en arabe, français et anglais respectivement (**Trichine, 2010 ; Al-Snafi et Thuwaini2, 2023**).

Le palmier dattier est une monocotylédone arborescente et diploïde ( $2n=36$ ) (**Moussouni, 2017 ; Gibril et al., 2023**). L'espèce *Phoenix dactylifera L.* est un membre de la famille des Arecaceae (anciennement Palmae) et le genre Phoenix parmi 14 espèces, classée comme une grande plante dioïque à feuilles persistantes (**Al-Snafi et Thuwaini2, 2023 ; Castillo et al., 2023 ; Khanum et al., 2023**).

L'espèce *Phoenix dactylifera L.* est cultivé dans de nombreuses régions arides et semi-arides, telles que le Moyen-Orient, l'Afrique du Nord, des régions d'Afrique de l'Est et du Sud, et certaines parties de l'Europe et des États-Unis (**Amom et Nongdam 2017 ; Flowers et al., 2019**). Les dattes ont besoin de chaleur estivale pour la maturation. Généralement l'activité végétative du palmier se manifeste à partir de 7 à 10 °C, avec une activité maximale à 38°C (**Fandougouma, 2023**). Par ailleurs, les palmiers sont des espèces thermophiles et héliophiles, sensibles à l'humidité de l'air, le vent applique un effet mécanique et un pouvoir desséchant. Les palmiers ont également besoin d'un sol de bonne qualité et d'endroits où les ressources en eau sont suffisantes afin d'assurer une bonne production dattière (**Benlabi, 2019 ; Fernández-López et al., 2022**).

Le palmier dattier est un arbre connu d'intérêt majeur en raison de sa valeur nutritive élevée et de ses fruits recherchés. Outre les avantages nutritionnels, les dattes ont été associées à plusieurs effets biologiques, notamment les effets antioxydants, antimutagènes, anti-inflammatoires, anticancéreux, antimicrobiens et immunostimulants (**Amadou, 2016 ; Fandougouma, 2023**).

La production de dattes en Algérie est passée de 206 MT en 1990 à 1152 MT tonnes en 2020. Quantitativement l'Algérie fournit 12,2% de la production mondiale, elle est le premier producteur de la variété Deglet-Nour qui compte parmi les variétés les plus appréciées au monde (FAOSTAT, 2020) (Figure 1).

Cependant, en Algérie la phoeniciculture est confrontée à plusieurs contraintes abiotiques et biotiques principalement dues aux rudes conditions désertiques dans lesquelles il pousse. Parmi ces contraintes, on cite : la désertification, la sécheresse, la salinité et les maladies dévastatrices comme le Bayoud (Benlarbi, 2019).



Figure 01 : Palmier dattier (Al-Snafi et Thuwaini, 2023).

### 1.1. Importance économique

Sur le plan socio-économique, la datté constitue la principale production des régions sahariennes. En effet, il contribue au revenu agricole des populations de ces régions (Boulahouat et al., 2022) et constitue la base de l'alimentation humaine et animale. Ils sont également une partie vitale de la culture et de l'agrobiodiversité de la région.

De plus, les dattes ne sont pas seulement un aliment de base, mais aussi une importante culture commerciale d'exportation (Sidky, 2017).

Compte tenu de la grande importance des palmiers dattiers dans le développement agricole et socio-économique pour tout au long de l'histoire humaine des pays producteurs, il est essentiel de surveiller, de préserver et d'assurer une gestion précise de la production de dattes (Gibril *et al.*, 2023 ; Ghazzawy *et al.*, 2023).

La variété Deglet Nour très appréciée, tant sur le marché national qu'international, elle constitue 51,8% de la production totale algérienne de palmier dattier et place l'Algérie au quatrième rang des pays producteurs dans le monde (FAOSTAT, 2020) (Tableau 01).

**Tableau 01** : Répartition de production de dattes par wilaya (Sidaoui, 2018).

Wilaya	Production (Quintal)	Nombre de palmiers dattiers
<b>Biskra</b>	4077900	4315 100
<b>El oued</b>	2474000	3788 500
<b>Ouargla</b>	1296300	2576 600
<b>Adrar</b>	910300	379 900
<b>Ghardaïa</b>	56500	1246 500
<b>Bechar</b>	300500	1639 800
<b>Tamanrasset</b>	109400	688 900
<b>Khenchela</b>	68 200	124 400
<b>Tébessa</b>	20 500	61 800
<b>Laghouat</b>	16 200	37 300
<b>Illizi</b>	15 600	129 100
<b>Batna</b>	14 000	28 700
<b>El Bayadh</b>	10 300	63 900
<b>Naama</b>	10 200	50 600
<b>Tindouf</b>	8 400	45 200
<b>Djelfa</b>	6 800	10 100
<b>Total</b>	9 903 600	18 605 100

## II. Les contraintes abiotiques et biotiques qui limitent la culture de palmier dattier

### 2.1. Les contraintes abiotiques

Ces stress abiotiques sont causés par des facteurs environnementaux tels que la salinité, la sécheresse et la désertification.

### 2.1.1. La salinité

La salinité est le terme utilisé pour décrire l'état dans lequel les sels solubles s'accumulent dans la solution (sol ou eau) à un niveau qui a un impact négatif sur la croissance et le développement des plantes (Ait El Mokhtar, 2020). La salinité est considéré comme étant le principal stress abiotique compliquant la culture de le palmier dattier et endommageant sa production dans le monde entier (Ait-El-Mokhtar et al., 2020 ; Rabhi et al., 2022).

L'accumulation anormale des sels dans le profil du sol limite la croissance et le développement des plantes en particulier dans les régions arides et semi-arides. En outre, elle réduit considérablement le rendement agricole de plus de 20%.

L'excès de sel dans les sols entraîne une perturbation des activités physiologiques et biochimiques des plantes. Le stress osmotique est le premier stress induit par l'excès de Na<sup>+</sup> et de Cl<sup>-</sup>. La salinité génère également un second stress appelé stress oxydatif qui est dû à l'accumulation d'espèces réactives de l'oxygène (ERO) (Ait El Mokhtar, 2020 ; Kerbab et al., 2021).

### 2.1.2. La sécheresse

Est le premier stress environnemental responsable d'une baisse de la production agricole dans le monde, elle affecte les plantes de diverses manières, notamment en ralentissant la croissance des plantes et en perturbant leur physiologie (Harkousse et al., 2021).

La sécheresse, provoquée par un déficit prolongé des précipitations, se traduit au niveau de la végétation par un stress hydrique induit par la baisse des réserves utiles en eau du sol. Ce stress impacte fortement la croissance, la reproduction, et la survie des plantes et est considéré comme le principal facteur climatique associé à la mortalité des plantes. La réponse des plantes à la déshydratation diffère en fonction des mécanismes adaptatifs exprimés par les plantes, mais également de l'intensité du stress hydrique (Xue et al., 2017).

### 2.1.3. La désertification

Il s'agit de la dégradation des terres dans les zones arides, semi arides et subhumides sèches due à une variété de facteurs, notamment le changement climatique et les activités humaines. Elle réduit la productivité et les revenus agricoles et contribue à la perte de biodiversité (Yukie et al., 2011 ; Fernández-López et al., 2022).

### 2.2. Les contraintes biotiques

Le stress biotique représente l'ensemble des paramètres physico-chimiques ou biologiques, qui résultent de l'existence de l'activité des organismes vivants. Ainsi, les facteurs biologiques caractérisant toutes les influences que les organismes exercent les uns sur les autres et sur leur environnement (Benabderahmane, 2021).

La culture du palmier dattier est exposée à des problèmes phytosanitaires qui entravent son développement et son expansion. Elle est menacée par de nombreux ravageurs et maladies à insectes et à champignons (Tableau 02), dont certains occasionnent des dégâts redoutables et présentent une importance économique considérable, alors que d'autres, occasionnent des dégâts moindres et parfois négligeables (Mohamed mahmoud, 2017 ; Hukou et al., 2023).

**Tableau 02:** Exemples de certaines maladies phytopathogènes et agents pathogènes sur le palmier dattier.

Type de maladies	agents pathogènes	Les symptômes	Les références bibliographies
Maladies à champignons	<i>Mauginiellascaett ae</i>	La maladie de pourriture de l'inflorescence (tuant les fleurs, les tissus internes apparaissent en coloration rouge à brune)	(Bensaci et al., 2023)
	<i>Thielaviopsis punctulata</i>	la maladie de la brûlure noire (flexion du cou, de dessèchement des feuilles, de nécrose des tissus, de flétrissement et de mortalité de l'arbre)	(Alhudaib et al., 2022)
	<i>Fusariumoxyspor umf.sp. albedinis</i>	la fusariose vasculaire (Bayoud) (couleur brune le long des vaisseaux conducteurs et sur le côté du rachis)	(Sahouli, 2021)





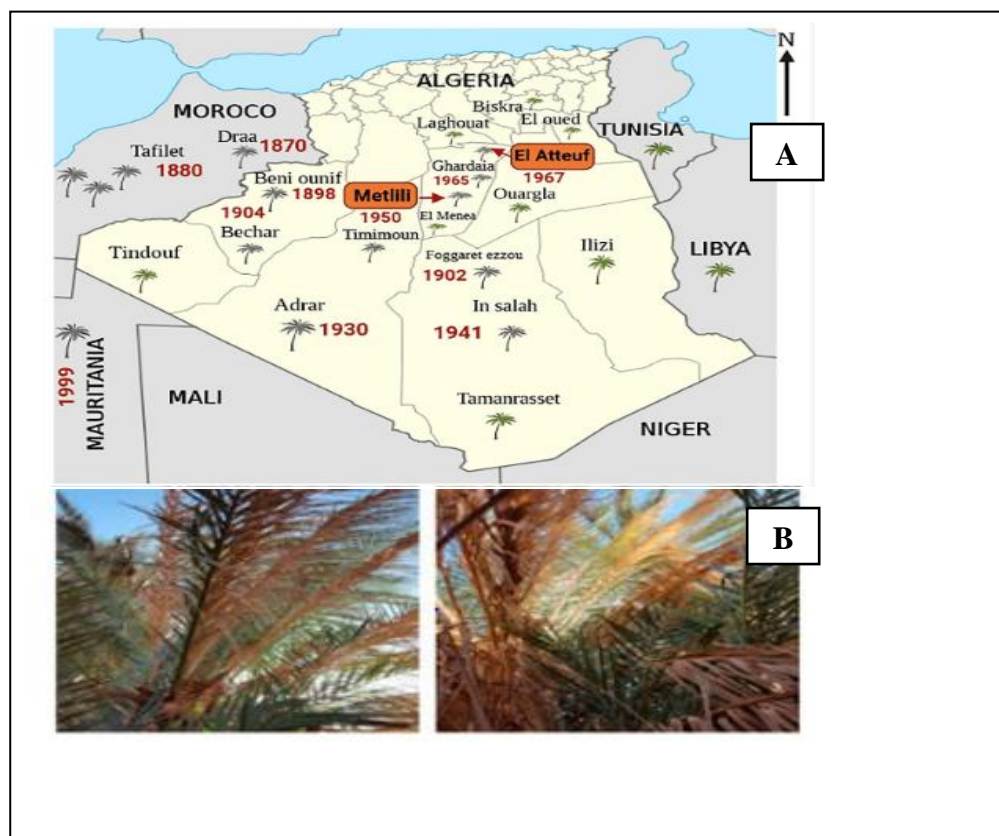
### 2.2.1. Généralité sur la maladie de Bayoud et son agent causal

Le bayoud, fusariose vasculaire du palmier dattier, est la plus grave maladie cryptogamique du palmier dattier. Il constitue un véritable fléau des zones phœnicicoles d'une partie de l'Afrique du Nord, et une menace pour tous les pays qui en sont indemnes. Sa propagation a causé la destruction des millions des palmiers. Il a détruit les deux tiers des palmeraies marocaines, soit 12 millions d'arbres en un siècle et plus de trois millions d'arbres en Algérie (**figure 2.A**). Ainsi, il a entraîné la disparition des meilleures de variétés de renommées mondiale et surtout celles qui sont les mieux soignées et les plus productives (**Bahriz et Bouras, 2020**).

C'est une maladie à caractère épiphytique, incurable à l'état actuel de nos connaissances (**Bahriz et Bouras, 2020**). Cette maladie est causée par le *F. o. a* champignon du sol classé sur la liste "A2" de l'OEPP des organismes de quarantaines, et sur la liste "A" des organismes nuisibles contre les quels la surveillance et la lutte sont obligatoires en Algérie (**Boulahouat et al., 2022**). Le genre *Fusarium* appartient à l'ordre des Hypocreales et à la famille des Nectriaceae (**Bahriz et Bouras, 2020**).

*Fusarium oxysporum* f. sp. *albedinis* est un champignon tellurique, vit dans le sol comme saprophyte et dans la plante comme parasite (**Bahriz et Bouras, 2020**). Il se persiste sous forme de chlamydospores dans les tissus morts des palmiers malades (racines, rachis, etc.) avec la désintégration ultérieure de ces tissus. Les chlamydospores peuvent être libérées dans le sol où elles restent dormantes. Le champignon peut également survivre sur des porteurs asymptomatiques, par exemple *Lawsonia inermis*, *Medicago sativa* (luzerne), *Trifolium*. *F. oxysporum* f. sp. *albedinis* peut se multiplier sur des débris végétaux décomposés dans le sol mais son développement saprophyte est relativement faible. Les chlamydospores sont rares mais peuvent persister dans le sol pendant plus de 8 ans. Lorsque les spores sont stockées dans du sable fin dans des conditions de température ambiante, elles peuvent conserver leur vitalité et leur niveau de pathogénicité pendant plus de 30 ans. Dans les oasis contaminées, l'agent pathogène est inégalement réparti et se trouve généralement dans la rhizosphère (30 à 60 cm de profondeur). Même un nombre relativement faible de chlamydospores (quelques milliers) suffit à déclencher la maladie et l'infection de quelques racines seulement peut entraîner la mort de l'arbre (**OEPP/PPE, 2022**).

La maladie du bayoud s'attaque aussi bien aux palmiers matures qu'aux jeunes palmiers, ainsi qu'à leurs ramifications basales (OEPP/PPE, 2017). Des symptômes spécifiques apparaissent sous la forme d'une couleur brune le long des vaisseaux conducteurs et sur le côté du rachis. Les symptômes des feuilles atteintes évoluent par l'apparition d'un palmier dans la cime médiane qui se dessèche et devient blanc, d'où le nom arabe de Bayoud, dérivant d'Abied, signifiant blanc (Boulahouat et al., 2022). Les folioles se dessèchent de bas en haut et se replient vers le rachis. La paume prend l'aspect caractéristique d'une plume mouillée. Les palmiers atteints finissent par se dessécher, entraînant la mort de l'arbre en quelques semaines à plusieurs mois (Figure 2.B) (Ahmed et al., 2019).



**Figure 02** : A) Propagation de la maladie du Bayoud en Afrique du Nord B) Symptômes de la maladie du bayoud sur des palmiers infectés (Boulahouat et al., 2022).

### 2.2.2. Généralité sur la maladie de pourriture et de rachis de palmier dattier

La famille des *Botryosphaeriaceae* est largement distribuée dans de nombreuses régions géographiques et climatiques du monde, à l'exception des régions polaires. Les espèces appartenant à cette famille peuvent être pathogènes, endophytes ou saprophytes (**Philips et al., 2013 ; Sun et al., 2022**). Pour ces deux derniers, il peut rester dormants dans l'hôte sans exprimer des symptômes apparents (**van Niekerk et al., 2006 ; Úrbez -Torres, 2011 ; Yang et al., 2017 ; Valencia et al., 2019**).

Ce champignon ubiquistes peut infecter plusieurs hôtes comme : les pommiers, les bleuets, les agrumes, les conifères ou les eucalyptus, la vigne (**Alves et al., 2006 ; Yan et al., 2013 ; Hilário et al., 2020**).

Les espèces de la famille *Botryosphaeriaceae* sont difficiles à contrôler, car ce sont des organismes endophytes et agents pathogènes latents dans le bois. Les symptômes de la maladie peuvent apparaître et s'exprimer uniquement lorsque l'hôte est stressé (**Slippers et Wingfield, 2007**).

De manière générale, les principaux symptômes sont le dépérissement des pousses, des bras et du tronc, des chancres vivaces et une nécrose vasculaire brune et noire qui forment des décolorations sur bois. Il a également été possible d'observer des malformations et une légère chlorose des feuilles en fonction des extensions boisées colonisées (**Van Niekerk et al., 2006 ; Úrbez-Torres et Gubles, 2009 ; Úrbez-Torres, 2011 ; Ramirez et al., 2018 ; Larach et al., 2020 ; Mojeremane et al., 2020**).

Parmi les genres de la famille *Botryosphaeriaceae* le genre *Lasiodiplodia* qui est un agent pathogène provoquant le dépérissement, la gommose ou la nécrose des racines sur palmier dattier (**Al-Sadi, 2013**). Les espèces du genre *Lasiodiplodia* sont des agents pathogènes importants de plusieurs espèces de plantes tropicales et subtropicales (**Domsch et al., 1980 ; Mohamed mahmoud, 2017**). Ils sont généralement associés au dépérissement et sont régulièrement isolés de divers tissus (brindilles, écorce, tissus vasculaires et fruits) des plantes atteintes. Ce champignon a été rapporté comme un agent causal de plusieurs maladies sur différentes parties du palmier dattier, y compris le rachis, la pourriture des inflorescences (**El-Morsy, 1999 ; Al-Sadi et al., 2013**) et la pourriture de la base des feuilles l'agent causal est : *Botryodiplodia theobromae* (**El-Morsi et al., 2012**).

### III. Moyens de lutte

A ce jour, aucun traitement curatif n'existe contre ces champignons qui provoquent des maladies dangereuses pour les palmiers. (Kaddouri et al., 2020 ; Boulahouat et al., 2022). Cependant, plusieurs mesures peuvent être prises pour contrôler et réduire ces ravageurs (Bahriz et Bouras, 2020).

Les principaux moyens de lutte sont :

#### 3.1. Les mesures prophylactiques

Pour éviter la propagation des maladies, des mesures prophylactiques doivent être prises pour protéger les palmeraies saines, par la sensibilisation des agriculteurs et les contrôles phytosanitaire visant à empêcher le transport de matériel végétal contaminé d'une palmeraie atteinte à une autre saine, ainsi que la prospection des palmeraies par les services de la protection des végétaux (Bahriz et Bouras, 2020).

Dans le cas de détection précoce du nouveau foyer de ces maladies dans une zone saine, 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. Mais l'utilisation de ce dernier a été totalement interdite ces dernières années en raison de sa dangerosité et de sa faible efficacité (Hakkou et al., 2023).

#### 3.2. Les techniques culturales

Pour prévenir les maladies, les techniques culturales consistent à éviter les conditions qui favorisent la croissance de l'agent pathogène. La maladie est moins présente en conditions d'irrigation réduites, ainsi que dans les sols à pH alcalin, riches en calcium et potassium, pauvres en phosphore et magnésium et dont l'azote est sous forme nitrique plutôt qu'ammoniacal (Benlarbi, 2019).

### 3.3. Lutte chimique

Il s'agit de l'utilisation des fongicides à action systémique ou endotherapique (**Boulahouat et al., 2022 ; Hakkou et al., 2023**), éradication et incinération du palmier, désinfestation du sol par solarisation (**Boulahouat et al., 2022**), et fumigation dans le cas de détection précoce d'un nouveau foyer de maladie dans une zone saine (**Essarioui et Sedra, 2017 ; Bahriz et Bouras, 2020**). Malheureusement, le contrôle chimique affecte le microbiote bénéfique du sol et peut s'accumuler dans la chaîne alimentaire (**De Lamo et Takken, 2020**).

Les fongicides ont des effets négatifs sur l'environnement et la santé humaine. En plus, ces produits sont peu stables dans le sol et peuvent favoriser le développement de nouvelles souches résistantes de champignons (**Khan et al., 2018 ; Hakkou et al., 2023**). De plus, l'utilisation de cultivars résistants ne permet pas d'obtenir une haute qualité alimentaire des dattes (**Boulahouat et al., 2022**).

Quant à l'utilisation d'un fumigeant, cette méthode présentant l'inconvénient d'être coûteuse, difficile et dangereuse. Cependant, la chloropicrine est commercialisée de moins en moins et le bromure de méthyle est l'objet d'une procédure internationale de retrait du marché pour son rôle sur la couche d'ozone, très toxique pour l'homme et les animaux (**Bahriz et Bouras, 2020**). De ce fait, la lutte chimique n'est pas envisageable à présent car son utilisation fréquente pendant de nombreuses années entraîne des dommages à l'environnement (**Bahriz et Bouras, 2020 ; Hakkou et al., 2023**).

### 3.4. La lutte génétique

La lutte génétique par l'utilisation de variétés résistantes apparaît donc comme la seule méthode efficace pour lutter contre les champignons phytopathogènes de palmier dattier (**Hakkou et al., 2023**). Plusieurs sources possibles de résistance sont distinguées : les variétés actuellement cultivées, la population naturelle des palmiers issus de semis naturel, introduction de résistance par croisements contrôlés et transformation génétique : incorporation de(s) gène(s) isolé(s) provenant de génotypes du dattier résistant ou d'autres espèces de palmarées ou de micro-organismes antagonistes ou autres sources de préférence végétales, L'introduction de la résistance pourrait être également faite par mutagenèse des cellules ou des tissus à l'aide de l'irradiation ou d'autres mutagènes (**Bahriz et Bouras, 2020**).

Mais il reste toujours des contraintes pour cette méthode telle que la qualité médiocre des dattes des variétés résistantes (**Sahouli, 2021**).

### 3.5. La lutte biologique

L'une des méthodes de lutte les plus prometteuses pour supprimer les maladies des plantes (**Boulahouat et al., 2022**). La lutte biologique contre les agents pathogènes telluriques se fait principalement par des mécanismes tels que le parasitisme, l'antibiose, la compétition et l'induction de réaction de défense (**Sahouli, 2021**). Elle comprend l'utilisation des antagonistes ou des substances naturelles.

## IV. La lutte biologique par les *Pseudomonase spp.* Fluorescents

### 4.1. La lutte biologique

L'application moderne de la lutte biologique a été introduite à la fin du XIXe siècle cependant, des techniques apparentées ont été utilisées pendant au moins 2000 ans (**Van Lenteren, 2018 ; Lahlali et al., 2022**).

La lutte biologique (ou biocontrôle) est une stratégie importante et respectueuse de l'environnement, appliquée pour la gestion des maladies infectieuses des plantes causées par différents types de ravageurs incluent des insectes nuisibles, des microorganismes pathogènes des cultures, des mauvaises herbes et des rongeurs (**Stenberg et al., 2021**). Son principe est basé sur l'utilisation de micro-organismes vivants pour réduire et/ou maintenir la population d'un phytopathogène en dessous des niveaux qui entraînent une perte économique (**Carmona-Hernandez et al., 2019**) et améliorer l'immunité des plantes (**He et al., 2021**).

D'une part, les agents de lutte biologique ou bien les biopesticides, sont toutes organismes qui inhibe ou stoppe la croissance d'un parasite ou d'un pathogène. Ils sont divisés en deux grands groupes :

- Les agents abiotiques qui sont des dérivés de diverses sources de matières d'origine organique (les extraits de plantes, les métabolites secondaires et les huiles essentielles) et inorganique comme les sels de phosphate et de silicium.
- Les agents biotiques comprenant des champignons microscopiques, des bactéries, des virus (ou phages) et même des insectes qui ont un effet inhibiteur sur les agents pathogènes ou les ravageurs à travers plusieurs mécanismes d'action (**Narayanasamy, 2013**).

D'une autre part, l'efficacité de la lutte dépend du choix des agents de la lutte biologique performante à partir des critères à savoir, un bon taux de reproduction, être spécifiques, avoir une bonne capacité d'adaptation, leur cycle de vie doit être synchronisé à celui du ravageur ou de l'organisme parasite (**Weeden et al., 2007**).

De ce fait, le choix des microorganismes antagonistes de l'agent pathogène est un critère très important pour lutter contre les maladies des plantes. Ces antagonistes doivent être (**Lamari et al., 2014**) :

- Efficaces in situ en présentant une aptitude importante à la compétition ou encore à l'antibiose.
- Capables de persister dans les sols et de coloniser rapidement les racines des plantes

#### **4.2. Les microorganismes utilisables dans la lutte biologique**

L'utilisation des micro-organismes est l'une des méthodes de lutte biologique les plus prometteuses pour supprimer les maladies des plantes (**Slama et al., 2019 ; Slama et al., 2021**). La rhizosphère contient une communauté microbienne complexe appelée le microbiome de la rhizosphère. Ce consortium microbien vit autour des racines des plantes et est formé de nombreux microorganismes, dont certains sont bénéfiques tels que les bactéries, les algues et les champignons (**Mohanram et Kumar, 2019 ; Lahlali et al., 2021**). Les plantes peuvent recruter des micro-organismes bénéfiques uniques dans la rhizosphère, ce qui peut les aider à atténuer l'activité de la maladie et à les rendre plus résistantes aux facteurs de stress environnementaux (**Tena, 2018**).

Concernant le contrôle biologique fongique, plusieurs espèces fongiques largement étudiées ont été identifiées et utilisées en agriculture comme agents de lutte biologique contre les agents pathogènes des plantes en raison de leur capacité à les concurrencer et à les parasiter (parasitisme fongique) (**Pfordt et al., 2020 ; Alfiky et Weisskopf, 2021 ; Poveda, 2021**).

Bien qu'il inclue une longue liste, mais les plus importants sont les *Metarhizium*, *Paecilomyces*, *Verticillium*, *Hirsutella*, *Nematophthora*, *Arthrobotrys*, *Drechmeria*, *Fusarium*, et *Monacrosporium* (**Mansouri, 2022**). *Trichoderma* est de loin l'agent de lutte biologique fongique le plus étudié (**Pfordt et al., 2020 ; Alfiky et Weisskopf, 2021**).



Il a été démontré qu'il supprime les insectes nuisibles directement par le parasitisme et la génération de métabolites insecticides secondaires (Degani et Dor, 2021 ; Poveda, 2021). En ce qui concerne le palmier dattier, les champignons de type *Fusarium* et *Trichoderma* sp et de genre *Aspergillus* ou *Penicillium* sont doués d'activités antagonistes vis à vis de champignon phytopathogène *Fusariumoxysporum* f. sp. *Albedinis* (Benlarbi, 2019).

Pour le contrôle biologique bactérien, de nouvelles approches impliquent l'utilisation de bactéries favorisant la croissance des plantes (PGPB), classées comme celles associées à la surface des racines des plantes, appelées rhizobactéries (PGPR), et celles qui vivent à l'intérieur des tissus végétaux, appelées endophytes (Cheikh, 2018 ; Slama et al., 2019 ; Slama et al., 2021). En effet, Les endophytes sont des micro-organismes qui vivent en symbiose avec les plantes et résident dans les tissus végétaux à un moment donné de leur vie, sans causer de dommages apparents à la plante hôte (Petrini, 1991 ; Rutkowska et al., 2023).

Ces bactéries sont connues pour leurs capacités à favoriser et stimuler la croissance des plantes et à protéger les plantes hôtes contre les phytopathogènes (Cherif, 2019). Les PGPR sont des espèces bactériennes dont les *Alcaligenes*, *Azospirillum*, *Erwinia*, *Arthrobacter*, *Acinetobacter*, *Bradyrhizobium*, *Bacillus*, *Burkholderia*, *Enterobacter*, *Flavobacterium*, *Pseudomonas*, *Rhizobium*, *Azorhizobium*, *Bradyrhizobium*, *Allorhizobium*, *Sinorhizobium*, *Frankia*, *Mesorhizob*, *Azoarcus*, *Exiguobacterium*, *Methylobacterium*, *Paenibacillus* et *Panorteil* (Lahlali et al., 2022). Les bactéries les plus étudiées en lutte biologique appartiennent aux genres *Bacillus*, *Burkholderia*, *Enterobacter* et *Pseudomonas* (Cherif et al., 2016 ; Slama et al., 2019). Les *Pseudomonas* spp. Fluorescents font partie des espèces utilisées comme agent de lutte biologique contre les maladies des cultures. Cela est dû à ses caractéristiques suivantes : une colonisation efficace des racines, des tubercules, de l'hypocotyle...etc, la capacité d'utiliser une variété de substrats organiques habituellement trouvés dans les exsudats de racines et de graines, leur culture facile dans des conditions de laboratoire, la production d'une variété de métabolites secondaires et leur compatibilité avec les pesticides couramment utilisés et d'autres agents de lutte biologique (Sindhu et al., 2016).

#### 4.2.1. Les *Pseudomonas* spp. fluorescents

*Pseudomonas* spp. fluorescents est un groupe assigné aux rhizobactéries dites PGPR "Plant Growth Promoting Rhizobacteria" (Kloepper et al., 1980 ; Wu et al., 2020), forment un groupe diversifié de bactéries qui peuvent généralement être distinguées visuellement des autres *Pseudomonas* par leur aptitude à produire de pigments jaune vert : les pyoverdines (sidérophore). Ils appartiennent à la Famille des *Pseudomonaceae* et du genre *Pseudomonas* (Palleroni et Migula, 1984).

Les *Pseudomonas* spp fluorescents saprophytes sont des habitants typiques des sols agricoles et interagissent avec les plantes de plusieurs façons. Ce sont des bacilles Gram négatifs typiques à de 0,5 à 1 mm de diamètre sur 1,5 à 5mm de long, chimio-hétérotrophes mobiles avec un flagelle polaire et sont regroupés au sein d'un même groupe d'homologie asporulées (Kloepper et Schroth, 1981 ; Bell Perkins et Lynch, 2002 ; Kahli et al., 2022 ) .

Dans ce groupe, les espèces saprophytes sont à cytochrome oxydase positive, catalase positive (Palleroni, 2009), ayant une arginine dihydrolase et ne provoquent pas de réaction d'hypersensibilité sur tabac (Stanier et al., 1966; Palleroni, 1984 et 1992 ; Benoussaid ,2018).

*P. fluorescent* est un agent de lutte biologique prometteur qui peut inhiber une variété d'agents pathogènes des plantes, tels que *Fusarium oxysporum* et *Botrytis cinerea*, mais en raison de sa faible résistance à la chaleur, son taux de survie est faible (Chen et al., 2019).

#### 4.2.2. Effets bénéfiques de *Pseudomonas* spp fluorescents endophytiques sur l'hôte

Les *Pseudomonas* spp. Fluorescents endophytes sont des habitant dominant de la rhizosphère de plusieurs plantes bien connus pour exercer une large gamme d'effets bénéfiques sur les plantes (Panth et al. 2020 ; Anuroopa et al., 2021).

Ils permettent d'améliorer le développement de la plante-hôte, en sécrétant divers métabolites qui améliorent la tolérance de l'hôte à différents stress, les rendant ainsi bénéfiques pour les plantes, et ils servent potentiellement d'agents biologiques prometteurs dans le biocontrôle des maladies telluriques (Widiantini et al., 2017).

Les effets bénéfiques de ces *Pseudomonas* endophytiques reposent sur leur action sur divers mécanismes, y compris des mécanismes directs et indirects (Jeyanthi et Kanimozhi, 2018) (Figure 03).

### 4.2.3. Action direct

#### 4.2.3.1. Induction de la résistance aux maladies des plantes (ISR)

L'induction de la résistance systémique chez les plantes est un processus qui permet de l'expression de gènes liés à la défense des plantes et activer la réponse immunitaire de l'hôte (**Bastias et al., 2017 ; Khare et al., 2018 ; Nerek et Sokolowska, 2022**). Ce qui permet une résistance contre les agressions biotiques et abiotiques.

Les rhizobactéries bénéfiques du groupe des *Pseudomonas* spp. fluorescents peuvent induire ce type de réaction pour inhiber la croissance d'un grand nombre d'agents phytopathogènes également, en synthétisant dans la rhizosphère quelques métabolites du métabolisme bactérien secondaire : tels que la production des sidérophores, le CLP, le DAPG et les composés organiques volatils (COV), y compris l'acétoïne et le 2,3 - butanediol agissent comme un éliciteur de l'ISR (**Arshad et al, 2007**). De plus, l'ISR implique une phytohormone l'éthylène qui stimule les réponses de défense de la plante hôte contre une variété de phytopathogènes (**Glick, 2012**). Ces composants bioactifs pourraient fournir une ressource alternative prometteuse pour la gestion des maladies des plantes (**Wu et al., 2018**).

#### 4.2.3.2. Stimulation de la croissance des végétaux

Les *Pseudomonas* spp. Fluorescents ont la capacité de synthétiser des métabolites secondaires influencent positivement sur la croissance des plantes (**Struz et Christie, 2003**). Il comprend l'amélioration de nutrition minérale de la plante, essentiellement pour le fer, le phosphore, l'azote et le manganèse (**Compant et al., 2005**).

Il existe également une synthèse microbienne de l'auxine, l'acide gibbérellique, cytokinines et de l'éthylène et des composés vitaminiques (**Li et al., 2018**), sont de substances de croissance analogues aux phytohormones (**Shanmugaiah et al., 2015**).

#### 4.2.4. Action indirects

##### 4.2.4.1. Compétition spatiale/trophique

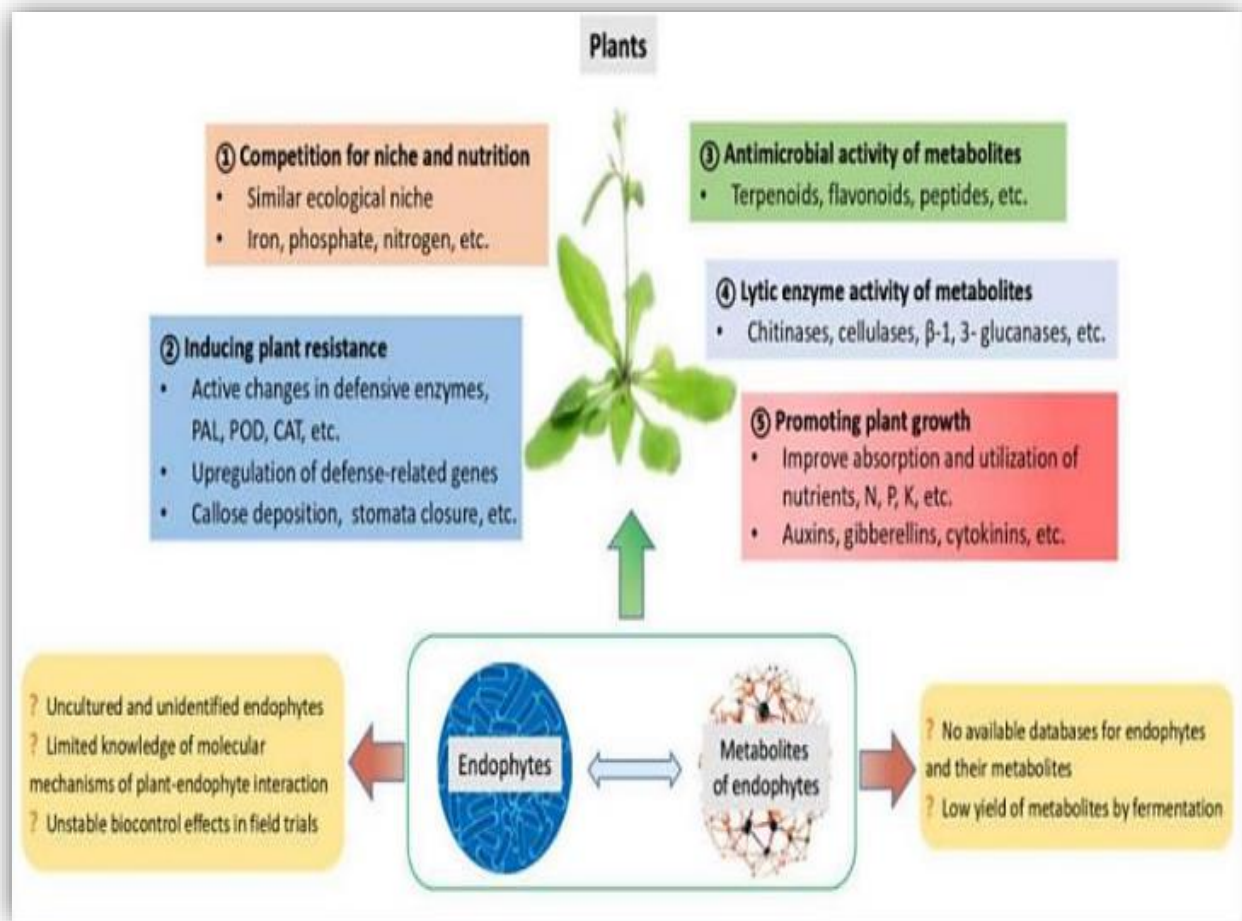
Il est intéressant que la compétition avec les microorganismes pathogènes pour la niche et la nutrition qui est un mécanisme prometteur pour l'utilisation des *Pseudomonas* spp fluorescents endophytiques dans le contrôle des maladies des plantes. Il est possible que ces derniers occupent les sites d'invasion des agents pathogènes dans les plantes et entrent en compétition avec les microbes pathogènes pour la nutrition, et ainsi réduire le nombre de sites habitables pour les microorganismes pathogènes et par conséquent, leur croissance (**Messaoudi, 2015**).

La compétition pour les nutriments se fait généralement par la disponibilité en fer dans le milieu. Par la sécrétion de sidérophores, les *Pseudomonas* spp. Fluorescents piègent le fer présent dans le milieu en privant les autres microorganismes et en inhibant leurs pouvoirs de pathogénicité (**Meliani, 2012 ; Shameer et al., 2018**).

##### 4.2.4.2. Antibiose

L'antibiose est un phénomène fréquent chez *Pseudomonas* spp fluorescent. Il consiste à produire des antibiotiques efficaces par l'agent antagoniste contre l'agent pathogène (**Corbaz, 1990 ; Oliveira et al., 2020**).

Les souches de *Pseudomonas* spp fluorescent produisent une variété de métabolites antifongiques et / ou antibactériennes puissante impliquée dans le biocontrôle, par exemple l'acide cyanhydrique (HCN), la pyolutéorine, le 2,4-diacetylphloroglucinol (DAPG), la pyrrolnitrine, les phénazines (**Defago, 1993; Haas et Defago, 2005**).



**Figure 03** : Mécanismes multiples employés par les endophytes et leurs métabolites dans la gestion des maladies des plantes (Yandong et *al.*, 2022).



## **Partie II : Matériel et méthodes**

Notre travail qui porte sur l'activité antagoniste des *Pseudomonas* spp fluorescents endophytiques a été réalisé au niveau du laboratoire de recherche de Protection et de Valorisation des Ressources Agrobiologiques (LPVRA) à l'université Saad d'ahlab Blida 01.

Notre travail a pour objectifs

- I. La Purification des souches de *Pseudomonas* spp fluorescents isolées.
- II. L'Identification préliminaire des souches de *Pseudomonas* spp. fluorescents endophytiques.
- III. Evaluation de l'activité antagoniste des souches de *Pseudomonas* spp. fluorescents sélectionnées in vitro et in situ.

## **1. Matériel**

### **1.1. Matériel non biologiques**

Le matériel non biologique représenté par la verrerie, l'appareillage et les compositions des milieux de culture est consigné en **annexe I**.

### **1.2. Matériel biologiques**

#### **1.2.1. Les souches bactériennes antagonistes**

Vingt souches bactériennes de *Pseudomonas* spp. fluorescents ont été utilisées dans notre travail. Les souches bactériennes ont été isolées en Mai 2021 de l'endophytosphère du palmier dattier des différentes variétés de la région Kenadsa et Taghit communes algériennes de la wilaya de Béchar située à 22km et 93km respectivement de cette dernière (**Tableau 03**).

**Tableau 03 :** Caractéristiques les codes des vingt souches bactériennes de *Pseudomonas* spp.fluorescents utilisées.

<b>Isolats</b>	<b>Age</b>	<b>Cultivar</b>	<b>Région</b>	
<b>TBR51</b>	2 ans	Biskra	Taghit	
<b>TRR5</b>	25 ans	Ras El Hmar		
<b>KHE7</b>	20 ans	Hmira	Kenadsa	
<b>KHE62</b>				
<b>KFR2</b>	19 ans	Feggous		
<b>KMR2</b>	35 ans	Hamriya		
<b>KMR7</b>				
<b>PF10 (TCE)</b>	20 ans	Cherka		Taghit
<b>PF3 (TCE)</b>				
<b>PF31 (TCE)</b>				
<b>CF1 (TRE)</b>	25 ans	Ras El Hmar		
<b>CF11 (TRE)</b>				
<b>EF5 (TBE)</b>	2 ans	Biskra		
<b>EF3 (TBE)</b>				
<b>BF12 (TBE)</b>				
<b>BF6 (TBE)</b>				
<b>ZF2 (TRE)</b>	25 ans	Ras El Hmar		
<b>ZF6 (TRE)</b>				
<b>RF6 (TFE)</b>		Feggous		
<b>RF5 (TFE)</b>				



### 1.2.2. Les souches bactériennes pathogènes

Pour l'évaluation de l'activité antagoniste des souches de *Pseudomonas* isolées, nous avons utilisé deux souches bactériennes phytopathogènes à savoir *Agrobacterium tumefaciens* (C5.83) et *Erwinia amylovora* (EMEA). Ces souches bactériennes font partie de la collection du laboratoire de phyto bactériologie à l'université Saad D'ahlab Blida -1-.

### 1.2.3 Les souches fongiques phytopathogènes

Pour évaluer l'activité antagonismes *in vitro* des souches de *Pseudomonas spp.* fluorescents, Nous avons utilisé deux formes spéciales de *Fusarium oxysporum* (*Fusarium oxysporum*f.sp. *lini* et *Fusarium oxysporum*f.sp. *albedinis*) et une souche fongique *Botriosphaeria Dothidae* (*B.s.d*) Ces souches fongiques appartiennent à la collection du laboratoire de mycologie (département de biotechnologie et agroécologie l'université Saad Dahlab Blida 1.

### 1.3. Matériel végétales

Pour l'évaluation de l'activité antagonisme *in vivo* du palmier, nous avons travaillé sur des inflorescences du palmier de la station expérimentale de la faculté des sciences de la Nature et de la vie l'Université Saad D'ahlab Blida 01 (figure 04).



**Figure 04 :** Palmier dattier de la station expérimentale de l'université saad dahlab Blida 01.

## 2. Méthodes

### 2.1. Purification des souches bactériennes

La purification c'est une opération nécessaire afin de vérifier la pureté des vingt souches bactériennes de *Pseudomonas* spp. Fluorescents. La purification a été effectuée en réalisant une série de repiquage par étalement sur des boîtes de pétri contenant du milieu King B (**King et al., 1954**) (**annexe I**) et incubées à 28 °C (**figure 05**).



**Figure 05** : Repiquage des souches de *Pseudomonas* spp. fluorescents par étalement sur milieu King B.

### 2.2. Conservation des souches

Les vingt souches de *Pseudomonas* spp. fluorescents purifiées obtenues ont été repiquées dans des tubes à essai inclinés contenant le milieu KB (**annexe I**) et conservées dans un réfrigérateur à 4°C, pour des utilisations ultérieures.

### 2.3. Identification des souches

La vérification préliminaire des caractères génériques a été effectuée selon les tests classiques décrits par **Lelliot et Stead (1987)** et **Schaad (1988)** : coloration de Gram, morphologie cellulaire, oxydase, catalase et la voie d'utilisation du glucose. Les caractérisations spécifiques d'identification des *Pseudomonas* spp. Fluorescents saprophytes ont été réalisée par

les tests de LOPAT (Levane, oxydase, pectinase, arginine deshydrolase et hypersensibilité sur Tabac).

### **2.3.1. Caractères cultureux**

Les caractères cultureux des isolats bactériens étudiés sur le milieu KB (**annexe I**), sont la fluorescence, la coloration des colonies, leur pourtour et leur forme ainsi que les dimensions des colonies.

### **2.3.2. Caractérisation physiologique et biochimique**

Pour l'identification de nos isolats, une série de tests physiologiques et biochimiques a été réalisée.

#### **2.3.2.1. Test de la fluorescence**

C'est le premier test a réalisé pour une sélection préliminaires des isolats. La production de pigment fluorescent diffusible a été recherchée sur milieu King Bensemencée avec une culture pure. Après incubation de 24 à 96h à 26°C, le pigment fluorescent a été révélé sous lampe UV (350-400nm) dans une chambre noire (**Bultreys et Gheysens, 2000 ; Olmar et al., 2001**).

#### **2.3.2.2. Coloration de Gram**

Est une technique de coloration des bactéries qui permet de les identifier en fonction de leur réaction à la coloration. Cette technique permet d'observer la forme et le mode de regroupement des bactéries, ainsi que de distinguer entre les bactéries à Gram positif des Gram négatif (**Gardant et Luisetti, 1981**). Dans notre étude nous avons utilisé une autre méthode plus rapide en utilisant l'hydroxyde de potassium 'KOH'.

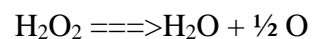
#### **2.3.2.3. Test de KOH**

Le test de l'hydroxyde de potassium 'KOH' peut être utilisé comme test de confirmation pour la 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 avec une anse stérile, on prélève une 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'anse 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**).

#### 2.3.2.4. Test catalase

Le test de catalase est une méthode courante utilisée pour identifier les bactéries qui produisent l'enzyme catalase. Il consiste à déposer une colonie bactérienne âgée de 24 heures sur une lame en verre propre et sèche, et à ajouter du peroxyde d'hydrogène (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) à 10 volumes. Une réaction positive est indiquée par l'apparition de bulles, causée par la libération d'O<sub>2</sub> (**Dickey, 1988**).



#### 2.3.2.5. Production de Levane sucrase

Le test de levane sucrase a été effectué sur milieu levane (**annexe I**). Après ensemencement du milieu en boîte de Pétri par une culture jeune âgée de 24h et incubation pendant 3 à 5 jours, le développement de colonies blanchâtres, convexes et bombées, étincelantes et muqueuses indique la présence de levane sucrase (**Hildebrand et al., 1988**).

#### 2.3.2.6. Test d'Oxydase

Le test de l'oxydase est utilisé pour identifier les bactéries à Gram négatif. Pour effectuer ce test, une crème bactérienne de 24 heures est étalée sur un papier Wathman stérile à l'aide d'une pipette Pasteur boutonnée. Ensuite, une goutte de réactif N diméthyl paraphénylène diamine est rajoutée. Si l'enzyme cytochrome oxydase est présente, une coloration violette apparaîtra dans les 30 secondes. Si la réponse apparaît en retard (Après 30 secondes), la réponse est positive tardive. Si la réponse n'apparaît pas après ce temps, la réponse est négative.

### 2.3.2.7. Activité Pécinolytique

La détermination de la production de pectinase a été faite selon la méthode décrite par **Cattelan et al., (1999)** sur le milieu gélosé M9 (**annexeI**) (**Miller, 1974**),supplémentée de 4,8g / l de pectine et de 1.2g d'extrait de levures. Après 48h d'incubation à 28 ° C, traitées les boites avec quelques gouttes d'HCL (73g/l). L'apparition d'un halo claire autour des colonies indique une réaction positive.

### 2.3.2.8. Test d'arginine dihydrolase

Certains *Pseudomonas* peuvent se développer dans des conditions anaérobies en utilisant le complexe enzymatique dihydrolase de l'arginine, qui implique deux réactions enzymatiques : la dégradation de l'arginine en citrulline (arginine desmidase) et la transformation de la citrulline en ornithine (citrullineureidase).

Ce test se déroule sur des tubes contenant le milieu Mueller Arginine (ADH 5%) (**annexeI**) qui ont été inoculés et recouverts d'une couche de vaseline (**figure 06**), et incubés ensuite à 28°C pendant 5 jours. Une réaction positive se traduit par l'apparition d'une coloration violette due à l'alcalinisation du milieu provoquée par la présence de NH<sub>3</sub> (**Hildebrand, 1988**).



**Figure 06** : Des tubes contenant le milieu Mueller Arginine (ADH 5%) inoculés et recouverts d'une couche de vaseline.

### 2.3.2.9. Test hypersensibilité de tabac

Dans le test d'hypersensibilité au tabac (Klement, 1963), une suspension bactérienne ( $10^8$ - $10^{10}$ cfu / ml) a été infiltrée dans le limbe foliaire de jeunes plantules de *Nicotiana tabaccum var xanti*. Cette infiltration a été réalisée en piquant latéralement une surface du limbe au niveau des nervures principales par utilisation d'une seringue stérile (figure 07), ce qui crée une zone humide. Sur une autre zone de la même feuille, une autre infiltration est réalisée avec de l'eau distillée stérile (témoin). Si des taches nécrotiques apparaissent et que des collapsés se forment au niveau de la zone infiltrée après 48 à 72 heures, la réponse est considérée comme positive.



**Figure 07 :** Infiltration surface du limbe foliaire des jeunes plantules de *Nicotiana tabaccum var xanti* par la suspension bactérienne

## 2.4. Evaluation du pouvoir antagoniste des souches sélectionnées *in vitro* et *in vivo*

### 2.4.1. Pouvoir antagoniste *in vitro*

#### 2.4.1.1. La confrontation bactérie- bactérie

Ce test a été réalisé sur deux milieux différents (King B et LPGA) (**annexe I**) par la méthode de confrontation directe dans le but de déterminer le meilleur milieu d'activité antagoniste.

Pour montrer l'activité antibactérienne des dix isolats endophytes (BF6, TBR51, TRR5, KFR2, ZF2, CF11, CF1, PF10, RF6, PF3) sélectionnés des différentes régions (Taghit ,Kenadsa) contre les souches cibles (*Agrobacterium tumefaciens* [C5.83] et *Erwinia amylovora* [EMEA]), nous avons utilisé un ratio de 10: 1. Cela signifie que l'antagoniste avait une concentration 10 fois supérieure à celle de la souche pathogène.

Pour préparer les suspensions bactériennes, une colonie bactérienne âgée de 24 à 48 h est prélevée à l'aide d'une anse stérile et transférée ensuite dans un tube contenant de l'eau distillée stérile. Après avoir homogénéisé la suspension, à l'aide d'une micropipette, 100µl de la suspension d'une densité proche de  $10^8$  CFU/ml sont déposés dans des boîtes de pétri contenant les deux milieux (LPGA, King B) (**figure 08**). Au total, trois spots ont été déposés dans chaque boîte de Pétri, en les incubant à 28-30°C pendant 24h. L'opération a été réalisée deux fois pour chaque bactérie dans les deux milieux (**kawaguchi et al., 2008**).

Les suspensions bactériennes pathogènes (*Erwinia amylovora* et *Agrobacterium tumefaciens*) d'une concentration de  $10^7$  CFU/ml ont été préparées en transférant une colonie bactérienne âgées de 24 h à l'aide d'une anse stérile dans un tube contenant de l'eau distillée stérile. Pour la confrontation directe, nous avons pulvérisé avec les suspensions bactériennes des deux souches pathogènes les surfaces des boîtes de Pétri préalablement ensemencées par les souches antagonistes (**figure 09**).Le tout est incubé à 28-30°C pendant 24 h.

Les témoins négatifs sont des boîtes de Pétri contenant 100µl d'eau distillée stérile déposée sur les deux milieux LPGA et KB à 24 h avant la pulvérisation des deux souches pathogènes. Les boîtes de Pétri sont ensuite entourées de papier film ou parafilm le long du bord pour éviter toute contamination.



**Figure 08:** Dépôt des spots bactériennes à l'aide d'une micropipette dans des boîtes de pétri contenant le milieu LPGA et le milieu King B.



**Figure 09:** Pulvérisation les suspensions bactériennes des deux souches pathogènes testée en spray sur les spots des bactéries antagonistes.



## ✚ Expression des résultats

L'activité antagoniste des souches de *Pseudomonas spp fluorescente* vis-à-vis a deux souche bactériennes phytopathogènes (*Agrobacterium tumefaciens* [C5.83] et *Erwinia amylovora* [EMEA]) se traduit par l'apparition des zones d'inhibition au tour des spots bactériennes.

### 2.4.1.2. La confrontation bactérie-Champignon

#### 2.4.1.2.1. Purification des souches fongiques

Les isolats fongiques ont été purifiés en utilisant une méthode de repiquage successif. À l'aide d'une pipette Pasteur, Un disque (3 mm de diamètre de mycélium) de chaque isolat de 7 jours a été placé au centre des boites de pétrie contenant le milieu PDA (Agar de pomme de terre et de dextrose) (Jehnston et Booth, 1983) (annexe I). Les boites ont été incubées à 30°C pendant 7 à 10 jours. Les souches purifiées ont été ensuite conservées à 4°C.

#### 2.4.1.2.2. Essai d'antagonisme

Le pouvoir antagoniste des isolats de *Pseudomonas spp* fluorescents a été effectué pour vérifier l'existence d'une éventuelle action inhibitrice des souches de *Pseudomonas spp.* fluorescents vis-à-vis des trois champignons : *Fusarium oxysporum albedinis* (Foa), *Fusarium oxysporum lini* (Foln) et souche de *Botriosphaeria Dothidae* (B.s.d). Deux méthode de confrontation ont été utilisée sur le milieu (PDA) (annexeI): déphasée et simultanée.

#### ✚ La méthode déphasée

La confrontation déphasée in vitro a été réalisée suivant la méthode décrite par Vincent et al., (1991) (figure 10). Elle consiste à étaler les souches de *Pseudomonas spp.* fluorescents âgée de 24 h sous forme d'une ligne sur une distance de 1,5 cm à partir des deux bords d'une boite de pétrie contenant du milieu PDA (figure 11). Après d'incubation de 24 h des lignes bactérienne, des disques fongiques (6 mm de diamètre de mycélium) d'une culture de 7 à 10 jours ont été déposés au centre des boites (figure 12). L'incubation est faite pendant 7 jours à une température de 28°C. Deux répétitions ont été effectuées pour chaque interaction.

### La méthode simultanée

La confrontation simultanée consiste à déposer les deux souches (antagoniste et pathogène) en même temps. Pour réaliser ce type de confrontation, nous avons déposé les disques fongiques au centre des boîtes immédiatement après avoir étalé les lignes des souches de *Pseudomonas* spp. fluorescents sur les boîtes, qui sont ensuite incubées à 28°C pendant 7 jours. Les disques mycéliens de chaque isolat fongique ont été utilisés comme témoins dans les cultures fongiques, sans la présence de souches de *Pseudomonas* spp. fluorescents.

#### 2.4.1.2.3. Expression des résultats

La présence d'une activité antagoniste est indiquée par la réduction du diamètre des colonies mycéliennes des champignons pathogènes en présence des souches de *Pseudomonas* spp. fluorescents par rapport au témoin non inoculé. Le pourcentage d'inhibition est calculé en utilisant la relation suivante (Wang et al., 2012) :

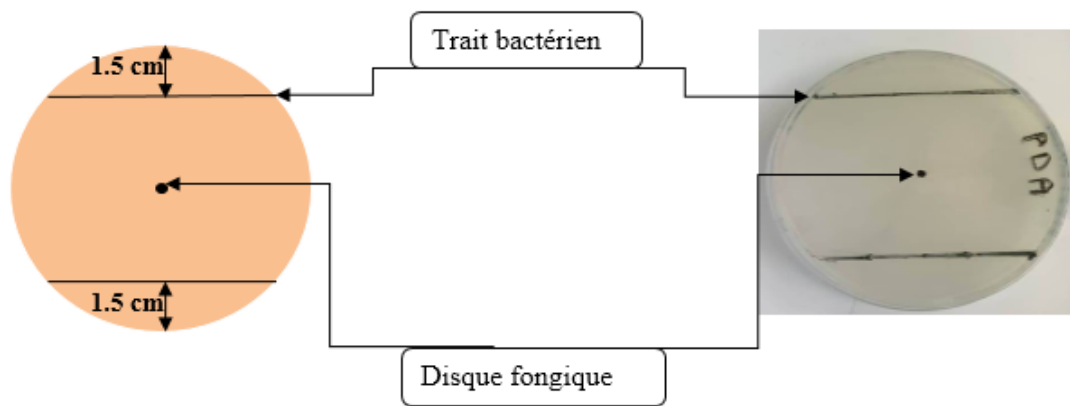
$$I\% = [(R-r)/R] \times 100$$

**I** : pourcentage d'inhibition des champignons testés (%).

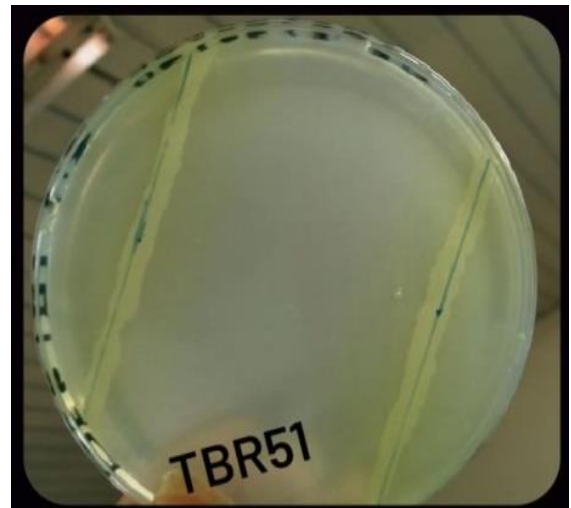
**R** : diamètre de mycélium dans la boîte de témoin (mm).

**r** : diamètre de mycélium dans les boîtes inoculées par les bactéries (mm).

Le pourcentage d'inhibition doit être supérieur à 20% pour qu'on puisse parler d'inhibition.



**Figure 10 :** Méthode de confrontation directe en boîte de pétrie entre les souches de *Pseudomonas* spp .fluorescents et les champignons phytopathogènes



**Figure 11:** Ensemencement d'une souche de *Pseudomonas* spp .fluorescents sous forme de deux stries en parallèles.



**Figure 12 :** Transplantation d'un disque fongique au centre de boîte de pétrie contient la souche de *Pseudomonas* spp.fluorescents après incubation de 24h.

### 2.4.2. Pouvoir antagoniste *in vivo*

Le champignon phytopathogène *Botriosphaeria Dothidae* (B.s.d) provoque des infections principalement présenté par la formation de nécroses sur la tige des palmiers dattier infectées.

Le test d'antagonisme *in situ* a été réalisé afin d'évaluer l'activité antagoniste de trois souches de *Pseudomonas* spp.fluorcsents sélectionnés sur la base de leur forte activité d'antagonisme *in vitro* (TBR51, TRR5 et BF6), vis-à-vis d'un champignon phytopathogène *Botriosphaeria Dothidae* (B.s.d).

La méthodologie utilisée est inspirée par **Moral et al. (2010)**, elle est réalisée en adaptant les étapes suivantes.

#### 2.4.2.1. Préparation des fragments

L'essai a été réalisé sur un ensemble de 80 boutures de 8 cm de long (**Figure 13.A**). (10 boutures pour le témoin négatif, 10 pour le témoin positif et 10 pour chaque des trois antagonistes). Deux répétitions ont été réalisées pour chaque bouture traitée.

#### 2.4.2.2. La désinfection

À l'aide des compresses, la désinfection superficielle pour chaque bouture a été faite par l'éthanol à 70 % pendant 2 min. Après, l'hypochlorite de sodium (NaOCl) à 0,5% pendant 10 min suiviede trois rinçages successifs à l'eau désilé stérile

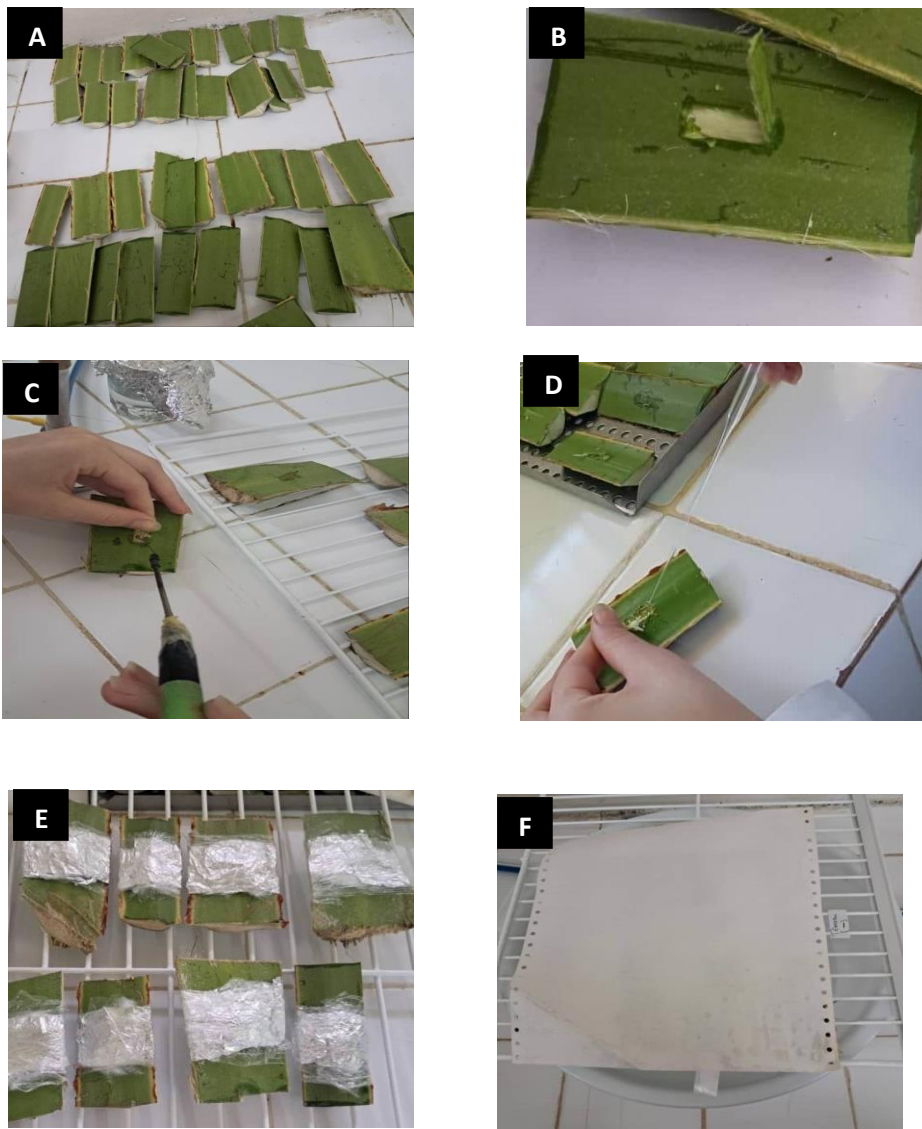
### 2.4.2.3. L'essai

Afin d'enlever l'écorce, des incisions ont été faites à l'aide d'un scalpel (**Figure 13.B**). À l'aide d'une pipette pasteur des pastilles de mycélium de chaque isolat, d'un diamètre de 10 mm ont été prélevés et déposés avec l'antagoniste qui a été placée la veille (selon la technique déphasée) sur les incisions (**Figure 13.C / 13.D**).

Après avoir inoculé les incisions, les boutures ont été enveloppé ensuite avec du coton stérile humide, puis scellé avec du papier aluminium et du parafilm (**Figure 13.E**). Les boutures ont été incubées pendant 20 jours dans des pots contenant de l'eau distillée stérile afin d'éviter le dessèchement (**figure 13.F**). Les témoins positifs ont été inoculés avec des disques des isolats fongiques, tandis que les témoins négatifs ont été inoculés avec l'eau distillée stérile uniquement.

### 2.4.2.4. Lecture des résultats

Après une période de 20 jours, les résultats se traduisent par l'apparition ou non de nécrose sur les boutures testées. Afin d'évaluer l'intensité de l'activité antagoniste des souches bactériennes, nous avons comparé la nécrose de champignons issu de la confrontations bactéries /champignons par rapport au témoin positive.



**Figure 13 :** les étapes de test d'antagonisme in situ



### **Partie III : Résultats et discussion**

Au cours de cette étude, nous avons procédé à l'identification et la caractérisation d'une collection de 20 souches isolées de l'endophytosphère du palmier dattier. Les résultats de l'identification des souches, la mise en évidence de l'activité antagoniste des souches identifiées et sélectionnées production des métabolites secondaires et de leur activité antagoniste sont présentés ci-après.

## **1. Identification préliminaire des souches *Pseudomonas* spp. Fluorescents endophytiques**

L'identification des 20 isolats repose sur la détermination de leurs caractéristiques culturaux, physiologiques et biochimiques, à travers d'une série des tests de LOPAT, test de fluorescence, test de Gram et de catalase.

### **1.1. Caractères culturaux**

Après purification, les souches bactériennes ont montré sur les milieux KB des caractères culturaux très proches (**Tableau 04**).

**Tableau 04 :** Quelques Caractéristiques morphologiques et biochimiques des 20 souches testées



Les souches	F	G	Aspect	Forme	Pigment	C
KFR2	+	-	Blanche, lisse	Circulaire	Jaune-vert	+
TBR51	+	-	Jaune verte, lisse	Circulaire	Jaune-vert	+
KHE7	+	-	Blanche, muqueuse	Circulaire	Jaune-vert	+
KMR2	+	-	Blanche, muqueuse	Circulaire	Jaune-vert	+
KMR7	+	-	Jaune, muqueuse	Circulaire	Jaune-vert	+
KHE62	+	-	Jaune, lisse	Circulaire	Jaune-vert	+
TRR5	+	-	Jaune, lisse	Circulaire	Jaune-vert	+
PF10	+	-	Jaune, muqueuse	Circulaire	Jaune-vert	+
PF31	+	-	Jaune, muqueuse	Circulaire	Jaune-vert	+
PF3	+	-	Jaune, muqueuse	Circulaire	Jaune-vert	+
CF1	+	-	Jaune, lisse	Circulaire	Jaune-vert	+
CF11	+	-	Jaune, lisse	Circulaire	Jaune-vert	+
EF5	+	-	Blanche, muqueuse	Circulaire	Jaune-vert	+
EF3	+	-	Blanche, muqueuse	Circulaire	Jaune-vert	+
BF12	+	-	Blanche, muqueuse	Circulaire	Jaune-vert	+
BF6	+	-	Blanche, muqueuse	Circulaire	Jaune-vert	+
ZF2	+	-	Blanche, lisse	Circulaire	Jaune-vert	+
ZF6	+	-	Blanche, lisse	Circulaire	Jaune-vert	+
RF6	+	-	Blanche, lisse	Circulaire	Jaune-vert	+
RF5	+	-	Blanche, lisse	Circulaire	Jaune-vert	+

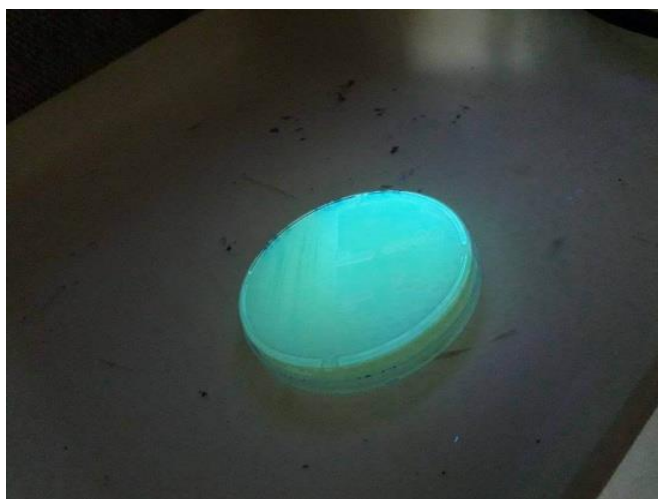
F : Fluorescence / G : Test de Gram / C : Catalase / + : réaction positive / - : réaction négative

## 1.2. Caractérisation physiologiques et biochimique des isolats

Les résultats de l'identification des 20 isolats provenant de l'endorhizosphère du palmier dattier des différentes variétés des deux régions (Kenadsa et Taghit) situées dans le sud de l'Algérie de la wilaya de Béchar sont illustrés dans (les tableaux 04 et 05).

### 1.2.1. Test de la fluorescence

Les résultats ont montré la présence d'un pigment fluorescent chez les isolats testés, qui émettent une couleur jaune verdâtre sous une lampe UV (350-400nm). Nous avons également remarqué que l'intensité de la fluorescence varie selon les souches et l'âge de la culture, ainsi que la couleur et l'intensité du pigment émis varient du vert jaune au jaune brun. Ces observations ont été rapportées précédemment par **Digat et Gardan, (1978) (Figure 14)**.



**Figure 14** : Les fluorescences des isolats bactériens sous UV (350-400nm).

### 1.2.2. Test de Gram

Les résultats du test de KOH ont montré que les 20 souches testées étaient des bactéries Gram(-). Cela a été confirmé par l'apparition d'un filament visqueux pendant l'ajout de réactif « KOH » (**Figure 15**).



**Figure 15** : Le test de potasse indicateur de Gram : La formation d'un filament mucoïde confirme le Gram négatif.

### 1.2.3. Test de catalase

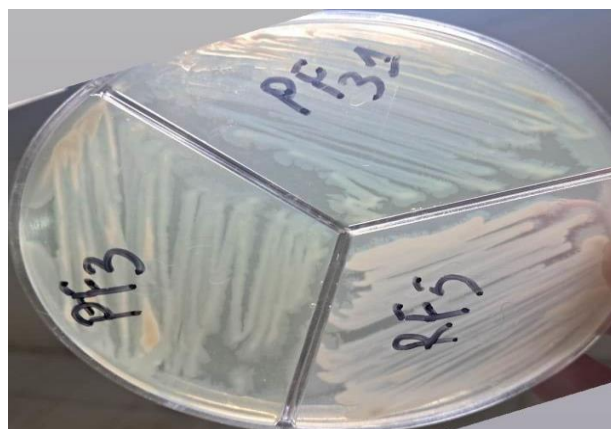
Les résultats obtenus à partir du test de catalase maintiennent que les 20 isolats testés étaient catalase positive, car l'observation des bulles d'air révèle un dégagement gazeux de dioxygène (**Figure 16**).



**Figure 16** : Résultat positive pour les souches testées de catalase

### 1.2.4. Test de Levane sucrase

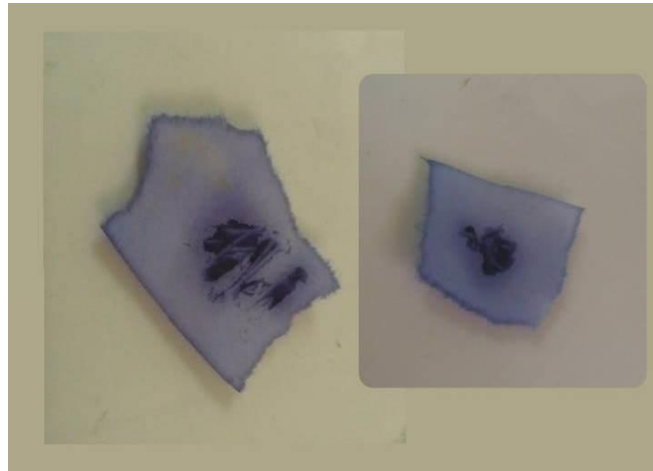
Les résultats montrent que les 20 souches sont positives pour la levane sucrase. Cela a été indiqué par l'apparition d'une culture gonflée, brillante, muqueuse et luisante (**Figure 17**).



**Figure 17** : Résultat de la production de levane sucrase sur les souches de *Pseudomonas* spp. fluorescents.

### 1.2.5. Test d'oxydase

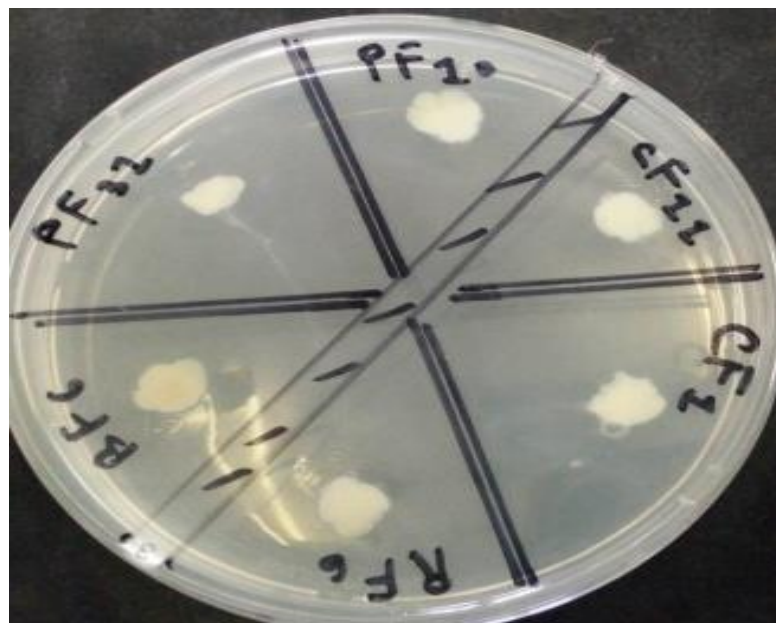
Les résultats du test d'oxydase ont montré que les 20 souches étaient positives, par l'apparition d'une couleur violette dans les 30 secondes après l'ajout du réactif (**Figure 18**).



**Figure 18 :** Résultat positive pour les souches testées d'oxydase

### 1.2.6. Test de Pectinase

Le test de pectinase montre qu'aucun halo clair n'a été observé autour des colonies lors de l'ajoute de HCL, ce qui indique une réaction négative (**Figure 19**).



**Figure 19:** Résultat négative pour les souches testées de pectinase

### 1.2.7. Test d'arginine dihydrolase

Toutes les souches testées ont montré une dégradation de l'arginine (100%). Le résultat positif a été observé lorsque le milieu est resté dans sa couleur violette après l'ajout du tampon PH4, en raison de l'alcalinisation du milieu (**Figure 20**).



**Figure 20:** Résultat positive pour les souches testées après l'ajoute de tampon PH4

### 1.2.8. Test d'hypersensibilité sur Tabac

Le test d'hypersensibilité sur Tabac n'a montré aucune réaction positive, car il n'y avait pas de taches nécrotiques ni de collapses formés dans la zone infiltrée (**Figure 21**).



**Figure 21 :** Résultat négative pour les souches testées de tabac

### 1.3. Identification phénotypique des isolats

Les résultats montrent que les 20 souches [oxydase (+), arginine (+) et tabac (-)], apparentées à des *Pseudomonas* spp. Fluorescents saprophytes, soit un taux de 100% des souches isolées. Par ailleurs, selon les résultats obtenus par le test LOPAT, on peut regrouper nos souches sous-groupes Vb de *Pseudomonas fluorescens* discriminés par **Lelliott et al., (1966)** (Tableau 05).

**Tableau 05** : Spectre de réponse d'identification selon les tests LOPAT

Les souches	LOPAT					Le groupe de LOPAT
	L	O	P	A	T	
KFR2	+	+	-	+	-	<b>Vb</b>
TBR51	+	+	-	+	-	
KHE7	+	+	-	+	-	
KMR2	+	+	-	+	-	
KMR7	+	+	-	+	-	
KHE62	+	+	-	+	-	
TRR5	+	+	-	+	-	
PF10	+	+	-	+	-	
PF31	+	+	-	+	-	
PF3	+	+	-	+	-	
CF1	+	+	-	-	-	
CF11	+	+	-	-	-	
EF5	+	+	-	-	-	
EF3	+	+	-	-	-	
BF12	+	+	-	-	-	
BF6	+	+	-	-	-	

ZF2	+	+	-	-	-	Vb
ZF6	+	+	-	-	-	
RF6	+	+	-	-	-	
RF5	+	+	+	-	-	

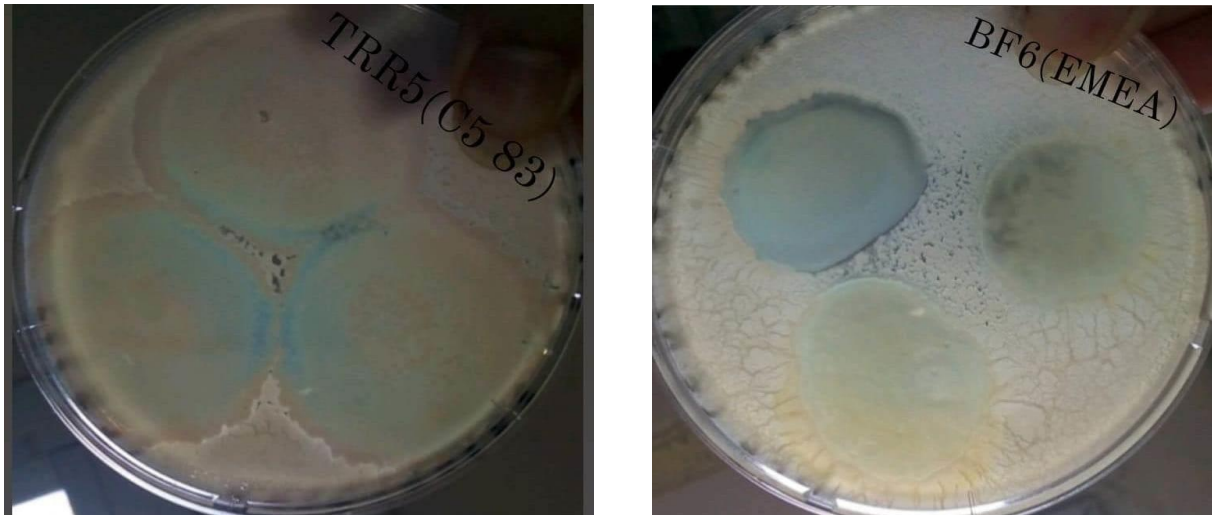
## 1.4. Sélection des souches de *Pseudomonas* spp. fluorescents antagonistes *in vitro*

### 1.4.1. Confrontation bactérie/ bactérie

Le pouvoir antagoniste des dix isolats de *Pseudomonas* spp. fluorescents vis-à-vis à deux souches bactérienne phytopathogènes (*Agrobacterium tumefaciens* [C5.83] et *Erwinia amylovora* [EMEA], a été déterminé par l'apparition des zone d'inhibitions autour des spots représentant les colonies bactérienne de chaque antagoniste. Cette activité est variable selon les souches antagonistes, les deux souches phytopathogènes et les deux milieux de cultures (King B et LPGA).

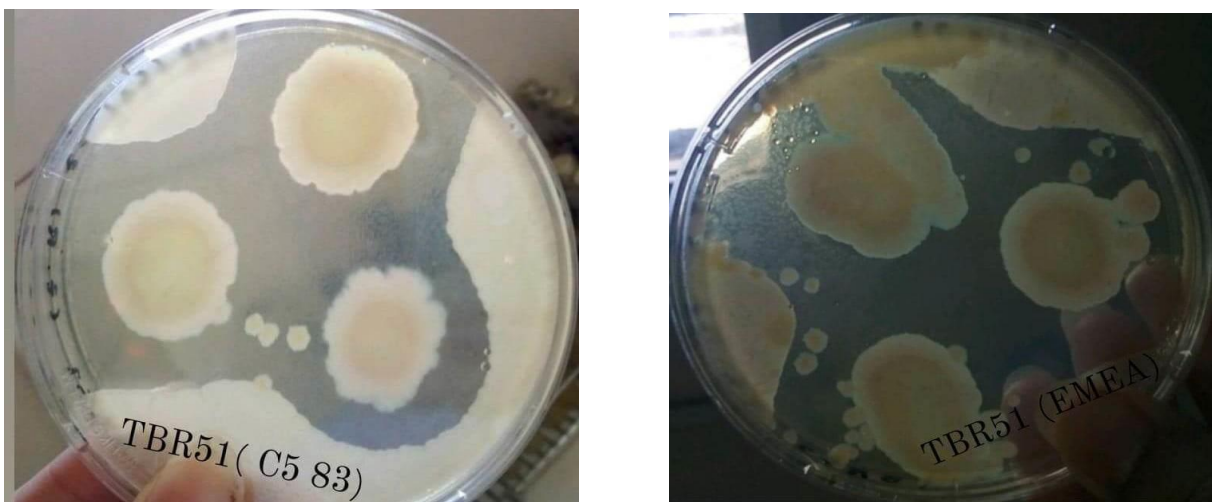
#### 1.4.1.1. Sur milieu KB

Lors de la confrontation sur le milieu KB, nous avons remarqué des phénomènes inattendus, notamment une croissance importante des spots bactérienne pour chaque antagoniste (**Figure 22**). Cette croissance a rendu difficile l'identification des zones d'inhibition, ce qui a compliqué la détermination de l'effet antagoniste des dix souches antagonistes sur les bactéries pathogènes



**Figure 22** : Phénomènes inattendus représentés par une croissance importante des spots bactériens pour chaque antagoniste sur le milieu King B.

Cependant, TBR51 est la seule souche dont l'effet antagoniste était très marquant dont la zone d'inhibition était très importante (4,5cm) avec un taux d'inhibition de 52 %, contre les souches pathogènes (*Agrobacterium.t* [C5.83] et *Erwinia.a* [EMEA]) (Figure 23).



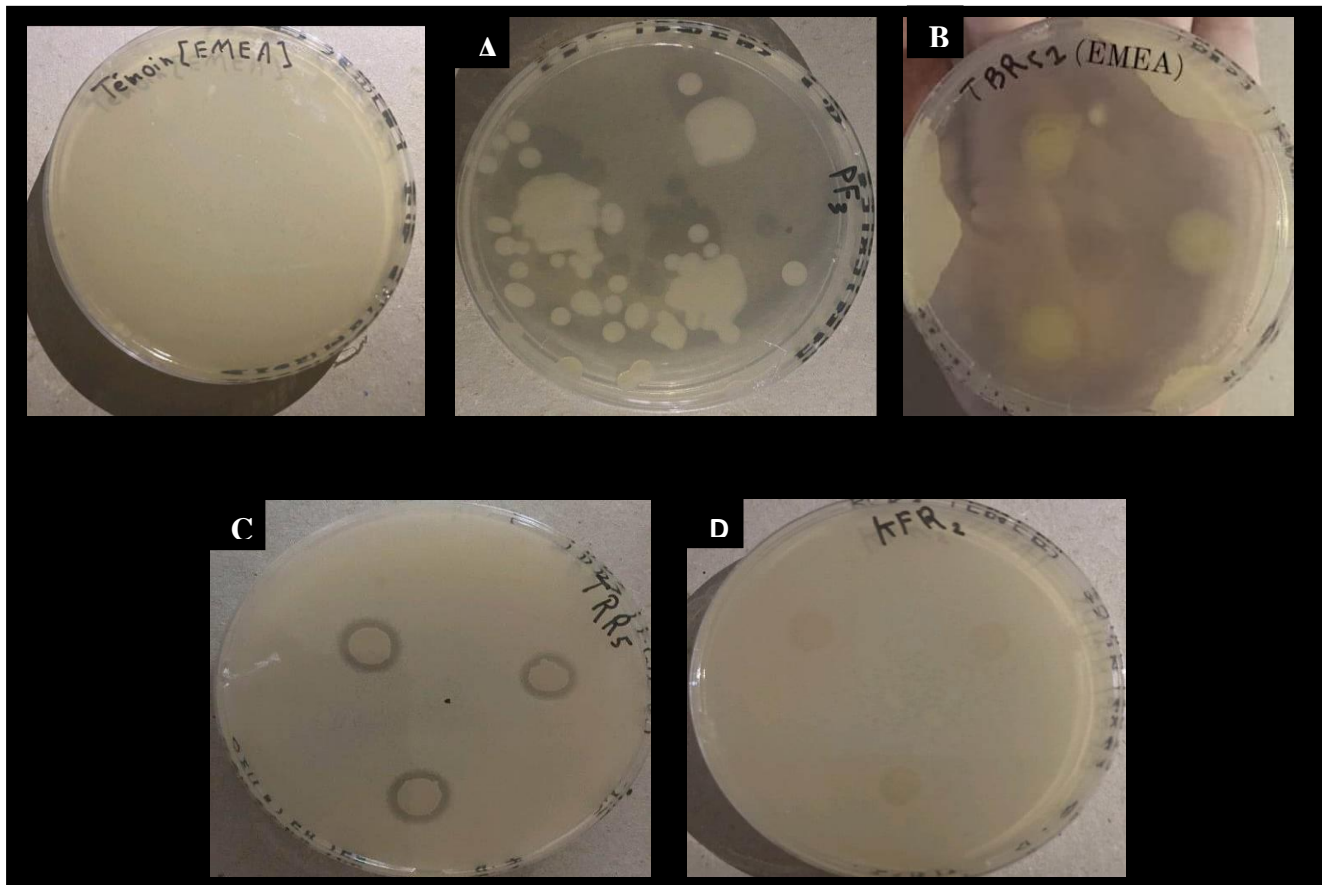
**Figure 23** : l'activité antagoniste de souche TBR51 contre les souches cible (*Agrobacterium.t* [C5.83] et *Erwinia.a* [EMEA])



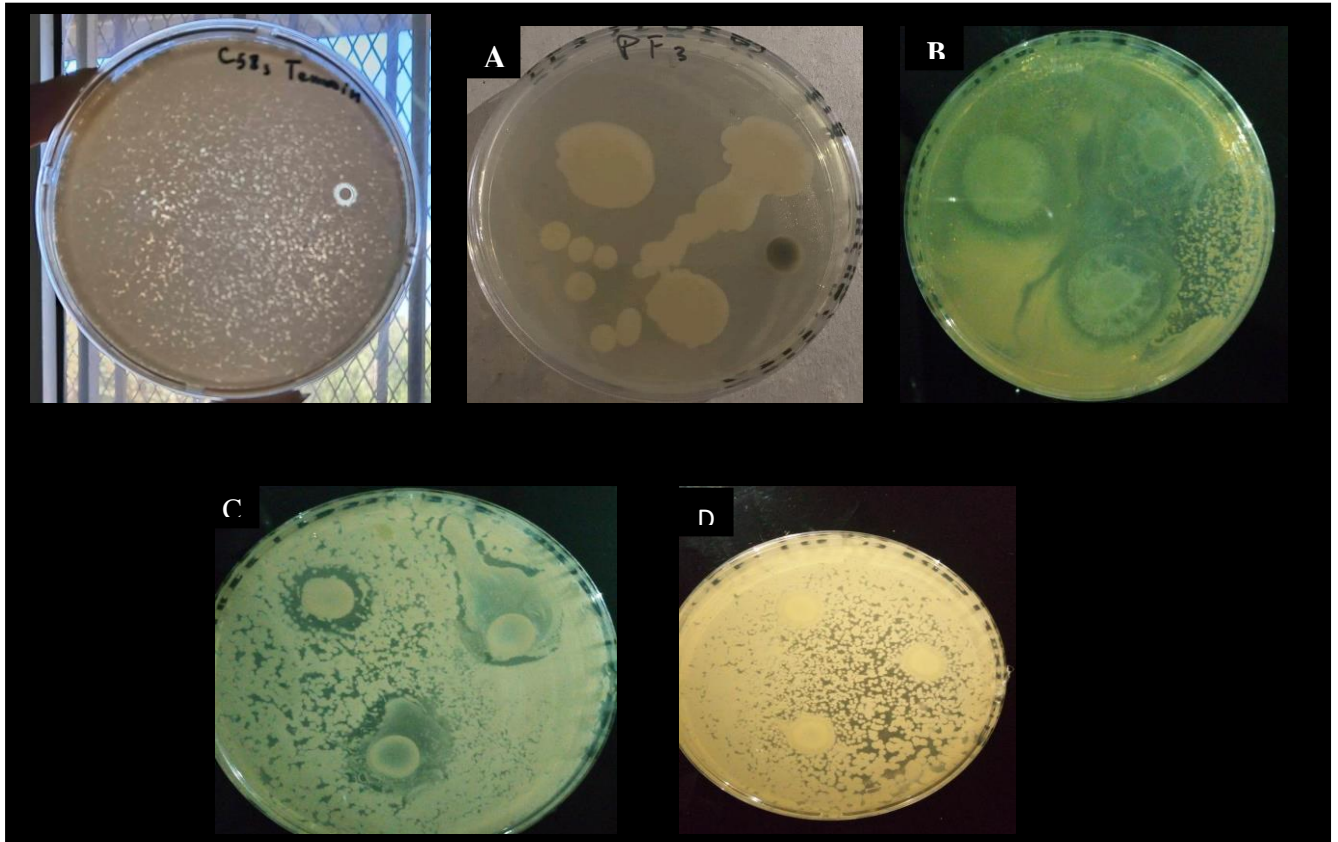
### 1.4.1.2. Sur milieu LPGA

Sur milieu LPGA et contrairement au milieu KB, les résultats obtenus montrent que les dix souches de *Pseudomonas* spp. fluorescents exercent des effets antagonistes vis-à-vis des champignons phytopathogènes s'exprimant par des zones claires autour des disques de champignons comparés au témoin (pathogène seul), mais à des degrés divers. Cette variation dépend des souches testées et les milieux de cultures utilisés.

La forte activité antagoniste a été observée avec la souche PF3 (réduit ou inhibe complètement la croissance des deux pathogènes dans la boîte) (**Figure 24.A et 25.A**). Et la souche TBR51 vis-à-vis des deux souches pathogènes [EMEA] et [C583] avec respectivement des diamètres de zone d'inhibition de 5 cm et de 3,7cm (**Figure 24.B et 25.B**). Les souches représentant des zones d'inhibitions moins importantes (très faible zone d'inhibition) sont les souches (BF6, TRR5, PF10) avec respectivement des diamètres de 1.2cm, 1.2cm et 1.5cm pour le pathogène [EMEA] (**Figure 24.C**) et les souches (BF6, TRR5, ZF2, PF10, CF1, KFR2) avec respectivement des diamètres de 2.8cm, 2.4cm, 1.4cm, 1.5cm, 1.3cm, 1.9cm pour le pathogène [C583] (**Figure 25.C**). Suivie par suite les souches (CF1, RF6, KFR2, CF11) avec le pathogènes [EMEA] (**Figure 24.D**) et (CF11, RF6) avec le pathogènes [C83] (**Figure 25.D**) n'ont montré l'absence des zones d'inhibitions et donc aucun effet antagoniste observé.



**Figure 24 :** l'activité antagoniste de différentes souches antagonistes contre la souche cible *Erwinia.a* [EMEA]



**Figure 25 :** l'activité antagoniste de différentes souches antagonistes contre la souche cible *Agrobacterium.t* [C5.83].

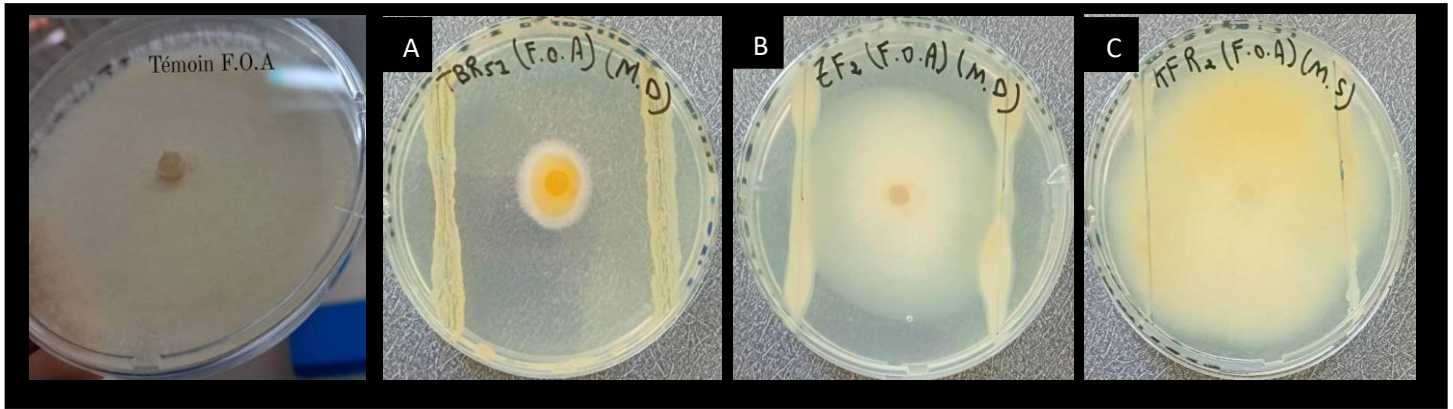
### 1.4.2. Les résultats de la confrontation bactérie /champignon :

Les résultats de l'activité antagoniste des dix souches de *Pseudomonas* spp. fluorescents vis à vis de *Fusariumoxysporum f spalbedinis* (F.o.a), *Fusariumoxysporum f spLini* (F.o.ln) et *Botriosphaeria Dothidae* (B.s.d) a été déterminée par l'inhibition de la croissance mycélienne exercée sur la boîte à des degrés divers. Cette variation dépend des souches antagonistes testées et des champignons phytopathogène et les deux méthodes utilisé déphasée et simultanée. L'inhibition mycélienne est traduite par une réduction du diamètre de ces trois champignons phytopathogènes par rapport au témoin.

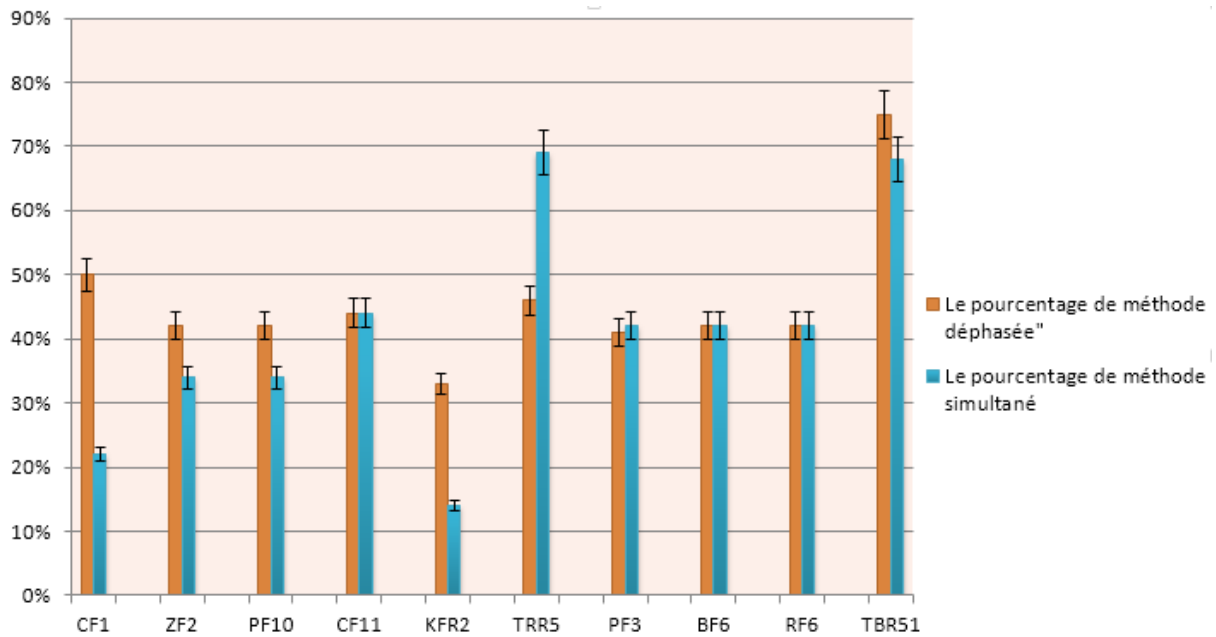
L'action inhibitrice la plus forte est enregistré pour la souche TBR51 vis-à-vis des trois champignons phytopathogènes : *Fusarium oxysporu albedinis* (Foa) (**Figure 26.A**), *Fusarium oxysporum lini* (Foln) (**Figure 28.A**) et *Botriosphaeria Dothidae* (B.s.d) (**Figure 30.A**) avec respectivement des taux d'inhibition très important 75%, 80% et 83%. Nous remarquons également que la souche TRR5 exerce une forte activité antagoniste vis-à-vis de *Fusariumoxysporum f sp albedinis* (F.o.a) à de taux d'inhibition (69%). Moins activité antagoniste avec le *Botriosphaeria Dothidae* (B.s.d) à de taux d'inhibition (47%). Alors qu'elle enregistre une faible activité antagoniste (11%) avec le *Fusarium oxysporum f sp Lini* (F.o.ln).

Alors les faible taux d'inhibition sont enregistrés pour les souches (PF10, CF11, BF6, ZF2, TRR5, RF6, PF3 et CF1) avec le *Fusariumoxysporum f sp albedinis* (F.o.a) à des taux d'inhibition 42%, 44%, 42%, 42%, 46%, 42%, 41%, 50% respectivement (**Figure 26.B**). Et les souches (PF10, CF11, BF6, KFR2, ZF2, RF6, TRR5, PF3 et CF1) vis-à-vis de *Botriosphaeria Dothidae* (B.s.d) avec respectivement des taux d'inhibition 49%, 49%, 45%, 47%, 47%, 47%, 49%, 53%, 47% (**Figure 30.B**). Suivie par la suite les souches enregistrées les très faible taux d'inhibition 25%, 25%, 38%, 38%, 3%, 11%, 27%, 10% sont les souches (PF10, CF11, BF6, KFR2, ZF2, TRR5, RF6, PF3 et CF1) avec le *Fusarium oxysporum f sp Lini* (F.o.ln) (**Figure 28.B**). Et la souche KFR2 avec le *Fusariumoxysporum f sp albedinis* (F.o.a) a de taux d'inhibition 33% (**Figure 26.C**).

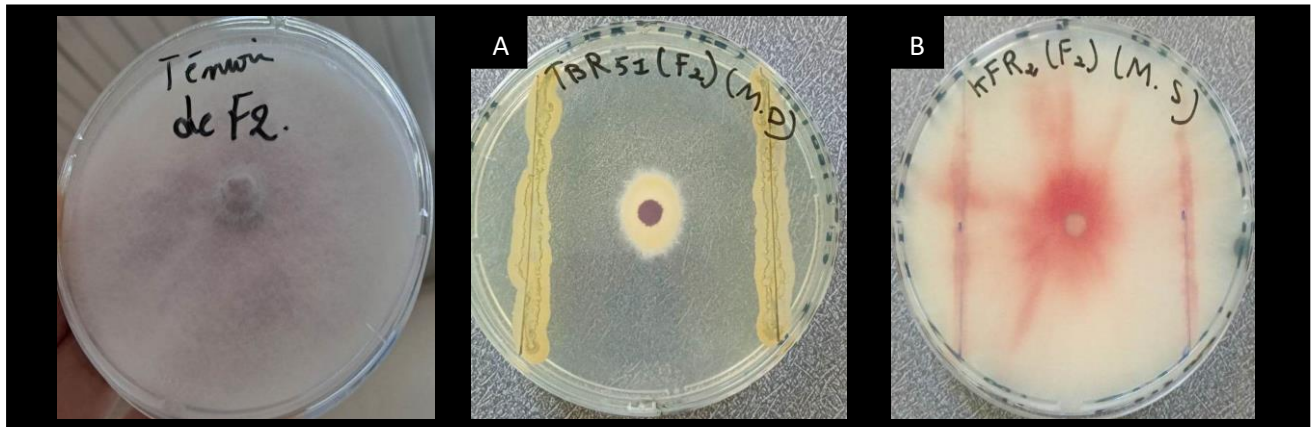
Ces résultats regroupent ces méthodes simultanées et déphasées car il y a une grande convergence des résultats entre les deux méthodes comme on peut le voir sur ses histogrammes (**Figures 27, 29 et 31**).



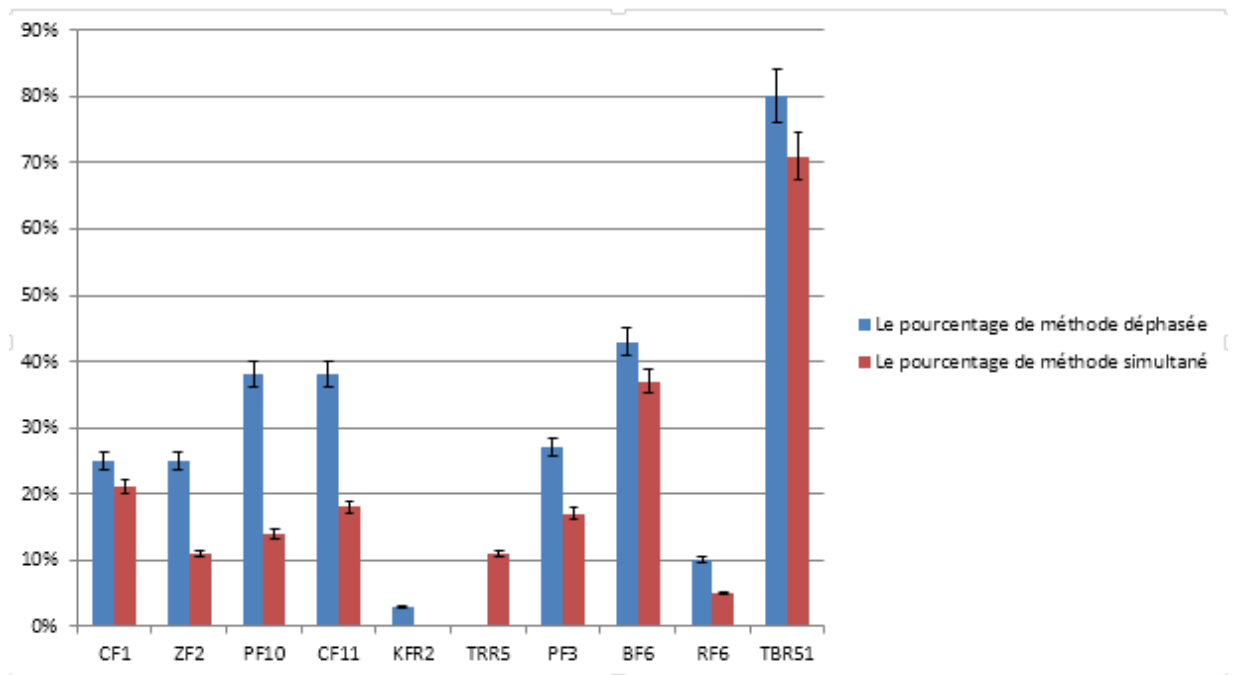
**Figure 26:** activité antifongique des souches antagonistes contre le champignon phytopatogène *Fusariumo xysporum f sp albedinis* (F.o.a) sur le milieu PDA.



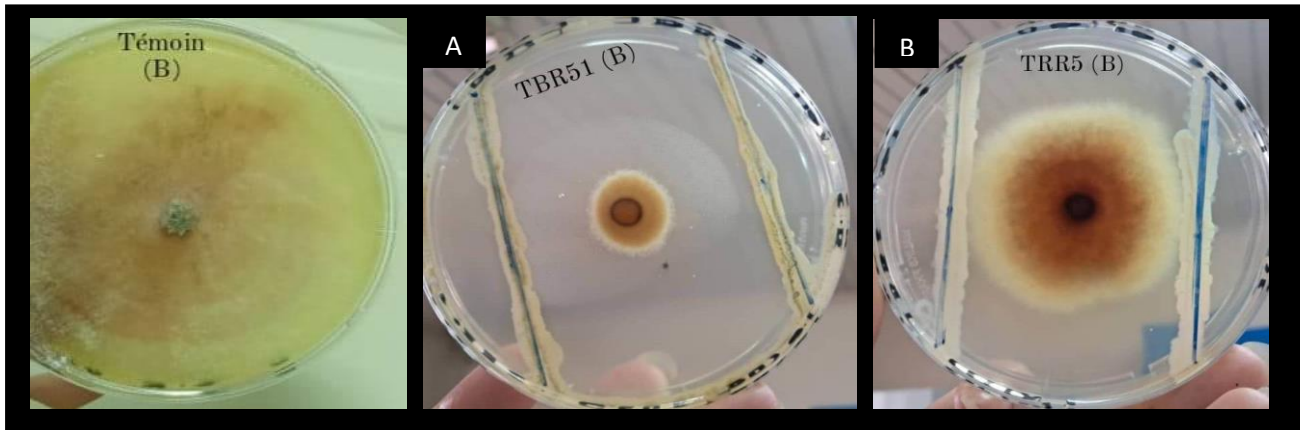
**Figure 27 :** Résultats de l'activité antifongique contre le champignon phytopatogène *Fusariumo xysporum f sp albedinis* (F.o.a) (courbe de pourcentage originale).



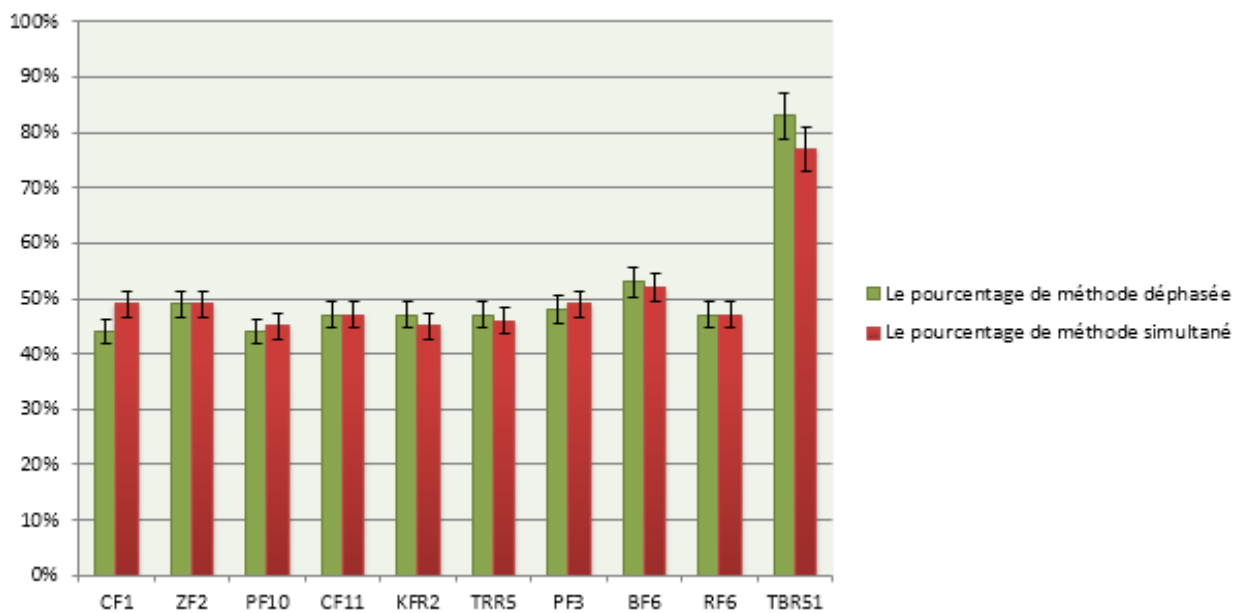
**Figure 28:** activité antifongique des souches antagonistes contre le champignon phytopatogène *Fusarium xysporum f sp Lini* (F.o.ln) sur le milieu PDA.



**Figure 29 :** Résultats de l'activité antifongique contre le champignon phytopatogène *Fusarium xysporum f sp Lini* (F.o.ln) (courbe de pourcentage originale).



**Figure 30:** activité antifongique des souches antagonistes contre le champignon phytopatogène *Botriosphaeria Dothidae* (*B.s.d*) sur le milieu PDA.



**Figure 31:** Résultats de l'activité antifongique contre le champignon phytopatogène *Botriosphaeria Dothidae* (*B.s.d*) (courbe de pourcentage originale).

### 1.5. Sélection des souches de *Pseudomonas* spp. fluorescents antagonistes *in vivo*

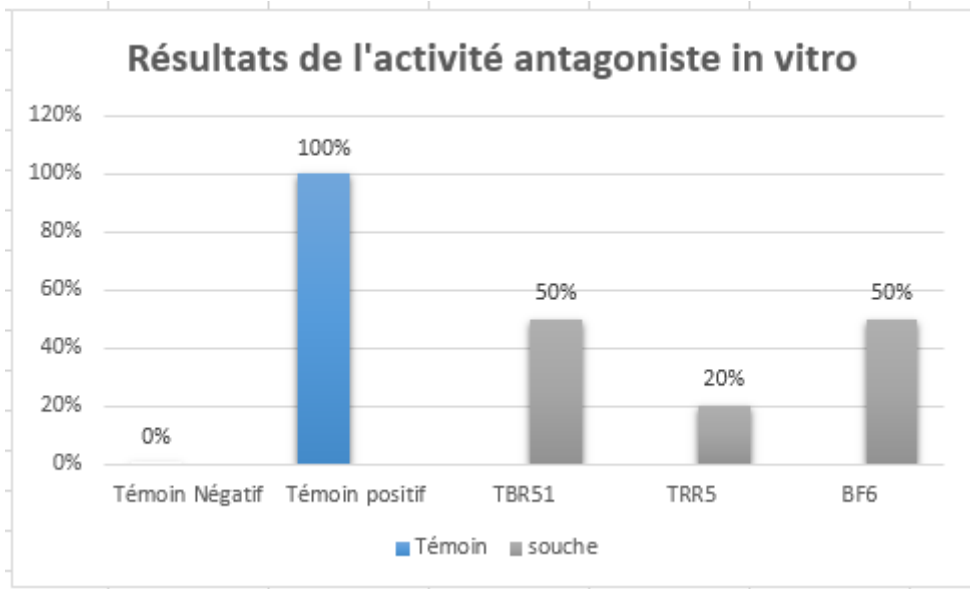
L'évaluation de l'activité antagoniste des trois souches de *Pseudomonas* spp. fluorescents sélectionnés sur la base de leur forte activité antagoniste *in vitro* (TBR51, TRR5 et BF6) vis à vis de *Botriosphaeria dothidae* a été déterminée par l'apparition ou non de nécrose sur les fragments testés en les comparant avec le témoin positif inoculé uniquement avec le pathogène.

Les résultats obtenus diffèrent selon les souches antagonistes. Où nous avons exprimé par une estimation en pourcentages de l'évolution du taux d'infection apparu au cours de trois semaines d'observation par rapport au témoin positif présentant 100% de nécroses et le témoin négatif avec absence totale de symptômes (0%).

L'action inhibitrice la plus forte est enregistrée par la souche TRR5 vis-à-vis de champignon phytopathogène *Botriosphaeria dothidae* à des taux d'infection ne dépassant pas 20% (ce qui indique une forte réduction des symptômes de la maladie avec de petites nécroses au niveau du site d'inoculation comparé au témoin positif qui a montré un développement de nécroses sur toute la surface de confrontation (**Figure32/ B**). Suivie par les souches TBR51 et BF6 ayant enregistré une activité antagoniste moyenne a des taux d'infection d'environ 50% (**Figure32/ A**).



**Figure 32:** Activité antifongique des souches antagonistes contre le champignon phytopathogène *Botriosphaeria dothidae* *in vivo*.



**Figure 33 :** Résultats de l'activité antifongique contre le champignon phytopatogène *Botriosphaeria dothidae* *in situ* (courbe de pourcentage originale).



## Discussion

Les *Pseudomonas* spp fluorescents sont un groupe de micro-organismes répandu parmi les bactéries associées à la rhizosphère végétale. Ils sont considérés comme des armes biologiques contre les agents pathogènes des plantes importants pour l'agriculture, en raison de leur potentiel antagoniste avec les antibiotiques et la sécrétion de substances favorisant la croissance des plantes, d'enzymes hydrolytiques et d'autres traits antimicrobiens ( **Shanmugaiah et al., 2006** ).

Notre travail s'est basé sur l'identification d'une collection de 20 souches de *Pseudomonas* spp. fluorescents et l'évaluation de leurs effets antagonistes *in vitro* et *in vivo* vis à vis à des bactéries et des champignons phytopathogènes.

L'identification préliminaire des caractères génériques selon les tests classiques a été basée en premier par la production de pigment fluorescent, la caractérisation morphologique, test de Gram, la catalase. Les caractérisations spécifiques d'identification des *Pseudomonas* spp. Fluorescents saprophytes ont été réalisés par les tests de LOPAT.

Les résultats obtenus à partir de ces tests ont permis de sélectionner les vingt souches dans leur ensemble comme des souches présentant les caractéristiques du groupe *Pseudomonas* spp. fluorescents.

Les résultats de ces tests ont montré la production d'un pigment fluorescent chez les 20 isolats testés (**test de fluorescence +**), cette production est une spécificité des *Pseudomonas* fluorescents et qui peuvent généralement être distinguées visuellement des autres *Pseudomonas* par leur aptitude à produire un pigment jaune vert soluble dans l'eau (**Palleroni et al., 1973**) appelé les pyoverdines (**Palleroni et Migula, 1984**).

Les souches bactériennes ont montré des caractères cultureux très proches. Ensuite, le test de KOH à confirmer que les souches bactériennes testées sont des bactéries à paroi Gram - (Test de Gram).

Le test de catalase est positive (**catalase +**) chez toutes les souches ce qui traduit par la capacité de ces souches de produire l'enzyme catalase qui décompose l'eau oxygénée en oxygène et en eau.

Les souches testé sont oxydase positive ce qui confirme leur capacité de produire l'enzyme cytochrome oxydase. Ainsi, une réaction positive pour l'arginine dihydrolase de ce fait que la dégradation de l'arginine est une voie caractéristique des *Pseudomonas* spp. Fluorescents saprophytes (**Thornley, 1960**).

Concernent le teste de pictinase, les résultats se sont avérés négatives, les souches bactériennes sont incapable de produire le pectinase (**pectinase -**). Aucune tache nécrotique ou effondrement ne s'est produit dans la zone infiltrée de la plante de *Nicotiana tabaccum var xanti* (**hypersensibilité de tabac -**)

Les résultats de l'identification phénotypique (teste de l'OPAT et de catalase) n'ont pas permis de réaliser une identification totale et précise. Car les résultats obtenu comparés par rapport les résultats obtenu par plusieurs auteurs (**Mezaache, 2012 ; Benoussaid et al., 2018**) ont validé que *Pseudomonas* spp fluorescents est un group hétérogène difficile à identifier. L'identification phénotypique reste une étape primordiale voir indispensable pour l'identification des *Pseudomonas* spp fluorescents. Cependant, d'autres tests phénotypiques et génotypiques par des moyens moléculaires tels que PCR, électrophorèse, western blot, le MALDI-TOF-MS sont nécessaires pour identifier avec certitude ces bactéries. Donc, c'est des technique efficace pour l'identification plus précise des *Pseudomonas* ce qui permet de confirmer ou infirmer les résultats obtenus par les méthodes classiques. Ainsi, elle permet de donner des résultats fiables dans un délai plus court que les méthodes habituelles et de réduire la quantité de l'échantillon à analyser (**Dieckmann et al. 2005 ; Degand et al. 2008**).

Les tests de l'oxydase et de l'arginine dihydrolase sont considérés comme des tests déterminatifs dans l'identification des *Pseudomonas* spp. fluorescents (**Mercenier et al., 1980 ; Digat et Gardan, 1987 ; Jacques, 1994 ; Bossis, 1995**).

D'après les résultats de la confrontation sur milieu KB, il ne s'est pas bien montré en raison de la forte croissance des spots bactériens de chaque antagoniste sur le milieu, ce qui a rendu difficile l'identification des zones d'inhibition (Des zones d'inhibition pas claire), et donc nous n'avons pas pu déterminer l'effet antagoniste des souches antagonistes sur les souches pathogènes. TBR51 est la seule souche dont l'effet antagoniste était très marquant dont la zone d'inhibition était très importante (4.5cm) avec un taux d'inhibition de 52 %, contre les deux souches pathogènes (*Agrobacterium.t* [C5.83] et *Erwinia.a* [EMEA]).

Au cours de ce test sur le milieu LPGA nous avons observé que l'activité antagoniste est variable selon le changement de dix souches antagonistes, ainsi que les deux souches cibles.

L'action inhibitrice la plus forte est estimée avec la souche PF3 (réduit ou inhibe complètement la croissance des deux photogène dans la boîte). Elle est suivie de la souche TBR51 vis-à-vis des deux souches pathogènes [EMEA] et [C583] avec respectivement des diamètres de zone d'inhibition de 5 cm et de 3,7cm. Les souches représentant des zones d'inhibitions moins importantes (très faible zone d'inhibition) sont les souches (BF6, TRR5, PF10) avec respectivement des diamètres de 1.2cm, 1.2cm et 1.5cm pour le pathogène [EMEA] et les souches BF6, TRR5, ZF2, PF10, CF1, KFR2 avec respectivement des diamètres de 2.8cm, 2.4cm, 1.4cm, 1.5cm, 1.3cm, 1.9cm pour le pathogène [C583]. Suivie par la suite les souches CF1, RF6, KFR2, CF11 vis avis du pathogènes [EMEA]. Et (CF11, RF6) avec le pathogènes [C83] n'ont montré l'absence des zones d'inhibitions et donc aucun effet antagoniste observé.

D'après les travaux menés par **Djellout, (2019)**, qui ont consisté à tester Le pouvoir antagoniste in vitro des souches de *Pseudomonas* contre la souche pathogène d'*Agrobacterium tumefaciens* sur milieu LPGA en suivant les mêmes étapes de travail que nous avons suivies sur le même milieu. Les résultats obtenus étaient que les bactéries *Pseudomonas* utilisées montrent une activité antagoniste vis-à-vis la souche pathogène d'*Agrobacterium tumefaciens*. Les différentes souches antagonistes présentent un effet inhibiteur variable.

La différence dans l'activité antagoniste exercée par ces bactéries peut être expliquée par la production d'une ou plusieurs substances antimicrobiennes. Cela dépend de l'espèce, de la nature du métabolite ainsi que la quantité libérée dans le milieu utilisé (**Kamilova et al., 2005**).

La forte croissance des souches de *Pseudomonas* sur milieu KB peut être due aux métabolites secondaires qu'elles produisent. Le milieu KB étant très favorable à la croissance de ces souches, elles synthèses des sidérophores qui chélates les ions de fer, suit à la production des pigments fluorescents (**Hassal et al., 1991 ; Digat, 1992 ; Weller et Thomashow, 1993**). En plus de la production d'autres métabolites secondaires.

En ce qui concerne le milieu LPGA, ces résultats indiquent que l'activité antagoniste sur ce milieu n'est pas due à l'effet de sidérophore, car le milieu ne favorise pas la production des pigments fluorescents. On peut alors suggérer que l'activité antagoniste était liée à la production d'autres métabolites secondaires tels que les antibiotiques (**Dahah, 2017**).

Les *Pseudomonas* sont déjà connus pour être des producteurs d'une gamme de molécules inhibitrices telles que l'acide ferrique, le HCN et les protéases, ce qui leur confère leurs

propriétés d'agents potentiels de lutte biologique contre de nombreux agents pathogènes des plantes et agents nuisibles aux cultures (**Haas et Defago, 2005**).

Les *pseudomonas* spp fluorescents sont déjà connus pour être des producteurs d'une gamme de molécules inhibitrices, notamment la chitinase, la  $\beta$ -1,3-glucanase, les sidérophores (comme la pyoverdine, responsable de la chélation de fer) (**Mputu Kanyinda, 2012**). Certains antibiotiques (2,4-diacetylphloroglucinol (DAPG), phenazines (PHZ), pyrrolnitrine), les composés organiques volatils (COV) tels que le cyanure d'hydrogène (HCN), l'acide indole acétique (IAA), les composés solvants phosphates et le 2,4-diacétylphloroglucinol (DAPG). Cela fait des *Pseudomonas* fluorescents des agents de lutte biologique contre les agents pathogènes des plantes (antifongiques, antibactériennes, antivirales, antitumorales et antinématocides (**Mishra, 2018 ; ADVINDA, 2022**).

Concernant la confrontation bactéries-champignons, les dix souches de *Pseudomonas* spp fluorescents ont été testées pour leur capacité à inhiber la croissance mycélienne de trois champignons phytopathogène : *Fusarium oxysporum f sp albedinis* (F.o.a), *Fusarium oxysporum f sp Lini* (F.o.ln) et *Botriosphaeria dothidae* (B.s.d). Cette inhibition se traduit par la réduction du diamètre des colonies des champignons, par rapport au témoin

Les résultats obtenus ont montré que les dix souches de *Pseudomonas* spp fluorescents exercent des effets antagonistes à des degrés variables vis-à-vis à des trois champignons phytopathogènes. Cette variation de l'activité antagoniste varie selon les différentes souches antagonistes et les trois champignons phytopathogènes, et aussi les deux méthodes utilisées (déphasé et simultané) et qui peut être expliquée par la production d'une ou plusieurs substances antimicrobiennes par les bactéries (**Kamilova, Validov et al., 2005**).

Cependant la présence d'activité inhibitrice dans le milieu PDA suggère que l'activité antagoniste n'est pas due à l'action des sidérophores, car ces milieux ne favorisent pas la production des pigments fluorescents. Alors nous pouvons suggérer que d'autres mécanismes ont été développés par la bactérie, telle que la compétition pour les éléments nutritifs ou l'antibiose. Selon plusieurs auteurs les activités antagonistes peuvent être attribuées à la synthèse d'antibiotiques et à d'autre type de métabolites secondaires à effet d'antibiose (**Digat et Gardan, 1987 ; Keel et al., 1992 ; Défago, 1993 ; Whipps et Lymsen, 2001**) et à la compétition pour les nutriments et pour l'espace (**Persello-Cartieaux et**

*al.*, 2000 ; Bloemerg et Lugtenberg, 2001; Persello-Cartieaux *et al.*, 2003).

Ces métabolites ont montré leur efficacité *in vitro* à l'égard des organismes pathogènes (Dahah, 2017) et la production des antibiotiques par *Pseudomonas* pour le contrôle contre les agents phytopathogènes a été mentionné la première fois par Howell et Stipanovic (1979).

Le pouvoir antagoniste la plus forte est enregistré pour la souche TBR51 vis-à-vis des trois champignons phytopathogènes, avec des taux d'inhibitions allant jusqu'à 83%. Ces résultats sont proches de ceux obtenus par Benoussaid *et al.*, (2018) et celle obtenue par Karmegham *et al.*, (2020) qui ont constaté que *Pseudomonas* spp. fluorescents présente un effet antagoniste claire contre *Fusarium oxysporum* avec des taux d'inhibition allant jusqu'à 70%., qui ont constaté que *Pseudomonas spp. fluorescents* endophytiques présentent un effet antagoniste claire contre *Fusarium oxysporum*.

Ainsi la souche TRR5 exerce une forte activité antagoniste contre *Fusarium oxysporum f. sp. palbedinis* (F.o.a), avec un taux d'inhibition (69%) et un taux moins important (47%) contre le *Botriosphaeria dothidae*.

Cependant, à travers nos résultats, nous remarquons que chez certaines souches bactérienne PF10, CF11, BF6, KFR2, ZF2, RF6, PF3 et CF1 faible taux d'inhibition ce qui peut être expliquer par la production de quantités insuffisante du métabolite secondaire par les *Pseudomonas* spp fluorescents pour l'activité inhibitrice.

La seconde partie de notre travail est consacrée à la suppression *in vivo* de l'effet nécrotique de *Botriosphaeria dothidae* par les souches de *Pseudomonas* spp fluorescents.

Les résultats obtenus dans le test d'antagonisme de trois souches de *Pseudomonas spp. fluorescents* sélectionnés sur la base de leur forte activité d'antagonisme *in vitro* (TBR51, TRR5 et BF6), vis-à-vis d'un champignon phytopathogène *Botriosphaeria dothidae* (espèce de la famille Botryosphaeriaceae), *in situ*, après trois semaine d'incubation des fragments (rachis) de palmier dattier, ont montré une différence très significatives entre le taux des nécroses des boutures inoculées par les antagonistes et le pathogène. Cette différence est due à des souches antagonistes différentes. Où nous avons exprimé par une estimation en pourcentages de l'évolution du taux d'infection apparu au cours de trois semaines d'observation par rapport au

témoin positif présentant 100% de nécroses et le témoin négatif avec absence totale de symptômes (0%).

La souche antagoniste TRR5 ont montré un fort d'activité antagoniste contre le champignon phytopathogènes (*Botriosphaeria dothidae*) à de taux d'infection tendant vers 20% par rapport au le témoin inoculé par le pathogène. Ou nous avons enregistré le moins forte d'activité antagoniste avec les deux souches TBR51 et BF6 a de taux d'infection tendant vers 50%.

Les champignons de la famille Botryosphaeriaceae sont des champignons phytopathogènes qui peuvent infecter plusieurs hôtes comme le palmier dattier .Ce champignons a été rapporté comme un agent causal de plusieurs maladies sur différentes parties du palmier dattier, la pourriture des inflorescences (**El-Morsy, 1999 ; Al-Sadi et al., 2013**) et la pourriture de la base des feuilles (*Botryodiplodia theobromae*) (**El-Morsi et al., 2012**).

De manière générale, les symptômes de la maladie peuvent apparaître et s'exprimer uniquement lorsque l'hôte est stressé (**Slippers et Wingfield, 2007**).

D'après les travaux de **Bustamante et al ., (2022)** , qui ont montré une aactivité inhibitrice d' un groupe de *Pseudomonas* spp ( *P. chlororaphis*) contre les *Botryosphaeriaceae* responsables de la maladies du tronc de la vigne (MTG) , ils ont expliqué que cette activité inhibitrice de groupe de *Pseudomonas* revient à la production des antibiotiques telle que la phénazine et les sidérophores( la pyoverdine).

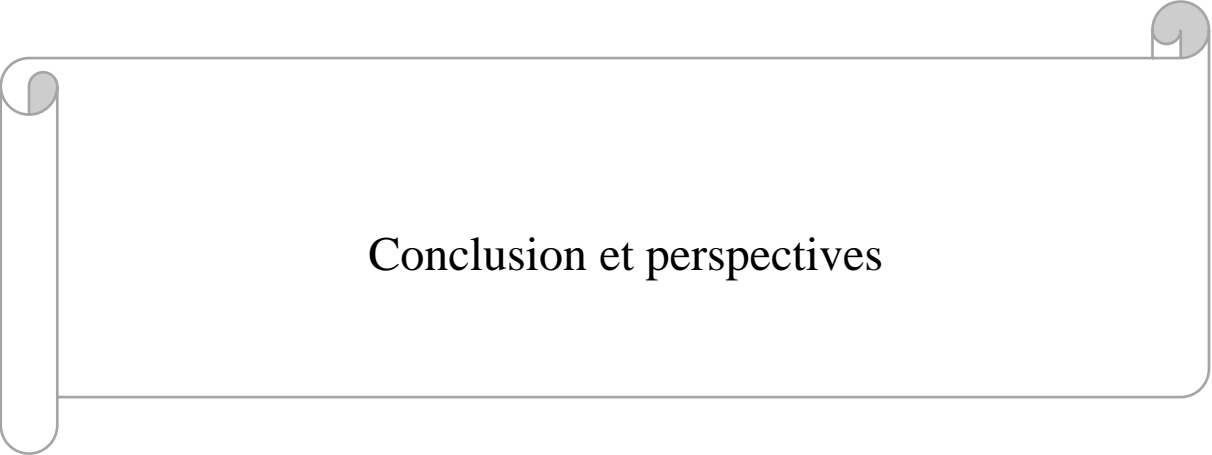
A la lumière de ce qui précède on peut expliquer la forte activité antagoniste des trois souches de *Pseudomonas* spp. Fluorescents contre le champignon phytopathogène (*Botriosphaeria dothidae*), *que ces bactéries endophytes ont la capacité d'améliorer la tolérance de l'hôte aux maladies par différents mécanismes, à savoir la compétition pour les nutriments et l'espace, l'antibiose, l'interruption de la signalisation pathogène ou l'induction de défenses de la plante* (**Rezgui et al., 2016 ; Compant et al ., 2013**).

En revanche, le caractère endophyte permettant à l'hôte de renforcer sa tolérance aux stress biotiques et abiotiques avant le passage d'un comportement endophyte à un comportement pathogène (**Graniti et al., 2000 ; Hrycan et al ., 2020**).

De nombreux exemples de lutte biologique réussie remontent aux mécanismes de mycoparasitismes et/ou antibiose, à l'efficacité racinaire, la synthèse d'enzymes lytiques telles

que la chitinase et la glucanase impliquées dans la dégradation de différents métabolites du phytopathogène (Chet, 1987 ; Yedidia et al., 1999). Les antibiotiques synthétisés par les souches antagonistes peuvent être impliqués dans l'inhibition de la croissance de *Botriosphaeria dothidae* (dothidae, 2002).

Avant de mettre en place une stratégie de lutte contre les champignons phytopathogènes à l'aide de produits biologiques, il est nécessaire de connaître le comportement des antagonistes et leurs interactions avec le pathogène (Larkin et al., 1999), c'est pour cette raison deux tests d'activité antagoniste ont été réalisés *in vitro* et *in situ* entre les isolats de *Pseudomonas* spp fluorescents et les champignons phytopathogènes (*Fusariumoxysporum f spalbedinis* (F.o.a), *Fusariumoxysporum f spLini* (F.o.ln) et *Botriosphaeria dothidae*). Ces deux tests ont donné des résultats différents *in vitro* étant plus indicatif par rapport à ceux obtenus sur place. Cependant, la relation entre les potentiels affichés *in vitro* et *in vivo* n'est pas toujours évidente (Benchaabane et al., 2000).



## Conclusion et perspectives



Les endophytes sont des micro-organismes qui habitent et prolifèrent à l'intérieur des plantes sans aucun symptôme distinct de maladie in-planta (Tripathi et al., 2022). Parmi ces endophytes, certains d'entre eux, notamment *Pseudomonas* spp. fluorescents sont considérées comme des armes biologiques contre les agents pathogènes des plantes importants pour l'agriculture en raison de leur potentiel antagoniste (Shanmugaiah et al., 2006 ; Suresh et al., 2021).

Notre travail a permis de faire une pré-identification d'une collection de souches de *Pseudomonas* spp. fluorescents isolées de l'endophytosphère du palmier dattier, et étudier leur pouvoir antagoniste *in vitro* et *in vivo*.

L'identification des souches de *Pseudomonas* spp. fluorescents selon les tests de fluorescence, de Gram, de catalase et les tests LOPAT, nous ont permis de sélectionner vingt souches dans leur ensemble présentant des caractéristiques de *Pseudomonas* spp. fluorescents saprophytes qui peuvent se regrouper en sous-groupes Vb de *Pseudomonas* fluorescents.

Les isolats de *Pseudomonas* spp. fluorescents endophytes sélectionnés selon les régions ont montré une activité antagoniste variable *in vitro* vis-à-vis de deux bactéries phytopathogènes (*Agrobacterium tumefaciens* [C5.83] et *Erwinia amylovora* [EMEA]) sur deux milieux (King B et LPGA) par la technique de confrontation directe. Les meilleurs résultats ont été observés sur le milieu LPGA où l'action inhibitrice la plus forte est estimée avec la souche PF3 avec un diamètre de zone d'inhibition de 5 cm.

L'activité antagoniste des isolats sélectionnés réalisée *in vitro* vis-à-vis des trois champignons phytopathogènes : *Fusarium oxysporum* f.sp *albedinis* (F.o.a), *Fusarium oxysporum* f.sp *Lini* (F.o.ln) et *Botryosphaeria dothidae* sur le milieu PDA par deux méthodes : déphasée et simultanée ont marqué une activité antagoniste importante. La plus forte activité a été enregistrée par la souche TBR51 avec un taux d'inhibition allant jusqu'à 83%.

Dans la partie *in vivo*, nous avons sélectionnés trois souches de *Pseudomonas* spp. fluorescents (TBR51, TRR5, BF6) qui ont montré une réduction importante des nécroses avec des taux d'inhibition allant jusqu'à 83% vis-à-vis de *Botryosphaeria dothidae*.

Les perspectives qui résultent de ce travail sont nombreuses

- D'un point de vue taxonomique, il serait nécessaire de procéder à l'identification phénotypique plus sophistiquée par des moyens moléculaires tels que PCR, électrophorèse, western blot, le MALDI-TOF-MS, car le groupe *Pseudomonas* spp. fluorescents est un groupe très hétérogène nécessitant des études génétiques plus profondes.
- La poursuite de l'étude est nécessaire, car l'antagonisme *in vitro* ne peut pas à lui seul, s'imposer comme le critère fondamental de la sélection des investigations.
- Nous encourageons à entreprendre d'autres études dans le futur afin d'élargir nos connaissances sur l'exploitation de *Pseudomonas* spp. fluorescents comme des inoculum microbiens, destinés aux applications pratiques en tant que biofertilisants et biopesticide.

---



Les références bibliographiques

## Les références bibliographiques

### A

Advinda L ; Putri D H ; Anhar A ; Irdawati I ; 2022 . Identification and Characterization of Fluorescent Pseudomonas Producing Active Compounds Controlling Plant Pathogens. Yuzuncu Yil University Journal of Agricultural Sciences, 32(4): 795-804.

Ahmed, Y ; Hussien A ; El-badry N ; Soliman MS ; 2019. Validation d'un protocole de diagnostic pour la détection de *Fusarium oxysporum* f.sp. *albedinis*, l'agent causal de la maladie du bayoud du palmier dattier. Egypte. J. Phytopathol , 47 :297–312.

Ait El Mokhtar M ; **2020**. Roles des champignons mycorhiziesarbusculaires autochtones et du compost dans l'amélioration de la tolérance du palmier dattier au stress salin. Thèse Doctorat : Biotechnologie et physiologie végétales. Marrakech : université Cadi Ayyad.

Ait-El-Mokhtar M ; Baslam M ; Ben-Laouane R ; Anli ; Boutasknit A ; Mitsui T ; Meddich, A ; **2020**. Alleviation of detrimental effects of salt stress on date palm (*Phoenix dactylifera* L.) by the application of arbuscular mycorrhizal fungi and/or compost. *Frontiers in Sustainable Food Systems*, 4:131.

Al-Alawi R ; Al-Mashiqri J H ; Al-Nadabi J S M; Al-Shihi B I; Baqi Y; 2017.Date palm tree (*Phoenix dactylifera*L.): Natural products and therapeutic options. *Frontiers in Plant Science*, 8: 1–12.

Alfiky A ; Weisskopf, L ; **2021**. Déchiffrer les interactions Trichoderma–Plant–Pathogen pour un meilleur développement des applications de biocontrôle. *J. Fungi* , 7 , 61.

Alhudaib K. A ; El-Ganainy, S. M ; Almaghasla, M. I ; Sattar M. N ; **2022**. Characterization and control of *Thielaviopsis punctulata* on date palm in Saudi Arabia. *Plants*, 11(3): 250.

Al-Sadi A M ; Al-Wehaibi A N; Al-Shariqi R M; Al-Hammadi M S; Al-Hosni I A; Al-Mahmooli I H; Al-Ghaithi A G; 2013. Population genetic analysis reveals diversity in *Lasiodiplodia* species infecting date palm, Citrus, and mango in Oman and the UAE. *Plant Disease*, 97: 1363-1369

AlSnafi AE ; Thuwaini MM ; 2023. *Phoenix dactylifera* : traditionnel usages, constituants chimiques, bénéfiques nutritionnels et effets thérapeutiques. *Tradit Med Res* ,8(4):20.

Alves A; Phillips A J L; Henriques I; Correia A; 2007. Différenciation rapide des espèces de Botryosphaeriaceae par PCR Fingerprinting. Rés. Microbiol, 158 :112–121.

Amadou I; 2016. Date Fruits: Nutritional Composition of Dates (*Balanites aegyptiaca* Delile and *Phoenix dactylifera* L.). In: Simmonds, M.S.J. and Preedy, V.R. (eds.) Nutritional Composition of Fruit Cultivars. Academic Press, USA,215–233.

Amom T; Nongdam P; 2017. The use of molecular marker methods in plants: a review. International Journal of Current Research and Review ,9(17) : 1-7.

## B

Bahriz H ; Bouras, N ; 2020. Etude de la Maladie du Bayoud, le Comportement Variétal du Palmier Dattier vis-à-vis du *Fusarium oxysporum* f.sp. *albedinis* dans la Vallée du M’Zab. Afr. Rev. Sci. Technol. Develop, 5 : 41–60.

Bell perkins L J; Lynch J M; 2002. Encyclopedia of environmental microbiology, A Wiley-Interscience Publication, Canada .Rhizosphere microbiology In.G.Bitton (ed), 2713-2728.

Benabderrahmane S ; 2021. Réponse biochimique et phytochimique d’une Fabacée soumise au stress salin, cas de *Vicia faba* L. Thèse Doctorat : science de l’environnement. Sidi bel abbes : université Djillali Liabes

Benchaabane M ; Bakour R ; Toua D ; Boutekrabt A ; 2000. Mise en évidence de l’effet antagoniste de *Pseudomonas fluorescens* vis-à-vis de la fusariose vasculaire de la tomate. Bull OEPP/EPPO, 30 :243-246.

Benlarbi L ; 2009. Isolement et caractérisation du *Fusarium oxysporum* f sp *albedinis* du sudouest algérien. Thèse Magister. Universite de Bechar. Algerie.

Benlarbi L., 2019. Contribution à l’étude de *Fusarium oxysporum* f sp *albedinis* agent causal de la fusariose vasculaire du palmier dattier et moyens de lutte. Thèse de doctorat. Université Abdelhamid Ibn Badis de Mostaganem. 175.

Benoussaid N ; 2018. Etude de quelques caractères phénotypiques et génotypiques du métabolisme secondaire lie au biocontrole et la phytostimulation chez les *Pseudomonas* spp.fluorescents. Thèse de Doctorat. Université Saad Dahleb, Blida.

**Benoussaid N; Benchabane M; Thonart P; 2018.** Identification de souches de *Pseudomonas* Fluorescents et application de leurs lyophilisats pour le biocontrôle de la fusariose de la tomate. *Agrobiologia*, 2507-7627.

**Bensaci M B ; Toumatia O ; Bouras N ; Rahmania F ; Douglas B ; Wade S ; Mur L. A; 2023.** Phylogenetic and pathogenic characterization of *Mauginiella scaettae* as the causal agent of date palm (*Phoenix dactylifera* L.) inflorescence rot in southeast of Algeria. *Physiological and Molecular Plant Pathology*, 127: 102062.

**Bossis E; Lemanceau P; Latour X; Gardan L; 2000.** The taxonomy of *Pseudomonas fluorescens* and *Pseudomonas putida*: current status and need for revision. *Agronomie*, 20: 51-63.

**Bouhlali E. D. T ; Derouich M ; Ben-Amar H ; Meziani R ; Essarioui A. 2020.** Exploring the potential of using bioactive plant products in the management of *Fusarium oxysporum* f. sp. *albedinis*: the causal agent of Bayoud disease on date palm (*Phoenix dactylifera* L.). *Beni-Suef University Journal of Basic and Applied Sciences*, 9(1): 1-9.

**Boulahouat S ; Cherif-Silini H ; Silini A ; Chenari Bouket A ; Luptakova L ; Saadaoui N ; Belbahri L ; 2022.** Critical Evaluation of Biocontrol Ability of Bayoud Infected Date Palm Phyllospheric *Bacillus* spp. Suggests That In Vitro Selection Does Not Guarantee Success in Planta. *Agronomy*, 12(10): 2403.

**Brader G; Compant S; Mitter B; 2014 .**Metabolic potential of endophytic bacteria. *Curr Opin Biotechnol*, 27: 30-37.

**Bultreys A; Gheysen I; 2000.**Production and comparison of peptide siderophores from strains of distantly related pathovars of *Pseudomonas syringae* and *Pseudomonas viridiflava* LMG 2352. *Appl. Environ. Microbiol*, 66:325-331.

**Bustamante M I; Elfar K; Eskalen A; 2022.** Evaluation of the Antifungal Activity of Endophytic and Rhizospheric Bacteria against Grapevine Trunk Pathogens. *Microorganisms*, 10: 2035.

## C

**Carlone G M; Valadez M J; Pickett M J; 1982.**Methods for distinguishing gram-positive from gram-negative bacteria. *J Clin Microbiol*, 16(6):1157-9.

Carmona-Hernandez S ; Reyes-Pérez J J ; Chiquito-Contreras RG ; Rincon-Enriquez G ; Cerdan-Cabrera CR ; Hernandez-Montiel LG ; 2019. Biocontrôle des maladies fongiques post-récolte des fruits par les antagonistes bactériens : une revue *Agronomie*, 9 (3) :121.

Castillo A. B ; Cortes D. J. D ; Sorino C. F ; Soriño C. K. P ; El-Naas M. H ; Ahmed T ; **2023**. Bioethanol Production from Waste and Nonsalable Date Palm (*Phoenix dactylifera* L.) Fruits: Potentials and Challenges. *Sustainability*, 15(4): 2937.

Cattelan A J; Hartelp G; fuhrmannj J; 1999. Screening for plant growth-promoting rhizobacteria to promote early soybean growth. *Soil sci. soc. am. J*, 63: 1670-1680.

Chakroune K ; **2006**. Valorisation des sous-produits organiques du palmier dattiers (*Phoenix dactylifera* L.) par compostage. Contribution à la lutte contre la fusariose vasculaire (BAYOUD). Thèse de Doctorat. Université Mohamed premier faculté des sciences,Oujda.

Cheikh SS ; Wani SJ ; Sayyed RZ ; 2018. Impact des interactions entre la rhizosphère et les rhizobactéries : une revue. *J. Bactériol. Mycol*, 5 :1058.

Chellaia ER ; 2018. Biorestauration du cadmium (métaux lourds) par *Pseudomonas aeruginosa* : une mini-analyse. *Appl Water Sci*, 8: 154.

Chen J; Wang X; Tang D; Wang W; 2019. Oxidative stress adaptation improves the heat tolerance of *Pseudomonas fluorescens* SN15-2. *Biological Control*, 138: 104070.

Cherif-Silini H ; Silini A ; Yahiaoui B ; Ouzari I ; Boudabous A ; 2016. Caractéristiques phylogénétiques et favorisant la croissance des plantes de *Bacillus* isolé de la rhizosphère du blé. *Ann. Microbiol*, 66 :1087–1097.

Cherif-Silini H ; Thissera B ; Chenari Bouket A ; Saadaoui N ; Silini, A ; Eshelli M ; Alenezi FN ; Vallat A ; Luptakova L ; Yahiaoui B ; et coll ; **2019**. Tolérance au stress du blé dur induite par l'endophyte *Pantoea agglomerans* avec des gènes contribuant aux fonctions de la plante et à l'arsenal de métabolites secondaires. *Int. J. Mol. Sci*, 20, 3989.

Chet L ; 1987. Trichoderma-application, mode of action, and as a biocontrol agent of soilborne plant pathogenic fungi, In I. Chet (ed), *Innovative approaches to plants disease control*. John Willey & sons, New York,147-160.

Christina A; Christopher V; Bhore SJ; 2013. Endophytic bacteria as a source of novel antibiotics. *Pharmacogn Rev*, 7: 11-16.

Compant S ; Brader G ; Muzammil S ; Sessitsch A ; Lebrihi A ; Mathieu F; 2013. Use of beneficial bacteria and their secondary metabolites to control grapevine pathogen diseases. *Biocontrol*, 58:435–455.

## D

Dahah H ; 2017. Etude de l'effet antimicrobien et antioxydant des métabolites secondaires sécrétés par des *Pseudomonas* originaires des conditions extrêmes. Doctorat Abdelhamid Ibn-Badis De Mostaganem.

Damiri N ; Mulawarman M ; Effendi RS ; 2019. Antagonisme de *Pseudomonas fluorescens* des racines des plantes au pathogène *Rigidoporus lignosus* des racines blanches du caoutchouc in vitro. *Biodiversitas*, 20(6): 1549-1554.

Degand N ; Carbonnelle E ; Dauphin B ; Beretti J L ; Le Bourgeois M; Sermet-Gaudelus I ; Segonds C ; Berche P ; Nassif X ; Ferroni A; 2008 .Matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry for identification of nonfermenting gram-negative bacilli isolated from cystic fibrosis patients. *J. Clin. Microbiol*, 46: 3361–3367.

Degani O ; Dor, S ; 2021. Trichoderma Lutte biologique pour protéger les hybrides de maïs sensibles contre le flétrissement tardif au champ. *J. Fungi*, 7 :315.

De Lamo FJ ;Takken FL ; 2020. Biocontrôle par *Fusarium oxysporum* utilisant la résistance médiée par les endophytes. *Devant. Usine Sci*, 11: 37.

Dieckmann R ; Graeber I ; Kaesler I ; Szewzyk U ;Von Dohren H ;2005.Rapid screening and dereplication of bacterial isolates from marine sponges of the sula ridge by intact-cell-MALDI-TOFmass spectrometry (ICM- MS). *Appl.Microbiol. Biotechnol* , 67: 539–548.

Digat B ; Gardan L ; 1987. Caractérisation, variabilité et sélection des souches bénéfiques de *Pseudomonas fluorescens* et *Pseudomonas putida*. *Bull OEPP* ,17: 559-568.



Djellout H ; Mekheldi D ; Belkacem K K ; Raio A ; Krimi Z ; 2019. Potential evaluation of antagonistic *Bacillus* spp. and *Pseudomonas* spp. to control pathogenic *Agrobacterium* spp. involved in crown gall diseases. *AgroBiologia*, 9(1):1267-1283.

Domsch K H; Gams W; Anderson T; 1980. Compendium of soil fungi, Academic Press, London Ltd,1: 860 .

## E

Essarioui A; Sedra M. H; **2017**. Lutte contre la maladie du bayoud par solarisation et fumigation du sol. Une expérimentation dans les palmeraies du Maroc. *Cahiers Agricultures*, 26(4): 45010.

## F

Fandougouma O ; 2023 .Production du Biodiesel à Partir des Noyaux de Quatre Variétés de Palmiers Dattiers (H'mira, Takerbouchet, Tegazza et Tinaceur) de la Région d'Adrar .Thèse Doc, Génie des Procédés, universite kasdi merbah ouargla.

Faostat ; (2020). Production FAOSTAT Food and agriculture Organisation of the United Nations. Rome.

Fernández-López J ; Viuda-Martos M ; Sayas-Barberá E ; Navarro-Rodríguez de Vera C ; Pérez-Álvarez J. Á ; **2022**. Biological, nutritive, functional and healthy potential of date palm fruit (*Phoenix dactylifera* L.): Current research and future prospects. *Agronomy*, 12(4): 876.

Flowers JM; Hazzouri KM; Gros-Balthazard M; Mo Z; Koutroumpa K;Perrakis A; Ferrand S; Khierallah HS; Fuller DQ ; Aberlenc F ;2019.Cross-species hybridization and the origin of North African date palms. *Proceedings of theNational Academy of Sciences*, 116(5): 1651-1658.

## G

Gardan L; Luisetti G; 1981. Méthodes d'isolement et d'identification des bactéries phytopathogènes. INRA Angers, France, 32p. Conclusion :

Ghadamgahi F ; Tarighi S ;Taheri P ; Saripella GV ; Anzalone A ; Kalyandurg PB ; Catara V ; Ortiz R ; Vetukuri RR ; 2022. Croissance des plante favorisant l'activité de *Pseudomonas aeruginosa* FG106 et sa capacité à agir comme agent de lutte biologique contre les pathogènes de la pomme de terre, de la tomate et du taro *Biologie*, 11 (1): 140.

Gibril M. B. A ; Shafri H. Z. M ; Al-Ruzouq R ; Shanableh A ; Nahas F ; Al Mansoori S ; **2023**. Large-Scale Date Palm Tree Segmentation from Multiscale UAV-Based and Aerial Images Using Deep Vision Transformers. *Drones*, 7(2): 93.

Giles C; Hsu P; Richardson A; Hurst M; Hill JE; 2014. L'assimilation végétale du phosphore à partir d'une forme organique insoluble est améliorée par l'ajout d'un anion organique produisant *Pseudomonas* sp *Sol Biol Biochem* ,68: 263-269.

Graniti A; Surico G; Mugnai L; 2000. Esca of grapevine: A disease complex or a complex of diseases? *Phytopathol. Mediterr*, 39:16–20.

## H

Hakkou A; Chakroune K; Souna F; Bouakka M; **2023**. La fusariose vasculaire du palmier dattier (Bayoud) : Méthodes de lutte. Laboratoire de Biochimie, Faculté des Sciences, Université Mohammed Premier, Oujda, Maroc.

Harkat H; Bousba R; Benincasa C; et al; 2022. Assessment of biochemical composition and antioxidant properties of Algerian date palm (*Phoenix dactylifera* L.) seed oil. *Plants*, 11 (3):381.

Harkousse O; Slimani A; Jadrane I; Aitboulahsen M; Mazri M. A; Zouahri A; Al Feddy M. N; **2021**. Role of local biofertilizer in enhancing the oxidative stress defence systems of date palm seedling (*Phoenix dactylifera*) against abiotic stress. *Applied and Environmental Soil Science*, 1-13.

He L; Cheng H; Zhao L; Htun A A; Yu Z H; Deng J X; Li Q L; 2021. Morphological and molecular identification of two new *Alternaria* species (Ascomycota, Pleosporaceae) in section *Radicina* from China. *Mycology*, 78:187.

Hilário S ; Lopes A ; Santos L ; Alves A ; 2020. Botryosphaeriaceae Espèces associées à la brûlure et au dépérissement de la tige du bleuet dans la région centrale du Portugal. *EUR. J. Plant Pathol.*156: 31–44.

Hildebrand D C; 1988. Pectate and pectin gel for differentiation of *Pseudomonas* sp. And other bacterial plant pathogens. *Phytopathol*, 61: 1430-1439.

**Hrycan J ; Hart M ; Bowen P ; Forge T ; Úrbez-Torres J R ; 2020.** Grapevine trunk disease fungi: Their roles as latent pathogens and stress factors that favour disease development and symptom expression. *Phytopathol. Mediterr*, 59: 395–424.

**Höfte M ; 2021.** L'utilisation de *Pseudomonas* spp. Comme agents de lutte biologique bactérienne pour lutter contre les maladies des plantes. Dans : Köhl J, Ravensberg W (eds.) *Bioprotecteurs microbiens pour la gestion des maladies des plantes*. Burleigh Dodds Science Publishing, Cambridge, Royaume-Uni.

**Howell C R; Stipanovic R D; 1979.** Control of *Rhizoctoniasolani* on cotton seedlings with *Pseudomonas fluorescens* and with an antibiotic produced by the bacteria. *Phytopathology*, 69, 480-482.

## **J**

**Jacques M A ; 1994.** Écologie quantitative et physiologie de la communauté bactérienne épiphyllé de *Cichorium endivia* var. *latifolia* L. Thèse de doctorat, université de Paris-XI, Orsay, 123.

**Jeyanthi V; Kanimozhi S; 2018.** Plant growth promoting rhizobacteria (PGPR)-prospective and mechanisms: A review. *J. Pure Appl.Microbiol*, 12, 733–749.

**JOHNSO D. V; MACKNIGHT J. C; 2022.** Date Palm Growing in South Texas. Disponible en ligne: <https://www.researchgate.net/publication/361255797>

**Johnston A, Booth C; 1983.** *Plant pathologist's pocketbook*. 2nd ed. kew, commonwealth mycological institute.

## **K**

**Kaddouri Y ; Abridach F ; Ouahhoud S ; Benabbes R ; El Kodadi, M ; Alsalme A ; Al-Zaqri N ; Warad I ; Touzani R ; 2020.** Ligands mono-alkylés à base de dérivés de pyrazole et de triazole testés contre *Fusarium oxysporum* f.sp. *albedinis* : synthèse, caractérisation, DFT et identification du site de liaison de la phytase à l'aide de l'accostage aveugle/du criblage virtuel pour les inhibiteurs puissants de Fophy. *Devant. Chim* , 8 :559262.

**Kamilova F; Validov S; Azarova T; Mulders I; Lugtenberg B; 2005.** Enrichment for enhanced competitive plant root tip colonizers selects for a new class of biocontrol bacteria. *Environmental Microbiology*, 7(11): 1809-1817.

**Kandel SL; Joubert PM; Doty SL; 2017.** Bacterial endophyte colonization and distribution within plants. *Microorganisms*, 5: 77-103.

**Karmegham N ; Vellasamy S ; Natesan ,B ; Sharma P M ; Al Farraj D ; Elshikh M ;2020.** Caractérisation du métabolite antifongique phénazine des pseudomonades fluorescentes (PF) de la rhizosphère du riz et leur effet sur la brûlure de la gaine du riz. *Journal saoudien des sciences biologiques*, 27 :3313-3326.

**Kaur T; Kour D; Pericak O; Olson C; Mohan R; Yadav A; Mishra S Kumar M; Rai AK Yadav AN ; 2022.** Diversité structurelle et fonctionnelle de la croissance des plantes favorisant les  
**Kawaguchi A ; Sawada H; Ichinose Y: 2008.** Phylogenetic and serological analyses reveal genetic diversity of *Agrobacterium vitis* strains in Japan. *Plant Pathol*, 57:747-753.

**KEEL C ; MAURHOFER; OBERLHANSLI T H ; VOISARD C; HAAS D; DEFAGO C ; 1991.** Role of 2,4- diacetylphloroglucinol in the suppression of take-all of wheat by strain of *Pseudomonas fluorescens*. In: *Biotic interactions and soil borne diseases .Rev. Agric. Managed Forest Ecol* 23, Elsevier, Amsterdam, 335-338. *Symbiosis*, 9:327-341.

**Kerbab S ; Silini A ; Chenari Bouket A ; Cherif-Silini H ; Eshelli M ; El Houda Rabhi N ; Belbahri L ; 2021.** Mitigation of NaCl stress in wheat by rhizosphere engineering using salt habitat adapted PGPR halotolerant bacteria. *Appl. Sci*, 11:1034.

**Khan N ; Martínez-Hidalgo P ; Glace TA ; Maymon M ; Humm, EA ; Nejat N ; Ponceuses ER ; Kaplan D ; Hirsch AM ; 2018.** Activité antifongique des espèces *Bacillus* contre *Fusarium* et analyse des mécanismes potentiels utilisés dans le biocontrôle. *Devant. Microbiol*, 9: 2363.

**Khan R.; Haq I. U; Naqvi S. A; 2023.** Pest and Disease Management in Date Palm. In *Date Palm*, 297-338.

**Khanum P; Khan A. A; Khan I. A; Ghaffar A; Khan Z; 2023.** TPD1-like Gene as a Suitable Marker for Early Sex Determination in Date Palm (*Phoenix dactylifera* L.). *Genes*, 14(4): 907.

**King E O; Ward M K; Raney DE; 1954.** Two simple media for the demonstration of pyocyanin and fluorescin. *J. Lab. Clin. Med*, 44:301-307.

Klement Z ;1963. Rapid detection of pathogenicity of phytopathogenic pseudomonads. *Nature*, 199:299-300.

Kloepper J W; Schroth M N; 1981. Plant growth promoting rhizobacteria and plant growth under gnotobiotic conditions. *Phytopathology*, 71 :642-664.

Kloepper JW ; Schroth M N; Miller T D; 1980. Effects of rhizosphere colonization by Plant Growth Promoting Rhizobacteria on potato plant development and yield. *Phytopathology*, 70: 1078-1082.

## L

Lahlali R ; Ezrari S ; Radouane N ; Kenfaoui J ; Esmael Q ; El Hamss, H ; Barka E. A; **2022**. Biological control of plant pathogens: A global perspective. *Microorganisms*, 10(3): 596.

Lahlali R ; Ibrahi DSS ; Bélabess Z ; Kadir Roni MZ ; Radouane, N ; Vicente, CSL ; Menendez E ; Mokrini, F ; Barka EA ; Galvão de Melo et Mota M ; et coll ; **2021**. Technologies moléculaires à haut débit pour percer le mystère de la communauté microbienne du sol : défis et perspectives d'avenir. *Helyon*, 7 : 08142.

Lamari N; Bouras H ; Oehk A; Oehm D ; Sabaou N ; 2014 . Influence de quelques souches bactériennes d'origine saharienne sur l'expression de la fusariose du lin et du palmier dattier. *Algerian Journal of Arid Environment "AJAE"*, 4(2).

Larach A ; Torres C ; Riquelme N ; Valenzuela M ; Salgado E ; Seeger M ; Canales X A B ; (2020). Yield loss estimation and pathogen identification from *Botryosphaeria dieback* in vineyards of Central Chile over two growing seasons. *Phytopathologia Mediterranea*, 59(3):537–548.

Larkin RP; Fravel DR; 1999. Mechanisms of action and Dose-Response relationships governing biological control of *Fusarium wilt* of Tomato by nonpathogenic *Fusarium* spp. *Phytopathology*, 89:1152–1161.

Lelliott R A; Billing E; Hayward A C; 1966. A determinative scheme for the fluorescent plant pathogenic *Pseudomonas*. *J. Appl. Bacteriol*, 29: 470–489.

Lelliott R A; Stead D E; 1987. In: T.F. Preece (Ed.). *Methods in Plant pathology. Methods for diagnosis of Bacterial Diseases of Plants*. Blackwell. Oxford. UK, 2: 212.

**M**

**Mansouri N.** (2022). Criblage du potentiel de biocontrôle de différents isolats microbiens. Thèse de doctorat. Université Larbi Ben M'Hidi Oum El Bouaghi, 260.

**Mercenier A ; Simon J P ; Van der Wauven C ; Haas D ; Stalon V ;** 1980. Regulation of enzyme synthesis in the arginine deiminase pathway of *Pseudomonas aeruginosa*. *J. Bacteriol*, 144: 159-163.

**Mezaache S ;** 2012. Localisation des Déterminants de la suppression de quelques souches de *Pseudomonas* isolées de la Rhizosphère de la pomme de terre. Thèse Doctorat, Université Ferhat Abbas, Sétif (Algérie) ,221.

**Miller J H;** 1974. *Experiments in Molecular Genetics*. Second Ed. Cold Spring Harbor, New York, 31-36.

**Mishra J; Arora N K;** 2018. Secondary metabolites of fluorescent pseudomonads in biocontrol of phytopathogens for sustainable agriculture. *Applied Soil Ecology*, 125: 35-45.

**Mohamed Mahmoud F ;** 2017. Activités biologiques de champignons endophytes isolés du palmier dattier (*Phoenix dactylifera L.*). Thèse de doctorat. Ecole Nationale Supérieure Agronomique d'El Harrach.

**Mohanram, S ; Kumar P ;** 2019. Microbiome de la rhizosphère : revisiter la synergie des interactions plante-microbe. *Ann. Microbiol*, 69:307–320.

**Mojeremane, K; Lebenya P; duPlessis I; van der Rijst M; Mostert L; Armengol J; Halleen F;** 2020. Cross pathogenicity of *Neofusicoccum australe* and *Neofusicoccum stellenboschiana* on grapevine and selected fruit and ornamental trees. *Phytopathologia Mediterranea*, 59(3): 581-593.

**Moral J ; Muñoz-Díez C; González N; Trapero A; Michailides T J ;** 2010. Characterization and pathogenicity of Botryosphaeriaceae species collected from olive and other hosts in Spain and California. *Phytopathology*, 100:1340-1351.

**Moussouni S; Pintaud J C; Vigouroux Y; Bouguedoura N;** 2017. Diversity of Algerian oases date palm (*Phoenix dactylifera L.*, Arecaceae): Heterozygote excess and cryptic structure suggest farmer management had a major impact on diversity. *PLoS ONE* ,12(4):e0175232.

**N**

Narayanasamy P; 2013. Biological management of diseases of crops (pp. 295-429). Dordrecht, The Netherlands : Springer.

## O

OEPP/PPE. Fiches informatives sur les organismes de quarantaine n 70, *Fusarium oxysporum* f.sp. *Albedinis*. Bulletin 1982, 12. Disponible en ligne : <https://gd.eppo.int/taxon/FUSAAL/datasheet> (consulté le 6 décembre 2017) (Dernière mise à jour : 22 avril 2022).

Olmar B ; Weber I ; Leanardo M; Cruz J L; Baladani J; Dobereiner; 2001. Herbaspirillum-like bacteria in banana plants .Brazilian Journal of Microbiology, 32: 201.

## P

Palleroni N J; 1992a. Introduction to the family Pseudomonadaceae. A. Ballows, H. G. Trüper, M. Dworking, W. Harder and K. H. Schleifer .Eds., In *The prokaryotes*, Springer Verlag, New York, 3071-3085.

Palleroni N J; 2009.The genus *Pseudomonas*. Dans "*Practical handbook of microbiology*", 2ème édition, Goldman, E. ET Green, L.H. (Eds). CRC Press, Taylor & Francis Group, Etats-Unis, 231-242.

Palleroni NJ; Ballard RW; Ralston E; Doudoroff M; 1973. desoxyribonucleic acid homologies among some pseudomonas species. *J. bacterial*, 110: 1-11.

Palleroni N J; Migula N; 1984. In: Krieg, N.R., Holt, J.G. (Eds), *Bergey's Manuel of systematic Bacteriology*, vol.I.Williams and Wilkins Co, Bltimore, USA: 141- 171.

Pandey S ; Gupta S ; 2020. Évaluation de *Pseudomonas* sp. Pour son potentiel multiforme de promotion de la croissance des plantes et sa capacité à atténuer le stress biotique et abiotique chez les plants de tomates (*Solanum lycopersicum*). *Sci Rep*, 10 (1): 20951.

PERSELLO-CARTIEAUX F; NUSSAUMEL ET ROBAGLIA C; 2003.Tless from underground: Molcular plant-rhizobacteria interaction .*Plant Cell Environ*, 26:189-199.

Pfordt A; Schiwiek S; Karlovsky P; von Tiedemann A; **2020**. Trichoderma Afroharzianum Ear Rot—Une nouvelle maladie du maïs en Europe. *Devant. Agro*, 2:547758.

Phillips A J L, Alves A ; Abdollahzadeh J ; Pantoufles B ; Wingfield M J ; Groenewald JZ ; 2013. Crous Les Botryosphaeriaceae : genres et espèces connus de la culture. *Étalon. Mycol*, 76: 51–167.

Poveda J ; **2021**. Trichoderma comme agent de lutte biologique contre les ravageurs : nouvelles utilisations pour un mycoparasite. *Biol. Contrôle*, 159, e104634.

## R

Rabhi N E H ; Cherif-Silini H ; Silini A ; Alenezi F N ; Chenari Bouket A ; Oszako T ; Belbahri L ; **2022**. Alleviation of Salt Stress via Habitat-Adapted Symbiosis. *Forests*, 13: 586.

Ramírez M ; Pérez L ; Montealegre J ; 2018. Susceptibility of different grapevine (*Vitis vinifera* L.) cultivars to *Diplodia seriata* and *Diplodia mutila*. *Ciencia E Investigacion Agraria*, 45(1):93-98.

Rezgui A ; Ghnaya-Chakroun A B ; Vallance J ; Bruez E ; Hajlaoui M R ; Sadfi-Zouaoui N ; Rey P ; 2016. Endophytic bacteria with antagonistic traits inhabit the wood tissues of grapevines from Tunisian vineyards. *Biol. Control*, 99: 28–37.

## S

Sah S; Krishnani S; Singh R; 2021. Pseudomonas a assuré la médiation d'activités nutritionnelles et de promotion de la croissance pour une sécurité alimentaire durable. *Rés actuelle Microb Sci* 2: 100084.

Sahouli S ; **2021**. Interaction palmier dattier-Fusarium oxysporum f.sp.albedinis (Foa): potentialisation des réactions de défense et développement de nouvelles stratégies pour le biocontrôle de la maladie. Thèse de Doctorat. Université Kasdi Merbah, Ouargla.

Schaad N W ; **1988**. Initial identification of common genera,. In in scaads, n.w .ed.. . Laboratory guide for identification of plant pathogenic bacteria . 2nd ed. st paul. minnosota . Aps, 1-15.



Slama HB ; Cherif-Silini H ; Chenari Bouket A ; Qader M ; Silini A ; Yahiaoui B ; Alenezi FN ; Luptakova L ; Triki M A ; Vallat A ; et coll ; **2019** . Le dépistage des bactéries antagonistes de *Fusarium* à partir de niches contrastées a désigné l'endophyte *Bacillus halotolerans* comme gardien des plantes contre *Fusarium* . *Devant. Microbiol*, 9 :3236.

Slama HB ; Cherif-Silini H ; Chenari Bouket A ; Silini A ; Alenezi FN; Luptakova L ; Vallat A ; Belbahri L ; **2021**. Biotechnologie et bioinformatique des endophytes dans le contrôle biologique, la bioremédiation et la promotion de la croissance des plantes. En *Endophytes : Gestion des Nutriments Minéraux* ; Maheshwari, DK, Dheeman, S., Eds. ; Springer : Cham, Suisse, 3: 181–205.

Slama HB ; Cherif-Silini H ; Chenari Bouket A; Silini A ; Alenezi, FN; Luptakova L ; Vallat A ; Belbahri L ; **2021**. Biotechnologie et bioinformatique des endophytes dans le contrôle biologique, la bioremédiation et la promotion de la croissance des plantes. En *Endophytes : Gestion des Nutriments Minéraux* ; Maheshwari, DK, Dheeman, S., Eds. ; Springer : Cham, Suisse, 3 :181–205.

Shanmugaiah V; Ramesh S; Jayaprakashvel M; Mathivanan N; 2006. Biocontrol and plant growth promoting potential of *Pseudomonas* sp. MML2212 from the rice rhizosphere. *MITTEILUNGEN-BIOLOGISCHEN BUNDESANSTALT FUR LAND UND FORSTWIRTSCHAFT*, 408:320.

Sidaoui A ; Karkachi N ; Bertella A ; El Goumi Y ; Haouhach S ; Oguiba B ; Boudeffeur S ; Chhiba M ; Kihal M ; **2018**. Pathogenicity and biological control of Bayoud disease by *Trichoderma longibrachiatum* and *Artemisia herba-alba* essential oil. *Journal of applied Pharmaceutical science*, 8 (04): 161-167.

Sidky R ; **2017**. Organogénèse directe optimisée à partir d'explants d'apex de palmier dattier. Dans les protocoles de biotechnologie du palmier dattier ; Humana Press : New York, NY, États-Unis, 1: 37–45.

Slippers B; Wingfield M J ;2007. Botryosphaeriaceae as endophytes and latent pathogens of woody plants: diversity, ecology and impact. *Fungal Biology Reviews* ,21:90–106.

Stanier R Y ; Palleroni N J ; Doudoroff M; 1966. The aerobic pseudomonads, a taxonomic study. *Microbiol*, 43 (2): 159-271.

Stenberg, J. A., Sundh, I., Becher, P. G., Björkman, C., Dubey, M., Egan, P. A., Gil, J. F., Jensen, D. F., Jonsson, M., Karlsson, M., Khalil, S., Ninkovic, V., Rehmann, G., Vetukuri, R. R and Viketoft, M. (2021). When is it biological control? A framework of definitions, mechanisms, and classifications. *Journal of Pest Science*, 94(3): 665-676.

Sun J E ; Meng C R; Phillips A J L ; Wang Y ;2022. Deux nouvelles espèces de *Botryosphaeria* (Botryosphaeriales, Botryosphaeriaceae) en Chine. *MycKeys* ,94: 1-16.

Suresh P ; Vellasamy S; Almaary K S; Dawoud T M ; Elbadawi Y B ; 2021 . Fluorescent pseudomonads (FPs) as a potential biocontrol and plant growth promoting agent associated with tomato rhizosphere. *Journal of King Saud University-Science*, 33(4) : 101423.

## T

Tena G ; 2018. Recrutement de gardes du corps microbiens. *Nat. Plantes*, 4: 857.

Thornley MJ ;1960. The differentiation of *Pseudomonas* from other gram-negative bacteria on the basis of arginine metabolism. *J Appl Bacteriol*, 23 : 37-52.

Trichine H S ; 2010. Etude ethnobotanique, activité antioxydants et analyse photochimique de quelques cultivars de palmier dattier (*phoenixdactylifera L.*) du sud-Est Algérien. Mémoire du diplôme de Magister en Biologie. Université d'ORAN- Es Senia, 106.

Tripathi A; Pandey P; Tripathi SN; Kalra A; 2022. Perspectives and potential applications of endophytic microorganisms in cultivation of medicinal and aromatic plants. *Front Plant Sci*, 13:985429.

## U

Úrbez-Torres J R; 2011. The status of *Botryosphaeriaceae* species infecting grapevines. *Phytopathol. Mediterr*, 50: 5-45.

Úrbez-Torres J R; 2011. The status of *Botryosphaeriaceae* species infecting grapevines. *Phytopathol. Mediterr* ;50: 5-45.

Úbez-Torres J; Gubler W; 2009. Pathogenicity of *Botryosphaeria* species isolated from grapevine cankers in California. *Plant disease*, 93:584-92.

## V

Valencia A, Gil P; Latorre B; & Rosales M; 2019. Characterization and Pathogenicity of Botryosphaeriaceae Species Obtained from Avocado Trees with Branch Canker and Dieback and from Avocado Fruit with Stem End Rot in Chile. *Plant disease*, 103:996-1005.

Van Lenteren J C ; Bolckmans K ; Köhl J ; Ravensberg W J ; Urbaneja A, 2018. Biological control using invertebrates and microorganisms: Plenty of new opportunities. *BioControl*, 63: 39–59.

Van Niekerk J; Fourie PH; Halleen F; Crous PW ; 2006 .Botryosphaeria spp. as grapevine trunk disease pathogens. *Phytopathologia Mediterranea*, 45:43-54.

Vincent M N; Harrison L A; Brackin J M; Kovacevich P A; Mukerji P ; Weller D M; 1991. Genetic analysis of the antifungal activity of a soilborne *Pseudomonas aureofaciens* strain. *Appl. and Environ. Microbiol*, 57: 2928-2934.

## W

Wang Y N ; He W H ; He H ; Du X; Jia B; Zeng Z P ; An M L; Chen G C; 2012. *Pseudomonas nitritireducens* sp. nov., a nitrite reduction bacterium isolated from wheat soil. *Arch. Microbiol*, 194:809–813.

WHIPPS J M; LUMSDEN R D; 2001. Commercial use of fungi as plant disease biological control agents: status and prospects. In: Butt, T.M., Jackson, C., Magan, N. (Eds.), *Fungi as Biocontrol agents. Progress, Problems and Potential*. CABI Publishing, Wallingford, 9-22.

Widiantini F ; Herdiansyah A ; Yulia E; 2017. Biocontrol Potential of Endophytic Bacteria Isolated from Healthy Rice Plant against Rice Blast Disease (*Pyricularia oryzae* Cav.). *KnE Life Sci*, 2:287–295.

## X

Xue D ; Zhang X ; Lu X ; Chen G ; Chen ZH ; 2017. Mécanismes moléculaires et évolutifs de la cire cuticulaire pour la tolérance à la sécheresse des plantes. *Devant. Usine Sci*, 8: 621.

## Y

Yang T; Groenewald JZ; Cheewangkoon R; et al; 2017. Families, genera, and species of Botryosphaeriales. *Fungal Biology*, 121: 322–346.

Yan JY; Xie Y; Zhang W ; Wang Y ; Liu J K ; Hyde KD Seem RC ;Zhang G Z ; Wang Z Y ; Yao S W ; et al ; 2013 .Espèces de Botryosphaeriaceae impliquées dans le dépérissement de la vigne en Chine. *Plongeurs fongiques*, 61: 221–236.

Yedidia I; Benhamou N; Chet I; 1999. Induction of defense responses in cucumber plants (*Cucumis sativus* L.) by the biocontrol agent *Trichoderma harzianum*. *Appl Environ Microbiol*, 65: 1061–1070.

Yield Skin G H S ; Alqahtani N ; Munir M ; Alghanim N S ; Mohammed M ; 2023. Combined Separation, and Physicochemical Properties of Date Palm Fruits. *Plants*, 12(5): 1003.

Yukie H. C ; Stuhlberger O. ; 2011. Desertification. *CNUCED, Zoi Environment Network* ,54.

## Annexe I :

## 1. Composition des Milieux de cultures

Milieu King B (KB) ( <b>King et al., 1954</b> )	Milieu L.P.G.A (Levure-Peptone-Glucose-Agar)
<ul style="list-style-type: none"> <li>- Peptone.....20 g</li> <li>-Glycérol.....15 ml</li> <li>- K2 Hpo4 .....1,5 g</li> <li>- MgSO4 .....1,5 g</li> <li>- Agar..... 20 g</li> </ul> PH = 7,2	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Extrait de levure.....0,5g</li> <li>- Peptone.....0,5g</li> <li>- Gélose.....15g</li> <li>- Glucose.....10g</li> </ul>
Milieu PDA (Potato Dextrose Agar) ( <b>Jonsthon et Booth, 1983</b> )	Milieu Levane ( <b>Hildebrand et al.,1988</b> )
<ul style="list-style-type: none"> <li>- Pomme de terre ..... 200 g</li> <li>- Dextrose ..... 20 g</li> <li>- Agar.....20g</li> </ul> PH =7	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Extrait de levure..... 2 g</li> <li>-Bactopeptone.....5 g</li> <li>- NaCl..... 5 g</li> <li>- Saccharose .....50 g</li> <li>- Agar .....20g</li> </ul> PH= 7,2
Gélose M9 ( <b>Miller, 1974</b> )	Moller-arginine ( <b>Gardan et aLuisetti, 1981</b> )
<ul style="list-style-type: none"> <li>- Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> ..... 6g-</li> <li>- KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>.....3g</li> <li>-NH<sub>4</sub>CL..... 1g</li> <li>-Na Cl ..... 0.5g</li> <li>- Agar..... 17g</li> </ul> Autoclavage puis additionné: Cellulose.....10g + extrait de levure 1.2g	<ul style="list-style-type: none"> <li>- monoHcl ..... 10g</li> <li>- Bactopeptone .....1g</li> <li>- Na Cl..... 5g</li> <li>- K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>..... 0.3g</li> <li>- Rouge de phénol .....0.01g</li> <li>- Gélose .....3g</li> </ul> pH = 7.2

Ces ingrédients pour 1 litre d'eau distillées

Après préparation du milieu, celui-ci est placé dans l'autoclave pendant 20 minutes à une température d'environ 120°C afin de le stériliser et d'homogénéiser les composants. Il est ensuite placé à température ambiante afin de le refroidir pour le manipuler plus facilement et surtout afin d'éviter la condensation sur les couvercles des boîtes de Pétri.







## **2. Les réactifs :**

- L'hydroxyde de potassium 'KOH'.
- Peroxyde d'hydrogène (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>).
- N diméthyl-paraphénylène-diamine.
- Le tampon PH4

## Annexe II

## 1. Appareillage

Nom de l'appareil	Photo (Originale)	Nom de l'appareil	Photo (Originale)
<p><b>Etuve</b> pour la croissance des bactéries et des champignons</p>		<p><b>Réfrigérateur</b> pour la conservation des bactéries et les milieux de cultures</p>	
<p><b>Autoclave</b></p>		<p><b>Micro-onde</b></p>	

<p><b>Balance</b></p>		<p><b>Microscope optique</b></p>	
<p><b>Lampe UV</b></p>		<p><b>Vortex</b></p>	
<p><b>Bec Bunsen</b></p>		<p><b>Micropipette</b></p>	



## 2. Verrerie et Accessoires

- Entonnoir.
- Anse de platine.
- Des boîtes pétries.
- Eprouvette graduée de 10ml, 20ml et 250ml.
- Erlenmeyer de 500ml, 1000ml et 2000ml.
- Fiole conique graduée de 250ml.
- Lame en verre.
- Flacons stérile de 150ml, 250ml et 1000ml.
- Portoir.
- Pipette Pasteur.
- Seringue stérile.
- Spatule.
- Tubes à essai Pipette Pasteur.
- Seringue stérile.
- Spatule.
- Tubes à essai.
- Embout bleu.
- Embout jaune.

## Annexe III : Tableaux de résultats de confrontation bactérie-champignons

**Tableau 06 :** Diamètres d'inhibition de chaque souche vis-à-vis de *Fusarium oxysporum f sp albedinis* (F.o.a) sur le milieu PDA.

Les souches	Le pourcentage de MD	Le pourcentage de MS	L'écartype de MD	L'écartype de MS
<b>CF1</b>	<b>50 %</b>	<b>22%</b>	0,070	0,07
<b>ZF2</b>	<b>42%</b>	<b>34%</b>	0,070	0,070
<b>PF10</b>	<b>42%</b>	<b>34%</b>	0,21	0
<b>CF11</b>	<b>44%</b>	<b>44%</b>	0,081	0,040
<b>KFR2</b>	<b>33%</b>	<b>14%</b>	0,069	0,033
<b>TRR5</b>	<b>46%</b>	<b>69%</b>	0,062	0,029
<b>PF3</b>	<b>41%</b>	<b>42%</b>	0,029	0,026
<b>BF6</b>	<b>42%</b>	<b>42%</b>	0,054	0,025
<b>RF6</b>	<b>42%</b>	<b>42%</b>	0,055	0,023
<b>TBR51</b>	<b>75%</b>	<b>68%</b>	0,049	0,022

**Tableau 07 :** Diamètres d'inhibition de chaque souche vis-à-vis de *Fusarium oxysporum f sp Lini* (F.o.ln) sur le milieu PDA.

Les souches	Le pourcentage de MD	Le pourcentage de MS	L'écartype de MD	L'écartype de MS
<b>CF1</b>	<b>50 %</b>	<b>22%</b>	0,070	0,070
<b>ZF2</b>	<b>42%</b>	<b>34%</b>	0,070	0,070
<b>PF10</b>	<b>42%</b>	<b>34%</b>	0,21	0
<b>CF11</b>	<b>44%</b>	<b>44%</b>	0,081	0,040
<b>KFR2</b>	<b>33%</b>	<b>14%</b>	0,069	0,033

<b>TRR5</b>	<b>46%</b>	<b>69%</b>	0,062	0,029
<b>PF3</b>	<b>41%</b>	<b>42%</b>	0,029	0,026
<b>BF6</b>	<b>42%</b>	<b>42%</b>	0,054	0,025
<b>RF6</b>	<b>42%</b>	<b>42%</b>	0,054	0,023
<b>TBR51</b>	<b>75%</b>	<b>68%</b>	0,049	0,022

**Tableau 08** : Diamètres d'inhibition de chaque souche vis-à-vis de *Botriosphaeria Dothidae* (B.s.d) sur le milieu PDA.

<b>Les souches</b>	<b>Le pourcentage de MD</b>	<b>Le pourcentage de MS</b>	<b>L'écartype de MD</b>	<b>L'écartype de MS</b>
<b>CF1</b>	<b>44%</b>	<b>49%</b>	0,070	0
<b>ZF2</b>	<b>49%</b>	<b>49%</b>	0,070	0
<b>PF10</b>	<b>44%</b>	<b>45%</b>	0	0,070
<b>CF11</b>	<b>47%</b>	<b>47%</b>	0	0,040
<b>KFR2</b>	<b>47%</b>	<b>45%</b>	0,040	0,034
<b>TRR5</b>	<b>47%</b>	<b>46%</b>	0,035	0,029
<b>PF3</b>	<b>48%</b>	<b>49%</b>	0,031	0,026
<b>BF6</b>	<b>53%</b>	<b>52%</b>	0,028	0,024
<b>RF6</b>	<b>47%</b>	<b>47%</b>	0,026	0
<b>TBR51</b>	<b>83%</b>	<b>77%</b>	0,025	0,023

**Tableau 09** : résultats de la confrontation bacterie-champignon *in situ* (de vingt repetition

Les souches	Les résultats de l'activité antagoniste									
	<b>TRR5</b>	+	+	++	+	+	++	+	++	+
	+	++	+	++	+	++	++	+	+	+
<b>BF6</b>	++	++	+	+++	+	++	+++	++	+	++
	+	++	+++	++	++	+++	+	++	+++	++
<b>TBR51</b>	++	++	+++	+++	+	++	+++	++	+++	++
	+++	++	+	++	++	+	+	+	++	+
<b>témoin positif</b>	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++
	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++
<b>témoin négatif</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>0</b>
	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>0</b>

