

Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie
Département de Microbiologie
Filière : Sciences biologiques
Spécialité : Microbiologie Appliquée



Réf :

Mémoire de Fin de Cycle
En vue de l'obtention du diplôme

MASTER

Thème

Etude *in vitro* et *in vivo* de l'effet de quelques souches bactériennes du genre *Pseudomonas* dans le biocontrôle d'*Aspergillus niger* sur l'ail

Présenté par :

HARFOUCHE Chahinez & HAMOUDI Wissam

Soutenu le : **22/06/2023**

Devant le jury composé de :

Mr. BENSALD K.	MAA	Président
Mme BENSIDHOUME L.	MCB	Promotrice
Mme BOUAOUD Y	MCB	Examinatrice

Année universitaire 2022/2023

Remerciements

Avant tout

Nous exprimons notre gratitude envers Allah, le Tout-Puissant et Miséricordieux, pour nous avoir accordé le courage, la patience et la volonté nécessaires pour surmonter les épreuves et les difficultés rencontrées tout au long de l'accomplissement de ce travail.

*Tout d'abord, ce travail ne serait pas aussi riche et n'aurait pas pu voir le jour sans l'aide et l'encadrement de notre chère promotrice, Mme **BENSIDHOUM Leila**. Nous la remercions pour la qualité exceptionnelle de son encadrement, sa patience, sa rigueur et sa disponibilité durant notre préparation.*

*Notre remerciement s'adresse également au professeur **NABTI EL-Hafid**. Pour avoir généreusement mis à notre disposition son laboratoire de recherche dans le but de la réalisation de ce modeste travail.*

*A notre président de jury Mr **BENSAID K**. Nos vifs remerciements vont à vous pour l'immense honneur que vous nous faites en présidant notre jury et en acceptant d'examiner notre travail et de l'enrichir par vos connaissances, vos propositions et vos remarques.*

*A notre examinatrice Mme **BOUAOUD Y**. Vous nous faites l'immense honneur de siéger au sein de notre jury, nous vous remercions infiniment pour l'intérêt que vous portez à notre travail ainsi qu'à votre disponibilité.*

*Nous remercions également Mr **ADJAOUD A**. pour sa précieuse aide.*

*Nous tenons à remercier de tout cœur Mme **MOKRANE Fatima (Faty)** pour sa précieuse aide, ses conseils éclairés, sa générosité et sa sympathie sans faille.*

*Nous remercions également toute l'équipe de laboratoire LMER, particulièrement l'équipe de Biomasse et Environnement. Merci à **Karima, Hamida, Safia, Kati** et à **Mme ABDOUNE Ahlem** pour leur disponibilité, leur aide et leur patience.*

Enfin, nous souhaitons exprimer notre sincère reconnaissance et nos remerciements à toutes les personnes qui ont contribué de près ou de loin à l'élaboration de ce mémoire.

Merci à tous et à toutes.

Dédicaces

Grâce à la bénédiction d'Allah, j'ai pu accomplir ce travail, et c'est avec un profond amour et une immense fierté que je le dédie à mes êtres les plus chers.

A mes chers parents

Aucun hommage ne peut véritablement rendre justice à l'amour inconditionnel qu'ils m'ont toujours offert. Je tiens à exprimer ici ma gratitude la plus profonde et toute ma tendresse pour leur soutien sans faille tout au long de mon parcours d'études, et leur présence réconfortante face aux épreuves de la vie.

Qu'Allah vous bénisse, vous prête une bonne santé et longue vie afin que je puisse à mon tour de vous combler.

A mes chers sœurs et frères

*Chères sœurs **Fatma, Sabah, Djahida**, je tiens à vous exprimer toute ma gratitude pour votre amour inconditionnel. Votre présence dans ma vie est un cadeau précieux. Merci d'être là pour moi, de m'écouter, de me comprendre et de me soutenir dans tous les aspects de ma vie.*

*Chers frères **Nassim, Karim, Djahid, Menad**, je tiens à vous exprimer mes sincères gratitude pour votre aimable présence et votre soutien continu. Vous êtes mes complices, mes confidents et mes protecteurs. Merci de partager tant de beaux moments avec moi, de m'inspirer et de me soutenir dans mes moments difficiles.*

*Chers **Abderrahmane, Islam & Manel**. Merci encore pour tout l'amour, la joie et le bonheur que vous apportez dans ma vie. Je suis bénie de vous avoir comme neveux et nièce.*

*À ma chère cousine **Dalila**, je tiens à te remercier du fond du cœur pour tout ce que tu as apporté pour moi que ce soit par tes mots encourageants, tes conseils avisés ou simplement par ta présence réconfortante.*

*A mes chères amies **Tinhinane, Hanane, thiziri, Aida, Sonia, Kenza, Lydia** pour leur soutien et encouragement.*

*A ma binôme **Wissam** et à toute l'équipe que je tiens à remercier chacun d'entre vous pour votre contribution précieuse, votre partage de connaissances et votre esprit d'équipe.*

À moi-même, je dis merci pour tout ce que j'ai accompli jusqu'à présent, et je me réjouis des possibilités futures qui se présentent à moi.

A tout ce qui a pris place dans mon cœur.

CHAHINEZ.

Dédicaces

Toutes les lettres ne sauraient trouver les mots qu'il faut, tous les mots ne sauraient exprimer la gratitude, l'amour, le respect et la reconnaissance, aussi c'est tout simplement que je dédie ce modeste travail à

L'Eternel Mon Dieu pour ce que je suis, car une vraie réussite n'est pas possible sans Lui.

A ma mère

Femme humble, généreuse honnête et travailleuse. Tu représentes encore pour moi l'exemple de la bonté, du respect de l'autre, de la femme modèle. Ce travail est le fruit de tes longues patiences, d'efforts et de sacrifices pour parfaire notre éducation. Tu n'as cessé de m'encourager toutes aux longues de mes études surtout en moments les plus pénibles. Ta tendresse ne peut s'évaluer. Tes bénédictions étaient toujours pour moi la lampe qui illuminait la voie devant et indiquait le chemin de l'honneur.

A mon père

Toute l'encre du monde ne pourrait suffire pour exprimer mes sentiments envers toi. Tu as toujours été mon école de patience, de confiance et surtout d'espoir et d'amour. Tu es et tu resteras pour moi ma référence, la lumière qui illumine mon chemin. Ce travail est le résultat de l'esprit de sacrifice dont tu as fait preuve. Que Dieu te bénisse, t'apporte une bonne santé et te garde pour nous.

A mon grand père

J'aurais bien voulu que vous soyez parmi nous en ce jour, mais héla le ciel a décidé autrement. Reposez en paix cher grand-père, que Dieu ait ton âme et l'accueille en son vaste paradis.

A mes sœurs et frère (Djalal, Mounia, Meriem)

Vous êtes mes alliés, mes confidents, l'épaule sur lequel m'appuyer, je souhaite seulement que Dieu nous accorde longue vie et une bonne santé pour que nous puissions cheminer ensemble sur la route du destin avec sincérité, respect mutuel, solidarité comme nous l'ont enseigné nous parents. Merci d'être ce que vous êtes pour moi. Je vous aime.

A toute ma famille, mes copines

Je vous remercie pour le courage, l'amour, le soutien qu'ils m'ont toujours accordé.

A ma binôme et mes compagnons pendant la période de la réalisation de ce travail : Chahinez, Fatima, Ahlem, Hamida, Katia, Karima, Safia, merci pour les bons moments qu'on a partagé ensemble.

Wissam.

Liste des figures

<i>N</i> °	Titres	Pages
1	Tête aspergillaire bisérié.	04
2	Symptômes de l'aspergillose sur l'ail.	05
3	Mécanismes d'action des PGPR	09
4	Présentation de l'Ail	16
5	Production d'Ail dans le monde durant les années 2009 - 2018	17
6	Superficies récoltées et production d'Ail en Algérie durant la période 2013 – 2018	17
7	Recherche de l'activité chitinasique	20
8	Recherche de l'activité protéasique	20
9	Recherche de l'activité cellulاسique	21
10	Recherche de l'activité amylasique	22
11	Recherche de l'activité éstéراسique et lipasique	22
12	Mise en évidence de l'effet antagoniste des souches bactériennes à l'égard d' <i>A. niger</i>	23
13	Recherche de la production d'ammoniac (NH ₃)	24
14	Production de cyanure d'hydrogéne (HCN)	25
15	Suspensions bactériennes et fongiques préparées.	26
16	Schéma explicatif de la répartition des différents traitements appliqués sur les gousses d'ail	27
17	Les différentes étapes suivies dans le test ex vivo sur l'ail	28
18	Schéma explicatif de la répartition des différents lots de test de biocontrôle d' <i>A. niger in vivo</i>	29
19	Les principales étapes suivies dans les tests <i>in vivo</i>	30
20	Les différentes étapes de mesures des paramètres de croissance de l'ail	31
21	Aspect des résultats positifs des activités enzymatiques testées	33
22	Résultats du test d'antagonisme à l'égard d' <i>A. niger</i>	36

23	Pourcentage d'inhibition de la croissance d' <i>A. niger</i> par les souches bactériennes.	37
24	Résultats de test de production d'ammoniac.	40
25	Aspect des résultats positive de production HCN	41
26	Résultats de biocontrôle d' <i>A. niger</i> sur les gousses d'ail par les souches	42
27	Résultat du test <i>in vivo</i> de contrôle d' <i>A.niger</i> sur l'ail.	44
28	Les longueurs des racines de l'ail dans le test de biocontrôle.	45
29	Les poids frais et sec des racines de l'ail dans le test de biocontrôle.	46
30	Quantités de chlorophylle a, b et totale de l'ail dans le test de biocontrôle.	47
31	Résultats du test de stimulation de la croissance de l'ail par les souches bactériennes.	49
32	Les longueurs des racines de l'ail inoculé avec les souches bactériennes.	50
33	Les poids frais et sec des racines de l'ail inoculé avec les souches bactériennes.	51
34	Quantités de chlorophylle a, b et totale de l'ail inoculés par les souches bactériennes.	52

Liste des tableaux

<i>N°</i>	Titres	Page
I	Taxonomie d' <i>Aspergillus niger</i>	05
II	Résultats des différents tests d'activités enzymatiques testés	32
III	Résultats des tests de production de métabolites antifongiques	39

Liste des abréviations

ACC désaminase : 1- aminocyclopropane-1-carboxylate
désaminase. **AIA** : Acide indole acétique.

DAPG : 2,4 -Diacétyl phluro glucinol.

FAO: Food and Agriculture Organization of the United Nations.

GN: Gélose Nutritive.

HCN: Cyanure d'hydrogène

ISR: Induced Systemic Resistance

NH₃ : Ammoniac

NPR: Nodule Promoting Rhizobacteria.

PCA : Plate Count Agar.

TSA : Tryptic Soy Agar

CMC : Carboxyméthylcellulose

PGI: Pourcentage Growth Inhibition

PGPR: Plant Growth-Promoting

Rhizobacteria. **PHPR**: Plant Health

Promoting Rhizobacteria. **PLT** :

Pyolutéorine

PRN : Pyrrolnitrine

PSB : Phosphate Solubilizing Bacteria.

ANOVA : Analysis of Variance.

DMSO : Diméthylsulfoxyde.

Remerciement	
Dédicace	
Liste des figures	
Liste des tableaux	
Liste des abréviations	

SOMMAIRE

<i>Introduction</i>	<i>1</i>
<u><i>Chapitre I: les champignons phytopathogènes</i></u>	
<i>1. Les microorganismes phytopathogènes</i>	<i>3</i>
<i>2. Les champignons phytopathogènes</i>	<i>3</i>
2.1. Généralités	3
2.2. Exemple de champignon phytopathogène	4
2.2.1. Aspergillus niger	4
a. Facteurs influençant leur développement	5
<u><i>chapitres II: le biocontrôle par les PGPR</i></u>	
<i>1. Les agents de biocontrôle</i>	<i>8</i>
<i>2. Les PGPR</i>	<i>8</i>
2.1. Généralités 8	
2.2. Mécanismes d'action	9
2.2.1. Biofertilisation	10
a. Fixation d'azote	10
b. Solubilisation du Phosphate	10
c. Production de sidérophores	11
2.2.2. Phytostimulation	12
a. Production des phytohormones	12
b. Aminocyclopropane-1-carboxylate (ACC) désaminase	13
2.2.3. Le biocontrôle	13
a. Compétition	13
b. Antibiose	14
c. Parasitisme	14
d. Résistance systémique induite	15

3. l'ail.....	15
3.1. Généralités sur l'ail.....	15
3.1.1. Définition étymologique de l'ail.....	15
3.1.2. Description de la plante.....	16
3.1.3. Production d'Ail	16

Matériel & Méthodes

1. Matériel biologique	19
1.1. Les souches microbiennes	19
• Les souches bactériennes.....	19
• Les souches fongiques.....	19
1.2. Matériel végétale.....	19
2. Méthodes	19
2.1. Recherche d'enzymes d'intérêt agricole	19
2.1.1. Détermination de l'activité chitinasique	20
2.1.2. Détermination de l'activité protéasique.....	20
2.1.3. Détermination de l'activité cellulasique.....	21
2.1.4. Détermination de l'activité amylasique.....	21
2.1.5. Détermination de l'activité estérasique et lipasique	22
2.2. Mise en évidence de l'activité antifongique	22
2.3. Recherche de métabolites à activité antifongique.....	24
2.3.1. Production d'ammoniac (NH ₃)	24
2.3.2. Production de Cyanure d'hydrogène (HCN)	24
2.4. Effet de l'inoculation bactérienne sur la croissance de l'ail et le biocontrôle de développement d' <i>Aspergillus niger</i>	25
2.4.3. Test <i>in vivo</i> de stimulation de la croissance d'ail par les souches bactériennes	29
2.5. Analyses statistiques	31

Résultats & Discussion

1. Recherche d'enzymes d'intérêt agricole	32
1.1. Production d'enzyme.....	32
1.1.1. Activité chitinasique	33
1.1.2. Activité protéasique	34
1.1.3. Activité cellulasique	34
1.1.4. Activité amylasique.....	35
1.1.5. Activité estérasique et lipasique	35
1.2. Mise en évidence de l'activité antifongique	36
1.3. Recherche de métabolites à activités antifongique	39

1.3.1. Production de NH₃.....	40
1.3.2. Production de l'HCN.....	40
2. Effet de l'inoculation bactérienne sur la croissance de l'ail et le biocontrôle du développement d'<i>Aspergillus niger</i>.....	42
2.3. Test <i>in vivo</i> de stimulation de la croissance d'ail par les souches bactériennes	49
conclusion.	55
Références bibliographiques	57

Annexes

Introduction

Introduction

Ces dernières années, la sécurité alimentaire est devenue une préoccupation majeure en raison de l'augmentation continue de la population. Dans ce contexte, il est essentiel de relever le défi de satisfaire les besoins alimentaires de milliards de personnes tout en préservant l'équilibre environnemental.

Chaque année, des pertes considérables se produisent à différentes étapes des récoltes. Les maladies cryptogamiques sont à l'origine des pertes les plus graves. En effet, plus de 10 000 espèces de champignons sont connues pour causer des maladies chez les plantes. Ces agents pathogènes peuvent provoquer une variété de symptômes, dont les pertes sont plus au moins considérables (Foughalia, 2021).

Diverses stratégies ont été mises en œuvre pour réduire l'incidence des maladies phytopathogènes, notamment l'utilisation de pesticides et de cultivars moins sensibles ainsi que la rotation des cultures et d'autres mesures de contrôle. Cependant, l'efficacité de ces stratégies est souvent limitée en raison de la survie et de la résistance des agents pathogènes.

En outre, l'utilisation excessive de pesticides de synthèse entraîne des conséquences néfastes sur l'environnement et les organismes vivants. Ces pesticides perturbent également le fonctionnement des écosystèmes et stimulent les systèmes de résistance des agents pathogènes (Miljaković et al., 2020).

La communauté scientifique s'oriente désormais vers la recherche et l'utilisation de nouvelles méthodes de lutte moins nocives pour l'homme et l'environnement. La lutte biologique contre les champignons phytopathogènes est un moyen naturel de lutte qui utilise des micro-organismes antagonistes isolés du milieu naturel pour concurrencer les micro-organismes pathogènes (Grzegorzcyk et al., 2017).

L'utilisation des rhizobactéries dans la lutte contre les agents phytopathogènes et dans la stimulation de la croissance des plantes, présente un grand intérêt scientifique et agronomique.

Notre travail s'inscrit dans le cadre de la recherche des rhizobactéries ayant un potentiel antagoniste *in vitro* et *in vivo* à l'égard d'*A. niger* et avec des critères PGPR.

- Recherche d'enzymes d'intérêt agricole.
- Sélection des isolats bactériens antagonistes *in vitro*, et leur capacité à produire des molécules antifongiques.
- Test *in vivo* :
 - ❖ L'effet antagoniste des isolats sélectionnés à l'égard d'*Aspergillus niger* sur la plante d'ail.
 - ❖ L'effet stimulateur des isolats sur la croissance d'ail.
- Test de l'effet antagoniste des isolats sélectionnés à l'égard d'*Aspergillus niger* sur les gousses d'ail.

Ce document comprend deux chapitres consacrés à la synthèse bibliographique relative au sujet, une partie expérimentale qui porte sur la présentation du matériel et l'ensemble des tests effectués *in vitro* et *in vivo*, et une partie comportant les résultats obtenus et leurs discussions.

Enfin, on termine par une conclusion globale sur la problématique traitée.

Chapitre I

Les

champignons

phytopathogènes

1. Les microorganismes phytopathogènes

Les microorganismes phytopathogènes, notamment les champignons, les bactéries et les virus, causent des pertes considérables aux cultures agricoles (Thambugala et *al.*, 2020). Ces microorganismes sont caractérisés par leur capacité à s'adapter et de résister aux différentes conditions (Ravigné, 2015). Sur la plante, ils profitent de la moindre opportunité pour pénétrer de façon passive et ils prennent avantage des blessures et des stomates ouverts pour atteindre l'intérieur des feuilles afin de se propager dans tout le végétal (Jost et Jost – Tse, 2016).

Les microorganismes phytopathogènes peuvent être classés en trois catégories en fonction de leur mode de vie sur les plantes: biotrophes, hémibiotrophes et nécrotrophes. Les biotrophes se nourrissent de cellules vivantes et maintiennent activement la viabilité des cellules hôtes contrairement aux nécrotrophes qui tuent les cellules hôtes avant de se nourrir des tissus morts. Les hémibiotrophes qui sont une classe intermédiaire, adopte une phase de biotrophie précoce suivie d'une phase de nécrotrophie. Le mode de vie de l'agent pathogène est largement déterminé par les effecteurs, qui sont des protéines et des métabolites secondaires élaborés par l'agent pathogène qui interagissent directement avec l'hôte et augmentent la virulence (Dou et Zhou, 2012).

2. Les champignons phytopathogènes

2.1. Généralités

Les champignons constituent le plus grand groupe des agents phytopathogènes (Foughalia, 2021). Ils sont à l'origine d'importantes pertes économiques, causant près de 85 % des maladies touchant les plantes (Aumer, 2020).

Les champignons phytopathogènes sont des microorganismes caractérisés par un mycélium, formé de filaments nommés hyphes, chez les moins évolués, les hyphes ne sont pas cloisonnés. Ce sont des organismes hétérotrophes, qui se reproduisent essentiellement par sporulation (spores uni- ou pluri-cellulaires). On distingue, selon leur origine, les spores sexuées et les spores asexuées. La forme sexuée ou téléomorphe,

a pour fonction de maintenir l'espèce, alors que la forme asexuée, dite aussi forme imparfaite ou anamorphe, assure la propagation (Corbaz, 1990).

Le cycle d'infection de ces champignons phytopathogènes comprend toujours un certain nombre d'étapes (inoculation, adhérence, germination, pénétration et invasion), durant ce cycle les champignons produisent plusieurs composés essentiels pour compléter le cycle d'infection (enzymes, toxines, etc.) ces composés sont appelés les facteurs de pathogénicité (Fernández-Acero, 2007).

2.2. Exemple de champignon phytopathogène

2.2.1. *Aspergillus niger*

a. Caractéristiques et classification

Les champignons classés dans la section *Aspergillus nigri* (les *Aspergillus* noirs) sont ubiquitaires, saprophytes et omniprésents grâce à leurs capacités d'adaptation et à la production abondante de conidiospores, qui sont distribuées par voie aérienne avec une fréquence plus élevée dans les endroits tropicaux et subtropicaux (Lahouar, 2016 ; Schuster *et al.*, 2002).

Ces champignons sont caractérisés morphologiquement par la présence de filaments conidiophores renflés à leur sommet par une vésicule partiellement couverte de phialides fixées à des métules, le tout forme une entité spécifique appelée « tête aspergillaire » (figure 1) (Thierry, 2011). La classification de *A. niger* est présentée dans le tableau I.

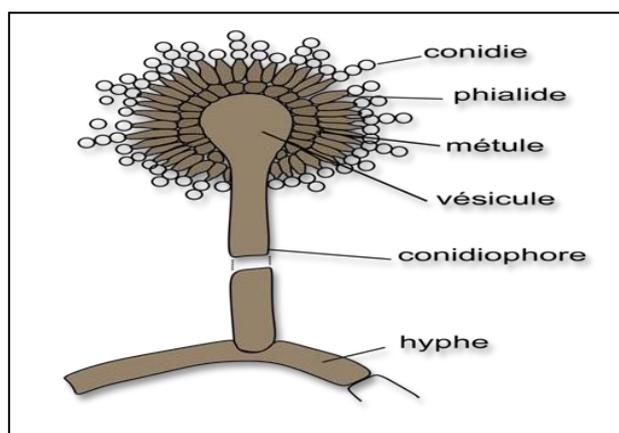


Figure 01 : Tête aspergillaire bisériée (Thierry, 2011).

La figure ci-dessus représente les symptômes de l'aspergillose sur l'ail



Figure 02 : Symptômes de l'aspergillose sur l'ail (Anonyme 2)

Tableau I : Taxonomie de *Aspergillus niger* (Schuster et *al.*, 2002 ; El-Khoury, 2007 ; Benlamoudi, 2021 ; Laib, 2021 ; Pitt et *al.*, 2022).

Reproduction	asexuée	Sexuée
Règne	Fungi	Fungi
Sous - embranchement	Deuteromycotina	Ascomycotina
phylum	Amastigomycota	Ascomycota
Classe	Deutoromycètes	Euascomycetes (Eurotiomycetes)
Ordre	Moniliales	Eurotiales
Famille	Moniliaceae	Trichomaceae
Genre	<i>Aspergillus</i>	<i>Aspergillus</i>
Espèce	<i>Aspergillus niger</i>	<i>Aspergillus niger</i>

a. Facteurs influençant leur développement

Comme tout microorganisme, la croissance fongique dépend de plusieurs facteurs qui peuvent être intrinsèques (liés au microorganisme) ou extrinsèques (propriétés physiques, chimiques ou biologiques de l'écosystème) (Lahouar , 2016).

L'humidité et la teneur en eau sont deux facteurs extrinsèques influençant le développement des champignons. Ils jouent un rôle primordial dans la croissance des moisissures, en particulier sur la germination des spores et la croissance de mycélium (Ben Miri, 2019). L'activité de l'eau et l'humidité relative favorable à la croissance d'*Aspergillus niger* sont respectivement 0,97 et 96-98 % (Lima, 2019).

En plus de ces 2 facteurs la température a un rôle capital sur la croissance, la physiologie et le développement des moisissures et sur la compétition entre les espèces.

Généralement les températures moyennes et élevées conviennent à la croissance des champignons, la croissance d'*A. niger* est plus favorable dans les climats tempérés à des températures entre 6 et 47°C avec une température optimale de 35-37°C (Lahouar , 2016). Cependant, il est important de noter que les conditions de croissance optimales peuvent varier légèrement en fonction de la souche spécifique d'*A. niger* et d'autres facteurs environnementaux tels que l'humidité et la disponibilité des nutriments.

D'après José et al. (1999), les contaminations fongiques avant la récolte sont particulièrement possibles dans le cas d'assèchement et de réchauffement du sol.

Certains facteurs comme la composition gazeuse et le pH, la lumière agissent également sur le développement d'*A. niger*. Ce dernier est acidophile, aérobic, résistant à des pH allant de 1,4 à 9,8 avec un optimum de 6. Les spores fournissent une protection contre la lumière du soleil et l'irradiation UV (Lima ; 2019 ; Anonyme 1).

Les insectes jouent un rôle majeur en tant que vecteurs de dispersion des spores de moisissures dans les champs et les lieux de stockage. En endommageant les parois des grains, les insectes favorisent la contamination par les moisissures et la production de mycotoxines. De plus, la compétition pour les nutriments et l'espace est un phénomène courant dans le règne vivant. Lorsque plusieurs espèces de microorganismes coexistent dans le même environnement, cela entraîne des interactions entre ces différentes espèces. Les conditions environnementales peuvent favoriser certaines espèces et défavoriser les autres (Lahouar, 2016 ; Tabuc, 2007).

L'état de la plante est un autre facteur pouvant avoir une influence sur le développement d'*A. niger*. Lorsque les conditions sont favorables à la croissance des plantes, les infections fongiques par *A. niger* ont tendance à ne pas aboutir à une colonisation complète. En revanche, les plantes soumises à un stress de manière générale sont plus sensibles aux attaques des ravageurs, y compris aux infections fongiques par *A. niger* (Martin, José et al, 1999).

Enfin, certaines pratiques agricoles telles que le labourage, la rotation des cultures, l'utilisation de traitements antifongiques, la méthode de récolte et les conditions d'entreposage peuvent réduire la production de mycotoxines dans le champ, au moment de la récolte et pendant la période d'entreposage (Ben Miri, 2019).

b. Le pouvoir pathogène

Aspergillus niger est responsable de plusieurs maladies de pourriture chez les plantes (Ruchi, 2012), notamment la maladie de la "moisissure noire". Il est également un contaminant fréquent des aliments stockés, entraînant la pourriture post-récolte des fruits frais, des céréales et des cultures à travers le monde (Lima, 2019). Le pouvoir pathogène d'*A. niger* est lié à plusieurs facteurs, ce champignon peut produire plusieurs toxines notamment l'acide oxalique, des malformines, et certaines souches, des aflatoxines (Tabuc, 2007). De plus, il est capable de décomposer différentes substances organiques grâce à la production d'une variété d'enzymes (Sharma, 2012).

Aspergillus niger a été identifié comme un agent infectieux opportuniste chez les êtres humains. L'inhalation d'une quantité suffisante de ce champignon peut entraîner des problèmes pulmonaires graves, tels que l'aspergillose, chez l'homme (Sharma, 2012)

CHAPITRE II

Le biocontrôle

Par

Les PGPR

1. Les agents de biocontrôle

En raison des inconvénients associés à l'utilisation des produits chimiques, tels que les pesticides, qui sont largement utilisés pour contrôler les maladies des plantes dans les pratiques agricoles, ceux-ci représentent désormais une menace pour la santé de l'environnement et la santé publique (Niranjan et al., 2005 ; Bensidhoum, 2016). Ainsi, l'utilisation d'agents de biocontrôle comme alternative est considérée comme l'une des solutions les plus prometteuses en raison de leurs avantages significatifs pour le développement agricole durable et la préservation de l'environnement (Meng, 2022).

Les agents de lutte biologiques sont des organismes bénéfiques qui comprennent des parasitoïdes, des prédateurs, des microorganismes (virus, bactéries, champignons), et des compétiteurs qui occupent la niche écologique plus vite que l'espèce nuisible (Badaoui, 2017 ; Foughalia, 2021). En plus de ces organismes vivants, certains produits inorganiques tels que les sels de phosphate et de silicium, ainsi que des dérivés de plantes, peuvent également être utilisés comme moyens de lutte biologique (Foughalia, 2021). Ces agents biologiques utilisés pour contrôler les ravageurs dans une approche respectueuse de l'environnement (Meng, 2022).

2. Les PGPR

2.1. Généralités

Les PGPR ou « Plant Growth-Promoting Rhizobacteria » sont des bactéries qui se développent dans la rhizosphère, et qui ont la capacité de coloniser de manière compétitive les racines des plantes et de stimuler leur croissance et/ou réduire l'incidence des maladies phytopathogènes (Haas et Défago, 2005 ; Benmati, 2014). Le terme PGPR a été utilisé pour la première fois par Kloepper et Schroth en 1978 pour désigner les souches de *Pseudomonas fluorescens* (Bestami et al., 2020).

Selon leur positionnement par rapport aux racines, les PGPR peuvent être classés en deux catégories :

- Les PGPR extracellulaires : Cette catégorie comprend les bactéries présentes dans le rhizoplan ou la rhizosphère et qui ont une action directe sur la santé des plantes. Ces rhizobactéries sont regroupées sous le nom des PHPR : Plant Health Promoting Rhizobacteria et comprennent plusieurs genres tels que :

Arthrobacter, Azospirillum, Bacillus, Burkholderia et *Pseudomonas*.

- PGPR intracellulaires : Ces bactéries résident à l'intérieur des nodules de cellules végétales (échange direct de métabolites). Elles sont connues sous le nom de rhizobactéries favorisant la nodulation (NPR : Nodule Promoting Rhizobacteria), et comprennent les espèces du genre *Frankia* et les endophytes, qui incluent des bactéries rhizosphériques appartenant à la famille des Rhizobiaceae (Mustafa et al., 2019 ; Taiwo et al., 2019).

Les rhizobactéries bénéfiques tirent leur efficacité de leur position stratégique à l'interface sol-racine. Le rhizoplan et la rhizosphère, où se produisent des interactions intenses entre la plante et son environnement, jouent un rôle clé dans ces échanges mutuels (Lemanceau, 1992).

2.2. Mécanismes d'action

Les PGPR peuvent avoir des effets positifs sur les plantes de manière directe ou indirecte (Benmati, 2014). L'effet direct se manifeste par l'amélioration de l'acquisition des nutriments par la plante, tels que la fixation de l'azote, la solubilisation du phosphate et l'apport en fer, ainsi que par la stimulation de la croissance via la régulation des niveaux de phytohormones. D'autre part, l'effet indirect englobe la lutte contre des phytopathogènes et l'induction d'une résistance systémique chez les plantes contre un large éventail de microbes pathogènes (Basu et al., 2021; Rawool et al., 2020), (Figure 4) (Mustafa et al., 2019).

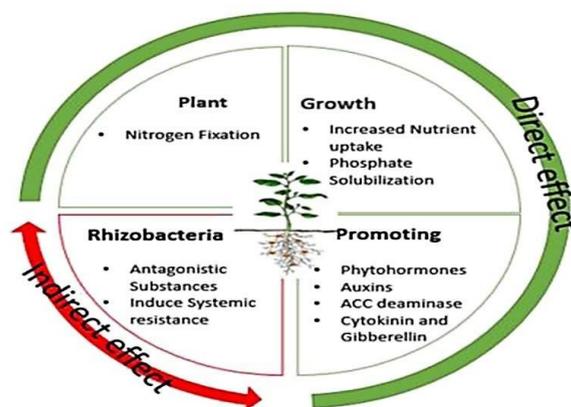


Figure 03 : Mécanismes d'action des PGPR (Mustafa et al., 2019)

Sur la base de leurs activités, les PGPR peuvent être classés comme bio-fertilisateurs, phyto-stimulateurs et agent de biocontrôle.

2.2.1. Biofertilisation

Les bio-fertilisants contribuent à la nutrition des plantes en facilitant l'absorption des nutriments et en améliorant la disponibilité des minéraux par des mécanismes directs (Chouchary et al., 2019)

a. Fixation d'azote

La fixation de l'azote par les PGPR est considérée comme l'un des principaux mécanismes par lequel les plantes bénéficient de l'association microbienne (Cherif, 2014). Ce mécanisme joue un rôle potentiel dans l'amélioration de la fertilité et la productivité des sols à faible teneur en azote en enrichissant les plantes avec des macronutriments importants pour la synthèse de protéines, d'acides aminés, d'alcaloïdes, de vitamines, etc. (Lopez et al., 2022 ; Sindhu et al., 2022).

L'azote est présent dans le sol sous forme inerte ou organique non assimilable par la plante (Wani et al., 2019; Sindhu et al., 2022). L'azote atmosphérique est converti en forme assimilable grâce à des rhizobactéries fixatrices d'azote qui transforment l'azote en ammoniac à l'aide d'un système enzymatique complexe connu sous le nom de nitrogénase (Arif, 2015).

Les rhizobiums, y compris les *Allorhizobium*, *Azorhizobium*, *Bradyrhizobium*, *Mesorhizobium*, *Rhizobium* et *Sinorhizobium*, sont parmi les PGPR les plus étudiés et exploités. Cela est dû à leur capacité à fixer l'azote atmosphérique dans les légumineuses hôtes et à améliorer le développement ainsi que le rendement des plantes lorsqu'ils sont utilisés comme inoculants agricoles (Vessey, 2003 ; González-López et al., 2005).

b. Solubilisation du Phosphate

Le phosphore (P) joue un rôle essentiel dans pratiquement tous les processus métaboliques des plantes, y compris la photosynthèse, le transfert d'énergie, la transduction du signal, la biosynthèse macromoléculaire et la respiration (Gupta et al., 2015). Des études ont démontré que le phosphore est essentiel pour la croissance et la formation précoce des racines, ce qui entraîne une amélioration de la qualité des fruits, des légumes et des céréales (Sindhu et al., 2022). Cependant, entre 95 et 99 % du

phosphore est immobilisé ou précipité, rendant difficile son absorption par les plantes, car il ne peut être utilisé qu'en tant que forme monobasique (HPO_4) ou dibasique (HPO_4^{2-}) (Seymen et al., 2019).

La capacité de certaines bactéries rhizosphériques, appelées PSB (Phosphate Solubilizing Bacteria), à convertir le phosphore insoluble en une forme accessible est une caractéristique importante des PGPR (Cherif, 2014).

Les PSB (Phosphate Solubilizing Bacteria) produisent des acides organiques de faible poids moléculaire, tels que l'acide gluconique et citrique, qui réduisent le pH du sol. Cela entraîne la chélation des cations fixés aux phosphates insolubles, les transformant ainsi en formes solubles ($\text{H}_2\text{PO}_4^{2-}$). En outre, les PSB sont capables de libérer le phosphore présent sous forme organique en catalysant l'hydrolyse des esters phosphoriques à l'aide d'enzymes extracellulaires telles que les phosphatases et les phytases. Ce processus conduit à la minéralisation du phosphore organique, le rendant davantage disponible pour les plantes (Arif, 2015 ; Rawool et al., 2020).

Parmi les PSB qui mobilisent le phosphore insoluble par solubilisation et minéralisation, on trouve notamment *Pseudomonas* spp., *Agrobacterium* spp. et *Bacillus circulans* (Alori et al., 2017).

c. Production de sidérophores

Le fer est un micronutriment essentiel à la survie de presque tous les organismes (Adedeji et al., 2020). Malgré sa présence abondante dans les sols aérobie en tant que quatrième élément le plus abondant sur terre, le fer n'est pas facilement assimilable par les bactéries ou les plantes. En effet, la forme prédominante du fer dans la nature est l'ion ferrique ou Fe^{+3} , qui a une faible solubilité. Par conséquent, la quantité de fer disponible pour être assimilée par les organismes vivants est extrêmement faible (Gupta et al., 2015).

Pour l'acquérir, les micro-organismes ont développé des mécanismes spécialisés pour l'assimilation du fer, y compris la production de composés chélateurs du fer de faible poids moléculaire appelés sidérophores. Ces molécules se lient au fer ferrique (Fe^{+3}) avec une très forte affinité et le transportent vers la cellule microbienne.

Le complexe sidérophores-Fe interagit avec des récepteurs spéciaux à la surface des cellules bactériennes, il est internalisé puis assimilé soit par réduction de fer ferrique en fer ferreux ou le clivage de la fraction sidérophores.

2.2.2. Phytostimulation

L'un des mécanismes directs utilisés par les PGPR pour améliorer la croissance des plantes est la production de régulateur de croissance des plantes ou les phytohormones (Kumar et al., 2015). Ces derniers sont des substances organiques présentes à des concentrations extrêmement faibles, elles régulent les différents processus biochimiques, morphologiques et physiologiques des plantes (Amara et al., 2015).

a. Production des phytohormones

Les phytohormones communément reconnues sont les auxines, les gibbérellines, les cytokinines, l'acide abscisique et l'éthylène (Bensidhoum et al., 2019).

L'acide indole acétique (AIA) est une auxine naturelle qui joue un rôle clé dans la régulation de divers aspects de la croissance et du développement des plantes. Parmi ces aspects figurent la division cellulaire, la germination des graines, la différenciation des tissus, l'expansion des feuilles, l'élongation des racines (Bensidhoum et al., 2019).

Les cytokinines et les gibbérellines sont une autre classe de phytohormones impliquées dans la morphologie des plantes et dans la promotion de la croissance de la partie aérienne (Van Loon, 2007).

L'acide abscisique est considéré comme une hormone de stress, il est impliqué dans la régulation de la germination des graines. Il agit comme un signal cellulaire et module divers gènes en réponse à la carence en eau et au stress salin (Bensidhoum et Nabti, 2019 ; Yasminet al., 2019).

L'éthylène est une phytohormone qui agit en tant que régulateur de la croissance des plantes. Elle est connue pour son rôle dans divers processus tels que le développement, la sénescence des plantes et la maturation des fruits. L'éthylène stimule la formation de racines adventives et de poils absorbants, favorise la germination des graines, et joue un rôle dans la défense systémique des plantes contre les phytopathogènes (Benmati, 2014).

b. Aminocyclopropane-1-carboxylate (ACC) désaminase

L'éthylène a été considéré comme l'une des hormones végétales les plus importantes sécrétées dans des conditions de stress (Kumar et al., 2022). Néanmoins un excès d'éthylène peut provoquer une défoliation, un flétrissement et des événements mortel et inhibela croissance racinaire chez les plantes (Arif, 2015 ; Pérez-Álvarez et al., 2022).

L'ACC désaminase (1- aminocyclopropane-1-carboxylate désaminase) est une enzyme capable d'hydrolyser l'ACC (précurseur de l'éthylène) en α -cétobutyrate et en ammonium. L'activité élevée de l'ACC désaminase dans les PGPR contribue à améliorer la croissance des plantes. En effet, cette enzyme permet de réduire les niveaux élevés d'éthylène qui peuvent être produits dans des conditions de stress. L'hydrolyse de l'ACC par l'ACC désaminase permet de diminuer les effets négatifs de l'éthylène sur la croissance et le développement des plantes, favorisant ainsi leur adaptation aux conditions stressantes (Cherif,2014 ; Morles – Garcíaet al., 2019 ; Pérez-Álvarez et al., 2022).

2.2.3. Le biocontrôle

Les PGPR peuvent agir de différentes manières pour contrôler les maladies des plantes. Ils peuvent compétitionner avec les pathogènes pour les ressources disponibles et pour l'espace, produire des substances antimicrobiennes et renforcer le système immunitaire des plantes.

a. Compétition

La compétition pour l'espace, les nutriments ou d'autres facteurs environnementaux qui limitent la croissance microbienne est un mécanisme biologique utilisé par les PGPR afin de limiter la croissance des phytopathogènes (Bestami et al., 2020).

D'un point de vue microbien, les sols entourant les racines des plantes sont des environnements où les nutriments sont limités, ce qui entraîne la compétition entre les microorganismes (M'henni, 2020).

Pour être un compétiteur efficace, un agent antagoniste doit être un colonisateur intense apte à s'adapter et se développer rapidement dans des conditions hostiles et être capable d'exploiter immédiatement et efficacement les nutriments présents à faible concentration dans le sol ou d'arrêter leur absorption par d'autres microorganismes afin d'empêcher leur développement (Bestami et al., 2020 ; Foughalia, 2021).

Un cas particulier de compétition pour les nutriments concerne la compétition pour le fer par un mécanisme spécifique basé sur la production de sidérophores décrit précédemment. Pour assurer leur survie, les microorganismes sécrètent ces molécules afin de priver les agents phytopathogènes d'un facteur essentiel à leur croissance (Bensidhoum et Nabti, 2020 ; Cherif, 2014 ; (Jijakli, 2003).

b. Antibiose

L'antibiose est le mécanisme d'action le plus largement étudié chez les agents de lutte biologique. Ce mécanisme implique la sécrétion par les souches antagonistes de substances antibiotiques et/ou antifongiques qui inhibent la croissance des microorganismes phytopathogènes (Jijakli, 2003). Ces substances produites par les agents de lutte biologique ont la capacité de perturber le métabolisme, la reproduction ou d'autres processus vitaux des agents pathogènes (Foughalia, 2021), limitant ainsi leur capacité à se développer et à causer des dommages aux cultures. L'antibiose est considérée comme un mécanisme efficace pour réduire l'incidence des maladies des plantes et promouvoir une protection biologique durable.

Les produits métaboliques sont de différentes natures ; des enzymes lytiques, des peptides ou protéines antimicrobiens, des composés phénoliques, etc. (Fernando et al., 2005).

c. Parasitisme

Le parasitisme est un mode d'action qui repose également sur la production des enzymes pour dégrader la paroi du pathogène parmi ces enzymes on trouve les protéases, laminariales, glucanases et chitinases, ces derniers doivent être capables de dégrader les polymères de glucose qui sont les constituants de base de la paroi des champignons.

En fait, l'inhibition de la croissance et de la sporulation des champignons pathogènes par les agents peut être due en grande partie à l'activité des enzymes lytiques, notamment les β -1,3-glucanases et les enzymes chitinolytiques car la chitine et les β -glucanes font partie des composants majeurs de la paroi cellulaire de plusieurs champignons (Bouaoud, 2017 ; Foughalia, 2021).

Les souches de *B. subtilis* produisent des enzymes hydrolytiques (β -1,3-glucanase) qui peuvent dégrader les parois cellulaires fongiques (Cherif, 2014).

d. Résistance systémique induite

Les mécanismes de défense jouent un rôle essentiel dans la gestion des maladies des plantes en activant diverses réactions qui renforcent l'immunité et favorisent la croissance des plantes (Fatima et al., 2022).

Certaines souches de PGPR peuvent protéger les plantes de manière indirecte par un mécanisme connu sous le nom d'induction de la résistance systémique (ISR). C'est un processus par lequel les PGPR activent les mécanismes de défense naturels de la plante, ce qui rend l'hôte beaucoup plus résistant aux attaques futures des agents pathogènes tels que les virus, les nématodes, les champignons et les bactéries pathogènes. (Benmati, 2014 ; Mustafa et al., 2019).

L'ISR est principalement régie par les voies de signalisation de l'éthylène (ET) et de l'acide jasmonique (JA) (Fatima et al., 2022). De plus, le lipopolysaccharide de la membrane externe, la chitine, les flagelles, le lipopeptide cyclique, la pyoverdine, les β -glucanes agissent également comme agents déclencheurs de l'ISR (Mustafa et al., 2019).

3. l'ail

3.1. Généralités sur l'ail

3.1.1. Définition étymologique de l'ail

Allium sativum désigne le nom de l'ail cultivé en latin. Il peut se retrouver sous le nom d'ail commun, d'ail blanc, d'ail cultivé, ou encore l'ail de printemps. En anglais, l'ail se traduit sous le nom de garlic (Ghesquiere, 2016).

3.1.2. Description de la plante

Une herbe dressée, robuste et pérenne à bulbe de 60 cm de hauteur, avec un bulbe central, couvert d'écaillés à l'aisselle. Le bulbe se compose d'un certain nombre de caïeux ou de gousses enfermées dans une peau semblable à du papier. Les feuilles sont longues, plates et lisses avec une lame de feuille à forme cylindrique, creuse, linéaire, plate et solide à sommet aigu (apex acuminé) ; une inflorescence sphérique avec des fleurs colorées blanches ou rose-violacées sur des pédoncules grêles (Gambogou et *al.*,2019).

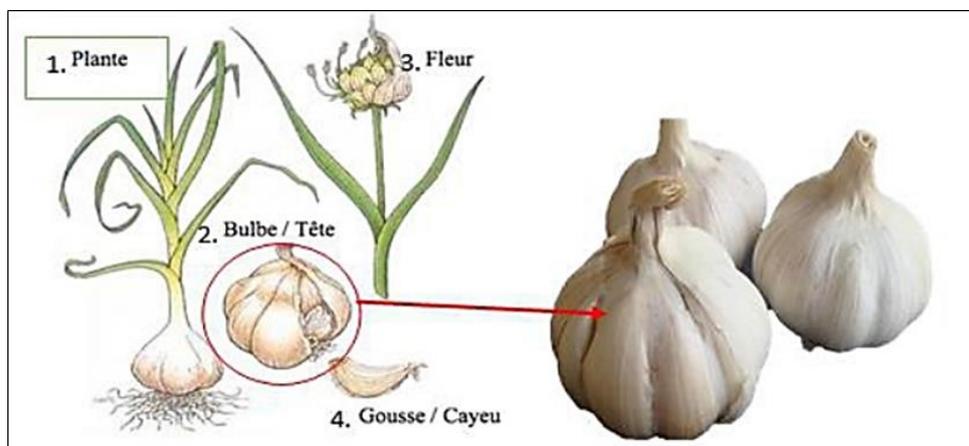


Figure 04 : Présentation de l'Ail (Gambogou et *al.*,2019)

3.1.3. Production d'Ail

a. Au niveau mondial

Selon les statistiques les plus récentes de l'Organisation des Nations Unies pour l'Alimentation et l'Agriculture (FAO), la production mondiale d'Ail découle directement de la production chinoise avec plus de 22 millions de tonnes en 2018, ce qui est l'équivalent de 78% de la production mondiale de l'ail durant l'année 2009 jusqu'à 2018 est présentée dans la figure (05).

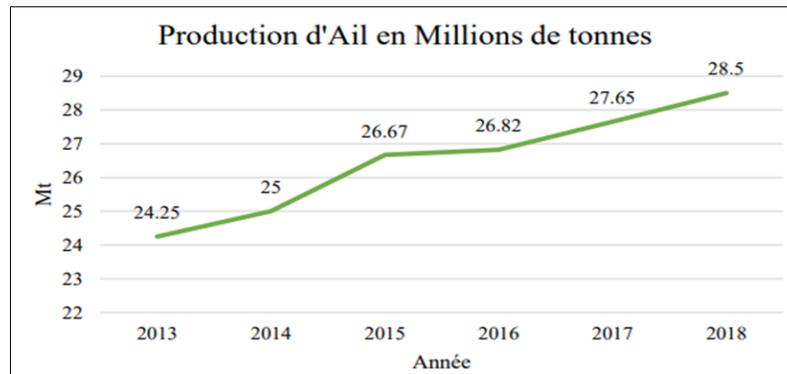


Figure 05 : Production d'Ail dans le monde durant les années 2009 - 2018 (FAO, 2018).

b. Au niveau National

La production nationale de l'Ail a connu au cours de ces dernières années, une nette augmentation des superficies plantées. Elle est de 12 945 ha pour une production de 202 201 tonnes durant les années 2017/2018, valeur très importante par rapport au prévision mise auparavant pour cette année (128 753 tonnes). L'Algérie a accompli plus de 27% de la production africaine en Ail pour la même année (2018) (FAO, 2018), dans des zones situées à Mila, Médéa, Skikda, Boumerdès, Batna et El Oued.

Il est à noter que la Wilaya de Mila vient en tête de liste dans la production de l'Ail et participent avec 27 à 30 % de la production nationale (ITCMI, 2018).

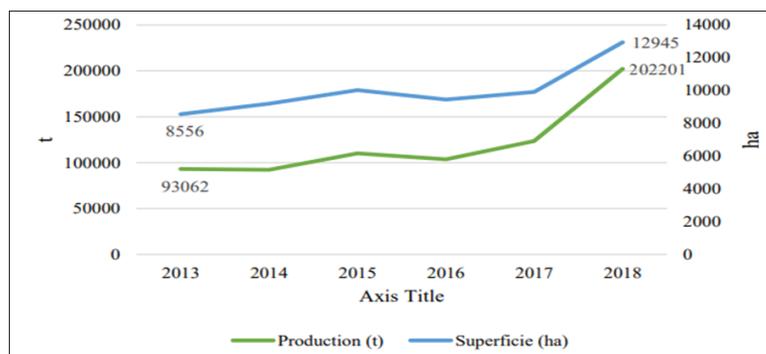


Figure 06 : Superficies récoltées et production d'Ail en Algérie durant la période 2013 – 2018 (FAO, 2018).

Matériels

&

Méthodes

La partie expérimentale a été effectuée au sein du Laboratoire de Maitrise des Energies Renouvelables LMER (équipe biomasse et environnement) et du Laboratoire de Mycologie, durant une période de trois mois (Mars-Mai 2023).

L'objectif principal de cette étude est de vérifier la capacité de cinq rhizobactéries à stimuler la croissance de l'ail et à contrôler le développement d'*A. niger* *ex vivo* et *in vivo*.

1. Matériel biologique

1.1. Les souches microbiennes

Les souches microbiennes utilisées dans ce travail sont une collection provenant du Laboratoire LMER.

- **Les souches bactériennes**

Les souches bactériennes utilisées sont :

- ✓ **PI** : *Pseudomonas* sp. I
- ✓ **PN** : *Pseudomonas* sp. Na
- ✓ **PB** : *Pseudomonas* sp. B6
- ✓ **BT** : *Bacillus thuringiensis*
- ✓ **CM** : *Cellulosimicrobium* sp.

- **Les souches fongiques**

L'agent phytopathogène utilisé dans ce présent travail est *Aspergillus niger*

1.2. Matériel végétale

Les tests *ex vivo* et *in vivo* ont été effectués sur une variété d'ail rose (*Allium sativum*), originaire de la commune Telegma, wilaya de Mila.

2. Méthodes

2.1. Recherche d'enzymes d'intérêt agricole

La recherche des enzymes est effectuée par ensemencement en spots de 10 µl de la suspension bactérienne de chaque isolat (âge de 24h) sur différents milieux de culture contenant des substrats spécifiques pour chaque enzyme.

2.1.1. Détermination de l'activité chitinasique

L'activité chitinasique est recherchée sur un milieu des cultures en g/l : chitine colloïdale (0,6-0,8), K_2HPO_4 (2,7), KH_2PO_4 (0,3), $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ (0,7), NaCl (0,5), KCl (0,5), Extrait de levure (0,13), agar (15). Après 7J d'incubation à 30°C, la production de chitinase se traduit par l'apparition de zones claires autour des colonies (Kopečný et al., 1996).

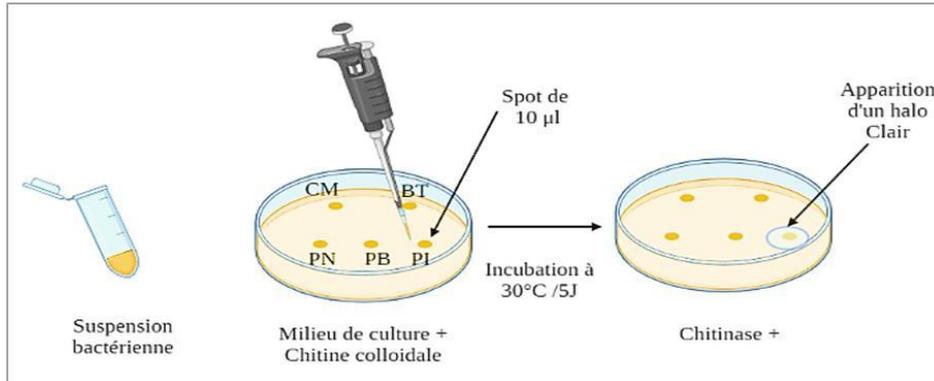


Figure 07 : Recherche de l'activité chitinasique

2.1.2. Détermination de l'activité protéasique

Cette activité est recherchée selon la méthode proposée par kavitha et al. (2013). Le milieu contient en g/l : caséine pancréatique (5) ; Extrait de levures (2,5) ; Glucose (1), Agar (15). Après autoclavage du milieu, 100 ml d'une solution de lait écrémé à 10% est ajoutée au milieu. Ce dernier est ensuite ensemencé puis incubé à 30°C pendant 48 heures. Les bactéries ayant une activité protéasique présentent un halo clair autour des spots.

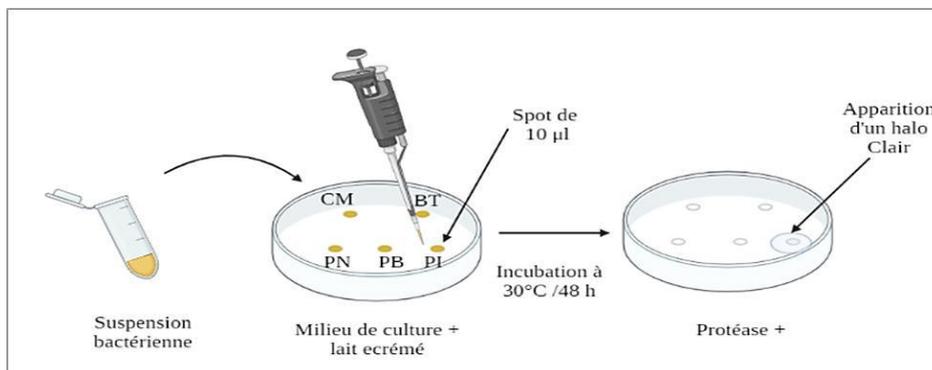


Figure 08 : Recherche de l'activité protéasique

2.1.3. Détermination de l'activité cellulasique

L'activité cellulasique est effectuée sur un milieu contenant en g /l : Na_2HPO_4 (6), KH_2PO_4 (3), NaCl (0,5), NH_4Cl (1), Extrait de levure (3), CMC (5), Agar (15). Après l'incubation des boîtes ensemencées à 30°C pendant 7 jours, une solution de rouge de Congo (1%) est ajoutée à la surface des colonies et laissée agir pendant 20 minutes, par la suite une

solution de NaCl de 1M est ajoutée et laissée une nuit. L'activité cellulasique se manifeste par l'apparition d'une zone orange autour des colonies (Carder, 1986).

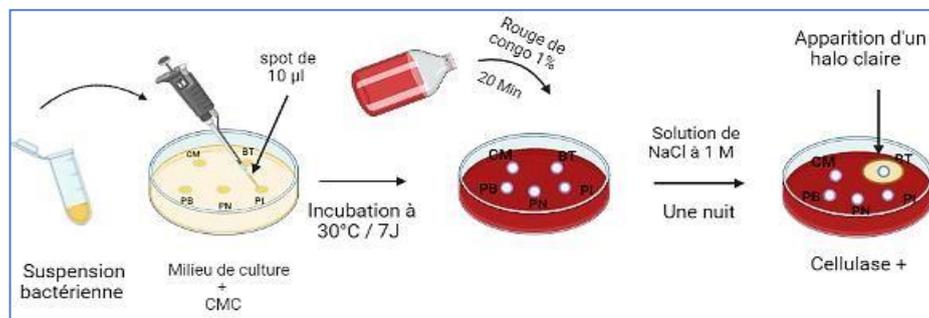


Figure 09 : Recherche de l'activité cellulasique

2.1.4. Détermination de l'activité amylasique

La mise en évidence de la capacité des souches à dégrader l'amidon soluble est révélée par un test d'activité sur gélose à base d'amidon contenant en g/l : KNO_3 (0,5), K_2HPO_4 (1,0), MgSO_4 (0,2), CaCl_2 (0,1), FeCl_3 (0,001), amidon soluble (10,0), agar (15,0). Le pH est ajusté à 7,2. Après ensemencement et incubation à $30^\circ\text{C}/48-72\text{h}$, une solution de lugol (Annexe II) est versée sur la surface, après quelques minutes du contact, l'excès est éliminé et les boîtes sont lavées à l'eau distillée. L'apparition d'une zone claire autour des colonies indique la présence d'une activité amylasique (Vinoth et al., 2009).

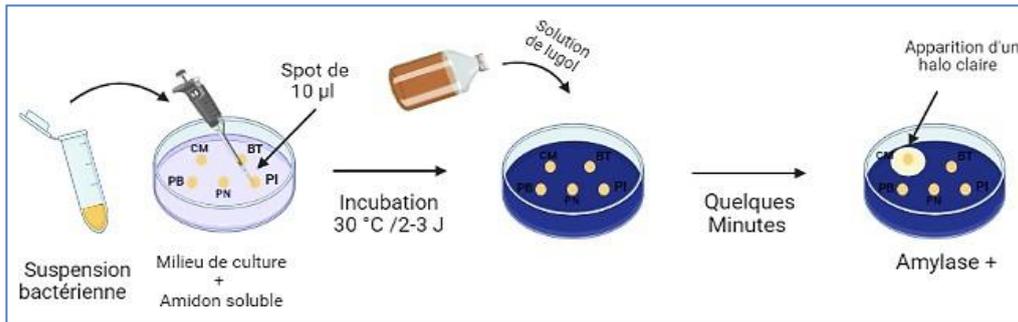


Figure 10 : Recherche de l'activité amylasique

2.1.5. Détermination de l'activité estérasique et lipasique

Le milieu décrit par Sierra (1957) est utilisé pour la recherche de l'activité estérasique et lipasique. Ce milieu contient en g/l : peptone (10) ; NaCl (5) ; CaCl 2H2O(0.1) et l'agar (18). Le Tween 80 (1%, v/v) est ajouté pour révéler l'activité estérasique, tandis que le Tween 20 est utilisé pour mettre en évidence l'activité lipasique. Le pH est ajusté à 7,4 (Carrim et al., 2006). Après ensemencement par les isolats et incubation à 30°C pendant 48h, un résultat positif se traduit par la présence d'un halo clair autour des colonies

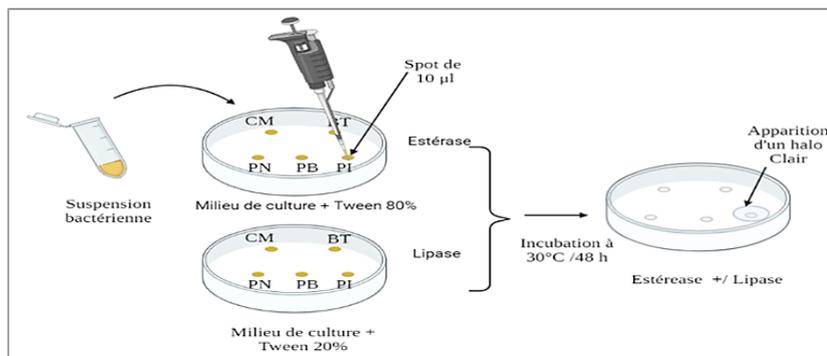


Figure 11 : Recherche de l'activité estérasique et lipasique.

2.2. Mise en évidence de l'activité antifongique

Le pouvoir antagoniste des cinq souches bactériennes est vérifié sur la souche phytopathogène *Aspergillus niger*. Le champignon est repiqué sur le milieu TSA (annexe I) pour obtenir une culture jeune.

L'évaluation de l'activité antifongique est réalisée selon la méthode de confrontation sur gélose, décrite par Sagahón et al. (2011). Cette méthode consiste à déposer un disque du champignon (5 mm de diamètre) au centre d'une boîte de pétrie contenant le milieu TSA. Ensuite, trois spots de 5µl de la même suspension bactérienne jeune de chacun des isolats sont déposés à une distance de 2.5 cm du champignon. Deux boîtes de pétries ne contenant que le champignon cible sont préparées en parallèle pour servir de témoin. Ces tests sont réalisés en duplicata. Toutes les boîtes sont par la suite incubées à 25 °C pendant 5-7 jours.

L'effet antifongique est évalué en déterminant le pourcentage d'inhibition de la croissance (PGI%) selon la formule décrite par Whipps (1987).

$$\text{PGI}\% = \frac{\text{RC} - \text{RS}}{\text{RC}} \times 100$$

RC : Distance en mm entre le point d'inoculation du champignon et la marge de la colonie contenue dans le témoin.

RS : Distance en mm entre le point d'inoculation du champignon et la marge de la colonie contenue dans la boîte de pétri traitée.

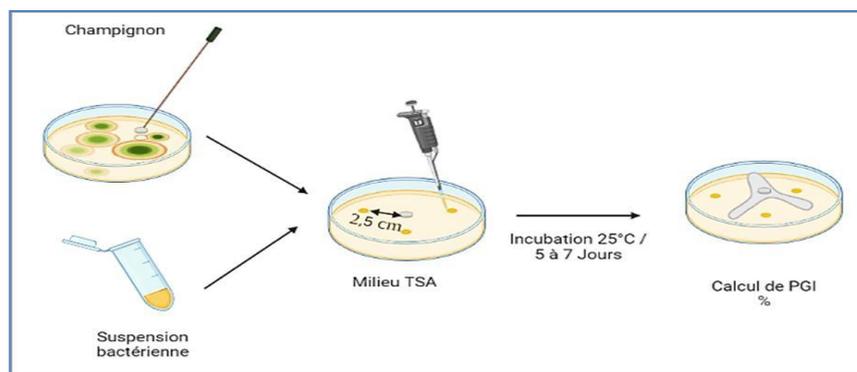


Figure 12 : Mise en évidence de l'effet antagoniste des souches bactériennes à l'égard d'*A.niger*

2.3. Recherche de métabolites à activité antifongique

2.3.1. Production d'ammoniac (NH₃)

Ce test est réalisé selon la méthode de Capuccino et Sherman (1992). Le protocole consiste à inoculer 100µl de la suspension bactérienne jeune dans 10 ml d'eau peptonée (annexe I). Après incubation à 30°C pendant une durée de 96 h, la production d'ammoniac est mise en évidence par l'apparition d'une couleur jaune-orange lors de l'ajout de 500µl du réactif de Nessler dans chaque tube.

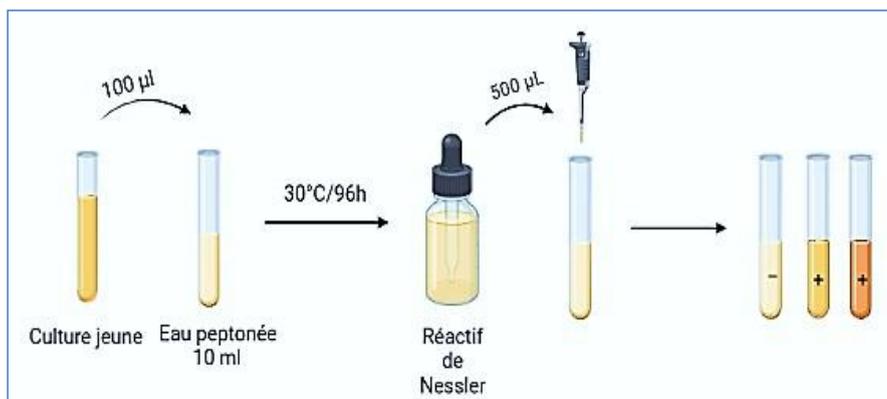


Figure 13 : Recherche de la production d'ammoniac

2.3.2. Production de Cyanure d'hydrogène (HCN)

La production du cyanure d'hydrogène (HCN) est évaluée selon le protocole décrit par Lorck (1948). Les cultures bactériennes jeunes sontensemencées par stries serrées sur des boîtes de Pétri contenant la gélose nutritive (GN) (annexe I) additionnée de glycine (4,4g/l). Un disque de papier Whatman imprégné d'une solution de picrate de sodium (5% d'acide picrique et de 2% de carbonate de sodium anhydre) est déposé au fond du couvercle de la boîte. Les boîtes sont ensuite scellées avec du parafilm et incubée à 30°C pendant 96 h. Le virage de la couleur du papier Whatman du jaune vers une couleur orange ou marron indique la production de l'HCN par les souches testées.

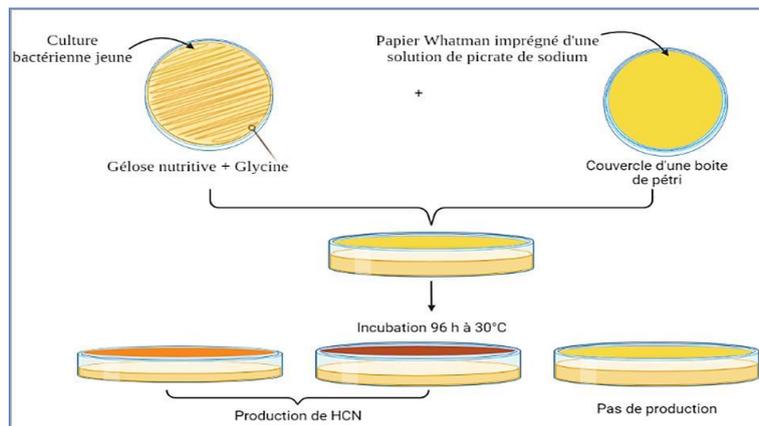


Figure 14 : Production de cyanure d'hydrogène (HCN)

2.4. Effet de l'inoculation bactérienne sur la croissance de l'ail et le biocontrôle de développement d'*Aspergillus niger*

Cette partie a pour objectif de :

- Tester *ex vivo* et *in vivo* l'efficacité des souches (*Bacillus thuringiensis* et *Pseudomonas* sp. I) ayant donné les meilleurs pourcentages d'inhibition du développement d'*A. niger*
- Vérifier la capacité de toutes les souches bactériennes (*Pseudomonas* sp. I ; *Pseudomonas* sp. Na ; *Pseudomonas* sp. B6 ; *Bacillus thuringiensis* et *Cellulosimicrobium* sp.) à stimuler la croissance de l'ail.

La suspension sporale est préparée comme suit : un volume d'eau physiologique d'environ 3 ml est versé dans une boîte de pétrie contenant l'une des souches fongiques d'*A. niger*, âgée de 7 jours. Par la suite, on procède à un frottement superficiel à l'aide d'une spatule stérile afin de récupérer les spores fongiques. La suspension sporale obtenue est ainsi récupérée par une micropipette, puis diluée dans de l'eau physiologique. La concentration des spores (10^5 spores/ml) est déterminée par le dénombrement sur une cellule de Malassez sous microscope optique.



Figure 15 : Suspensions bactériennes et fongiques préparées

2.4.1.1. Désinfection des gousses

La désinfection est réalisée selon la méthode décrite par Mondani et al.,(2021). Les étapes sont les suivantes :

- Sélection des gousses d'ail saines et de même taille ;
- Lavage à l'eau de robinet ;
- Désinfection par une solution d'hypochlorite de sodium à 1% pendant 3 minutes ;
- Rinçage six fois dans de l'eau distillée stérile jusqu'à l'élimination des traces d'hypochlorite ;
- Répartition des gousses en groupes (6 gousses) puis laissé sécher sous la hotte.

2.4.1.2. Test ex vivo

Après séchage des gousses, des trous sont réalisés à l'aide d'un emporte pièces stériles sur les deux côtés de chaque gousse. Ensuite, les différents traitements sont introduits dans les trous comme suit :

- **Témoin (eau physiologique) :** 15 μ l de l'eau physiologique stérile ;
- **Test 1 (Souches bactériennes) :** 10 μ l de la suspension bactérienne, puis ajouter 5 μ l ;de l'eau physiologique ;
- **Test 2 (*A. niger*) :** 10 μ l d'eau physiologique, puis ajouter 5 μ l de la suspensionsporale d'*A niger* ;
- **Test 3 (Souches bactériennes + *A. niger*) :** 10 μ l de la suspension bactérienne, puisajouter 5 μ l de la suspension sporale d'*A niger*.

Les gousses d'ail sont par la suite mises dans des boites de pétris tapissées au préalable avec du papier imbibé d'eau stérile, à raison de 3 gousses par boîte. L'incubation est réalisée à 25 °C pendant 7 jours.

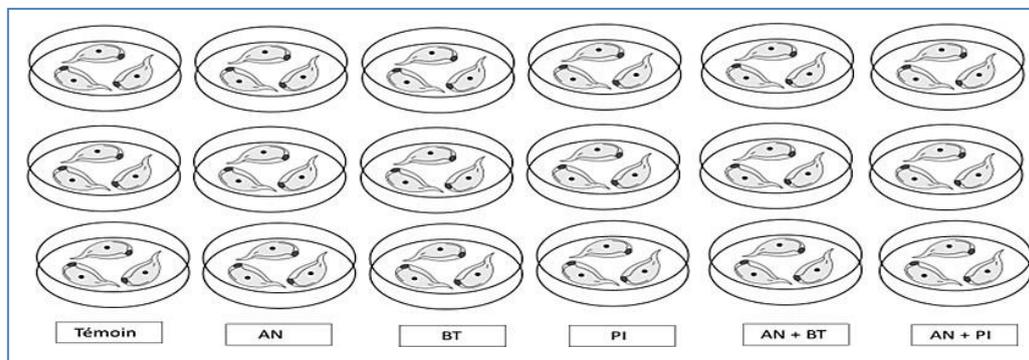


Figure 16 : Schéma explicatif de la répartition des différents traitements appliqués sur les gousses d'ail



Figure 17 : Les différentes étapes suivies dans le test ex vivo sur l'ail

1- Désinfection des gousses /2- Humidification du papier /3-Réalisation des trous/ 4 - Inoculation des suspensions/ 5 - Transfert des gousses dans les boîtes /6- incubation.

2.4.2. Test *in vivo* de Biocontrôle de développement d'*A. niger* sur l'ail

Les gousses désinfectées (section 2.4.1.2), sont semées après traitement dans des pots en plastique (10cm de diamètre et 14cm de hauteur) contenant environ 870 g d'un mélange composé de 2/3 de sol et 1/3 de terreau. Les gousses sont mises à raison de 3 gousses par pot et à une profondeur de 1cm de la surface.

Les pots ont été divisés en 6 lots (5 pots/ lot) :

- **Lot 1 (Témoin)** : Les gousses sont trempées 30 minutes dans de l'eau physiologique ;
- **Lot 2 (PI)** : Les gousses sont trempées 30 minutes dans la suspension bactérienne de *Pseudomonas* sp. I ;
- **Lot 3 (BT)** : Les gousses sont trempées 30 minutes dans la suspension bactérienne de *Bacillus thuringiensis* ;
- **Lot 4 (AN)** : Les gousses sont trempées 15 minutes dans de l'eau physiologique puis 15 minutes dans la suspension sporale d'*A. niger* ;

- **Lot 5 (PI+AN)** : Les gousses sont trempées 15 minutes dans la suspension bactérienne de *Pseudomonas* sp. I, puis 15 minutes dans la suspension sporale d'*A niger* ;
- **Lot 6 (BT+AN)** : Les gousses sont trempées 15 minutes dans la suspension bactérienne de *Bacillus thuringiensis*, puis 15 minutes dans la suspension sporale d'*A niger*.

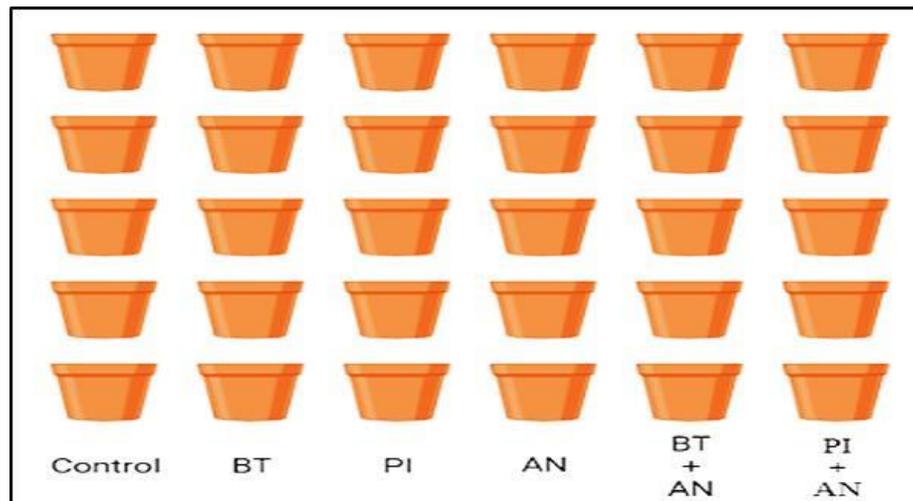


Figure 18 : Schéma explicatif de la répartition des différents lots de test de biocontrôle d'*A.niger in vivo*

2.4.3. Test *in vivo* de stimulation de la croissance d'ail par les souches bactériennes

Les étapes de la réalisation de cette expérience sont les mêmes que celles citées dans la section précédente (2.4.2).

Les lots sont préparés comme suit :

- **Lot (Témoin)** : Les gousses sont trempées 30 minutes dans de l'eau physiologique ;
- **Lot 2 (PI)** : Les gousses sont trempées 30 minutes dans la suspension bactérienne de *Pseudomonas* sp. I ;
- **Lot 3 (BT)** : Les gousses sont trempées 30 minutes dans la suspension bactérienne de *Bacillus thuringiensis* ;

- **Lot 4 (PN)** : Les gosses sont trempés 30 minutes dans la suspension bactérienne de *Pseudomonas* sp. Na ;
- **Lot 5 (PB)** : Les gosses sont trempés 30 minutes dans la suspension bactérienne de *Pseudomonas* sp. B6 ;
- **Lot 6 (CM)** : Les gosses sont trempés 30 minutes dans la suspension bactérienne de *Cellulosimicrobium* sp..



Figure 19 : Les principales étapes suivies dans les tests *in vivo*

Les deux expériences *in vivo* ont été réalisées dans des conditions naturelles à température ambiante (16-30°C) pendant une période de 38 jours. A la fin du test, les plantes ont été soigneusement déracinées et le sol adhérent à leurs racines a été complètement éliminé. Les paramètres de croissance : longueur, poids frais et poids sec des racines ainsi que la teneur en chlorophylle a, b et totale, ont été mesurés.

2.4.4. Dosage de la chlorophylle

La teneur en pigment photosynthétiques est déterminée selon la méthode de Hiscox et Tsraelstam (1979). Pour cela, 100 mg de matière fraîche est découpé puis placé dans un flacon contenant 7 ml de DMSO (Diméthylsulfoxyde). Le mélange est incubé à 65° C pendant 30 minutes. Après incubation, l'échantillon est transféré dans une éprouvette de 25 ml et le volume est ajusté à 10 ml avec le DMSO. L'absorbance est lue immédiatement à 645 et 663 nm. Les teneurs en chlorophylle a, b et totale sont déterminées suivant les équations établies par Arnon (1949).

$$\text{Chla (g l}^{-1}\text{)} = 0.0127 \times A_{663} - 0.00269 \times A_{645};$$

$$\text{Chlb (g l}^{-1}\text{)} = 0.0229 \times A_{645} - 0.00468 \times A_{663};$$

$$\text{Chl totale (g l}^{-1}\text{)} = 0.0202 \times A_{645} + 0.00802 \times A_{663}.$$



Figure 20 : Les différentes étapes de mesures des paramètres de croissance de l'ail

2.5. Analyses statistiques

Une analyse de la variance (ANOVA) est réalisée à l'aide du logiciel GraphPad Prism® version 6.01. Dans le cas où des différences significatives sont détectées, le test de comparaison multiple des moyennes LSD est réalisé.

Résultats

&

Discussions

1. Recherche d'enzymes d'intérêt agricole

1.1. Production d'enzyme

Les résultats des activités enzymatiques recherchées dans ce travail sont regroupés dans le tableau et la figure ci-dessous.

Tableau II : Résultats des différents tests d'activités enzymatiques testées

Souches	Estérase	Lipase	Protéase	Chitinase	Amylase	Cellulase
CM	+++	++	+++	++	+++	-
PN	-	-	+++	++	+	-
BT	+++	++	+++	+	+++	++
PB	-	-	+++	++	+	-
PI	+++	+++	++	++	+	-

(+) : diamètre entre 7 à 10 mm ; (++) : diamètre entre 10 à 20 mm ; (+++) : > 20 mm ; (-) : Aucune production
 CM : *Cellulosimicrobium* sp. ; PN : *Pseudomonas* -sp. N; BT: *Bacillus thuringiensis*; PB: *Pseudomonas* sp. B; PI: *Pseudomonas* sp. I

Les résultats montrent que les souches bactériennes présentent des profils enzymatiques différents et qu'elles produisent au moins trois types d'enzymes.

La souche BT s'est avérée la plus performante en produisant toutes les enzymes recherchées avec des diamètres supérieurs à 1 cm (excepté pour la chitinase). Comparées aux souches PB et PN, Les souches CM et PI ont un profil plus intéressant, elles ont produit 5/6 des enzymes testées avec des diamètres également important (supérieur à 1 cm).

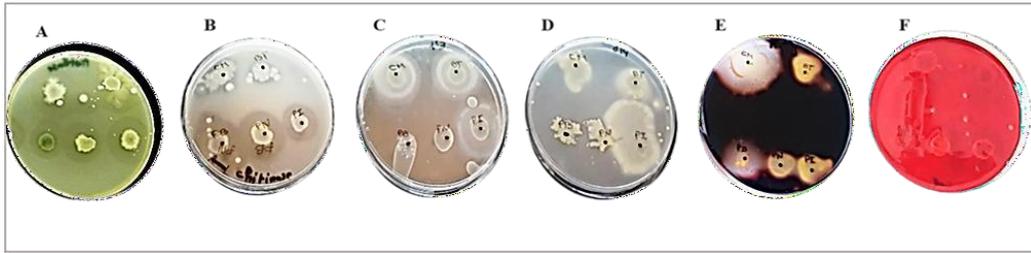


Figure 21 : Aspect des résultats positif des activités enzymatique testées

A : Protéase, B : Chitinase, C : Estérase, D : Lipase, E : Amylase, F : Cellulase

L'un des mécanismes impliqués par les rhizobactéries dans la lutte contre les phytopathogènes est la production d'enzymes lytiques et hydrolytiques. Ces enzymes ont la capacité de dégrader les composants organiques présents dans la paroi cellulaire des phytopathogènes, contribuant ainsi à leur suppression et à la prévention des infections (Tahmish et al., 2022). L'intérêt de ces microorganismes en agriculture repose sur leur application comme bio-fertilisants et comme agents de biocontrôle.

1.1.1. Activité chitinasique

La chitinase est la principale enzyme hydrolytique libérée par le PGPR et reconnue pour son activité antifongique en dégradant la chitine, qui est un constituant majeur de la paroi cellulaire de la plupart des champignons (3 à 60 %) (Jalil et al.,2015 ; Bajimaya et al.,2022; Duhan et al.,2022). Cette enzyme joue également un rôle important dans les mécanismes de contrôle biologique et de défense des plantes contre les phytopathogènes (Reddy et al.,2022).

Les genres bactériens utilisés dans notre étude, notamment *Bacillus* et *Pseudomonas* sont largement connus pour leur capacité à ralentir la croissance et le développement des champignons en sécrétant les chitinases. L'application de ces bactéries peut contribuer à la protection des cultures contre les agents pathogènes fongiques (Prasad et al.,2015).

Une étude menée par Martinez et al., (2014), a rapporté le potentiel chitinolytique de *Bacillus thuringiensis*. Les chitinases de cette dernière se sont révélées plus efficaces que celles de *B. licheniformis* dans la dégradation des parois cellulaires de nombreux champignons. La même étude a montré que les chitinases purifiées de *Bacillus subtilis* ont inhibé la croissance mycélienne de *Fusarium oxysporum*.

1.1.2. Activité protéasique

Il est bien établi que les PGPR possèdent divers mécanismes d'action pour éliminer les microorganismes nuisibles. Parmi ces mécanismes, la production des protéases (Twisha et Desai, 2014). Cette enzyme joue un rôle essentiel dans le processus de lyse cellulaire des champignons phytopathogènes en ciblant spécifiquement les composants de nature protéique (Han et al.,2015 ; Jadhav et al., 2016 ; Bajimaya et al.,2022). En effet, les protéases sont responsables de la décomposition des protéines majeures des phytopathogènes en chaînes peptidiques et/ou en acides aminés constitutifs, entraînant ainsi la perte de leur potentiel pathogène. En outre, certaines protéases sont impliquées dans l'inactivation des enzymes extracellulaires des champignons phytopathogènes (Jadhav et al., 2016 ; Bajimaya et al.,2022 ; Reddy et al.,2022).

Dimkic et al. (2022), ont montré que les bactéries du genre *Bacillus* et *Pseudomonas* produisent des protéases impliquées dans l'élimination de nombreuses maladies fongiques. Par ailleurs, Ahmad et al. (2013), ont révélé que ces deux genres montrent une activité protéasique importante avec des diamètres de zone supérieurs à 3 cm, ces résultats corroborent avec ceux trouvés dans notre étude.

D'après Duhan et al., (2022), les protéases sécrétées par le PGPR sont essentielles dans les activités de lutte biologique contre *Aspergillus flavus*, *Aspergillus niger* et *Alternaria alternata*.

1.1.3. Activité cellulasique

Les cellulases sont des enzymes impliquées dans la dégradation des polysaccharides ligno-cellulosiques, qui sont des composés complexes présents dans les parois cellulaires des plantes. Cette enzyme joue un rôle primordial en hydrolysant les liaisons 1,4- β -D- glucosidiques de la cellulose en sucres simples (Yi et al., 2022 ; Bajimaya et al.,2022).

Contrairement à ce qui est trouvé dans cette étude, plusieurs auteurs ont rapporté le potentiel cellulolytique des *Pseudomonas* (Avinash et Ravishankar, 2014 ; Bensidhoum et al., 2016 ; Rai et al., 2016 ; Khalil et al., 2022).

Khalil et al., (2022), ont rapporté que les souches *Bacillus mégathérium*, *B. subtilis*, *B. cereus*, ainsi que *Pseudomonas fluorescens*, produisent des enzymes cellulolytiques. En revanche Avinash et Ravishankar (2014), ont montré que les souches *Pseudomonas aeruginosa* MTCC2581, *Bacillus coagulans* MTCC3534, *Bacillus subtilis* MTCC2763 et *Bacillus circulans* MTCC7194, sont cellulase négative.

1.1.4. Activité amylasique

Les amylases, enzymes extracellulaires, jouent un rôle essentiel dans l'hydrolyse de l'amidon ou le glycogène, conduisant à la formation de glucose et/ou des oligosaccharides. Cette enzyme est largement distribuée dans le sol et les plantes (Indriati et al., 2018 ; Bensidhoum et Nabti, 2020).

Plusieurs bactéries rhizosphériques du genre *Pseudomonas* et *Bacillus* ont la capacité de produire l'enzyme cellulases. Khalil et al., (2022) ont montré dans leur étude que *Bacillus subtilis*, *B. cereus* et *Pseudomonas fluorescent* sont capables de produire de l'amylase, contrairement à *B. mégathérium*. Karthik et al., (2016) dans leurs études sur les souches bactériennes de genre *Cellulosimicrobium*, ont rapporté que la souches *C.funkei* KM032184 (AR6 et AR8) possèdent un potentiel amylolytique. Nabti et al., (2014) ont également montré la capacité de la souche *Cellulosimicrobium* sp. S16 à produire l'amylase.

1.1.5. Activité estérasique et lipasique

Les lipases jouent un rôle crucial dans la dégradation des lipides présents dans les membranes cellulaires des phytopathogènes. Cependant, leur utilisation ne se limite pas uniquement à la lutte biologique contre ces organismes nuisibles. En effet, les lipases sont également largement utilisées dans les industries alimentaires, pharmaceutique et des biocarburants (Choudhary et al., 2023). Les estérases sont également des enzymes hydrolytiques impliquées dans la lyse de la paroi cellulaire des phytopathogènes. Elles agissent en hydrolysant spécifiquement les esters présents dans certains composants de la paroi fongique (Mekonnen et Kibret, 2021).

Les lipases sont largement répandues chez les bactéries, les levures et les champignons filamenteux. Elles sont aussi bien produites chez les bactéries Gram + (*Bacillus* et *Staphylococcus*) que les bactéries Gram – (*Pseudomonas*) (Bensidhoum, 2016).

Talbi et al. (2013), ont rapporté que la souche B. S15 appartenant au genre *Bacillus* produit la lipase et l'estérase. Dans une autre étude menée par Herrera-quiterioa, (2020), les deux enzymes présentaient une activité remarquable contre les espèces fongiques d'*Aspergillus*. Par ailleurs, Choudhary et al. (2023) rapportent que les *Pseudomonas* spp. Sont une source potentielle de diverses lipases.

1.2. Mise en évidence de l'activité antifongique

L'activité antifongique de nos souches contre *Aspergillus niger* est évaluée en mesurant le pourcentage d'inhibition de la croissance (PGI%).

Au terme de 7 jours d'incubation, les 5 souches ont montré un effet inhibiteur vis-à-vis le champignon phytopathogène testé et avec des pourcentages d'inhibition (PGI%) qui varient d'une souche à une autre. Les résultats obtenus sont présentés dans les figures (18 et 19) ci- dessous.

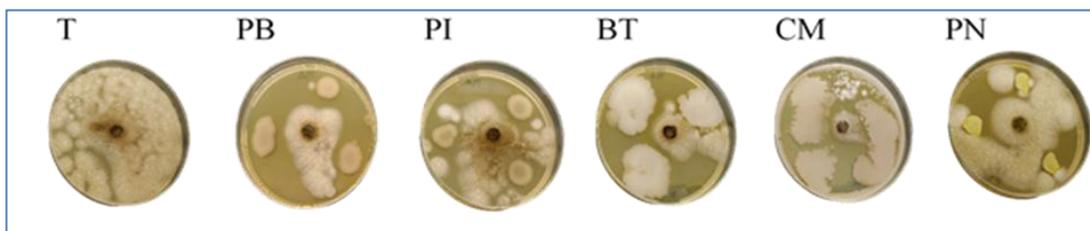


Figure 22 : Résultats du test d'antagonisme à l'égard d'*A. niger*

CM : *Cellulosimicrobium* sp. ; PN : *Pseudomonas* sp. N; BT : *Bacillus thuringiensis* ; PB : *Pseudomonas* sp. B ;PI : *Pseudomonas* sp. I

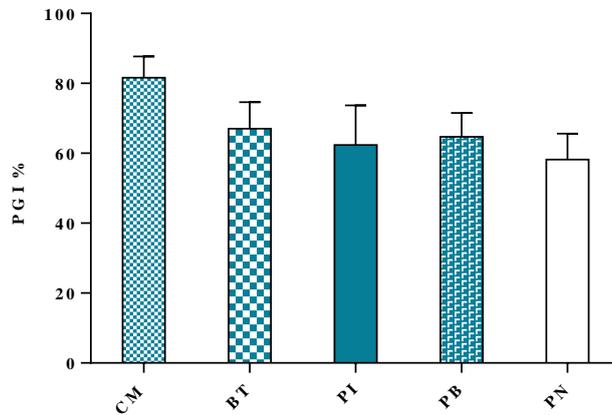


Figure 23 : Pourcentage d’inhibition de la croissance d’*A.niger* par les souches bactériennes

D’après les PGI% obtenus, *Cellulosimicrobium* sp., est la plus active des souches avec un taux de réduction importante (PGI% > 81%). Les autres souches ont également donné des valeurs intéressantes (58% < PGI% < 68).

L’utilisation d’antagonistes bactériens dans le biocontrôle des ravageurs de plantes, semble être une alternative prometteuse à l’utilisation de produits agrochimiques (Fernando et al., 2006). De nombreuses études font état de bactéries ayant un potentiel antagoniste contre les champignons et/ou les insectes phytopathogènes. Parmi les genres bactériens souvent mentionnés dans ces études figurent *Pseudomonas*, *Cellulosimicrobium* et *Bacillus* (Agrillo et al., 2019)

Les souches étudiées ont présenté des spectres d'activité importants et variables *vis-à-vis* d'*A. niger*. Cette variation peut être attribuée aux modes d'action spécifiques des souches bactériennes, ainsi qu'au type et à la quantité des métabolites bioactifs sécrétés. Selon Rao et al. (2017), les taux d'inhibition de la croissance mycélienne, peuvent varier entre différentes souches bactériennes appartenant à la même espèce.

La souche *Cellulosimicrobium* sp., utilisée dans notre étude a réduit 81.6% de la croissance mycélienne d'*A. niger*. Des résultats analogues ont été obtenus par Nabti et al. (2014), qui ont montré que la souche *Cellulosimicrobium* sp. S16 possède une activité antagoniste remarquable (PGI%>82 %) *vis-à-vis* de trois champignons phytopathogènes : *Botrytis cinerea* ; *Fusarium oxysporum* et *Verticillium dahliae*. Selon une étude menée par Gebreel et al. en 2008, *Cellulosimicrobium* inhibe significativement la croissance d'*A. niger*, les auteurs ont suggéré que cette activité est due à la production de métabolites bioactifs diffusibles dans le milieu.

Bacillus thuringiensis et les trois autres souches appartenant au genre *Pseudomonas* ont également présenté un potentiel antagoniste intéressant (PGI%>58 %). *Bacillus thuringiensis* est connu pour son potentiel en tant qu'agent de lutte biologique contre diverses espèces fongiques et bactériennes. Elle possède cette capacité grâce à l'expression de plusieurs molécules antimicrobiennes. Selon Djénane et al., (2017), 106 souches de *B. Thuringiensis* (77,4 %) ont inhibé la croissance d'*A. niger* avec des taux remarquables. Driss et al. (2005), ont rapporté que le surnageant de culture de *B. thuringiensis* souche BUPM255 avait un potentiel antifongique important contre *A. niger*.

Rao et al. (2017), ont montré que les souches de *Pseudomonas* inhibent 66,70 % de la croissance d'*A. niger*. Des valeurs similaires ont été obtenus par Rai et al., (2016), avec la souche *Pseudomonas protegens*. RhiNA. Jošić et al., (2015) ont rapporté dans leur étude que les souches de *Pseudomonas* spp., Q16 et B25, ont montré un effet antagoniste important contre *Trichoderma viride*, *A. fumigatus* et *Aspergillus niger*, tandis que sur *Penicillium verrucosum* les taux étaient faibles. D'après Rao et Nnaji.,2017, *Pseudomonas* spp. et *Bacillus* spp. ont un potentiel antagoniste contre *A. niger* isolé à partir de tomates abîmées. Le pourcentage d'inhibition de la croissance mycélienne par ces deux espèces est 40 % et 27 % respectivement.

Le biocontrôle des champignons phytopathogènes par *Pseudomonas* sp. est attribué à la production de substances antimicrobiennes et à la compétition pour les nutriments par le biais de la production de sidérophores. Par ailleurs, certaines souches de *Pseudomonas fluorescens* produisent des métabolites antimicrobiens à large spectre d'activité antifongique, tel que *Pseudomonas protegens* CHAO qui synthétise le 2,4-diacétylphloroglucinol (DAPG), la pyolutéorine (PLT) et la pyrrolnitrine (PRN)(Bensidhoum et Nabti, 2020).Islam et al., (2012), ont constaté que l'effet inhibiteur des champignons par les *Pseudomonas* sp. réside dans leur capacité à inhiber le fonctionnement intégral de certains composants de la paroi cellulaire fongique, ce qui conduit à l'altération de la perméabilité des membranes fongiques.

1.3. Recherche de métabolites à activités antifongique

La lutte biologique contre les agents pathogènes repose sur divers mécanismes, notamment la production de métabolites antifongiques tels que l'ammoniac et le cyanure d'hydrogène.

Les résultats de la production d'HCN et d'NH₃ sont présentés dans le tableau suivant.

Tableau III : Résultats des tests de production de métabolites antifongiques

Souches	Production d'NH ₃	Production d'HCN
CM	+	++
PN	++	-
BT	+	+
PB	-	-
PI	+	+++

(-) : Aucune production ;(+) : Faible production ; (++) : Production moyenne ; (+++) : Forte production

1.3.1. Production de NH₃

Suite à l'incubation et à l'ajout du réactif de Nessler, la couleur de l'eau peptonée inoculée a viré vers une couleur jaune foncé, révélant ainsi la présence d'ammoniac dans le milieu (Figure 20). Tous les isolats ont produit de l'ammoniac, excepté la souche PB.



Figure 24 : Résultats du test de production d'ammoniac

Plusieurs auteurs, ont rapporté que la production d'ammoniac par les rhizobactéries est l'un de leurs mécanismes directs et indirects de promotion de la croissance des plantes, direct par l'apport en azote et indirects par l'alcalinisation du sol, ce qui empêche la croissance de certains champignons pathogènes (Bhattacharyya et al., 2020 ; Abdelwahed et al., 2022 ; Abdullahi et al., 2022 ; Agustiyani et al., 2022 ; Getahun et al., 2022).

Dans notre étude, la production d'ammoniac a été observée chez la majorité des souches, Lukkani et al. (2014) a rapporté que 80 % des *Pseudomonas* testés dans leurs études, ont produit l'ammoniac. Agbodjato et al. 2015 ont également mentionné que 80 % des souches de *Bacillus* l'ont produit. Dans une autre étude menée par Joseoh et al. (2007), La production d'ammoniac a été détectée chez 95 % des isolats du genre *Bacillus* et 94% des *Pseudomonas*.

1.3.2. Production de l'HCN

Le changement de couleur du papier Whatman du jaune vers l'orange ou le marron indique la présence d'HCN (Figure 21). Dans cette étude, les souches PI, CM et BT ont produit l'HCN, contrairement aux souches PB et PN.

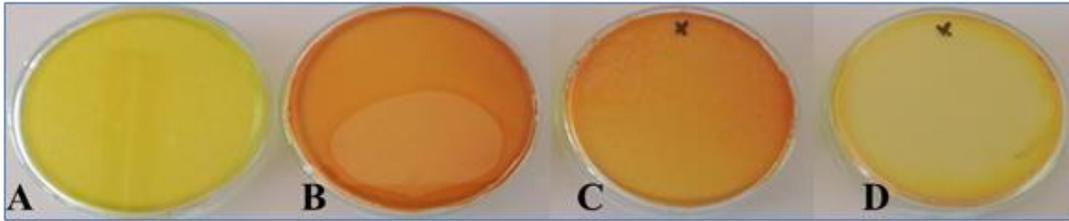


Figure 25 : Aspect des résultats positive de production HCN

(A): Témoin ; (B) : *Pseudomonas sp.I* ; (C) : *Cellulosimicrobium* sp. ; (D) : *Bacillus thuringiensis*

Le cyanure d'hydrogène (HCN) est l'un des métabolites bioactifs volatils impliqués par les PGPR dans la lutte contre les agents phytopathogènes (Sarita et al., 2022). Cette substance agit directement sur les cellules en bloquant la cytochrome-oxydase dans la chaîne respiratoire (Ouf et al., 2023).

La production de HCN dépend de la composition du milieu en acides aminés. Ainsi, la glycine est le précurseur direct de la production microbienne de cyanure par l'enzyme HCN synthase qui est codée par trois gènes biosynthétiques (*hcn A*, *hcn B* et *hcn C*) d'où la différence dans les taux de production (Ramette et al., 2003 ; Mokrani et al., 2018 ; Naz et al., 2022).

Dans l'étude menée par Sarita et al. (2022) toutes les espèces du genre *Bacillus* et *Pseudomonas* testées, produisent l'HCN en grande quantité. Le même résultat est obtenu par Sajjad Hyder et al. (2020). D'autre part, l'incapacité des deux souches PN et PB à produire du HCN peut être expliquée par l'absence de gène (*hcn*) responsable de la production de ce métabolite, ou l'absence d'un précurseur approprié (Cherif et al., 2016).

2. Effet de l'inoculation bactérienne sur la croissance de l'ail et le biocontrôle du développement d'*Aspergillus niger*

2.1. Test *ex vivo* du contrôle du développement d'*A. niger* sur les gousses d'ail

L'ail (*Allium sativum*) appartient à la famille des Alliacées, il est le deuxième légume le plus cultivé après l'oignon, produit à la fois pour ses propriétés médicinales et nutritionnelles (Wang et al., 2019).

La culture de l'ail est sujette à de nombreuses maladies fongiques, ce qui entraîne des pertes significatives à différentes étapes, de la croissance des plantes à la récolte, en passant par la transformation et la commercialisation. Ces maladies fongiques peuvent affecter la qualité des gousses d'ail, réduire le rendement global de la culture et compromettre sa valeur marchande, notamment en ce qui concerne les exportations (Chavda, 2016). La pourriture noire de l'ail causée par *A. niger*, est la maladie la plus destructrice aussi bien en entrepôt qu'au champ (Chavda, 2016 ; Harshit et Minesh, 2023).

La pourriture est favorisée par les températures allant de 20 à 30 °C, et une humidité élevée, ainsi les bulbes d'ail sont assez périssables en raison de leur forte teneur en humidité (Bjelić et al., 2018).

Les résultats obtenus au cours de ce test sont illustrés par la figure ci-dessous.



Figure 26: Résultats de biocontrôle d'*A. niger* sur les gousses d'ail par les souches bactériennes

T : Témoin ; PI : *Pseudomonas* sp. I ; BT : *Bacillus thuringiensis* ; AN : *A. niger* ; AN+PI : *A. niger* + *Pseudomonas* sp. I ; AN+BT : *A. niger* + *Bacillus thuringiensis*

Les deux souches PI et BT ont été choisis pour ce test suite à leur potentiel antagoniste vérifié lors du test *in vitro vis-à-vis A. niger*.

Après 7 jours d'incubation de l'ail à 25°C dans des boîtes humectées, les gousses d'ail inoculées uniquement avec la suspension fongique AN (Témoin +) ont montré les symptômes de la pourriture noire. La Co-inoculation des gousses par le champignon suivi des souches a montré une action antagoniste importante *vis-à-vis* l'agent phytopathogène en inhibant son développement, ce qui confirme les résultats obtenus *in vitro*.

Plusieurs travaux ont été publiés sur l'application des agents de biocontrôle pour l'inhibition de la croissance des agents phytopathogènes fongiques (Bensidhoum et al., 2015 ; Fan et al, 2017 ; Raie, 2017 ; Tabli et al., 2018). Des résultats analogues à notre étude ont été obtenus par Bjelić et al. (2018) où *B. subtilis* a inhibé significativement l'infection des gousses d'ail par *Fusarium* spp. (Jusqu' à 58 % de réduction des symptômes de pourriture). Cavalcanti et al. (2020) ont rapporté que la souche *B. pumilus* a réduit significativement le développement de *Sclerotinia sclerotiorum* de 86,74 % sur les gousses d'ail. De même Fan et al, (2017) ont rapporté que la souche *Bacillus* sp. a contrôlé l'agent pathogène *A. niger*. Khadiri et al. (2023) ont trouvé que la souche *B. cereus* B8W8 a la capacité d'inhiber complètement la pourriture brune (moniliose) des pommes causées par *Monilia laxa*, ainsi que la moisissure verte des agrumes causée par *Penicillium digitatum*.

D'après Sun et al. (2023), *P. syringae* B-1 a réduit fortement l'incidence de la pourriture annulaire du pommier de 90,2 % à 41,2%, de même, Rai et al. (2017) montrent que l'antagoniste *P. protegens*-RhiNA a exprimé une forte activité inhibitrice *vis-à-vis* le développement de *B. cinerea* sur les fruits de pomme.

Contrairement aux résultats trouvés dans notre étude, Harshit et Minesh (2023) ont trouvé que les souches *B. subtilis* et *P. fluorescens* sont peu efficaces dans le contrôle d'*A. niger* sur l'ail.

Les mécanismes exacts par lesquels les antagonistes bactériens réduisent les maladies post-récolte restent encore peu connus, cependant plusieurs modes d'action sont discutés dans la littérature scientifique, notamment la compétition pour les nutriments et l'espace, la synthèse d'antibiotiques et de sidérophores, ainsi que la production d'enzymes dégradant la paroi cellulaire (Singh et al., 2022).

Bien que les mécanismes précis ne soient pas encore entièrement élucidés, il est clair que les antagonistes bactériens jouent un rôle important dans la protection des cultures contre les maladies post-récolte en utilisant différentes stratégies pour inhiber la croissance des phytopathogènes.

2.2. Test *in vivo* du Biocontrôle du développement d'*A. niger* sur l'ail

Après 38 jours, les plantes ont été soigneusement déracinées et le sol adhérent à leurs racines a été éliminé. Les paramètres de croissance : longueur, poids frais et sec des racines, ainsi que les taux de chlorophylles de chaque plante ont été mesurés. Les résultats obtenus sont résumés dans la figure et les graphes ci-dessous

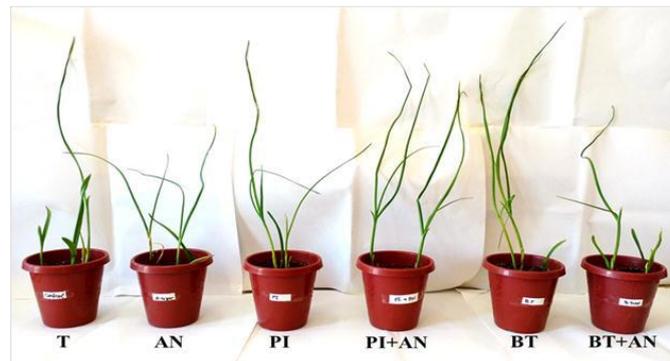


Figure 27: Résultat du test *in vivo* du contrôle d'*A. niger* sur l'ail

T : Témoin ; **AN** : *A. niger* ; **PI** : *Pseudomonas* sp. I ; **PI+AN**: *Pseudomonas* sp. I +*A. niger*; **BT** : *Bacillus thuringiensis* ; **BT+AN**: *Bacillus thuringiensis*+ *A. niger*

Les résultats des longueurs des racines, sont montrés dans le graphe ci-dessous.

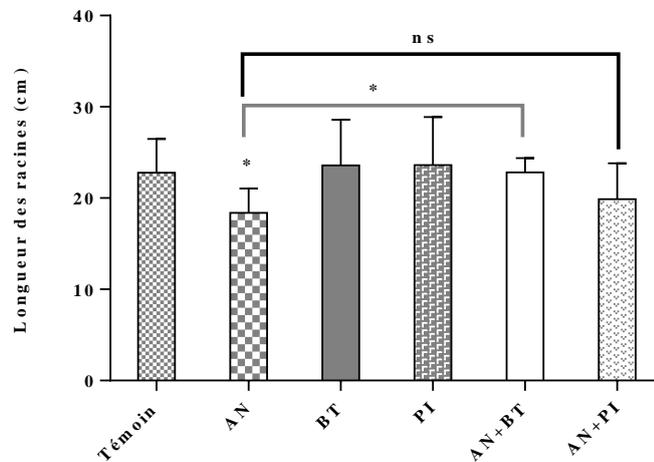


Figure 28 : Les longueurs des racines de l’ail dans le test de biocontrôle

ns : Non significative ; * : significative (P< 0.04)

Selon le graphe ci-dessus, *A. niger* a affecté significativement (p<0,04) la longueur des racines, avec une valeur de 18,04±2.66 comparée à celle du témoin (22,8±3,7). Ce résultat signifie que cet agent phytopathogène a altéré l’un des mécanismes fonctionnels de la plante et par conséquent il a provoqué un ralentissement de sa croissance. D’autre part le traitement par les souches bactériennes, des gousses infectées, montre que seul la souche BT a pu restaurer significativement (p<0,029) la croissance des racines de l’ail. En parallèle la souche PI a montré un effet positif (19.87±3.94) mais non significatif.

Concernant les valeurs du poids des racines, les résultats sont montrés dans les deux graphes ci-dessous.

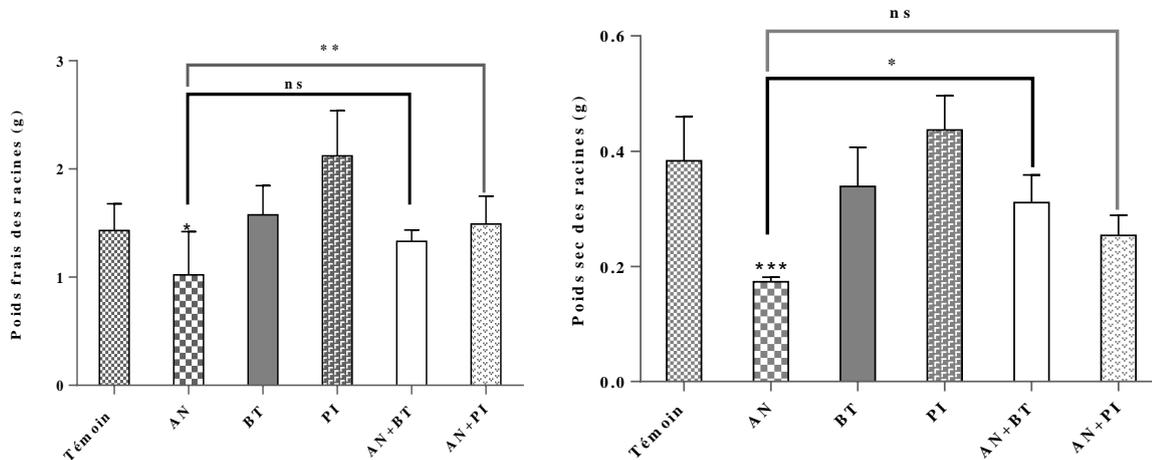


Figure 29 : Les poids frais et sec des racines de l’ail dans le test de biocontrôle

ns : Non significative ; * : Significative (P< 0.016) ; ** : Significative (P< 0.0098)

*** : Significative (P<0.0018)

D’après nos résultats, *A. niger* affecté significativement les deux paramètres poids frais et sec des racines ($p < 0,016$; $p < 0,0009$) respectivement. Contrairement aux résultats trouvés dans le paramètre précédent, la souche PI a significativement ($p < 0,009$) restauré le poids frais des racines infecté par *A. niger* ($49 \pm 0,26$) comparé au témoin positif ($1,02 \pm 0,40$). Cependant, leur effet sur le poids sec n’est pas significatif ($p > 0,05$). Le potentiel de la souche BT est confirmé dans cette partie, où elle a significativement restauré le poids sec des racines des plantes infectées ($0,31 \pm 0,04$) comparé au témoin infecté ($0,17 \pm 0,007$).

Les résultats de l'effet de l'inoculation bactérienne sur les teneurs de l'ail infecté enchlorophylle sont présentés dans le graphe ci-dessous

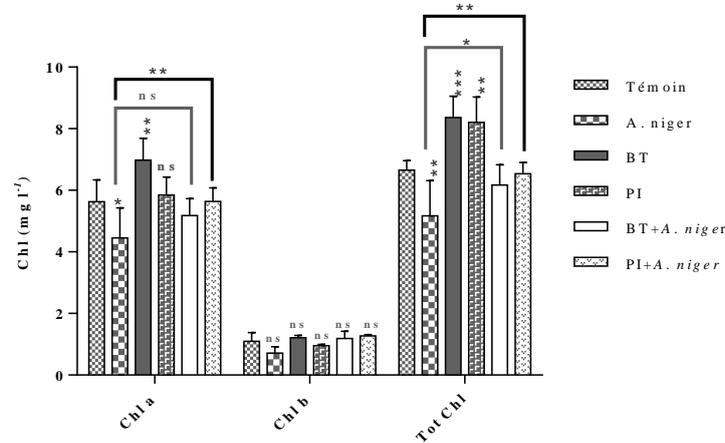


Figure 30 : Quantités de chlorophylle a, b et totale de l'ail dans le test de biocontrôle

ns : Non significative ; * : Significative ($P < 0.012$; $P < 0.02$) ; ** : Significative ($P < 0.0045$; $P < 0.0046$; $P < 0.0019$; $P < 0.0024$; $P < 0.0012$) ; *** : Significative ($P < 0.0004$)

Les résultats obtenus lors de l'analyse des taux de chlorophylle, montrent une réduction significative ($P < 0,012$) du taux de la chlorophylle a dans les plantes infectées par *A. niger* ($4,45 \pm 0,97$) par rapport au témoin ($5,63 \pm 0,7$). Pour la chlorophylle b, une baisse non significative a été enregistrée sur les plantes infectées. Concernant le taux de la chlorophylle totale, *A. niger* a réduit considérablement ($P < 0,0019$) son taux ($5,17 \pm 1,44$) par rapport au témoin ($6,67 \pm 0,3$).

Le traitement par les souches bactériennes semble être efficace contre *A. niger* où les taux des chlorophylles ont été améliorés. Les deux souches ont montré des résultats significatifs ($p < 0.05$), excepté pour la chlorophylle b où l'amélioration n'est pas significative ($p > 0.05$). PI et BT ont montré un effet significatif ($p < 0,0012$) et ($p < 0,002$) sur le taux de la chlorophylle totale avec des pourcentages de $6,53 \pm 0,37$ et $6,17 \pm 0,66$ respectivement.

L'analyse de nos résultats montre que les deux souches bactériennes sélectionnées pour cette étude, (PI et BT) possèdent un potentiel antagoniste remarquable. Elles ont réduit l'altération causée par l'agent pathogène *A. niger*.

Le pouvoir des bactéries rhizosphériques du genre *Bacillus* et *Pseudomonas* à contrôler le développement des champignons phytopathogènes *in vivo*, a été rapporté par plusieurs auteurs.

Wang et al., (2019) dans leur étude sur l'effet des souches du genre *Pseudomonas* et *Bacillus*, dans le biocontrôle d'*A. niger*, ont rapporté que la souche *Pseudomonas* 200, a significativement amélioré le poids frais des parties aériennes et racinaires de l'ail. Les auteurs ont suggéré que cet effet est lié à la capacité de cette souche à solubiliser le phosphate. Dans la même étude, la souche *Bacillus Siamensis*153 s'est avérée la plus efficace dans la réduction de l'incidence de la pourriture blanche de l'ail causé par *Sclerotium cepivore*.

Dans une étude similaire, Elshahawy et al. (2018) ont montré que les souches *B. subtilis*, *B. pumilus* et *P. fluorescens* ont réduit l'incidence de la pourriture blanche d'ail causé par *Stromatinia cepivora* de 80 %, 75 %, 85 % respectivement. Mondani et al. (2021) ont montré que *B. subtilis* réduit l'incidence de la pourriture sèche de l'ail causé par les *Fusarium* spp. de 70,8%.

De plus, Yuttavanichakul et al. (2012) ont rapporté une réduction de 50 % de la pourriture du collet et des racines de l'arachide Co-inoculé par *B. Subtilis*, *B. megaterium* et des souches de genre *Pseudomonas*. De même, la souche *Pseudomonas guariconesis* RA1 s'est avérée capable de restaurer la croissance d'arachides et de réduire de 66 % l'incidence de la pourriture noire, causée par *A. niger* (Patel et al., 2015).

En outre, Bidima et al. (2022) ont rapporté que la souche *B. velezensis* NC318 a pu inhiber de manière significative la pourriture racinaire de la betterave causée par l'agent pathogène *Sclerotium rolfsii*. Cette souche a également amélioré les paramètres de croissance de cette plante (le poids frais de la partie aérienne, le poids frais des racines, la longueur des tiges et le nombre de feuilles).

En outre, Syed et al. (2020) affirment qu'un consortium de PGPR composé de : *Pseudomonas otitidis* souche SLC8 ; *Pseudomonas aeruginosa* souche Kasamber 11 ; *Bacille* espèce ADMK68 et *Bacillus subtilissub* sp. *inaquosorum* souche KCTC 13429, a significativement amélioré les paramètres de croissance d'arachide et que le même consortium s'est avéré le plus efficace contre *A. niger*. D'après ces auteurs le potentiel de ce consortium est lié à la capacité des souches qui le composent à solubiliser le phosphate, à produire l'AIA, l'HCN et l'ammoniac.

2.3. Test *in vivo* de stimulation de la croissance d'ail par les souches bactériennes

De manière similaire au test de biocontrôle, ce test s'est étendu sur une période de 38 jours, et afin d'analyser les résultats, les plantes ont été déracinées et la partie racinaire a été nettoyée et débarrassée du sol adhérent à leur surface. Les mêmes paramètres de croissance ont été mesurés et les résultats obtenus sont résumés dans la figure et les graphes ci-dessous.

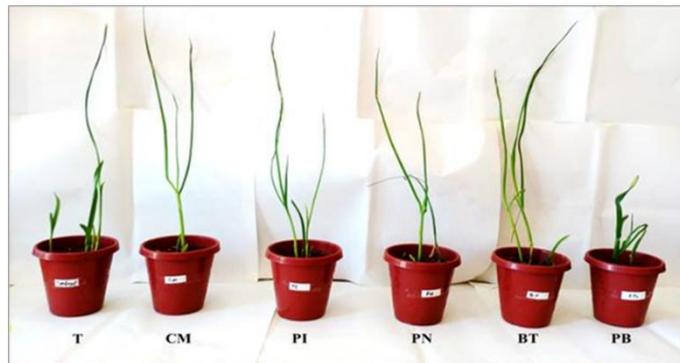


Figure 31 : Résultats du test de stimulation de la croissance de l'ail par les souches bactériennes

Les résultats des longueurs des racines, sont montrés dans le graphe ci-dessous.

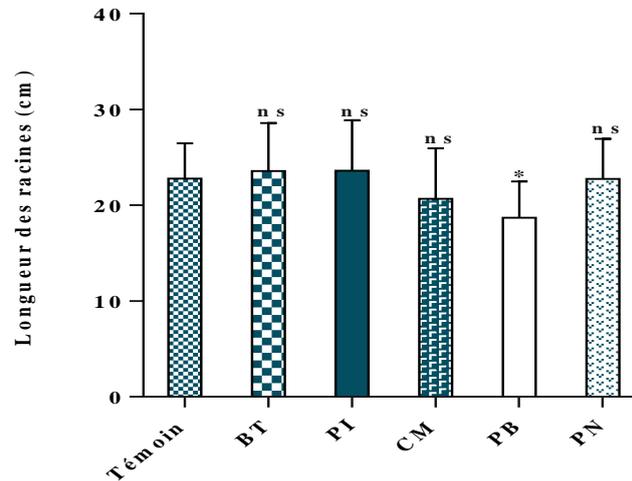


Figure 32 : Les longueurs des racines de l’ail inoculé avec les souches bactériennes

ns : Non significative ($P > 0.05$) ; * : Significative ($P < 0.023$)

D'après les résultats présentés ci-dessus, on observe que les souches *Bacillus thuringiensis* (BT) et *Pseudomonas* sp.I (PI) ont légèrement stimulé la longueur des racines de l'ail, cependant cette différence n'est pas significative ($P > 0.05$). En revanche, la souche *Pseudomonas* sp. B a montré un effet inverse, où elle a affecté de manière significative la croissance des racines ($P < 0.023$). *Cellulosimicrobium* sp. a légèrement réduit la croissance des racines mais de manière non significative.

Les valeurs du poids frais et sec des racines, sont montrées dans les deux graphes ci-dessous.

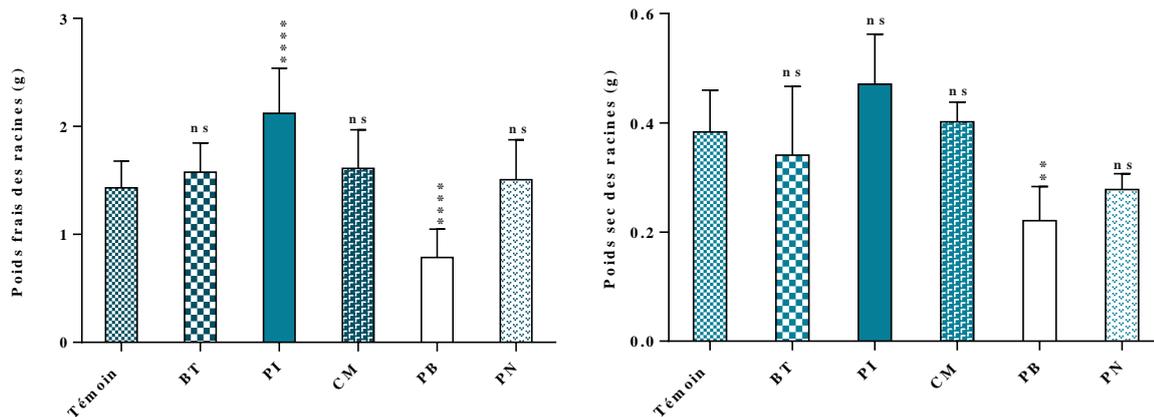


Figure 33 : Les poids frais et sec des racines de l’ail inoculé avec les souches bactériennes
 ns : Non significative ; ** : Significative ($P < 0.0045$; $P < 0.0046$; **** : Significative ($P < 0.0001$)

Sur les paramètres poids frais et sec des racines, la souche PI est la plus performante. Comparée au témoin, cette souche a amélioré significativement ($P < 0.0001$) le poids frais des racines, cependant sur le poids sec, son effet stimulateur n’est pas significatif. Les souches BT, CM et PN ont amélioré modérément le poids frais, toutefois, cette amélioration n’est pas significative ($P > 0.005$). Sur le poids sec, la souche CM a gardé le même effet, cependant les deux autres souches ont montré un effet négatif. Concernant la souche PB, on observe une réduction significative de poids frais ($P < 0.0001$) et sec ($P < 0.0056$) des racines.

Le graphe ci-après présente les résultats de l'effet de l'inoculation bactérienne sur les teneurs de l'ail en chlorophylle.

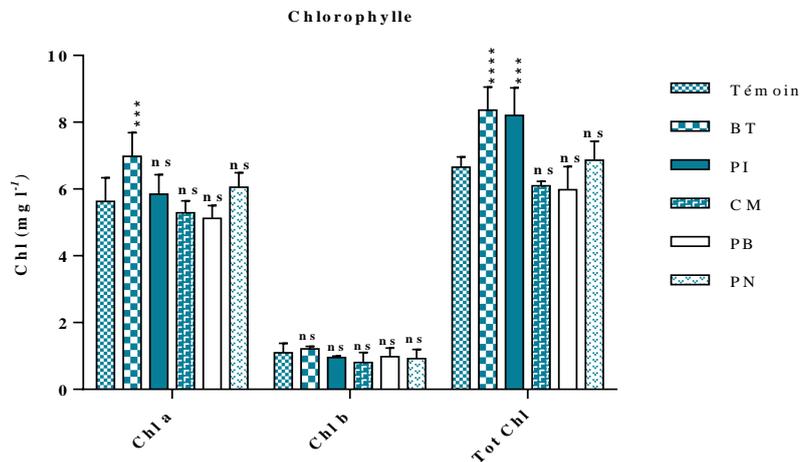


Figure 34 : Quantités de chlorophylle a, b et totale de l'ail inoculés par les souches bactériennes

ns : Non significative ; *** : Significative (P < 0.0005 ; P < 0.0002) ; **** : Significative (P < 0.001)

Les résultats représentés sur le graphe montrent une augmentation significative ($p < 0.0005$) du taux de chlorophylle a dans le cas de plante inoculée par BT. Cette dernière a également amélioré significativement ($p < 0.0001$) le taux de la chlorophylle totale. De même, la souche PI a significativement ($p < 0.0002$) amélioré le taux de la chlorophylle totale contrairement à la chlorophylle a où son effet n'était pas significatif ($p > 0.05$). Concernant les souches CM et PB, les taux n'étaient pas différents de ceux du témoin. La souche PN a amélioré les taux de chlorophylle a et totale, cependant cette amélioration n'était pas significative. Concernant la chlorophylle b, toutes les souches n'ont pas montré une amélioration significative.

Les souches *Pseudomonas* sp. I (PI) et *Bacillus thuringiensis* (BT) sont les plus performantes des souches testées. Notons que la souche PI s'est révélée plus efficace que la souche BT en termes de poids frais et sec. Les deux souches ont montré leur fiabilité dans la promotion de la croissance de la longueur des racines, cependant, leur efficacité n'était pas remarquable.

Selon l'étude menée par Tariq et al. (2023), l'inoculation des plantes avec *Pseudomonas putida* permet l'amélioration de la longueur des racines. Des racines plus longues permettent aux plantes de puiser l'eau plus profondément dans le sol et, par conséquent, les plantes peuvent mieux s'adapter aux conditions de déficit en humidité. De même, *Pseudomonas putida* amélioré le poids sec et le taux de la chlorophylle.

Karthik et Arulselvi (2016) ont rapporté que la souche *Cellulosimicrobium* M032184 (AR6) a stimulé plusieurs paramètres de croissance des plantes, notamment, le taux de la chlorophylle a, b et total, et la longueur des racines. En outre, l'inoculation bactérienne en période de stress peut augmenter la concentration de la chlorophylle en favorisant sa synthèse et en réduisant sa dégradation.

Le potentiel des rhizobactéries dans la stimulation des paramètres de croissance des plantes, est étroitement lié à leurs mécanismes très diversifiés (direct et indirect), notamment la production de phytohormone, la biofertilisation du sol, la lutte contre les phytopathogènes, l'induction des systèmes de résistance des plantes, etc.

Selon l'étude effectuée par Costa Junior et al., (2020). Les auteurs suggèrent que l'effet des souches *B. subtilis* M9A et *B. megaterium* M13C est lié à leur forte capacité à fixer l'azote, à produire l'auxine et à sa capacité à solubiliser le phosphate.

Delshadi et al., (2017) affirme que les bactéries du genre *Pseudomonas*, en plus, de leur pouvoir à modifier l'acidité de leur environnement et les processus enzymatiques, elles sont capables de produire des hormones comme l'auxine et l'acide gibbérellique, ainsi que des vitamines. En outre, les acides produits par les bactéries *Pseudomonas* lors du processus de solubilisation du phosphate contribuent également à réduire le pH du sol et à dissoudre les phosphates. Un autre mécanisme des PGPR pour stimuler la croissance des plantes est l'utilisation de l'enzyme ACC-désaminase pour réduire l'impact négatif d'un excès d'éthylène.

Botelho et al., (2019) affirment que l'inoculation des plantes par les PGPR, notamment les *Pseudomonas fluorescens*, stimule le développement des plantes, en particulier celles qui peuvent solubiliser le phosphate et produire l'acide indolacétique (AIA). Selon Beneduzi et Passaglia (2011), une faible concentration d'acide indolacétique (AIA) stimule la croissance des plantes, tandis qu'une concentration élevée peut inhiber le développement des racines.

Ghadamgahi et al. (2022), dans une étude sur l'inoculation des plantes par des souches du genre *Pseudomonas*, ont rapporté que ces dernières augmentent significativement les niveaux de chlorophylles en raison d'une augmentation des taux de micronutriments assimilables par les plantes et qui sont impliqués dans plusieurs processus, notamment la synthèse de la chlorophylle, le maintien de la structure des chloroplastes et la photosynthèse.

Conclusion

Cette étude établit tant à valoriser l'utilisation des PGPR en agriculture en tant qu'agents de lutte et comme biostimulants. Cette approche est une alternative biologique prometteuse visant à améliorer le développement et la qualité des cultures.

Ce travail avait pour objectif de vérifier le potentiel de cinq rhizobactéries dans la stimulation de la croissance de l'ail et dans le contrôle du développement d'*A.niger ex vivo* et *in vivo*.

Les souches bactériennes testées à savoir *Pseudomonas* sp. I; *Pseudomonas* sp. Na; *Pseudomonas* sp. B6 ; *Bacillus thuringiensis* ; *Cellulosimicrobium* sp., ont montré des profils enzymatiques variables et intéressants pour une éventuelle utilisation dans le domaine agricole.

Les résultats du test de biocontrôle *in vitro* ont révélé que toutes les souches présentent une activité antagoniste intéressante *vis-à-vis* d'*A.niger*, avec des PGI% variables allant de 58% à 81%. En outre, les résultats des tests de production de métabolites antifongiques ont démontré que tous les isolats produisent l'ammoniac et le cyanure d'hydrogène à l'exception de la souche PB.

Le test de biocontrôle d'*A. niger* sur les gousses d'ail a révélé que la co-inoculation des gousses par le champignon suivi des souches a montré une action antagoniste importante *vis-à-vis* de l'agent phytopathogène en inhibant son développement, ce qui confirme les résultats obtenus *in vitro*. De même sur les plantes d'ail, les souches *Pseudomonas* sp. I et *Bacillus thuringiensis* ont montré un potentiel antagoniste remarquable, elles ont réduit significativement l'altération causée par l'agent pathogène.

D'autre part, les résultats du test de stimulation de la croissance de l'ail ont révélé que les souches de *Pseudomonas* sp. I (PI) et de *Bacillus thuringiensis* (BT) étaient les plus performantes comparées aux trois autres souches.

A l'issue de ce travail, nous voudrions présenter quelques perspectives dans le but d'une meilleure utilisation de ces souches bactériennes :

- ✓ Etudier l'effet antagoniste des isolats actifs à l'égard d'autres champignons et bactéries phytopathogènes, *in vitro* et *in vivo*
- ✓ Tester la capacité des souches à produire les molécules impliquées dans la stimulation de la croissance des plants
- ✓ Réaliser l'extraction et l'identification des substances bioactives impliquées dans la lutte biologique et la promotion de la croissance des plantes

*Références
Bibliographiques*

Références Bibliographiques

Abdelwahed, S., Saadouli, I., Kouidhi, S., Masmoudi, A. S., Cherif, A., Mnif, W., & Mosbah, A. (2022). A new pioneer colorimetric micro-plate method for the estimation of ammonia production by plant growth promoting rhizobacteria (PGPR). *Main Group Chemistry*. 21(1), 55-68.

Abdullahi, S., Muhammedi, Y. G., Muhammad, A., Ahmed, J. M., & Shehu, D. (2022). Isolation and characterization of *Bacillus* spp. for plant growth promoting properties. *Acta Biologica Marisiensis*. 5(2) :47-58.

Adedeji, A. A., Häggblom, M. M., & Babalola, O. O. (2020). Sustainable agriculture in Africa: Plant growth-promoting rhizobacteria (PGPR) to the rescue. *Scientific African*. 9, 2468-2276.

Agbodjato, N. A., Noumavo, P. A., Baba-Moussa, F., Salami, H. A., Sina, H., Sèzan, A., & Baba-Moussa L. (2015). Characterization of potential plant growth promoting rhizobacteria isolated from Maize (*Zea mays* L.) in central and Northern Benin (West Africa). *Applied and Environmental Soil Science*.1-9.

Agrillo, B., Mirino S., Tatè, R., Gratino, L., Gogliettino, M., Cocca, E., & Palmieri, G. (2019). An alternative biocontrol agent of soil-borne phytopathogens: A new antifungal compound produced by a plant growth promoting bacterium isolated from North Algeria. *Microbiological research*. 221, 60-69.

Agustiyani, D., Purwaningsih, S., Dewi, T. K., Nditasari, A., Nugroho, A. A., Sutisna, E., Mulyani, N., & Antonius, S. (2022). Characterization of PGPR isolated from rhizospheric soils of various plant and its effect on growth of radish (*Raphanus sativus* L.). In *IOP Conference Series: Earth and Environmental Science*, 976, IOP Publishing, pp 1755-1315.

Ahmad, N., Shinwari, Z.K., Bashi, S., & Yasir M. (2013). Function and Pylogenetic Characterization Of Rhizospheric Bacteria Associated with GM And Non GM Maize. *Pak. J. Bot.* 45, 1781-1788.

Alori, E. T., Glick, B. R., & Babalola, O. O. (2017). Microbial Phosphorus Solubilization and Its Potential for Use in Sustainable Agriculture. *Frontiers in Microbiology*. 8, 1-8.

Amara, U., Khalid, R., & Hayat, R. (2015). Soil bacteria and phytohormones for sustainable crop production, *In: Maheshwari D. K. (ed.), Bacterial metabolites in: sustainable agro-ecosystem*, 12, Springer International Publishing Switzerland, 87-103.

Arif, F. (2015). Effets du stress salin et d'osmoprotecteurs naturels sur la germination de blé dur (*Triticum durum*) inoculé par *Pseudomonas fluorescens*. Thèse de Doctorat, Université Ferhat Abbas, Sétif 1. Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie, Sétif, 155.

Arnon, D.T. (1949). Copper enzyme in isolated chloroplasts polyphenoloxidase in *Beta vulgaris*. *Plant Physiol*. 24: 1-15.

Aumer, T. (2019). Étude du mécanisme d'action d'un peptide antifongique de la famille des héliomicines pour contrôler le champignon phytopathogène *Botrytis cinerea*. Thèse de Doctorat, Université Grenoble Alpes. Chimie-Physique, France, 235

Avinash, T. S., & Rai, R. V. (2014). Antifungal activity of plant growth promoting rhizobacteria against *Fusarium oxysporum* and *Phoma* sp. of cucurbitaceae, in : *Microbial diversity and biotechnology in food security*, Springer India, 257-264.

Badaoui, M. (2018). Contribution à l'étude de la dynamique des populations de *Tuta absoluta* Meyrick (*Lepidoptera ; Gelechiidae*) et essais de contrôle biologique sur la culture de tomate. Thèse de Doctorat, Université Abdelhamid Ibn Badis de Mostaganem. Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie, Mostaganem, 151.

Bajimaya, M., Basnet, S., Malla, S., & Thapa, L. P. (2022). Bioactive Biomolecules from Plant Growth-Promoting Rhizobacteria (PGPR). *In: Sayyed R. Z. (eds.), Antifungal Metabolites of Rhizobacteria for Sustainable Agriculture*, Springer Nature Switzerland, pp 157-178.

Basu, A., Prasad, P., Das, S. N., Kalam, S., Sayyed, R. Z., Reddy, M. S., & El Enshasy, H. (2021). Plant growth promoting rhizobacteria (PGPR) as green bioinoculants: recent developments, constraints, and prospects. *Sustainability*. 13(3),1140.

Ben Miri, Y. (2019). Etude du potentiel antifongique, anti-aflatoxinogène et antioxydant de certaines huiles essentielles et leur efficacité dans le système alimentaire. Thèse de Doctorat, Université Mouloud Mammeri, Tizi Ouzou. Faculté des Sciences Biologiques et des Sciences Agronomiques, Tizi Ouzou, 192.

Beneduzi, A. & Passaglia, L.M.P. (2011). Genetic and Phenotypic Diversity of Plant Growth Promoting Bacilli. *In: Maheshwari D.K. (Eds.), Bacteria in Agrobiolgy: Plant Growth Responses.* Springer-Verlag, Berlin Heidelberg. 1-20.

Benlamoudi, W. (2021). Isolement et identification de quelques agents responsables des maladies fongiques de la tomate (*Lycopersicum esculentum* L.) dans la région d'Oued Righ et essais de lutte biologique (*In Vitro* et *In Vivo*) en utilisant *Trichoderma asperellum* contre *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici*. Thèse de Doctorat. Université Kasdi Merbah, Ouargla. Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie, Ouargla, 153.

Benmati, M. (2014). PGPR, paranodules, stimulation de la croissance et tolérance au déficit hydrique chez le blé dur (*Triticum durum* Desf.) : Aspects moléculaires et génétiques. Thèse de Doctorat, Université Constantine 1. Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie, Constantine, 181.

Bensidhoum, L. (2016). Effet des extraits d'algues marines et d'une souche de *Pseudomonas protegens* S5LiBe résistante aux métaux lourds sur la croissance de l'orge et le biocontrôle d'agents phytopathogènes. Thèse de Doctorat, Université Abderrahmane Mira, Bejaia. Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie, Bejaia, 227.

Bensidhoum, L., & Nabti, EL. H. (2019). Plant growth-promoting bacteria for improving crops under saline conditions. *In: Giri B., and Varma A. (eds.), Microorganisms in saline environments: strategies and functions,* 56, Springer Nature Switzerland, 329-352.

Bensidhoum, L., Ait Bessai, S., & Nabti, E. (2019). Restoration of plant growth under saline soil by halotolerant plant growth-promoting rhizobacteria (PGPR). *In: Kumar M., Etesami H., and Kumar V. (eds.), Saline soil-based agriculture by halotolerant microorganisms,* Springer Nature Singapore, 23-51.

Bensidhoum, L., Nabti, E., Tabli, N., Kupferschmied, P., Weiss, A., Rothballer, M., & Hartmann, A. (2016). Heavy metal tolerant *Pseudomonas protegens* isolates from agricultural well water in northeastern Algeria with plant growth promoting, insecticidal and antifungal activities. *European Journal of Soil Biology.* 75, 38-46.

Bensidhoum, L., Nabti, EL. (2020). Biofertilizers and Biopesticides: Microbes for Sustainable Agriculture. *In: Yadav, A., Rastegari, A., Yadav, N., Kour, D. (eds) Advances in Plant Microbiome and Sustainable Agriculture. Microorganisms for Sustainability,* vol 19. Springer, Singapore, pp, 257–279.

- Bensidhoum, L., Rai, A., Tabli, N., Kahouadji, N., Khaber, M., & Nabti EL.H. (2015).** Biological Control of *Botrytis cinerea* by *Bacillus* sp strain S7LiBe under abiotic stress. International Journal of Scientific Research in Science and Technology. 6,07-14.
- Bestami, M., Rokaia, B. M., Kheira, F., & Asmaa, B. (2020).** Biological control by Plant Growth Promoting Rhizobacteria. Algerian Journal Of Biosceinces, 1(02), 30-36.
- Bhattacharyya, C., Banerjee, S., Acharya, U., Mitra, A., Mallick, I., Haldar, A., ... & Ghosh, A. (2020).** Evaluation of plant growth promotion properties and induction of antioxidative defense mechanism by tea rhizobacteria of Darjeeling, India. Scientific reports, 10(1), 15536.
- Bidima, M. G. S., chtaina, N., Ezzahiri, B., El Guilli, M., Khezane, A., & Barakat, I. (2022).** Efficacité d'une souche de *Bacillus velezensis* dans le biocontrôle de la pourriture racinaire de la betterave à sucre due à *Sclerotium rolfsii*. Revue Marocaine des Sciences Agronomiques et Vétérinaires.10(4).
- Bjelić, D., Ignjatov, M., Marinković, J., Milošević, D., Nikolić, Z., Gvozdanović-Varga, J., & Karaman, M. (2018).** Bacillus isolates as potential biocontrol agents of *Fusarium* clove rot of garlic. Zemdirbyste-Agriculture. 105(4), 369-376.
- Botelho, G. R., Leoncio, M. R., Orsi, B., Coser, E., Eutrópio, G. R., De Armas, R. D., ... & Zilli, J. E. (2019).** Plant growth promoting bacteria from garlic sowed at Curitiba micro-region-Santa Catarina-Brazil. Ciencia del suelo. 37(1), 51-65.
- Capuccino J.C. et Sherman N. (1992).** Negative staining. *In*: Capuccino J.C. et Sherman N. (Eds), Microbiology: A laboratory Manual. Redwood City, CA: Benjamin/Cummings. pp. 125-179.
- Carder, J. H. (1986).** Detection and quantitation of cellulase by Congo red staining of substrates in a cup-plate diffusion assay. Analytical Biochemistry, 153(1), 75–79.
- Carrim, A. J. I., Barbosa, E. C., & Vieira, J. D. G. (2006).** Enzymatic activity of endophytic bacterial isolates of *Jacaranda decurrens* Cham. (Carobinha-do-campo). Brazilian Archives of Biology and Technology, 49(3), 353–359.
- Cavalcanti, V. P., Araújo, N. A. F., Machado, N. B., Júnior, P. S. P. C., Pasqual, M., Alves E., & Doria, J. (2020).** Yeasts and *Bacillus* spp. as potential biocontrol agents of *Sclerotinia sclerotiorum* in garlic. Scientia Horticulturae. 261,108931.

- Chaudhary, P., Jain, D., Anand, K., & Mitra, D. (2019).** Biofertilizers: A sustainable approach for plant and soil health. *Microbial Resources for Sustainable Agriculture*. LAP LAMBERT Academic Publishing, 106-119.
- Chavda, H. (2016).** Molecular characterization and management of *Aspergillus niger* Van Tieghem causing black mold of garlic (*Allium sativum* L.). *Biology*.
- Cherif, H. (2014).** Amélioration de la croissance du blé dur en milieu salin par inoculation avec *Bacillus* sp. Et *Pantoea agglomerans* isolées de sols arides. Thèse de Doctorat, Université Ferhat Abbas Sétif 1. Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie, Sétif,162.
- Cherif-Silini, H., Silini, A., Yahiaoui, B., Ouzari, I., & Boudabous, A. (2016).** Phylogenetic and plant-growth-promoting characteristics of *Bacillus* isolated from the wheat rhizosphere. *Annals of Microbiology*. 66(3), 1087-1097.
- Choudhary, P., Bhowmik, A., Verma, S., Srivastava, S., Chakdar, H., & Saxena, A. K. (2023).** Multi-substrate sequential optimization, characterization and immobilization of lipase produced by *Pseudomonas plecoglossicida* S7. *Environmental Science and Pollution Research*. 30(2), 4555-4569.
- Corbaz R. (1990).** Principes de phytopathologie et de lutte contre les maladies des plantes. PPUR presses polytechniques. Presses polytechnique et universitaire romandes. CH-1015 ausanne. Imprimé en Suisse par Schuler SA, Bienne ISBN 2-88074-201-3.
- Costa Júnior, P. S. P., Cardoso, F. P., Martins, A. D., Teixeira Buttrós, V. H., Pasqual, M., Dias, D. R., & Dória, J. (2020).** Endophytic Bacteria of Garlic Roots Promote Growth of Micropropagated Meristems. *Microbiological Research*, 126585.
- Delshadi, S., Ebrahimi, M. & Shirmohammadi, E. (2017).** Influence of Plant-Growth-Promoting Bacteria on Germination, Growth and Nutrients' Uptake of *Onobrychis sativa* L. under Drought Stress. *Journal of Plant Interactions*. 12 (1), 200-208.
- Dimkić, I., Janakiev, T., Petrović, M., Degrassi, G., & Fira, D. (2022).** Plant-associated *Bacillus* and *Pseudomonas* antimicrobial activities in plant disease suppression via biological control mechanisms-A review. *Physiological and Molecular Plant Pathology*.117, 101754.
- Djenane, Z., Nateche, F., Amziane, M., Gomis-Cebolla, J., El-Aichar, F., Khorf ; H., & Ferré J. (2017).** Assessment of the antimicrobial activity and the entomocidal potential of *Bacillus thuringiensis* isolates from Algeria. *Toxins*. 9(4) : 139.

- Dou, D., & Zhou, J.-M. (2012).** Phytopathogen Effectors Subverting Host Immunity: Different Foes, Similar Battleground. *Cell Host & Microbe*. 12(4), 484–495.
- Driss, F., Kallassy-Awad, M., Zouari, N., & Jaoua, S. (2005).** Molecular characterization of a novel chitinase from *Bacillus thuringiensis* subsp. *kurstaki*. *Journal of applied microbiology*. 99(4), 945-953.
- Duhan, L., Kumari, D., Verma, R., & Pasrija, R. (2022).** Fungal Hydrolytic Enzymes Produced by Plant Growth-Promoting Rhizobacteria (PGPR). *In: Sayyed R. Z., and Uarrota V. G. (ed.), Secondary Metabolites and Volatiles of PGPR in Plant-Growth Promotion, Springer Nature Switzerland, pp 313-333.*
- El Khoury, A. (2007).** Champignons Mycotoxinogènes et Ochratoxine A (OTA) et Aflatoxine B1 (AFB1) dans les vignobles libanais : Occurrence et Origine. Thèse de Doctorat. Université Saint Joseph de Beyrouth. École doctorale Sciences et Santé, Beyrouth ,213.
- Elshahawy, I. E., Saied, N. M., Abd-El-Kareem, F., & Morsy, A. A. (2018).** Field application of selected bacterial strains and their combinations for controlling onion and garlic white rot disease caused by *Stromatinia cepivora*. *Journal of Plant Pathology*.100, 493-503.
- Fan, H., RU J., Zhang, Y., Wang, Q., & Li, Y. (2017).** Fengycin produced by *Bacillus subtilis* 9407 plays a major role in the biocontrol of apple ring rot disease. *Microbiological Research*. 199, 89-97.
- Fatima, T., Verma, P., Verma, S., Alaylar, B., & Arora, N. K. (2022).** Role of Metabolites Produced by Plant Growth-Promoting Bacteria in Biocontrol of Phytopathogens Under Saline Conditions. *In: Microbial BioTechnology for Sustainable Agriculture, Vol 1 Singapore: Springer Nature Singapore, pp,287-324.*
- Fatima, T., Verma, P., Verma, S., Alaylar, B., & Arora, N. K. (2022).** Role of Metabolites Produced by Plant Growth-Promoting Bacteria in Biocontrol of Phytopathogens Under Saline Conditions. *In: Arora N. K., and Bouizgarne B. (eds.), Microbial BioTechnology for Sustainable Agriculture 1, Springer Nature Singapore, 287-324.*
- Fernandez-Acero, F., Carbu, M., Garrido, C., Vallejo, I., & Cantoral, J. (2007).** Proteomic Advances in Phytopathogenic Fungi. *Current Proteomics*. 4(2), 79–88.

- Fernando, W. D., Nakkeeran, S., & Zhang, Y. (2006).** Biosynthesis of antibiotics by PGPR and its relation in biocontrol of plant diseases, *In: Siddiqui Z. A. (ed.), PGPR: biocontrol and biofertilization*, Springer, Dordrecht, The Netherlands, pp 67-109.
- Fernando, W. D., Ramarathnam, R., Krishnamoorthy, A. S., & Savchuk, S. C. (2005).** Identification and use of potential bacterial organic antifungal volatiles in biocontrol. *Soil Biology and Biochemistry*, 37(5), 955-964
- Foughalia, A. (2022).** Recherche d'agents de lutte biologique d'origine microbienne contre des champignons phytopathogènes. Thèse de Doctorat, Université Mohamed Khider de Biskra. Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie, Biskra,133
- Gebreel, H. M., El-Mehalawy, A. A., El-Kholy, I. M., Rifaat, H. M., & Humid, A. A. (2008).** Antimicrobial activities of certain bacteria isolated from Egyptian soil against pathogenic fungi. *Research Journal of Agriculture and Biological Sciences*. 4(4), 331-339.
- Getahun, A., Muleta, D., Assefa, F., Kiros, S., & Hungria, M. (2022).** Phytobeneficial traits of Rhizobacteria isolated from degraded soil and evaluate their effect in augmentation of Acacia (*Acacia abyssinica* Hochst. Ex Benth) seeds germination. *SINET : Ethiopian Journal of Science*. 45(3), 330-346.
- Ghadamgahi, F., Tarighi, S., Taheri, P., Saripella, G. V., Anzalone, A., Kalyandurg, P. B., & Vetukuri, R. R. (2022).** Plant growth-promoting activity of *Pseudomonas aeruginosa* FG106 and its ability to act as a biocontrol agent against potato, tomato and taro pathogens. *Biology*. 11(1), 140.
- Grzegorezyk, M.; Zarowska, B., Restuccia, C., & Cirvilleri, G, (2017).** Postharvest biocontrol ability of killer yeasts against *Monilinia fructigina* and *Monilina fruticola* on stone fruit . *food Microbiol* .61, 93-101.
- Gupta, G., Parihar, S. S., Ahirwar, N. K., Snehi, S. K., & Singh, V. (2015).** Plant growth promoting rhizobacteria (PGPR): current and future prospects for development of sustainable agriculture. *J Microb Biochem Technol*. 7(2), 096-102.
- Haas, D., & Défago, G. (2005).** Biological control of soil-borne pathogens by *fluorescent pseudomonads*. *Nature Reviews Microbiology*.3(4), 307–319.

- Han, J. H., Shim, H., Shin, J. H., & Kim, K. S. (2015).** Antagonistic activities of *Bacillus* spp. strains isolated from tidal flat sediment towards anthracnose pathogens *Colletotrichum acutatum* and *C. gloeosporioides* in South Korea. *The plant pathology journal*, 31(2), 165.
- Harshit, C., & Minesh, G.S. (2023).** Bio-efficacy of Antagonists and its Culture Filtrates against Black Mould Rot [*Aspergillus niger* Van Tieghem] of Garlic (*Allium sativum* L.). *Agricultural Science Digest*, 1-7.
- Hiscox, J.D., & Tsraelstam, G.F. (1979).** A method for the extraction of chlorophyll from leaf tissue without maceration. *Can. J. Bot.* 57: 1332-1334
- Indriati, G., Megahati, R. R. P., & Rosba, E. (2018).** Potency of Amylase-producing Bacteria and Optimization Amylase Activities. In *IOP Conference Series: Materials Science and Engineering*, 335, IOP Publishing, pp 012023.
- Islam, M. R., Jeong, Y. T., Lee Y. S., & Song C. H. (2012).** Isolation and identification of antifungal compounds from *Bacillus subtilis* C9 inhibiting the growth of plant pathogenic fungi. *Mycobiology*. 40(1), 59-65.
- Jadhav, H. P., & Sayyed, R. Z. (2016).** Hydrolytic enzymes of rhizospheric microbes in crop protection. *MOJ Cell Sci Rep.* 3(5), 135-136.
- Jalil, S. U., Mishra, M., & Ansari, M. I. (2015).** Current view on chitinase for plant defence. *Trends in Biosciences*. 8 (24) ,6733-6743.
- Jijakli, M.H. (2003).** La lutte biologique en phytopathologie, *In* : Lepoivre Ph, *Phytopathologie*, 1^{er} édition De Boeck Université. Rue des minimes 39, B-1000 Bruxelles. ISBN 978-28041-411s5-8. 289-311.
- Joseph, B., Patra, R. R., & Lawrence, R. (2007).** Characterization of plant growth promoting rhizobacteria associated with chickpea (*Cicer arietinum* L.). *International Journal of Plant Production*. 1(2), 141-152.
- Jošić, D., Ćirić, A., Soković, M., Stanojković-Sebić, A., Pivić, R., Lepšanović, Z., & Glamočlija, J. (2015).** Antifungal activities of indigenous plant growth promoting *Pseudomonas* spp. from alfalfa and clover rhizosphere. *Frontiers in Life Science*. 8(2), 131-138.
- Jost, J. P., & Jost-Tse, Y. C. (2016).** Stratégie de défense des plantes contre les maladies et les parasites (et: quelques applications prat. Editions Publibook.

- Karthik, C., & Arulselvi, P. I. (2016).** Biotoxic Effect of Chromium (VI) on Plant Growth-Promoting Traits of Novel *Cellulosimicrobium funkei* Strain AR8 Isolated from *Phaseolus vulgaris* Rhizosphere. *Geomicrobiology Journal*, 1–9.
- Karthik, C., Oves, M., Thangabalu, R., Sharma, R., Santhosh, S. B., & Arulselvi, P. I. (2016).** *Cellulosimicrobium funkei*-like enhances the growth of *Phaseolus vulgaris* by modulating oxidative damage under Chromium (VI) toxicity. *Journal of Advanced Research*. 7(6), 839-850.
- Kavitha T., Nelson R. et Jesi S.J. (2013).** Screening of rhizobacteria for plant growth promoting traits and antifungal activity against charcoal rot pathogen *Macrophomina phaseolina*, *Int. J. Pharm. Bio Sci.* 4: 177-186.
- Khadiri, M., Boubaker, H., Askarne, L., Ezrari, S., Radouane, N., Farhaoui, A., & Lahlali, R. (2023).** *Bacillus cereus* B8W8 an effective bacterial antagonist against major postharvest fungal pathogens of fruit. *Postharvest Biology and Technology*. 200, 112315.
- Khalil, M. S. M., Hassan, M. H. A. R., Mahmoud, A. F., & Morsy, K. M. M. (2022).** Involvement of secondary metabolites and extracellular lytic enzymes produced by plant growth promoting rhizobacteria in inhibiting the soilborne pathogens in Faba Bean Plants. *Jurnal Hama dan Penyakit Tumbuhan Tropika*. 22(2), 100-108.
- Kopečný, J., Hodrová, B., & Stewart, C.S. (1996).** The isolation and characterization of a rumen chitinolytic bacterium. *Lett. Appl. Microbiol.* 23 :195-198.
- Kumar, A., Bahadur, I., Maurya, B. R., Raghuwanshi, R., Meena, V. S., Singh, D. K., & Dixit, J. (2015).** Does a plant growth-promoting rhizobacteria enhance agricultural sustainability? *J Pure Appl Microbiol.* 9(1), 715-724.
- Kumar, R., Swapnil, P., Meena, M., Selpair, S., & Yadav, B. G. (2022).** Plant Growth-Promoting Rhizobacteria (PGPR): Approaches to Alleviate Abiotic Stresses for Enhancement of Growth and Development of Medicinal Plants. *Sustainability*. 14(23), 15514.
- Lahouar, A. (2016).** Mycotoxines et champignons mycotoxinogènes dans les grains de sorgho commercialisé en Tunisie : Incidence et profils écophysiologicals. Thèse de Doctorat, Université de Lérída. Faculté Sciences Biologiques, Biotechnologie et Santé, Espagne, 225.
- Laib, B. (2021).** Bioremédiation des sols pollués (Nickel, Cuivre, Cadmium) par deux souches fongiques : *Fusarium oxysporum* et *Aspergillus niger*. Thèse de Doctorat. Université Badji Mokhtar, Annaba. Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie, Annaba, 267.

- Lemanceau, P. (1992).** Effets bénéfiques de rhizobactéries sur les plantes : exemple des *Pseudomonas* spp fluorescents. *Agronomie*. 12(6), 413-437.
- Lima, M. A., de Oliveira, M. da C., Pimenta, A., & Uchôa, P. (2019).** *Aspergillus niger*: A Hundred Years of Contribution to the Natural Products Chemistry. *Journal of the Brazilian Chemical Society*. 30, 2029-2059.
- Lopez, A. M. Q., Silva, A. L. D. S., Maranhão, F. C. D. A., & Ferreira, L. F. R. (2022).** Plant Growth Promoting Bacteria: Aspects in: Metal Bioremediation and Phytopathogen Management. *In: Kumar A. (ed.), Sustainable Agriculture and Phytopathogen Management*, 1, Springer Nature Switzerland, 51-78.
- Lorck H. (1948).** Production of hydrocyanic acid by bacteria. *Physiol. Plant*. 1 :142-146.
- Lugtenberg B et Kamilova F. (2009).** Plant-Growth-Promoting Rhizobacteria *Annu. Rev. Microbiol.*63, 541-556
- Lukkani, N. J., & Reddy, E. S. (2014).** Evaluation of plant growth promoting attributes and biocontrol potential of native fluorescent *Pseudomonas* spp. against *Aspergillus niger* causing collar rot of ground nut. *International Journal of Plant, Animal and Environmental Sciences*. 4, 256-262.
- Martin, J., Ba, A., Dimanche, P., & Schilling, R. (1999).** Comment lutter contre la contamination de l'arachide par les aflatoxines ? expériences conduites au Sénégal. *Agriculture et développement*, 23, 58-67.
- Martínez-Absalón, S., Rojas-Solís, D., Hernández-León, R., Prieto-Barajas, C., Orozco-Mosqueda, M. D. C., Peña-Cabriales, J. J., & Santoyo, G. (2014).** Potential use and mode of action of the new strain *Bacillus thuringiensis* UM96 for the biological control of the grey mould phytopathogen *Botrytis cinerea*. *Biocontrol Science and Technology*. 24(12), 1349-1362.
- Mekonnen, H., & Kibret, M. (2021).** The roles of plant growth promoting rhizobacteria in sustainable vegetable production in Ethiopia. *Chemical and Biological Technologies in Agriculture*. 8(1), 1-11.
- Meng, J., Zhang, X., Han, X., & Fan, B. (2022).** Application and Development of Biocontrol Agents in China. *Pathogens*, 11(10), 1120.

- M'Henni, Y. B. (2020).** Gestion de la maladie de dépérissement du pommier : criblage in vitro et in planta des activités protectrices d'une collection de microorganismes contre les Pythiacées et caractérisation chimique du principal actif produit par l'isolat *A. westerdijkiae* A7. Thèse de Doctorat, Université Paris-Saclay, Paris. Biologie végétale, Paris, 177.
- Miljaković, D., Marinković, J., & Balešević-Tubić, S. (2020).** The significance of *Bacillus* spp. in disease suppression and growth promotion of field and vegetable crops. *Microorganisms*. 8(7), 1037.
- Mokrani, S., Rai, A., Belabid, L., Cherif, A., Cherif, H., Mahjoubi, M., & Nabti, E. (2019).** *Pseudomonas* diversity in western Algeria: role in the stimulation of bean germination and common bean blight biocontrol. *European Journal of Plant Pathology*. 153, 397-415.
- Mondani, L., Chiusa, G., & Battilani, P. (2021).** Chemical and biological control of *Fusarium* species involved in garlic dry rot at early crop stages. *European Journal of Plant Pathology*, 160, 575-587.
- Morales-Garcia, Y. E., Baez, A., Quintero-Hernández, V., Molina-Romero, D., Rivera-Urbalejo, A. P., Pazos-Rojas, L. A., & Muñoz-Rojas, J. (2019).** Bacterial mixtures, the future generation of inoculants for sustainable crop production, *In: Maheshwari D. K., and Dheeman S. (eds.), Field crops: sustainable management by PGPR, Sustainable Development and Biodiversity 23, Springer Nature Switzerland, 11-44.*
- Mustafa, S., Kabir, S., Shabbir, U., & Batool, R. (2019).** Plant growth promoting rhizobacteria in sustainable agriculture: from theoretical to pragmatic approach. *Symbiosis*. 78, 115-123.
- Nabti, E., Bensidhoum, L., Tabli, N., Dahel, D., Weiss, A., Rothballer, M., & Hartmann, A. (2014).** Growth stimulation of barley and biocontrol effect on plant pathogenic fungi by a *Cellulosimicrobium* sp. strain isolated from salt-affected rhizosphere soil in ; northwestern Algeria. *European Journal of Soil Biology*. 61, 20-26.
- Naz, R., Fatima, Q., Zaheer, M., Anwar, Z., & Ansari, M. J. (2022).** Metabolites of *Bacillus* spp. to Control Fungal Phytopathogens. *In: Sayyed R. Z., and Uarrota V. G. (eds.), Secondary Metabolites and Volatiles of PGPR in Plant-Growth Promotion, Springer Nature Switzerland, pp 173-198.*

- Niranjan Raj, S., Shetty, H. S., & Reddy, M. S. (2006).** Plant growth promoting rhizobacteria: potential green alternative for plant productivity. PGPR: biocontrol and biofertilization. Springer. Printed in the Netherlands. 197-216.
- Ouf, S. A., El-Amriti, F. A., Abu-Elghait, M. A., Desouky, S. E., & Mohamed, M. S. (2023).** Role of Plant Growth Promoting Rhizobacteria in Healthy and Sustainable Agriculture. *Egyptian Journal of Botany*. 63(2),333-359.
- Patel, R. R., Thakkar, V. R., & Subramanian, B. R. (2015).** A *Pseudomonas guariconensis* strain capable of promoting growth and controlling collar rot disease in *Arachis hypogaea* L. *Plant and Soil*. 390, 369-381.
- Pérez-Álvarez, S., Ardisana, E. F. H., Magallanes-Tapia, M. A., Bonilla, C. M. E., Garcia C. U., González, M. M., & Guerrero-Morales, S. (2022).** Microorganisms Used as Growth Regulators in Modern Agriculture, *In: Prasad R., and Zhang S. H. (eds.), Beneficial Microorganisms in Agriculture*, Springer Nature Singapore, 37-84.
- Pitt, J. I., & Hocking, A. D. (2022).** Ecology of Fungal Food Spoilage. In *Fungi and food spoilage* Cham: Springer International Publishing. (pp. 3-12).
- Prasad, R., Kumar, M., & Varma, A. (2015).** Role of PGPR in soil fertility and plant health. *Plant-growth-promoting rhizobacteria (PGPR) and medicinal plants*, 247-260.
- Rai, A. (2017).** Effet du stress salin sur les bactéries du sol : rôle d'extraits dérivés de *Enteromorpha intestinalis*, *Ulva lactuca* et *Opuntia ficus-indica* sur la relation bactérie-plante sous stress salin. Thèse de doctorat, Université Ferhat Abbas, Sétif 1. Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie, Sétif ,238p.
- Rai, A., Bensidhoum, L., Tabli, N., Bouaoud, Y., Naili, F., Cristina, C., & Nabti, EL.H. (2016).** A *Pseudomonas Protegens* with High Antifungal Activity Protects Apple Fruits Against *Botrytis Cinerea* Gray Mold. *IJSRST*. 6(2), 227-237.
- Ramette, A., Frapolli, M., Défago, G., & Moëgne-Loccoz, Y. (2003).** Phylogeny of HCN synthase-encoding hcnBC genes in biocontrol fluorescent pseudomonads and its relationship with host plant species and HCN synthesis ability. *Molecular Plant-Microbe Interactions*. 16(6), 525-535.
- Rao, A., Agbo, B., Udoekong, N., & Etuk, H. (2017).** Evaluation of antagonistic potential of soil bacteria against plant pathogenic fungus: *Aspergillus niger*. *Journal of Advances in Microbiology*. 3(2), 1-7.

- Ravigné, V. (2015).** Dynamique d'adaptation des agents pathogènes de plantes. Thèse de Doctorat, Université Montpellier II. Sciences et Techniques du Languedoc, France,65.
- Rawool, P. P., Berde, V. B., Veera Bramha Chari, P., & Parulekar-Berde, C. (2020).** Endophytic microbiomes and their plant growth–promoting attributes for plant health. *In: Yadav, and Tyagi (eds.), Advances in: Plant Microbiome and Sustainable Agriculture, Microorganisms for Sustainability 19, Springer Nature Singapore, 145-158.*
- Reddy, E. C., Reddy, G. S., Goudar, V., Sriramula, A., Swarnalatha, G. V., Al Tawaha, A. R. M., & Sayyed, R. Z. (2022).** Hydrolytic Enzyme Producing Plant Growth-Promoting Rhizobacteria (PGPR) in Plant Growth Promotion and Biocontrol. *In: Sayyed R. Z., & Uarrota V. G. (eds.), Secondary Metabolites and Volatiles of PGPR in Plant-Growth Promotion, Springer Nature Switzerland, pp 303-312.*
- Sagahón IP, Anducho-Reyes MA, Silva-Rojas HV, Arana-Cuenca A, Alejandro Tellez Jurado A, Cárdenas-Álvarez IO et Mercado-Flores Y, (2011).** Isolation of Bacteria with Antifungal Activity against the Phytopathogenic Fungi *Stenocarpella maydis* and *Stenocarpella macrospora*. *International Journal of Molecular Sciences.* 12 :5522-5537
- Sajjad Hyder, Gondal, A. S., Rizvi, Z. F., Ahmad, R., Alam, M. M., Hannan, A., ... & Inam-ul-Haq, M. (2020).** Characterization of native plant growth promoting rhizobacteria and their anti-oomycete potential against *Phytophthora capsici* affecting chilli pepper (*Capsicum annum* L.). *Scientific reports,* 10(1), 1-15.
- Sarita, S., Amirita, R., Amrita, D., Narina Banoo, S., Nidahurmain, S., & Meenu; S. S. (2022).** Plant Growth Promoting Rhizobacteria as Biofertilizers: Application in Agricultural Sustainability. *Acta Scientific Microbiology.* 5,12-21.
- Schuster, E., Dunn-Coleman, N., Frisvad, J. C., & Van Dijck, P. W. (2002).** On the safety of *Aspergillus niger*—a review. *Applied microbiology and biotechnology.* 59, 426-435.
- Seymen, M., Kurtar, E. S., Dursun, A., & Türkmen, Ö. (2019).** Sustainable Agriculture: Assessment of plant growth promoting rhizobacteria in: cucurbitaceous vegetable crops, *In: Maheshwari D. K., and Dheeman S. (eds.), Field crops: sustainable management by PGPR, Sustainable Development and Biodiversity 23, Springer Nature Switzerland, 69-103.*
- Sharma, R. (2012).** Pathogenicity of *Aspergillus niger* in plants. *Cibtech Journal of Microbiology.* 1(1), 47-51.

- Sindhu, S. S., Sehrawat, A., Phour, M., & Kumar, R. (2022).** Nutrient acquisition and soil fertility: Contribution of rhizosphere microbiomes in: sustainable agriculture. *In: Arora N. K., et Bouizgarne B. (eds.), Microbial BioTechnology for Sustainable Agriculture*,1, Springer Nature Singapore, 1-41.
- Singh, M., Pandey, K. D., Rathore, A. C., Sharma, S. P., & Kumar, R. (2022).** Bacterial antagonists: Effective tools for the management of postharvest diseases in fruits, vegetables, and food grains. *In: Kumar, A. (Ed.), Microbial Biocontrol: Food Security and Post-Harvest Management*, 2, Springer Nature Switzerland, pp 295-309.
- Syed, S., Tollamadugu, N. P., & Lian, B. (2020).** *Aspergillus* and *Fusarium* control in the early stages of *Arachis hypogaea* (groundnut crop) by plant growth-promoting rhizobacteria (PGPR) consortium. *Microbiological Research*. 240, 126562.
- Tabli, N., Nabti, E. H., Dahel, D., Mokrane, N., Manyani, H., Dary, M., & Megias, M. G. (2014).** Impact of diazotrophic bacteria on germination and growth of tomato, with bio-control effect, isolated from Algerian Soil. *J. Ecol. Health and Environ*. 2(1), 1-7.
- Tabli, N., Rai, A., Bensidhoum, L., Palmieri, G., Gogliettino, M., Cocca, E., & Nabti, EL.H. (2018).** Plant growth promoting and inducible antifungal activities of irrigation well water-bacteria. *Biological Control*. 117, 78-86.
- Tabuc, C. (2007).** Flore fongique de différents substrats et conditions optimales de production des mycotoxines. Université de Bucarest, Toulouse. Thèse de Doctorat. Pathologie, Mycologie, Génétique et Nutrition, Toulouse, 190.
- Taiwo, L. B., Oyedele, A. O., Ailenokhuoria, B. V., & Okareh, O. T. (2019).** Plant-microbe's relationships in soil ecological system and benefits accruable to food health, *In: Maheshwari D. K., and Dheeman S. (eds.), Field Crops: Sustainable Management by PGPR, Sustainable Development and Biodiversity* 23, Springer Nature Switzerland, pp 177-190.
- Tariq, S., Bano, A., & Khan, N. (2023).** Comparative Analysis of Various Strains of Plant Growth Promoting Rhizobacteria on the Physiology of Garlic (*Allium sativum*). *Natural Science*. 15(3), 79-90.
- Thambugala, K. M., Daranagama, D. A., Phillips, A. J. L., Kannangara, S. D., & Promptutha, I. (2020).** Fungi vs. Fungi in Biocontrol: An Overview of Fungal Antagonists Applied Against Fungal Plant Pathogens. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*. 10.

Thierry, S. (2011). Etude de la diversité génétique et du pouvoir pathogène d'*Aspergillus fumigatus* et de *Chlamydomphila psittaci* chez les oiseaux. Thèse de Doctorat, L'Institut des Sciences et Industries du Vivant et de l'Environnement. Microbiologie et Parasitologie, 214.

Twisha, P. & Desai, P. B. (2014). Study on Rhizospheric microflora of Wild and Transgenic varieties of *Gossypium* species in Monsoon. Res. J. Recent. Sci. 3, 42- 51.

Van Loon, L. C. (2007). Plant responses to plant growth-promoting rhizobacteria. New perspectives and approaches in plant growth-promoting Rhizobacteria research, 243-254.

Vessey, J. K. (2003). Plant growth promoting rhizobacteria as biofertilizers. 255, 571-586.

Vinoth, R.S., Kanikkai, R.A., Babu, V.A., Manoj, G.T., Naman, H.S., Johnson, A.J., Infant, S.B., & Sathiyaseelan K. (2009). Study of starch degrading bacteria from kitchen waste soil in the production of amylase by using paddy straw. Recent Research in Science and Technology 1: 8-13.

Wang, J., Shi, L., Wang, D., Li L., Loake, G. J., Yang, X., & Jiang, J. (2019). White rot disease protection and growth promotion of garlic (*Allium sativum*) by endophytic bacteria. Plant Pathology. 68(8), 1543-1554.

Whipps, J. M. (1987). Effect of media on growth and interactions between a range of soil-borne glasshouse pathogens and antagonistic fungi. New Phytologist, 107(1), 127-142.

Yasmin, H., Nosheen, A., Naz, R., Keyani, R., & Anjum, S. (2019). Regulatory role of rhizobacteria to induce drought and salt stress tolerance in plants, *In: Maheshwari D. K., and Dheeman S. (eds.), Field Crops: Sustainable Management by PGPR, Sustainable Development and Biodiversity 23, Springer Nature Switzerland, 279-335.*

Yi, W., Ziyu, Z., Shujun, Y., Hao L., Noman, A., & Zhang, S. H. (2022). Cellulose Degradation Microorganisms and Environmental-Friendly Solution to the Agricultural Waste Management, *In: Prasad R., et Zhang S. H. (eds.), Beneficial Microorganisms in Agriculture, Springer Nature Singapore, pp, 307-328.*

Yuttavanichakul, W., Lawongsa, P., Wongkaew, S., Teaumroong, N., Boonkerd, N., sincorporation of plant growth promoting rhizobacteria (PGPR) as biocontrol against the seed borne fungus, *Aspergillus niger*. Biological Control. 63(2), 87-97.

Annexe I : Composition des milieux de culture utilisés (pour un litre de milieu)

- **Bouillon nutritif (BN)**

Composition	Quantité
Extrait de bœuf	1 g
Extrait de levure	2 g
Peptone	5 g
Chlorite de sodium	5g
PH	6.8 ± 0.2

- **Le Milieu Plate Count Agar (PCA)**

Composition	Quantité
Agar	9 g
Dextrose	1 g
Tryptone	5 g
Extrait de levure	2,5
PH	7 ± 0.2

- **Le Milieu Trypticase Soy Agar (TSA)**

Composition	Quantité
Digestion pancréatique de caséine	17g
Digestion papaique de soja	3 g
Chlorure de sodium	5 g
Hydrogénophosphate dipotassique	2,5 g
Glucose monohydraté	2,5 g
Agar	15 g
PH	7,3 ± 0,2

- **Gélose nutritive (GN)**

Composition	Quantité
Peptone	5g
Extrait de viande	1 g
Extrait de levure	2 g
NaCl	5 g
Agar	7,5 g
PH	7,2 ± 0.2

- **Eau peptonée (EP)**

Composition	Quantité
Peptone de caséine	1 g
Extrait de levure	5 g
NaCl	5 g
Tween	1 ml

- **Le milieu Potato Dextrose Agar (PDA)**

Composition	Quantité
Agar	15 g
Dextrose	20 g
Filtrat pommes de terre	200 g
PH	6.8 ± 0.2

- **Eau physiologique (EPh)**

Composition	Quantité
NaCl	9g
Eau distillé	1000 ml
PH	7 ± 0,2

Annexe II : Composition de la solution du Lugol

Composition	Quantité
Iodine cristallin	1 g
KI	2 g
Eau distillée	300 ml

Résumé : L'application des rhizobactéries dans le biocontrôle des champignons phytopathogènes est une alternative prometteuse à l'utilisation des moyens de lutte chimique. Ce travail a pour but, la recherche de rhizobactéries avec un potentiel antagoniste *in vitro* et *in vivo* à l'égard d'*A. niger* et avec des critères PGPR. A cet effet, 5 souches bactériennes rhizosphériques (*Pseudomonas* sp. I ; *Pseudomonas* sp. Na ; *Pseudomonas* sp. B6 ; *Bacillus thuringiensis* ; *Cellulosimicrobium* sp.) ont été testés pour leur capacité à produire des enzymes d'intérêt agricole (Chitinase, Protéase, Amylase, cellulase, estérase et lipase) et des métabolites antifongiques (Ammoniac et cyanure d'hydrogène) ainsi que pour leur pouvoir antagoniste à l'égard d'*Aspergillus niger*. Toutes les souches ont été testées pour leur effet sur la croissance de l'ail. Les souches bactériennes (*Pseudomonas* sp. I et *Bacillus thuringiensis*) ont été sélectionné pour le test de biocontrôle d'*A. niger ex vivo* et *in vivo* sur l'ail. Les résultats ont montré que les souches ont des profils enzymatiques variables et intéressants, produisent l'ammoniac et le cyanure d'hydrogène à l'exception de la souche *Pseudomonas* sp. B6, et montrent une activité antagoniste intéressante *vis-à-vis* d'*A.niger*, avec des PGI% variables allant de 58% à 81%. Dans le test *in vivo* de stimulation de la croissance des plantes, les souches *Pseudomonas* sp. I et *Bacillus thuringiensis* étaient les plus performantes comparées aux trois autres souches. Dans le test *ex vivo* et *in vivo* de biocontrôle, les deux souches ont montré un potentiel antagoniste important *vis-à-vis* de l'agent phytopathogène.

Mots-clés : Rhizobactéries ; *A. niger*; Ail, Biocontrôle ; Biofertilisant.

Abstract: The application of rhizobacteria in the biocontrol of phytopathogenic fungi is a promising alternative to the use of chemicals products. This work aims to search for rhizobacteria with *invitro* and *in vivo* antagonistic potential against *A. niger*, as well as PGPR criteria. For this purpose, five rhizospheric bacterial strains (*Pseudomonas* sp. I, *Pseudomonas* sp. Na, *Pseudomonas* sp. B6, *Bacillus thuringiensis*, *Cellulosimicrobium* sp.) were tested for their ability to produce enzymes of agricultural interest (chitinase, protease, amylase, cellulase, esterase, and lipase), as well as antifungal metabolites (ammonia and hydrogen cyanide), and for their antagonistic potential against *Aspergillus niger*. All strains were tested for their effect on garlic growth. The bacterial strains (*Pseudomonas* sp. I and *Bacillus thuringiensis*) were selected for the *ex vivo* and *in vivo* biocontrol test against *A. niger* on garlic. The results showed that the strains had variable and interesting enzymatic profiles, produced ammonia and hydrogen cyanide except for strain *Pseudomonas* sp. B6, and exhibited significant antagonistic activity against *A. niger*, with variable PGI% ranging from 58% to 81%. In the *in vivo* plant growth promoting test, *Pseudomonas* sp. I and *Bacillus thuringiensis* strains outperformed the other three strains. In the *ex vivo* and *in vivo* biocontrol test, both strains demonstrated significant antagonistic potential against the phytopathogenic agent.

Keywords: Rhizobacteria; *A. niger* ; Garlic; Biocontrol ; Biofertilizer.