



جامعة بجاية  
Tasdawit n Bgayet  
Université de Béjaïa

République Algérienne Démocratique et Populaire  
Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique  
Université A.MIRA-BEJAIA

Faculté des sciences de la nature et de la vie  
Département de Microbiologie

Laboratoire de Maitrise des Energies Renouvelables/Equipe Biomasse et Environnement

# THÈSE

Présentée par

**Mme TABLI-CHERIFI Nassira**

Pour l'obtention du grade de

**DOCTEUR EN SCIENCES**

Filière : Biologie

Option : Microbiologie Appliquée

Thème

**Isolement de bactéries à partir des milieux aquatiques productrices des substances antifongiques**

Soutenue le : 26 /06/2018

Devant le Jury composé de :

<b>Nom et Prénom</b>	<b>Grade</b>		
<b>Mr. IGUEROUDA Mokrane</b>	<b>Professeur</b>	Univ. de Bejaia	Président
<b>Mr. NABTI El-Hafid</b>	<b>Professeur</b>	Univ. de Bejaia	Rapporteur
<b>M<sup>me</sup> PALMIERI Gianna</b>	<b>Professeur</b>	IBBR-Naples-Italie	Co-rapporteur
<b>M<sup>me</sup> BEDJOU Fatiha</b>	<b>Professeur</b>	Univ. de Bejaia	Examinatrice
<b>Mr. HOUALI Karim</b>	<b>Professeur</b>	Univ. de Tizi-Ouzou	Examineur
<b>Mr. KHENCHOUCHE A/Halim</b>	<b>MCA</b>	Univ. de Sétif	Examineur

Année Universitaire : 2017/2018

## *Dédicaces*

*À mes chers parents*

*Nassira*

## REMERCIEMENTS

A l'issue de la rédaction de ce manuscrit, je suis convaincue que la thèse est loin d'être un travail solitaire. En effet je n'aurais jamais pu réaliser ce travail doctoral sans le soutien d'un grand nombre de personnes dont la générosité, la bonne humeur et l'intérêt manifesté à l'égard de ma recherche m'ont permis de progresser dans cette phase très délicate.

En premier lieu, je tiens à remercier mon directeur de thèse, Monsieur NABTI EL-H , pour la confiance qu'il m'a accordée en acceptant d'encadrer ce travail, pour ses multiples conseils et pour toute les heures qu'il a consacrées à diriger cette recherche. J'aimerais également lui dire à quel point j'ai apprécié sa grande disponibilité et son respect sans faille des délais serrés de lecture des documents que je lui ai adressés. Enfin, j'ai été extrêmement sensible à ses qualités humaines d'écoute et de compréhension tout au long de ces années de travail.

J'ai l'honneur de formuler ma gratitude et profonde reconnaissance à l'égard du Professeur IGUEROUADA M. d'avoir accepté de présider le jury de ma soutenance

Mes remerciements vont également aux Professeurs BEDJOU F., HOUALI K., et KHENCHOUCHE H, pour avoir accepté de participer à ce jury de thèse, d'avoir donné de leur temps et de leurs intérêts pour l'examiner et l'évaluer,

Je souhaiterais aussi adresser ma gratitude au Professeur PALMIERI G, ma co-promotrice de m'avoir accueilli au sein de son laboratoire de recherche, à l'institut « IBBR-Naples-Italie » de l'intérêt qu'elle a toujours donné à mes manipulations et les résultats obtenus, pour sa disponibilité tout au long de ma période de stage, et la rédaction de mon article et ma thèse,

Merci à Dr COCCA et les membres de son laboratoire pour l'identification phylogénique, et leur disponibilité au moment de besoin,

Ces remerciements seraient incomplets si je n'en adressais pas à l'ensemble de l'équipe de l'institut IBBR-Naples-Italie, en particulier le laboratoire de Pr PALMIERI et Dr COCCA ;

Merci à Marta, Marco, Bruna, Sara, Lorena, Alessia, Carmen, Carmela, Ciro, Sabrina, Rozalia, Antonio, pour la très bonne ambiance que j'ai toujours trouvé à l'institut, je remercie plus particulièrement Dr FABRIZIO et son équipe pour les tests *in vivo*,

Je remercie vivement Mr ABBACI Hocine pour ses encouragements et ses conseils rédactionnels qui m'ont aidé à mener à bien ce travail de thèse,

Un merci tout particulier à une personne que j'ai gagnée comme collègue et amie ; Melle BOUKTIT N, pour ses mots qui dans les moments angoissants de doute, m'ont permis de ne jamais dévier de mon objectif final,

Merci à mes amies en or ; BENSIDHOUM Leila, DAHEL Djamila, MEZHOUD Halima et KHELOUFI Nouria,

Je remercie également toute l'équipe de laboratoire LMER, à leur tête Mr OUZELLAG. et l'équipe de Biomasse et Environnement. Merci à Mr RAI Abdelwahab, Mr DAHDAH Kamel, Mlle, AIT BESSAI Silia, BELKEBLA Nadia et MOKRANI Slimane, pour leurs aides, leurs disponibilités et leurs sympathies, sans oublier ; BOUAOUD Yousra, TITOUCHE Yacine et BELHAMEL Chiraz,

Merci aux ingénieurs des laboratoires ; FATIMA ZOHRA, BADRIA, SAIDA et SAADIA, pour vos aides aux moments de besoin,

Ces remerciements ne peuvent s'achever, sans une pensée à mes chers parents ; je sais que le mot merci ne suffit jamais pour vous récompenser, cette thèse est un cadeau offert spécialement pour vous, c'est le résultat de vos efforts, et je reste toujours reconnaissante pour vous deux. Merci mes chers frères, Karim et sa petite famille, Rafik, Abdelhak, et Boubekeur, mes très adorables sœurs ; NABILA et RIMA, vous étiez et vous êtes toujours à mes côtés à chaque moment de besoin,

Je remercie vivement ma belle-famille, en particulier mes beaux-parents, En fin je remercie mon cher époux pour son soutien quotidien indéfectible et son enthousiasme contagieux à l'égard de mes travaux comme de la vie en général. Notre vie de couple a grandi en même temps que mon projet scientifique. La naissance de 'Amine' a apporté du bonheur et de joie à ma vie et c'était un porte-bonheur aussi car sa naissance a coïncidé avec le début de ce travail de thèse

**Liste des figures**

<b>Figure 01 :</b> Structure chimique des antibiotiques produits par des agents de biocontrôle bactériens et fongiques .....	20
<b>Figure 02 :</b> Site de prélèvement des échantillons d'eau de puits .....	24
<b>Figure 03 :</b> Les étapes suivies pour l'obtention des différents isolats à partir d'eau de puits ..	26
<b>Figure 04 :</b> Étapes de la sélection des souches bactériennes .....	27
<b>Figure 05 :</b> Aspect des espèces fongiques sur milieu à extrait de Malt.....	28
<b>Figure 06 :</b> Mise en évidence de l'inhibition de la croissance mycélienne par les isolats bactériens .....	29
<b>Figure 07 :</b> Inhibition de la germination des spores fongiques ( <i>B. cinerea</i> et <i>A. niger</i> ) par les isolats bactériens .....	30
<b>Figure 08 :</b> Mise en évidence de la production de substances volatiles .....	31
<b>Figure 09 :</b> Recherche de la production de la chitinase.....	32
<b>Figure 10 :</b> Recherche de la production de la protéase.....	33
<b>Figure 11 :</b> mise en évidence des deux activités estérasique et lipasique.....	34
<b>Figure 12 :</b> Recherche de l'activité uréasique.....	35
<b>Figure 13 :</b> Recherche d'activité phosphatasique.....	35
<b>Figure 14 :</b> Recherche de production des sidérophores.....	36
<b>Figure 15 :</b> Recherche de la production d'Acide Indole Acétique (AIA). .....	38
<b>Figure 16 :</b> Mise en évidence de la production de cyanure d'hydrogène.....	39
<b>Figure 17 :</b> Recherche de la production d'ammoniac.....	39
<b>Figure 18 :</b> Les différentes étapes du test d'activité antifongique sur pomme .....	42
<b>Figure 19 :</b> Test de croissance sur tomate montrant la mise en place des pots dans la serre....	47
<b>Figure 20 :</b> <i>Pseudomonas</i> sp. ....	51
<b>Figure 21 :</b> Induction de production de molécules antifongiques par une co- inoculation de <i>Pseudomonas</i> sp. et <i>A. niger</i> sur milieu TSA .....	52
<b>Figure 22 :</b> Etapes suivies pour l'extraction et la purification des protéines membranaires ....	53
<b>Figure 23 :</b> Protocole suivi pour l'extraction des protéines membranaires totales (PM-TOT) et des protéines membranaires retenues à un cut- off de 30KDa (MP-R30) à partir d'une culture de <i>Pseudomonas</i> sp.....	56
<b>Figure 24 :</b> Etapes de purification par sur électrophorèse SDS-page.....	58
<b>Figure 25 :</b> Aspect des quatre souches fongiques sur gélose à Extrait de Malt .....	59

<b>Figure 26 :</b> Effet des PM-TOT et PM-R30 sur la croissance mycélienne de quelques champignons phytopathogènes sur gélose TSA .....	60
<b>Figure 27 :</b> Boudin de dialyse contenant les fractions protéiques.....	62
<b>Figure 28 :</b> Les étapes du test d'antagonisme des PM-R30 à l'égard d' <i>A. niger</i> sur fruits de tomate .....	63
<b>Figure 29 :</b> Effet des PM-R30 (7.35µg/µl) sur la croissance mycélienne d' <i>A.niger</i> .....	64
<b>Figure 30 :</b> Effet fongicide ou fongistatique des fractions protéiques membranaires à l'égard des champignons cibles.....	65
<b>Figure 31 :</b> Pourcentage d'inhibition de la croissance (PGI%) d' <i>Aspergillus niger</i> (A) et <i>B cinerea</i> (B) par les isolats B, C, D, M, N, O, P, K sur gélose à extrait de malt.....	70
<b>Figure 32 :</b> Activités antifongiques <i>in vitro</i> à l'égard de <i>B. cinerea</i> et <i>A. niger</i> des huit isolats bactériens .....	70
<b>Figure 33 :</b> Inhibition de la germination des spores par les huit isolats bactériens.....	73
<b>Figure 34 :</b> PGI% d' <i>A. niger</i> (A) et <i>B. cinerea</i> (B) suite à la production de substances volatiles par les huit isolats.....	75
<b>Figure 35 :</b> Aspect des résultats positifs d'activités enzymatiques testées sur boîtes.....	78
<b>Figure 36 :</b> Production d'AIA par les 8 isolats .....	81
<b>Figure. 37 :</b> Aspect de quelques résultats de test d'antagonisme en double culture après.....	70
jours d'incubation à l'égard de <i>B. cinerea</i> .....	85
<b>Figure 38 :</b> Zones pourries sur fruits de pomme attaqués par <i>Aspergillus niger</i> en présence et en absence des huit isolats.....	86
<b>Figure 39 :</b> Pourcentage d'inhibition de croissance (PGI%) d' <i>A. niger</i> sur fruits de pomme par les huit isolats .....	87
<b>Figure 40 :</b> Pourcentage d'inhibition de croissance (PGI%) de <i>B. cinerea</i> sur fruits de pomme par les huit isolats .....	87
<b>Figure 41 :</b> Arbre phylogénétique des séquences d'ADNr16s des souches N, B et O) basé sur la comparaison de la séquence du gène d'ADNr 16s avec celles d'autres espèces proches....	91
<b>Figure 42 A:</b> Arbre phylogénétique des séquences d'ADNr 16s des isolats analysés .....	93
<b>Figure 42B :</b> Arbre phylogénétique des séquences d'ADNr16s des isolats analysés.....	94
<b>Figure 43 :</b> Profil de d'ARNr16s des quatre isolats sur gel d'agarose .....	95
<b>Figure 44 :</b> Effet promoteur de croissance sur plants de tomate cultivés en pots.....	99
<b>Figure 45 :</b> Effet PGP des souches bactériennes sur plants de tomate en pots sous serre.....	100
<b>Figure 46 :</b> Contrôle de Damping-off causé par <i>Pythiumaphanidermatum</i> sur petit pois .....	103

<b>Figure 47 :</b> Germination des graines de petit pois dans un sol infecté avec <i>Pythium aphanidermatum</i> et inoculé avec la souche N .....	103
<b>Figure 48 :</b> Activité antifongique à l'égard d' <i>A. niger</i> des filtrats extracellulaires obtenus des cultures bactériennes des souches B, N, C et D.....	109
<b>Figure 49 :</b> Résultats du test d'activité antifongique des deux fractions .....	110
<b>Figure 50 :</b> Activités antagonistes des fractions membranaires totales à l'égard d' <i>A. niger</i> .....	111
<b>Figure 51 :</b> SDS-page sur gel de polyacrylamide révélant le profil protéique des protéines membranaires totales d'une culture de 24h de <i>Pseudomonas</i> sp. ....	111
<b>Figure 52:</b> Résultats de l'activité antagoniste des protéines membranaires à l'égard d' <i>A. niger</i> .....	112
<b>Figure 53:</b> Une native-page (10%) des PM-R30(à droite),et une SDS-page (12%) à gauche des PM-TOT et PM-R30.....	112
<b>Figure 54:</b> Activité antifongique des PM-TOT et PM-R30 à l'égard d' <i>A.niger</i> .....	113
<b>Figure 55:</b> Activité antifongique des PM-TOT et PM-R30 à l'égard de quelques champignons phytopathogènes sur milieu TSA.....	115
<b>Figure 56:</b> Electrophorèse SDS-page des PM-TOT et des PM-R30 sur gel de polyacrylamide pour la révélation du profil protéique de chaque fraction .....	118
<b>Figure 57:</b> Chromatogramme de la chromatographie d'exclusion des PM-R30 .....	119
<b>Figure 58:</b> Résultats de l'effet des fractions A, B, C, et D, collectées d'une chromatographie d'exclusion sur la croissance mycélienne d' <i>A.niger</i> sur milieu TSA .....	120
<b>Figure 59:</b> Electrophorèse SDS-page des fractions A, B, C et D issus d'une étape de chromatographie d'exclusion.....	120
<b>Figure 60:</b> Chromatogramme de la chromatographie échangeuse d'anions des PM-R30 .....	121
<b>Figure 61 :</b> Chromatogramme montrant l'intervalle de la fraction 4 active.....	121
<b>Figure 62 :</b> Résultats de l'effet des fractions 2, 3 et 4 collectées d'une chromatographie échangeuse d'anions sur la croissance mycélienne d' <i>A.niger</i> sur milieu TSA ....	122
<b>Figure 63:</b> SDS-page 12% des fractions récoltées d'une étape de chromatographie échangeuse d'anions des PM-R30. ....	122
<b>Figure 64:</b> Développement de lésions sur fruits de deux variétés de tomate A et B.....	126
<b>Figure 65:</b> Pourcentage de contamination des fruits de tomate des deux variétés (A et B) infectés par <i>A. niger</i> après 6jours d'incubation en présence et en absence des PM-R30 .....	127

**Figure 66 :** Vérification de l'effet fongicide ou fongistatique de la souche N à l'égard des quatre champignons phytopathogènes après 3 jours d'incubation..... 129

**Figure 67:**Effet de substances volatiles sur la croissance mycélienne après 3jours d'incubation ..... 131

## Liste des tableaux

<b>Tableau I :</b> Quelques maladies des plantes et les agents causals .....	06
<b>Tableau II :</b> Exemples de bactéries et de champignons agents de biocontrôle et l'organisme cible .....	13
<b>Tableau III :</b> Quelques agents de biocontrôle sous leur forme commercialisée, les cultures protégées et les organismes cibles .....	15
<b>Tableau IV :</b> Mélanges réactionnels pour la quantification d'ADN .....	45
<b>Tableau V :</b> Résultats des différents tests d'activités enzymatiques testés pour les huit isolats.....	78
<b>Tableau VI :</b> Résultats de solubilisation du phosphate .....	79
<b>Tableau VII :</b> Production de sidérophores sur milieu CAS .....	79
<b>Tableau VIII :</b> résultats de production des cyanures par les huit isolats testés .....	80
<b>Tableau IX :</b> Résultats de la capacité des différents isolats à produire l'ammoniac (NH <sub>3</sub> ) ....	81
<b>Tableau X:</b> Concentrations d'ADN génomique totale des isolats B, C, D et N.....	95
<b>Tableau XI:</b> Résultats des tests biochimiques de la souche N ( <i>Pseudomonas</i> sp.) sur galerie API 50 CHB/E.....	96

**Liste des abréviations**

- ACC** : Aminocyclopropane-1-carboxylique
- ADN** : Acide désoxyribonucléique
- AIA** : Acide Indole Acétique
- ANOVA** : **A**nalyse of **V**ariance (Analyse de la variance)
- APS**: Ammonium Persulfate [(NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>8</sub>]
- AS**: Acide Salicylique
- BSA**: **B**ovine **S**erum **A**lbumine
- CAS**: Chrome Azurol **S**
- DAPG**: **D**iacetyl **P**hluro **g**lucinol
- dNTP** : desoxyribo Nucleotide **T**riphosphate
- DO**: Densité Optique
- EDTA** : Ethylène-**D**iamine-**T**étra-**A**cétique
- HCN**: Hydrogen Cyanide
- JA**: Jasmonic Acid
- IR**: **I**nduced **R**esistance
- KDa**: **K**ilo **D**alton
- LB**: **L**uria **B**ertani
- LSD**: **L**east **S**ignificative **D**ifference
- PBS**: **P**hosphate **B**uffer **S**olution
- PCR**: **P**olymerase **C**hain **R**eaction
- PGI**: **P**ercentage **G**rowth **I**nhibition
- PGPR**: **P**lant **G**rowth **P**romoting **R**hizobacteria
- PGS** : **P**ourcentage des **S**pores **G**ermées
- PHPR**: **P**lant **H**ealth **P**romoting **R**hizobacteria
- PM-F30** : **P**rotéines **M**embranaires **F**iltrées à **30KDa**
- PM-R30**: **P**rotéines **M**embranaires **R**etenues à **30KDa**
- PM-TOT**: **P**rotéines **M**embranaires **T**otales
- PMSF** : **F**luorure de **P**hényl **M**éthyl **S**ulfonyle

**rpm** : rotation par minute

**RSA** : Résistance Systémique Acquisée

**RSI** : Résistance Systémique Induite

**SDC** : Désoxycholate de Sodium

**SDS**: Sodium Dodecyl Sulfate

**TLC**: Thin Layer Chromatography

**TSA**: Trypticase Soja Agar

## Sommaire

**Introduction .....1**

### Synthèse Bibliographique

#### Chapitre I

##### *La phytopathologie et les moyens de lutte*

**1. Historique.....4**

**2. Définition de la phytopathologie.....5**

**3. Les agents phytopathogènes.....6**

3.1. Symptômes .....6

**4. Les agents de biocontrôle.....7**

a. Les bactéries .....8

b. Les champignons.....8

c. Les Insectes et les acariens.....9

d. Les virus.....9

e. Les nématodes et les protozoaires.....9

**5. Les moyens de lutte .....10**

a. La lutte chimique.....10

b. La lutte culturale.....11

c. La lutte biologique.....11

d. La lutte intégrée.....14

**6. Exemples de quelques produits commercialisés.....14**

## Chapitre II

### *Les PGPB comme agents stimulateurs de croissance et de biocontrôle*

<b>1. Définition.....</b>	<b>16</b>
<b>2. Les propriétés directes de stimulation de croissance.....</b>	<b>17</b>
2.1. Apport de nutriments non disponibles.....	17
a. Fixation d'azote.....	17
b. Solubilisation de phosphore.....	17
c. Production de sidérophores.....	17
2.2. Production de phytohormones.....	18
2.3. Diminution de la synthèse d'éthylène.....	18
<b>3. Les propriétés indirectes.....</b>	<b>19</b>
a. Synthèse d'antibiotiques (Antibiose).....	19
b. Production de cyanure d'hydrogène (HCN).....	20
c. Compétition pour les niches spécifiques et les nutriments.....	21
d. Enzymes lytiques .....	21
e. Induction de la résistance systémique.....	22
f. Combinaison des mécanismes d'action.....	23

## Matériels et Méthodes

### *Partie I. Criblage de bactéries à critères de Biocontrôle*

<b>1. Prélèvement des échantillons d'eau de puits.....</b>	<b>24</b>
<b>2. Analyses physicochimiques.....</b>	<b>25</b>
2.1. pH.....	25

2.2. Conductivité électrique.....	25
3. Criblage d'isolats bactériens à caractères PGP et producteurs de molécules antifongiques.....	25
3.1. Isolement des bactéries.....	25
3.2. Détermination de l'activité antifongique.....	27
3.2.1. Les souches fongiques.....	27
3.2.2. Inhibition de la germination des spores.....	29
3.2.3. Effet des substances volatiles sur la croissance mycélienne fongique.....	30
3.3. Caractérisation métabolique et fonctionnelle (quelques traits PGP impliqués dans le biocontrôle.....	31
3.3.1. Les activités enzymatiques.....	31
3.3.2. Production de sidérophores.....	36
3.3.3. Production de l'acide indole acétique (AIA).....	37
3.3.4. Production de Cyanure d'hydrogène (HCN).....	38
3.3.5. Production Ammoniac (NH <sub>3</sub> ).....	41
3.4. Activité fongistatique/fongicide des souches bactériennes .....	40
3.5. Contrôle de <i>Botrytis cinerea</i> BC1 et <i>Aspergillus niger</i> sur fruits de pomme avec blessure de fruit.....	40

## **Partie II. Caractérisation des souches sélectionnées**

1. Courbes de croissance des isolats bactériens.....	43
2. Identification phénotypique .....	43
3. identification phylogénique.....	43
4. identification biochimique.....	46

**Partie III : Effet des isolats B, C, D et N sur la croissance de la tomate et des petits pois dans un sol contaminé par *Pythium aphanidermatum***

1. Effet promoteur de croissance sur tomate.....	47
2. Contrôle de Damping- off causé par <i>Pythium aphanidermatum</i> sur petit pois.....	48
4. Analyse statistique.....	48

**5. Partie IV : Extraction et purification partielle des protéines membranaires responsables de l'activité antifongique**

1. La localisation de composés antifongiques et les tests d'induction.....	49
1.1. Localisation des composés antifongiques .....	49
1.2. Préparation des fractions de protéines intracellulaires et membranaires de surface.....	50
2. Test d'induction en présence d' <i>Aspergillus niger</i> .....	50
2.1. Localisation, extraction et essais de purification des molécules responsables de l'activité antifongique de <i>Pseudomonas</i> sp.....	50
2.2. Le test d'induction.....	51
2.3. Localisation des composés antifongique et leur production en fonction du temps.....	52
2.4. Extraction des protéines membranaires totales (PM-TOT) et des protéines membranaires retenues à un cut-off de 30KDa (PM-R30).....	54
2.5. La SDS-page.....	57
2.6. Électrophorèse SDS-page pour les PM-TOT et les PM-R30.....	57
3. Effet de milieu de culture sur l'activité antifongique .....	58
4 Effet des PM-TOT et PM-R30 à l'égard d'autres d' champignons phytopathogènes cibles.....	59
6. Séparation du contenu des fractions protéiques par chromatographie .....	60

5.1. Chromatographie d'exclusion.....	60
5.2. Chromatographie échangeuse d'anions .....	61
5.3. La dialyse.....	61
6. Test d'antagonisme des fractions issues des deux chromatographies sur boîte.....	62
7. Effet antifongiques des fractions protéiques membranaires .....	62
7.1. Test d'antagonisme des PM-R30 à l'égard d' <i>A. niger</i> sur fruits de tomate.....	62
7.2. Effet des PM-R30 (7.35µg/µl) à l'égard d' <i>A. niger</i> sur gélose TSA.....	63
7.3. Conformation de l'effet fongicide ou fongistatique des fractions protéiques.....	64
8. Effet des substances volatiles produites par la souche <i>Pseudomonas</i> sp. sur les quatre espèces fongiques .....	66

## **Résultats et Discussion**

### **Partie I. Criblage de bactéries à critères de Biocontrôle**

<b>1. Prélèvement des échantillons et isolement de bactéries .....</b>	<b>67</b>
<b>2. Caractères physicochimiques.....</b>	<b>67</b>
<b>3. Recherche de bactéries à caractère PGP et productrices de métabolites antifongiques.....</b>	<b>69</b>
3.1. Détection de quelques propriétés antagonistes.....	69
3.1.1. Inhibition de la croissance mycélienne.....	69
3.1.2. Inhibition de la germination des spores fongiques.....	73
3.1.3. Synthèse de substances volatiles.....	74
3.2. Caractérisation métabolique et fonctionnelle.....	77
3.2.1. Les activités enzymatiques .....	77
3.2.2. Solubilisation du phosphate.....	78
3.2.3. Production de sidérophores.....	79
3.2.4. Production de cyanure d'hydrogène.....	80

3.2.5. Production d'ammoniac.....	80
3.2.6. Synthèse d'AIA phytohormone.....	81
3.3. Effet des isolats bactériens sur la croissance fongique après 70 jours d'incubation.....	84
3.4. Contrôle de <i>Botrytis cinerea</i> BCI et <i>Aspergillus niger</i> sur fruits de pomme.....	85

## **Partie II. Caractérisation des souches sélectionnées**

1. Courbes de croissance des huit isolats bactériens.....	91
2. Identification phénotypique et phylogénique.....	91
3. Identification biochimique de la souche N ( <i>Pseudomonas</i> sp.) sur galerie Api 50CH/BE.....	95

## **Partie III : Effet des isolats B, C, D et N sur la croissance de la tomate et des petits pois dans un sol contaminé par *Pythium aphanidermatum***

1. Effet stimulateur de croissance sur plants de la tomate.....	99
2. Contrôle de Damping- off causé par <i>Pythium aphanidermatum</i> sur Petit pois.....	102

**Partie IV : Extraction et purification partielle des protéines membranaires  
responsables de l'activité antifongique**

<b>1. Localisation des composés antifongiques et les tests d'induction.....</b>	<b>109</b>
<b>2. Localisation, extraction, et essais de purification des molécules responsables de l'activité antifongique de <i>Pseudomonas sp</i>.....</b>	<b>110</b>
2.1. Essais préliminaires de localisation de molécules antifongiques.....	110
2.1.1. L'activité du contenu intra et extracellulaire sur milieu TSA à pH 7.....	110
2.1.2. Essais d'activité des fractions protéiques membranaires sur milieu TSA à pH 7.....	111
2.1.3. Ultra filtration des protéines membranaires totales.....	112
2.2. Effet de milieu de culture sur l'activité antifongique des PM-TOT et des PM-R30 à l'égard d' <i>A. niger</i> .....	113
2.3. Effet des PM-TOT et PM-R30 sur la croissance d'autres champignons-cibles....	114
2.4. Séparation des PM-TOT (7.78µg/µl) et des PM-R30 (11.05µg/µl) de <i>Pseudomonas sp.</i> sur électrophorèse SDS page .....	118
2.5. Chromatographie d'exclusion des PM-R30.....	119
2.6. SDS-Page 12%.....	120
2.7. Chromatographie échangeuse d'anions (Mono Q) des PM-R30.....	120
<b>3. Effet antifongique des fractions protéiques membranaires .....</b>	<b>126</b>
3.1. Effet des PM-R30 (7.35µg/µl) à l'égard d' <i>A. niger</i> sur fruits de tomate.....	126
3.2. Vérification de l'effet fongicide ou fongistatique de la souche N ( <i>Pseudomonas sp.</i> ) à l'égard des souches fongiques : <i>A. niger</i> , <i>B. cinerea</i> , <i>Penicillium sp.</i> et <i>Alternaria</i> sp.....	129
<b>4. Effet des substances volatiles produites par <i>Pseudomonas sp.</i> (N) sur la croissance fongique.....</b>	<b>130</b>
<b>Conclusion.....</b>	<b>134</b>
<b>Références Bibliographiques .....</b>	<b>136</b>
<b>Annexes</b>	

### Introduction

Depuis plusieurs décennies, les maladies des plantes sont connues pour leur effet dévastateur sur les récoltes à petite et grande échelle. Les agents causals sont similaires à ceux causant des maladies à l'être humain, et les animaux. Ils incluent, les microorganismes pathogènes comme, les virus, les bactéries, les champignons, les protozoaires, et les nématodes (Agrios, 2005). Ils attaquent et détruisent des parties de la plante ou la plante en entier, en générant plusieurs problèmes y compris l'insécurité alimentaire et la famine. Les plantes fruitières sont aussi gravement touchées. Depuis le début des années 1970, les maladies poste récolte y compris celles des fruits et légumes causent des pertes annuelles importantes atteignant les 25% malgré les techniques modernes de conservation (Jijakli et al., 1999 ; Jijakli, 2011). Durant le stockage, les plaies causées par la senescence physiologique des fruits et légumes, les plaies de manutention, sont les premiers sites d'infection pour le déclenchement des maladies provoquées par les ravageurs en particulier fongiques comme ; *Penicillium expansum*, *Botrytis cinerea*, et *Gloeosporoides* sp. (Gholamnejad et al., 2009).

Il y'a environ 7 milliards de personnes dans le monde, et on s'attend à ce que ce chiffre atteigne environ 8 milliards en vers 2020. En considérant cette augmentation continue de la population mondiale et en parallèle à celle des dommages environnementales, il devient clair et objectif que dans quelques décennies le défi à lancer pour nourrir toutes ces populations augmente d'avantage avec le temps. Par conséquent, la recherche des méthodes alternatives pour minimiser les pertes considérables des cultures devient de grand intérêt (Glick, 2012). Il est donc urgent de doubler la production agricole afin de réduire le risque de malnutrition et de pauvreté accrue (Noumavo et al., 2016).

Les microorganismes pathogènes affectant la santé des plantes constituent une menace majeure et chronique pour la production alimentaire et la stabilité de l'écosystème dans le monde entier (Compant, 2005). Avec l'intensification de la production agricole au cours des dernières décennies, les producteurs sont devenus de plus en plus dépendants des produits chimiques en tant que méthode de protection des cultures relativement faibles (Thakur et al., 2013). Cependant, l'utilisation croissante d'intrants chimiques entraîne plusieurs effets négatifs, c'est-à-dire le développement

d'une résistance aux pathogènes vis-à-vis des agents appliqués, l'accumulation de résidus chimiques nocifs dans l'environnement, et leurs effets néfastes sur les organismes non ciblés (Belhadi et *al.*, 2016).

Plusieurs travaux sont cités sur l'utilisation des bactéries/rhizobactéries promotrices de la croissance des plantes (PGPB/R) comme agents stimulateurs de la croissance et luttant contre les maladies des plantes (Jeon et *al.*, 2003 ; Dey et *al.*, 2004; Tabli et *al.*, 2014; Noumavo et *al.*, 2016 ).

Les PGPR peuvent promouvoir la croissance des plantes à travers différents mécanismes, directs et indirects. Les plus couramment observés et considérés responsables de ces effets consistent ; en la disponibilité accrue des nutriments due à leur solubilisation et mobilisation, fixation d'azote, protection des plantes contre les maladies et les ravageurs en produisant des antibiotiques comme le 2,4 DAPG, les sidérophores qui jouent un rôle crucial dans le biocontrôle, la production de cyanure d'hydrogène (HCN) et d'autres composés volatils stimulant la croissance des plantes etc. production d'hormones végétales comme l'AIA (Acide Indole Acétique), les cytokinines, l'acide gibbérellique qui influencent leur processus physiologique, amélioration de la tolérance au stress comme ; la salinité, la sécheresse et abaissement du niveau d'éthylène par production de l'ACC désaminase (Vessey, 2003; Adesemoye and Egamberdieva, 2013 ; Dey et *al.*, 2014 ).

Il est bien documenté que le stress biotique affecte la croissance végétale à tous les niveaux et réduit donc le rendement de la récolte, pour cela, une alternative est fortement encouragée par les scientifiques, il s'agit des agents de biocontrôle en particulier fongiques et bactériens en l'occurrence l'application des bactéries appartenant aux genres *Bacillus* et *Pseudomonas* connus pour leur divers traits PGP et de biocontrôle (Sheeba et *al.*, 2017).

Le but de ce présent travail est de donner un appui pour la recherche dans le domaine de la Phytoprotection. Ainsi, une série de screening de souches bactériennes sélectionnées sur la base des différents traits PGP et de biocontrôle est effectuée.

Le présent manuscrit est scindé en plusieurs parties :

Deux chapitres bibliographiques,

Une partie pratique divisée en plusieurs volets à savoir :

\*/ Le Criblage des bactéries sur la base de quelques traits PGP et production de molécules antifongiques,

\*/ Identification phénotypique et génique des différentes bactéries sélectionnées,

\*/ Effet stimulateur sur la croissance de la tomate et des petits –pois dans un sol inoculé avec *Pythium aphanidermatum*,

\*/ Localisation, extraction, et purification partielle des molécules responsables de l'activité antifongique,

\*/ Effet des molécules protéiques extraites sur d'autres champignons cibles.

\*/ Effet des fractions membranaires *in vivo* (sur fruits de tomate).

## **Chapitre I : La Phytopathologie et les moyens de lutte**

### **1. Historique**

Tout au long de l'histoire de l'humanité, les parasites et les maladies des plantes ont eu un impact sur les pratiques liées à l'alimentation, sur la démographie et sur le commerce mondial (Flood, 2010). Bien que la source de perte de récoltes puisse avoir différentes origines, avec de graves conséquences pour les producteurs, les pertes dues aux maladies infligent des dommages beaucoup plus graves à plus grande échelle (Walters, 2009a). Ces faits expliquent pourquoi les maladies affectant les plantes ont été autant redoutées que les maladies humaines à travers l'histoire (Mandal and Ray, 2011).

Elles sont considérées comme problème continu pour l'humanité depuis les débuts de l'agriculture il y'a 10000ans (Walters, 2009a). Ces problèmes persistent malgré l'apparition de fongicides et de variétés résistantes, en raison de l'adaptabilité génétique des agents pathogènes responsables. En générale les pertes de rendement directes causées par les agents pathogènes, les animaux, et les mauvaises herbes sont entièrement responsables de pertes allant de 20 à 40% de la productivité agricole mondiale (Savary et *al.*, 2012). Les pertes pré-récolte dues aux ravageurs sont estimées à 42% de la valeur potentielle de la production, une perte de 15% était considérée comme étant due aux insectes ; alors que les mauvaises herbes et les agents pathogènes représentaient une perte de 13% chacun. Une perte supplémentaire de 10% a été estimée après la récolte (Flood, 2010).

Pour cela, elles doivent être contrôlées pour maintenir la qualité et l'abondance de l'alimentation humaine et animale et les fibre produits dans le monde entier (Pal et *al.*, 2006). Pour faire face à ces bios agresseurs, la première ligne de défense était l'utilisation des pesticides de synthèse, mais malheureusement, l'existence de mauvaises pratiques phytosanitaires (non-respect des doses prescrites, non-respect des règles de protection et d'hygiène conseillées lors des traitements, mauvaise gestion des emballages vides des pesticides), a résulté en à de graves répercussions à savoir ; l'intoxication des agriculteurs et des consommateurs, la pollution de l'environnement et la sélection de souches de bio agresseurs résistantes aux pesticides (Toé, 2010 ;

Mandal and Ray, 2011 ; Ahouangninou et *al.*, 2011 reporté par : Son et *al.*, 2017). Ces faits expliquent pourquoi les maladies affectant les plantes ont été autant redoutées que les maladies humaines à travers l'histoire (Mandal and Ray, 2011). Toute solution future concernant l'amélioration de la sécurité alimentaire mondiale, doit s'attaquer à ces pertes et cela signifie améliorer la santé des plantes (Flood, 2010).

### ***2. Définition de la phytopathologie***

La phytopathologie est l'étude scientifique des maladies des plantes provoquées par les pathogènes (maladies infectieuses) et les conditions environnementales (facteurs physiologiques), elle tente d'améliorer les chances de survie des plantes lorsqu'elles sont confrontées à des conditions environnementales défavorables et les microorganismes parasites qui causent la maladie (Agrios, 2005). C'est un domaine en plein croissance, avec des recherches qui mettent constamment en lumière de nouvelles informations (Stewart and Globig, 2011), et comme les autres sciences, elle est subdivisée en plusieurs sous-thèmes (Dyakov et *al.*, 2007). D'une part, elle appartient aux sciences des vivants, telle que : botanique, mycologie, microbiologie, en étudiant la plante infectée ainsi que le pathogène. D'autre part ; la phytopathologie appartient aux sciences agricoles telles que la culture, la sélection et la chimie agricole, car elle contribue à la création des conditions permettant de minimiser les pertes de récolte causées par les maladies (Dyakov et *al.*, 2007 ; Kannan et *al.*, 2015). Les organismes qui causent les maladies infectieuses comprennent ; les champignons, les oomycètes, les bactéries, les virus, les viroïdes, les organismes viraux, les phytoplasmas, les protozoaires, les nématodes et les plantes parasites (Stewart and Globig, 2011). Les dégâts causés sont des facteurs limitants importants dans la plupart des plantes, avec des pertes inacceptables (James et *al.*, 2002).

La maladie des plantes peut être contrôlée en utilisant une variété d'approches, la première ligne de défense est l'exclusion de l'agent pathogène par la mise en quarantaine des plantes, et l'utilisation d'un matériel de propagation exempt de d'agents pathogènes (Walters, 2009b). La deuxième ligne de défense est pour exclure, éliminer, ou réduire le pathogène et cela pourra être atteint de divers manières : y compris le contrôle cultural, l'utilisation de la résistance de plantes hôtes, et le contrôle chimique.

Au cours de ces dernières années, la gestion des champignons pathogènes s'est largement appuyée de produits chimiques synthétiques, cependant, cette approche n'est pas considérée comme durable en raison du développement de la résistance de ces champignon aux fongicides, et les soucis sur la santé humaine et environnementale (Janisiewicz and Korsten, 2002).

### 3. Les agents phytopathogènes

On estime que les maladies, les insectes, et les mauvaises herbes interfèrent chaque année avec la production ou la destruction de 31 à 42% de toutes les cultures produites dans le monde. Dès 1878 des bactéries sont montrées agents causales de la maladie du feu bactérien sur pomme et poire, suivi par plusieurs maladies d'origine bactérienne sur plante (Agrios, 2005). Les champignons causent également des pertes en affectant l'hôte à travers les blessures formées pendant la manutention et le traitement (Vero et *al.*, 2002).

#### 3.1. Symptômes (quelques exemples)

Les agents phytopathogènes (bactéries, champignons, virus et autres) attaquent une large gamme de cultures agricoles à différents stades de croissance. Le tableau I présente quelques maladies causées et les agents responsables correspondants (Elmhirst, 2006 ; Flood, 2010 ; Savary et *al.*, 2012 ; Son et *al.*, 2017).

**Tableau I :** Quelques maladies des plantes et les agents causals

<i>Maladie</i>	<i>Agent (s) causal (s)</i>
Taches bactériennes	<i>Xanthomonas capestris pv. vesicatoria</i>
Pourriture bactérienne de la tige	<i>Erwinia carotovora subsp carotovora</i>
Nécrose de la moelle	<i>Pseudomonas corrugata</i>
Nécrose de la tige	<i>Pseudomonas sp.</i>
Flétrissure verticillienne	<i>Verticillium dahliae</i> et <i>V. albo-atrum</i>
Chancre de la tige	<i>Didymella lycopersici</i>
Mildiou	<i>Phytophthora infestans</i>
Racines liégeuse	<i>Pyrenochaeta lycopersici/ Humicola fuscoatra</i>
Flétrissure fusarienne	<i>Fusarium oxysporum f.sp. lycopersici</i>
Pourriture fusarienne du pied et	<i>F oxysporum f.sp. radidis lycopersici</i>

de la racine	
Blanc	<i>Oidium nealycoparsici</i>
Chancre bactérien	<i>Clavibacter michiganensis sub sp. michiganensis</i>
Pourridié des racines	<i>Pythium spp.</i>
Brulures alternariennes	<i>Alternaria solani</i>
Pourriture alternarienne des fruits	<i>Alternaria alternata</i>
Brulures et taches septoriennes	<i>Septoria lycopersici</i>
Moisissures blanches	<i>Sclerotinia sclerotiorum</i>
Brulure de pomme de terre	<i>Phytophthora infestans</i>
Rouille de tige de blé	<i>Puccinia graminis tritici</i> race Ug99
Fusariose de blé, avoine, orge	<i>Fusarium sp.</i> producteur ou non de toxines
Attaques sur oignon	<i>Ralstonia solanacearum, Fusarium oxysporum, Benisia tabaci, Helicoverpa armigera, Tuta absoluta</i>
Pourriture grise	<i>Botrytis cinerea</i>
Flétrissement du café	<i>Fusarium xylarioides</i>
Tâche des feuilles :	
Sur le blé	<i>Stagnospora nodorum, Septoria tritici, Drechslera tritici- repentis</i>
Sur l'orge	<i>D. teres Rynchosporium sativus Ramularia collo-cygni</i>
Sur l'avoine	<i>D. avenae Stagonospora avenae</i>
Sur les 3 cultures	Oïdium causé par <i>Blumeria graminis</i>

#### **4. Les agents de biocontrôle**

Les agents de biocontrôle ; sont des organismes non pathogènes vivants qui exercent un potentiel antagoniste contre les pathogènes microbiens [oomycètes, champignons, bactéries, phytoplasmas, virus et viroïdes, agents causal des pertes considérables dans les cultures] (Xu et al., 2014).

Un agent de biocontrôle doit pousser et persister ou « coloniser » la surface des plantes qu'il protège. Les caractéristiques idéales d'un agent de biocontrôle comprennent ; la compétence élevée en rhizosphère, la capacité saprophytique compétitive élevée, stimulation de la croissance de la plante, facilité pour la multiplication en masse, large spectre d'action, contrôle fiable, sans effet nocif sur l'environnement, et la compatibilité avec d'autres rhizobactéries et doivent tolérer le stress abiotique comme la dessiccation, chaleur....etc. (Meena et *al.*, 2014).

Les microorganismes regroupent des bactéries (environ une centaine d'espèces), des virus (650-1200 espèces), des champignons (700 espèces) et des protozoaires (6 Phyla) pathogènes aux insectes (Boivin, 2001).

### ***a- Les Bactéries***

La production de substances antifongiques par les bactéries est reconnue depuis longtemps, et cette connaissance est devenue une pratique réelle grâce à l'utilisation d'antagonistes bactériens, pour protéger les cultures contre leurs ennemis fongiques (Weisskopf, 2013).

Les agents de biocontrôle bactériens sont principalement ; les espèces du genre ; *Pseudomonas* (en particulier les *Pseudomonas* fluorescents), *Bacillus*, *Azospirillum*, *Rhizobium* et *Serratia* (Fernanado et *al.*, 2005). Parmi les bactéries Gram positif, *Bacillus*, *Paenibacillus* et les actinomycètes sont les groupes les plus importants parmi les PGPR (Bouizgarne, 2013). Ces espèces bactériennes secrètent plusieurs antibiotiques ; Sidérophores, et cyanure d'hydrogène (HCN), qui sont impliqués dans leurs activités de biocontrôle.

### ***b. Les champignons***

Les champignons sont des microorganismes eucaryotes. Il a été estimé qu'il existe entre 70.000 et 1.5 millions d'espèces fongiques. Les champignons phytopathogènes sont capables d'infecter n'importe quel tissu à n'importe quel stade de croissance de la plante (Agrios, 2005), ils sont responsables d'environ 20% des pertes en agriculture (Fernandez-Acero et *al.*, 2007). L'humidité est nécessaire pour la germination de la

spore. Certains s'attaquent aux insectes, d'autres aux mauvaises herbes ou compétitionnent les microorganismes pathogènes (Agrios, 2005).

### **c. Les Insectes et les acariens**

Les acariens se nourrissent à la face inférieure des feuilles, perforant les cellules foliaires et en suçant le contenu. Les feuilles très infectées pâlissent, deviennent cassantes et se couvrent d'une toile. En s'alimentant, les acariens bouchent les stomates, entraînant ainsi une diminution de l'apport en CO<sub>2</sub> et un ralentissement de la transpiration et la photosynthèse. Ces dommages provoquent éventuellement une baisse de rendement (Elmhirst, 2006).

### **d. Les virus**

Les virus sont utilisés depuis longtemps en lutte biologique, particulièrement les baculovirus. [Le virus est intégré sous forme de cristal (protéine) puis passe dans le système sanguin où il prend le contrôle de plusieurs cellules et se multiplie jusqu'à la mort de l'hôte. Chung et Ferris. (1996) ont rapporté qu'en 1898, Beijerinck été le premier qui a conclu que la mosaïque du tabac est dû à un fluide vivant contagieux qu'il a appelé « virus ».

### **e. Les nématodes et les protozoaires**

Les nématodes comme les protozoaires, participent tous les deux avec un grand pourcentage dans la formation de la microflore du sol (Bardgett et *al.*, 1999). [Certains s'alimentent des microbes comme les bactéries et les champignons dans les écosystèmes terrestres], et d'autres sont des phytoparasites se nourrissant des racines (Griffiths, 1990).

D'autres agents de biocontrôle peuvent être utilisés à savoir ; les composés minéraux et organiques qui sont appliqués comme fongicides d'origine naturelle pour contrôler les agents pathogènes des plantes, exp : CaCl<sub>2</sub>, K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>, NaHCO<sub>3</sub>, Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>, et les extraits de plantes comme la Propolis (Ajouz, 2009).

### 5. *Les moyens de lutte*

Les méthodes utilisées pour contrôler les maladies des plantes varient en fonction de la plante hôte, de type de pathogène, l'interaction entre les deux, ainsi qu'une gamme d'autres facteurs, y compris les conditions environnementales. La plupart des méthodes de lutte visent à protéger les cultures contre les pathogènes plutôt que de les guérir une fois qu'elles ont été infectées.

#### *a. La lutte chimique*

Depuis la deuxième guerre mondiale, l'utilisation des pesticides de synthèse est généralisée et intensifiée, même synthétisés à faible coût, ces pesticides ont été facilement disponibles et utilisables, et leur utilisation a été pour plusieurs années fulgurante (Elmhirst, 2006).

La lutte chimique se définit par l'utilisation de fongicides pour détruire, affaiblir, ou réprimer le champignon (Ajouz, 2009). Les fongicides font partie intégrante de la production agricole dans la plupart des régions du monde, l'un des problèmes liés à l'utilisation répétée et à haute fréquence de fongicides est que les champignons peuvent devenir non sensibles à ces derniers (Vanitha and Ramjegathesh, 2014).

L'augmentation des soucis publics au sujet de l'accumulation de pesticides dans l'environnement et de son impact sur les organismes non ciblés ont mené à l'introduction de processus de réglementation rigoureux (Konradsen et al., 2003). Au cours des 50 dernières années, l'utilisation de pesticides a considérablement augmenté la quantité et amélioré la qualité de la nourriture pour la population mondiale croissante (Walters, 2009b). La plupart des fongicides affectent directement des fonctions essentielles, comme par exemple, la respiration, la biosynthèse des stéroïdes ou la division cellulaire chez l'organisme cible (Leroux, 2004 ; Ajouz, 2009).

Vu l'émergence de résistance des pathogènes aux fongicides, la pression croissante pour réduire l'utilisation de produits chimiques dans l'environnement et la disponibilité réduite des ingrédients actifs, par conséquent, la recherche de méthodes non chimiques de contrôle des maladies continue de gagner en importance (Whipps et

*al.*, 2009 ; Smeesters et *al.*, 2000). Diverses gestions de maladies, y compris le contrôle biologique ont été appliquées (Xu et *al.*, 214). Les phénomènes de résistance constituent un problème dans la lutte contre les phytopathogènes, justifiant ainsi l'intérêt actuel pour l'étude de méthodes alternatives à la lutte chimique (Ajouz, 2009).

### *b. La lutte culturale*

Les producteurs désirant de réduire leur dépendance en pesticides chimiques ont accès à d'autres méthodes alternatives de lutte contre les ravageurs, mais sont peu éprouvées ou difficilement accessibles. Les méthodes alternatives sont souvent, plus respectueuses de l'environnement et plus stables que les méthodes de lutte chimique (Smeesters et *al.*, 2000). Les techniques culturales visent à prévenir le contact avec le pathogène ou au moins d'éviter des conditions favorables, ou à réduire la quantité d'inoculum pathogène disponible pour infecter les plantes cultivées (Walters, 2009a). Les méthodes utilisées pour cet effet comprennent l'éradication de l'hôte, la rotation des cultures, l'assainissement, l'irrigation, le travail du sol et l'amélioration des conditions de croissance des cultures, par exemple par utilisation des engrais appropriés (Walters, 2009a). Elles visent à diminuer la sensibilité des agroécosystèmes aux attaques de ravageurs, [il s'agit d'un ensemble de pratiques peu dommageables pour l'environnement] dans le but de diminuer les populations de pathogènes en rendant l'environnement défavorable à leur développement (Walters, 2009). En serre par exemple, il est nécessaire de contrôler les températures, le taux d'humidité et l'aération pour favoriser une bonne évapotranspiration et éviter une accumulation excessive d'eau au niveau des racines, retirer ceux qui montrent des symptômes au début de la saison car peuvent abriter le pathogène, désinfecter la serre et l'équipement entre les cultures, éliminer régulièrement les débris végétaux (Elmhirst, 2006).

### *c. La lutte biologique*

L'utilisation des produits chimiques antibactériens et antifongiques est déconseillée en raison des pratiques culturales durables, d'où la recherche d'une autre alternative du contrôle chimique des maladies des plantes par l'utilisation des bactéries capables de contrarier les phytopathogènes. Le biocontrôle des pathogènes du sol avec des

bactéries antagonistes a été intensivement enquêté (Bouizgarne, 2013). La lutte biologique est faite pour l'encouragement des ennemis naturels dans le but de réduire l'utilisation des pesticides, et vers une exploitation agricole intégrée et respectueuse de l'environnement (Smeesters et *al.*, 2000).

Plusieurs définitions sont données, mais on cite une définition générale rapportée par Dib, (2010) ; « La lutte biologique est un processus agissant au niveau des populations et par lequel la densité de population d'une espèce est abaissée par l'effet d'une autre espèce qui agit par prédation, parasitisme, pathogénicité ou compétition », c'est celle de Van Driesche et Bellows (1996), La lutte biologique est donc l'utilisation d'organismes vivants dans le but de limiter la pullulation et/ou la nocivité des divers ennemis des cultures « rongeurs, insectes, nématodes, maladies des plantes et mauvaises herbes » (Vincent et Coderre, 1992; Eilenberg, 2006; Jourdeuil et *al.*, 2002; Altieri et *al.*, 2005). La lutte biologique se base sur la régulation préventive et durable d'importants ravageurs par leurs ennemis naturels. Cette interaction se base alors sur trois éléments: le ravageur, l'auxiliaire et son habitat (Boller et *al.*, 2004). Le contrôle biologique est la réduction de la densité de l'inoculum ou des activités pathogènes des phytopathogènes par d'autres organismes, accomplies par des manipulations environnementales ou l'introduction massive d'antagonistes (James et *al.*, 1993).

Le contrôle biologique est défini aussi, comme la réduction de la densité d'inoculum ou des activités néfastes d'un pathogène ou parasite dans son état actif ou dormant, par un ou plusieurs organismes, accomplis naturellement ou par manipulation de l'environnement, hôte ou antagoniste, ou par introduction en masse d'un ou plusieurs antagonistes (James et *al.*, 2002). L'élimination de la maladie peut être basée sur la réduction de la capacité saprophyte des pathogènes, la dissémination des spores, la virulence ou la résistance induite chez la plante hôte (Elad et Freeman, 2002). Le tableau ci-dessous résume quelques agents de biocontrôle bactériens et fongiques inscrits comme agents de biocontrôle, leurs cibles et la plante hôte.

**Tableau II :** Exemples de bactéries et de champignons agents de biocontrôle et l'organisme cible (Smeesters et *al.*, 2000 ; Elmer and Reglinski, 2006 ; Gholmjad et *al.*, 2009 ; Whipps et *al.*, 2009).

<i>Agent pathogène</i>	<i>Cible</i>	<i>Plant hôte</i>
<p><b>Exemple de Bactéries</b></p> <p><i>Bacillus</i> spp. ; <i>Bacillus circulans</i>, <i>Brevibacillus brevis</i>, <i>Bacillus subtilis</i>, <i>Pseudomonas fluorescens</i> et <i>Serratia liquefaciens</i></p> <p><i>Pseudomonas syringae</i> ESC-10</p>	<p><i>Botrytis cinerea</i></p> <p><i>Botrytis cinerea</i>, <i>Helminthosporium</i> spp., <i>Fusarium</i> spp., <i>Penicillium</i> spp.,</p>	<p>Tomate, fraise, pomme, poire, raisins</p> <p>Fruits à pépins, citrons, Cerise, pomme de terre</p>
<p><b>Exemple de champignons</b></p> <p><i>Alternaria</i> spp., <i>Cladosporium</i> spp.,</p> <p><i>Aureobasidium pullulans</i></p> <p><i>Metschnikowia fruticola</i></p>	<p><i>B cinerea</i></p> <p><i>Pezicula</i> sp., <i>Nectria galligena</i>, <i>Botrytis cinerea</i>, <i>Penicillium expansum</i>, <i>Monilinia fructigena</i></p> <p><i>Aspergillus niger</i>, <i>Botrytis cinerea</i>, <i>Penicillium</i> spp., <i>Rhizopus stolonifera</i></p>	<p>/</p> <p>Maladies sur pomme</p> <p>Fruits à pépins et à noyaux, raisins, fraise</p>
<p><b>Exemple de levures</b></p> <p><i>Aureobasidium pullulans</i></p> <p><i>Rhodotorula mucilaginosa</i> <i>Pichia guilliermondii</i></p>	<p><i>Penicillium expansum</i></p>	<p>Fruits de pomme</p>

### *d. La lutte intégrée*

Les maladies causées par les phytopathogènes sont généralement maintenues sous les seuils d'endommagement grâce à une approche intégrée comprenant notamment ; le traitement des semences visant à éviter l'introduction de l'inoculum, l'utilisation de variétés résistantes, une bonne hygiène, des mesures d'assainissement, un contrôle approprié des conditions ambiantes (Elmhirst, 2006). Le choix de variétés de plantes résistantes reste aussi un autre moyen de lutte.

### **6. Exemples de quelques produits commercialisés**

Quoi qu'il y'a des fluctuations en cours vu que certains produits apparaissent et d'autres retirés du marché, une liste de produits de bactéries, champignons, et virus actuellement sont, enregistrés ou commercialisés comme agents de biocontrôle, pour les maladies dues aux pathogènes du sol, des semences ou des feuilles, des pourritures fongiques des arbres, ou les pathogènes de poste récolte (tableau III). Il y'a plus de 50 produits bactériens, 50 produits fongiques, et un seul produit viral. La majorité des produits bactériens et fongiques sont vendus pour le contrôle des pathogènes du sol et des semences, moins pour les pathogènes foliaires et moins de 10 pour les pathogènes en poste récolte. La plupart contiennent des microorganismes individuels, mais certains sont un mélange de microorganismes (Whipps et al., 2009).

La protection biologique contre les maladies des plantes est moins avancée mais, a toutefois abouti à la commercialisation de quelques produits (Ajouz, 2009). Le nombre de produits pour le contrôle et le traitement de ces maladies continue à augmenter (Whipps et al, 2009). Aux Etats –Unis, l'agence pour la protection de l'environnement (Environmental Protection Agency) a par exemple autorisé la commercialisation de 32 bactéries (14 fongicides, 2 bactéricides, 16 insecticides), 17 champignons (8 fongicides, 4 herbicides, 5 insecticides) et 8 virus (principalement des insecticides) (Ajouz, 2009). Le tableau III résume quelques produits rencontrés sur le marché avec les microorganismes les constituant, ainsi que leurs germes cibles.

**Tableau III:** Quelques agents de biocontrôle sous leur forme commercialisée, les cultures protégées et les organismes cibles (Elad and Stewart, 2007)

<b>Nom commerciale</b>	<b>Le microorganisme de base</b>	<b>Plante cible</b>	<b>Pathogène ciblé</b>
<b>Binab</b>	<i>Trichoderma harzianum</i> , et <i>T. polysporum</i>	Blessures d'arbres	<i>B. cinerea</i>
<b>Serenade</b>	<i>Bacillus subtilis</i> (QST 713)...	Des maladies bactériennes et fongiques telluriques des cultures en plein champs et des cultures protégées	/
<b>Mycostop</b>	<i>Streptomyces griseoviridis</i> (K61)	Fonte des semis, pourriture des racines et des tiges, concombre, tomate, poivron, laitue et plantes ornementales	<i>B. cinerea</i>
<b>Plantshield</b>	<i>Trichoderma harzianum</i> (T22)	Les maladies de fonte, les maladies des racines dans les cultures de serre et autre	<i>Fusarium</i> , <i>Rhizoctonia</i> , <i>Pythium</i> et autres
<b>TRICHODEX</b>	<i>T. harzianum</i> (T39)	Raisins, culture sous serre	<i>B. cinerea</i>
<b>Botry- Zen</b>	<i>Ulocladium oudemansii</i>	Nécrose des tissus de plantes, pourriture de raisin	<i>Botrytis</i>
<b>Aspire</b>	La levure <i>Candida oleophila</i> . "I-182"	Pourriture poste récolte sur fruits	<i>B. cinerea</i>
<b>Bio-save</b>	<i>Pseudomonas syringae</i>	Pourriture poste récolte sur fruits	<i>B. cinerea</i>

## **Chapitre II**

### ***Les PGPB comme agents stimulateurs de croissance et de biocontrôle***

#### **1. Définition**

Les bactéries/rhizobactéries stimulatrices de la croissance des plantes (PGPB/PGPR), sont des bactéries, une fois réintroduites dans le sol contenant une microflore compétitive par une inoculation de plantes, exercent un effet bénéfique sur la croissance de ces dernières (Antoun and Prevost, 2006). Selon une définition très récente par Tsegaye et al. (2017), les PGPR ou PHPR (rhizobactéries stimulatrices de la santé des plantes) sont des bactéries du sol vivant aux alentours ou à la surface des racines, qui sont directement impliquées dans la stimulation de la croissance et de développement des plantes à travers la production et la sécrétion de divers régulateurs chimiques aux voisinage de la rhizosphère, c'est la première définition donnée par Klopper, 1994. Pour plusieurs décennies, les bactéries sont introduites dans le sol, les graines, les racines ou autres matériels de plantation pour améliorer la croissance et la santé des plantes (Raaijmakers et al., 2002). A ce jour, plusieurs genres bactériens sont utilisés comme inoculants de plantes y compris ; *Acinetobacter*, *Agrobacterium*, *Alcaligenes*, *Arthrobacter*, *Azospirillum*, *Azotobacter*, *Bacillus*, *Bradyrhizobium*, *Frankia*, *Pantoea*, *Pseudomonas*, *Rhizobium*, *Serratia*, *Stenotrophomonas*, *Streptomyces* et *Thiobacillus* (Raaijmakers et al., 2002).

Les PGPR sont connu pour leurs effets bénéfiques sur les plantes à travers plusieurs mécanismes directs et indirects (Winding et al., 2004 ; Antoun and Prevost, 2006 ; Glick, 2012 ; Bouizgarne, 2013 ; Meena et al., 2014 ; Sivasakthi et al., 2014 ; El-Gamal et al., 2016).

La bactérie peut être bénéfique pour la plante hôte directement à travers la production de métabolites qui peuvent soit stimuler le développement racinaire et la croissance des plantes ou déclencher l'induction de la résistance systémique acquise (Van Loon and Bakker, 2005).

### 2. Les propriétés directes de stimulation de croissance

#### 2.1 Apport de nutriments non disponibles

Les PGPR peuvent jouer un rôle de biofertilisants une fois appliqués sur les graines, la surface de la plante ou du sol, colonisent la rhizosphère ou l'intérieur de la plante et stimulent la croissance en augmentant l'apport et la disponibilité de nutriments primaires à la plante hôte, par exemple par la mobilisation enzymatique de nutriments à partir de la matière organique et la production de sidérophores (Hrynkiewicz and Baum, 2011), parmi ces nutriments :

##### a. Fixation d'azote

En plus des rhizobia, un nombre de bactéries vivants librement comme *Azospirillum* sp sont aussi capables de fixer l'azote et le fournir aux plantes. D'après Glick (2012), certaines bactéries facilitent la croissance des plantes en fournissant des nutriments comme l'azote et le phosphore, qui sont des composés souvent présents uniquement en quantités limitantes dans plusieurs sols.

##### b. Solubilisation du phosphore

Malgré la disponibilité du phosphore dans le sol, la quantité majoritaire de cet élément est insoluble, donc non disponible pour être impliquée dans la croissance des plantes. Le phosphore insoluble peut être sous une forme organique ou inorganique (Chaiarn and Lumyong, 2009). La solubilisation du phosphore inorganique a lieu sous l'action des acides organiques de faible poids moléculaire, comme l'acide gluconique et citrique. La minéralisation du phosphore organique a lieu à travers la synthèse de différentes variétés de phosphatases, catalysant l'hydrolyse des esters phosphoriques (Glick et al., 2012).

##### c. Production de sidérophores

Le biocontrôle peut impliquer l'élimination du pathogène en le privant d'un de ses facteurs de croissance (Alabouvette et al., 1998). L'exemple le plus étudié et le plus connu est la compétition pour le fer (Van Loon and Bakker, 2005).

Le fer ferrique ( $\text{Fe}^{3+}$ ) est la forme la plus prédominante dans le sol, malheureusement cette forme n'est pas facilement assimilée soit par les bactéries ou les plantes. Les

plantes et les microorganismes demandent de quantités élevées en fer disponible pour l'assimilation, ce qui pose problème, dans la rhizosphère où la plante, les bactéries, champignons concurrencent pour cet élément. Les bactéries synthétisent des sidérophores de faible poids moléculaire (400-1500Da) avec une grande affinité pour  $Fe^{3+}$  le complexe Fe-sidérophores est capté par des récepteurs membranaires facilitant la prise du fer par les microorganismes (Glick, 2012 ; Meena, 2014). La production de sidérophores est l'un des mécanismes de biocontrôle des PGPB sous des conditions limitées en fer (Nagarakumar et *al.*, 2004 ; Sheeba et *al.*, 2017).

### **2.2 Production de phytohormones**

Les bactéries d'intérêt agricole synthétisent des cytokinines, Gibbérellines, AIA (Acide Indole Acétique). L'AIA affecte la division cellulaire des plantes, l'extension et la différenciation, la germination des semences, augmente la vitesse du développement du xylème et des racines, contrôle le processus de la croissance végétative, formation des racines latérales et secondaires, biosynthèse des divers métabolites et la résistance au stress (Glick et *al.*, 2012). Cette phytohormone stimule la croissance et la santé des plantes (Patten et Glich, 2002).

### **1.3 Diminution de la synthèse d'éthylène**

L'éthylène est une hormone végétale, c'est l'une des molécules les plus simples avec une activité biologique. Le rôle de l'éthylène est la promotion de l'initiation des racines, inhibition de l'élongation racinaire, promouvoir la maturation des fruits, la germination des graines, le flétrissement des fleurs, l'abscission des feuilles et autres (Glick et *al.*, 2012). En plus d'être un régulateur de croissance des plantes, l'éthylène a également été établi comme une hormone du stress (Tsegaye et *al.*, 2017). L'éthylène stimule la croissance à de faibles concentrations mais il est inhibiteur à des niveaux élevés. L'ACC désaminase hydrolyse l'ACC, le précurseur immédiat de la synthèse d'éthylène, et ainsi prévient la production des niveaux inhibiteurs sur la croissance des plantes (Patten and Glick, 2002). Ainsi, la bactérie peut inciter la plante à augmenter la masse racinaire et au même temps utilise les produits de dégradation comme nutriments (Danielson, 2008 ; Tsegaye et *al.*, 2017).

### 3. Les propriétés indirectes

Somers et *al.* (2004) classent les PGPR en ; biofertilisants, phytostimulateurs, rhizoremédiateurs et biopesticides. Des études récentes sur les PGPR sont focalisées plus sur le biocontrôle des maladies de plantes, que sur la stimulation de croissance ; et les bactéries comme *P. fluorescens* et *B. subtilis* sont les exemples les plus fréquents (Kloepper et *al.*, 1989). Les biopesticides stimulent la croissance de la plante indirectement par le contrôle des organismes délétères par différents mécanismes comme la production des antibiotiques (Hrynkiewicz and Baum, 2011).

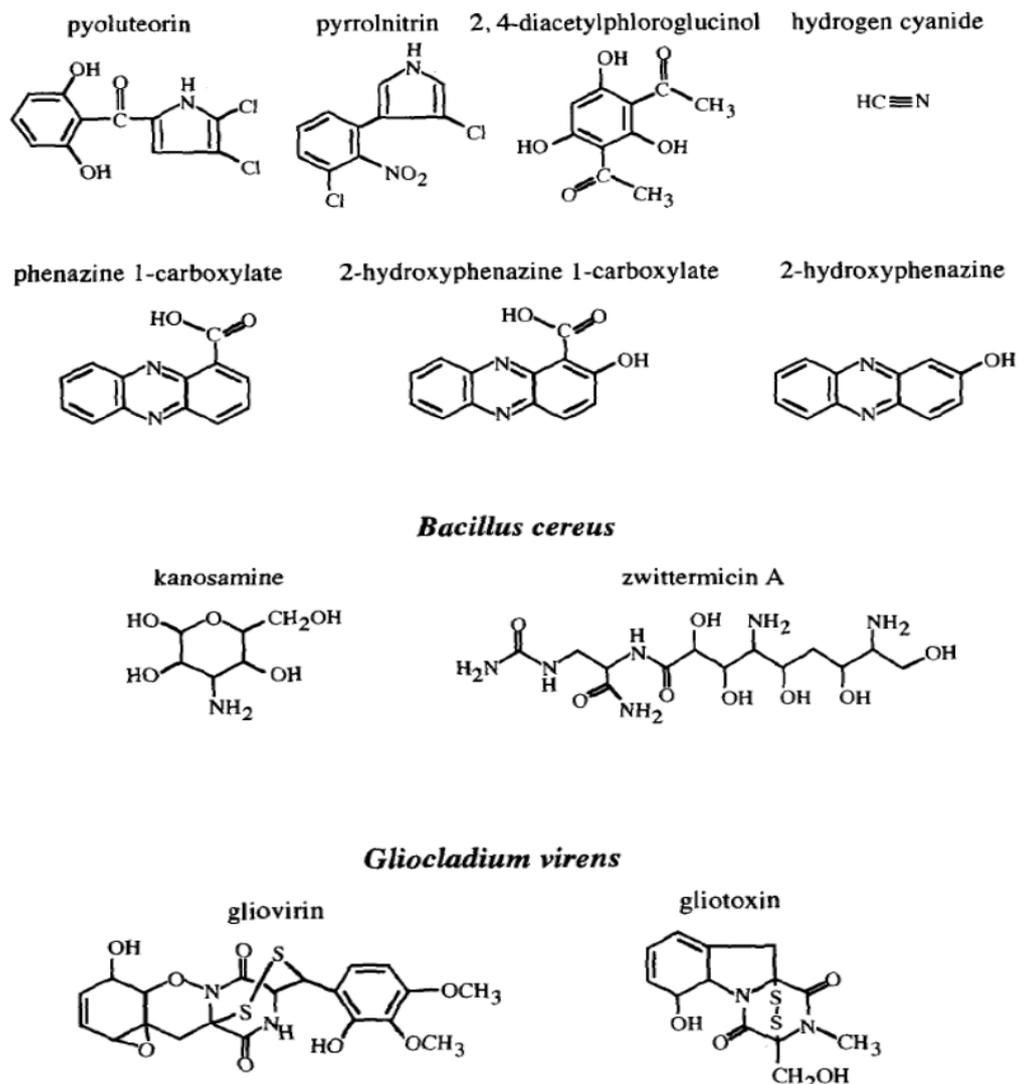
Les PGPR stimulent indirectement la croissance des plantes par élimination de phytopathogènes par divers mécanismes :

#### *a. Synthèse d'antibiotiques (Antibiose)*

La production et la libération des molécules qui tuent ou réduisent la croissance des pathogènes cibles est le mécanisme le plus efficace par lequel les microorganismes peuvent contrôler les maladies des plantes, (Harman et Shores, 2007). Les antibiotiques généralement produits par diverses bactéries antagonistes consistent en : l'ammoniac, le butyrolactone, 2,4 diacétyl phluroglucinol (DAPG), Kanosamine, oligomycine A, phénazine – 1 acide carboxylique, pyolutéorine, pyrrolnitrine, viscosinamide, xanthobaccine et zwittermycine. Le rôle de l'antibiose dans la protection à l'égard de phytopathogènes a été largement révisé (Raijmakers et *al.*, 2002).

Le biocontrôle est souvent attribué à l'antibiose, et dans plusieurs systèmes qui ont été étudiés un ou plusieurs antibiotiques ont été montrés avoir un rôle dans l'élimination des maladies (Handelsman and Stabb, 1996 ; Ramette, 2011).

La production d'antibiotiques est maintenant reconnu comme un mécanisme important à travers lequel les agents de biocontrôle en particulier les PGPR inhibent les phytopathogènes (Ahmadzadeh and Sharifi Tehrani, 2009). Les PGPR sont connus pour leur contrôle d'une large variété de phytopathogènes comme ; les champignons, bactéries, virus, insectes et nématodes (Meena et *al.*, 2014). Sur la figure suivante est montrée la structure chimique de quelques antibiotiques d'origine bactérienne et fongique.



**Fig.1** : Structure chimique des antibiotiques produits par des agents de biocontrôle bactériens et fongiques

**b. Production de cyanure d'hydrogène (HCN)**

En plus des substances diffusibles, les bactéries libèrent une large gamme de composés volatiles dans l'atmosphère, ces composés non seulement capables de promouvoir la croissance des plantes, mais aussi fortement inhiber la croissance fongique (Weisskopf, 2013). Le cyanure est extrêmement toxique pour les cellules vivantes, le cyanure d'hydrogène (HCN), est un composé antimicrobien à large spectre impliqué dans le contrôle biologique des maladies dû aux phytopathogènes

(Ramette et *al.*, 2003). l'HCN inhibe le cytochrome c oxydase terminal dans la chaîne respiratoire (Knowles, 1976).

### *c. Compétition pour les niches spécifiques et les nutriments*

Certains microorganismes (bactéries, levures, champignons filamenteux peuvent inhiber la germination des conidies des agents pathogènes via la compétition pour les éléments nutritifs, comme ; l'azote, le carbone, ou des micros ou macroéléments présents dans le milieu (Blakeman and Fokkema, 1982 ; Filonow, 2010).

La concurrence est faite entre le pathogène et le microorganisme saprophytique pour les matériaux organiques, l'azote, le carbone, les micros et les macroéléments libérés par les racines, en réduisant ainsi le nombre de tribunaux d'infection et l'étendue de la nécrose provoquée par le pathogène (Blakeman and Fokkema, 1982). La compétition pour l'espace de croissance et les nutriments est un facteur important (Handelsman and Stabb, 1996). L'implication de la compétition pour les nutriments dans le biocontrôle a été montrée dans plusieurs tests *in vitro* (Meena et *al.*, 2014). Les PGPB colonisent rapidement les surfaces des plantes et utilisent la plupart des nutriments disponibles, ce qui rend difficile la croissance des champignons (Glick et *al.*, 2012). La levure *Cryptococcus laurentii* BSR-Y22 et *Sporobolomyces roseus* FS43-238 contrôlent *B. cinerea* dans les plaies sur pomme en compétition pour le fructose, glucose, et sucrose (Filonow, 1998), pareil pour *Candida guilliermondii* rentrant en compétition pour les nutriments durant le contrôle de *Penicillium expansum* sur pomme (Scherin et *al.*, 2003). La compétition pour le fer dans le sol est le mécanisme le plus commun (Whipps et *al.*, 2009).

### *d. Enzymes lytiques*

La production d'enzymes extracellulaires par les microorganismes joue un rôle important dans la gestion des phytopathogènes, pour cela ces antagonistes sont largement analysés (Sheeba et *al.*, 2017).

Une grande importance est accordée aux bactéries produisant différentes enzymes hydrolytiques vu leur divers mécanismes à inhiber les champignons (Woo and Lorito, 2007).

Quelques bactéries de biocontrôle produisent les enzymes chitinases, cellulases,  $\beta$  (1,3) glucanase, des protéases, et des lipases qui sont capable de lyser une partie des parois cellulaires de plusieurs champignons phytopathogènes (Whipps, 2001 ; Nagarakumar et al., 2004 ; Glick et al., 2012 ; Tsegaye et al., 2017). L'activité antifongique est mesurée suite à la production de protéases, hydrolyse de la caséine, amylase, cellulase et pectinases (Sheeba et al., 2017), *Pseudomonas* sp. est l'une des espèces de PGPR produisant de large variétés de métabolites bioactifs jouant un rôle vital dans la protection des cultures (Fernando et al., 2005). La digestion des parois cellulaires de l'hôte est accomplis par une variante d'enzymes secrétées incluant ; les protéases, chitinases, et Glucanase (Di pietro et al., 1993).

Le mélange d'enzymes hydrolytiques avec des modes d'action complémentaires peut être nécessaire pour une efficacité maximale, et ça induit une augmentation de l'inhibition fongique *in vitro* (Lorito et al., 1992). Ces isolats bactériens en question jouent un rôle important dans l'augmentation du rendement et l'amélioration de la croissance et la qualité des légumes et fruits, ils sont considérés comme une alternative pour les fertilisateurs et les fongicides chimiques (El-Gamal et al., 2016).

### *e. Induction de la résistance systémique*

La résistance induite (IR) est le terme général de tous les types de réponses induites qui conduisent à une meilleure protection contre la maladie, y compris la résistance locale et systémique (Mandal and Ray, 2011). Elle exploite les mécanismes de défense naturels des plantes (Edreva, 2004).

Le type de défense induite de l'hôte varie selon ; la source, la quantité de stimulant (Pal et al., 2006). La résistance Systémique Acquise (RAS); est stimulée à la suite d'une infection initiale par un pathogène avirulent. Les plantes acquièrent une sorte de mémoire de la première infection afin de se protéger plus rapidement une fois en contact avec une seconde (Adam, 2008). Elle est induite par l'acide salicylique (SA), un composé qui est souvent produit suite à l'infection par le pathogène et typiquement mène à l'expression des protéines reliées à la pathogénicité (PR). La Résistance Systémique Induite (RSI) est activée par l'acide jasmonique (JA) et/ ou l'éthylène, qui

sont produits suite aux applications de quelques rhizobactéries non pathogènes (Pal et *al.*, 2006).

La résistance systémique induite est phénotypiquement similaire à la résistance systémique acquise qui a lieu quand les plantes activent leurs mécanismes de défense en réponse à l'infection par l'agent pathogène (Handelsman and Stabb, 1996 ; Winding et *al.*, 2004). Les plantes ISR positif réagissent plus rapidement et plus fortement aux attaques par le pathogène en induisant des mécanismes de défense, et ce type de résistance ne requière pas une interaction directe entre le PGPB et le pathogène (Glick et *al.*, 2012).

La synthèse de l'acide salicylique par les bactéries peut rendre la plante plus résistante aux ravageurs et aux agents pathogènes en stimulant la résistance systémique acquise (SAR), l'induction de la résistance systémique induite (ISR) dans la plante est une autre façon dont les bactéries peuvent protéger les plantes. Les déterminants bactériens de l'ISR incluent les lipopolysacharides, sidérophores, et acide salicylique (SA) (Van Loon et *al.*, 1998).

Il a été démontré que le traitement des racines par des PGPR produit des effets protecteurs sur d'autres parties de la plante sans migration des bactéries induisant la résistance au travers du système vasculaire de la plante ou à travers les tissus. Des exemples sont cités ; certaines souches de rhizobactéries induisent une réponse de résistance des feuilles au pathogène *Colletotrichum orbiculare* une fois appliquées sur les graines de concombre (Wei et *al.*, 1991), et une résistance systémique au flétrissement fusarien sur la même plante (Liu et *al.*, 1995).

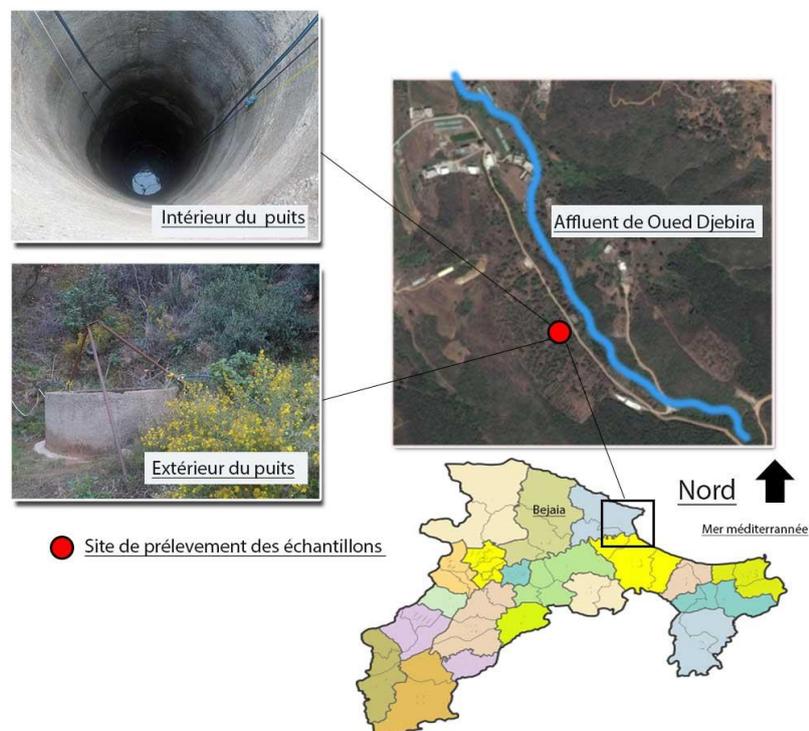
### ***f. Combinaison des mécanismes d'action***

Dans de nombreux cas, on peut supposer que le biocontrôle est le résultat de plusieurs modes d'action combinés de l'antagoniste, et beaucoup de travaux ont été publiés sur ça (fiume et Fium, 2006 ; Yigit et Dikilitas, 2007 ; Karkaci et *al.*, 2010). Ces travaux et d'autres suggèrent que la combinaison de plusieurs agents de lutte biologique et des agents induisant la résistance systémique peut être plus efficace puisqu'un seul agent peut être incapable de réagir dans toutes les circonstances (Izallalen, 1997).

## Partie I. Criblage de bactéries à critères de Biocontrôle

### 1. Prélèvement des échantillons d'eau de puits

Dans le but de rechercher des bactéries à caractères PGP (Plant Growth Promotion) et productrices de molécules antifongiques contre les champignons phytopathogènes, des prélèvements sont réalisés en toute asepsie à partir des eaux douces (puits) du village de Djebira ( $36^{\circ}41'59.2$  »N  $5^{\circ}04'28.8$  »E) en mois d'Octobre 2015. Le puits est à usage agricole situé au pied d'une montagne recevant ainsi les flux des eaux de ruissellement en période d'hiver, et n'a pas été nettoyé pendant plusieurs années. Les échantillons sont prélevés à l'aide d'un récipient désinfecté à l'eau de javel et sont récupérés dans des flacons stériles en verre puis transportés à l'aide d'une glacière ( $4^{\circ}\text{C}$ ) le jour même au laboratoire. La figure 2 illustre l'endroit de prélèvement et sa position géographique.



**Fig.2** : Site de prélèvement des échantillons d'eau de puits.

## **2. Analyse physicochimiques**

### **2.1. pH**

Les valeurs du pH sont déterminées par un pH-mètre étalonné, l'expérience est réalisée en triplicata (Mathieu et Pieltain, 2003).

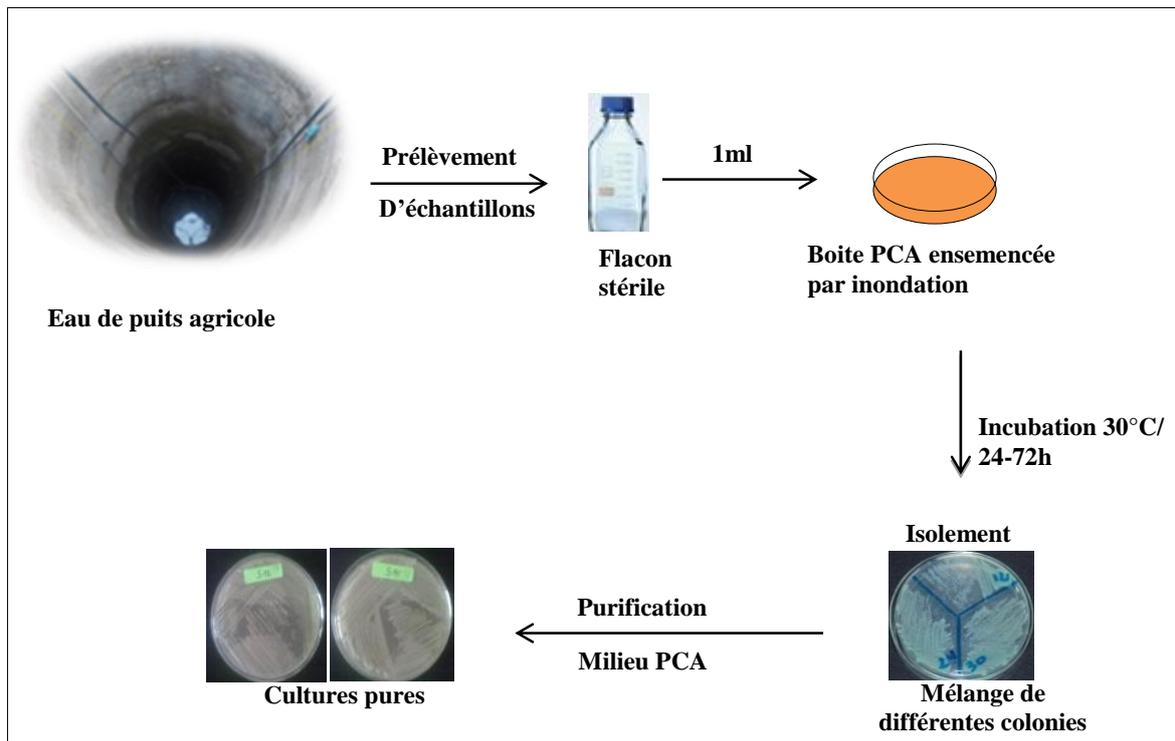
### **2.2. Conductivité électrique**

La conductivité électrique est déterminée selon le protocole de Hardie and Doyle (2012). Elle est mesurée à l'aide d'un conductimètre (Hanna Instruments-HI98129), préalablement étalonné. La cellule du conductimètre est trempée dans la solution en la déplaçant vers le haut et vers le bas légèrement. La lecture est faite lorsque le système se stabilise.

## **3. Criblage d'isolats bactériens à caractères PGP et producteurs de molécules antifongiques**

### **3.1. Isolement des bactéries**

1ml de chaque échantillon d'eau prélevé a servi pour ensemer la surface de milieu PCA par inondation. Les boites sont ensuite incubées à 30°C pendant 24 à 72h. Après incubation, chaque colonie apparaissant différente à l'œil nu est repiquée stérilement dans une autre boite de milieu PCA, incubée puis conservée pour les tests ultérieurs (Fig. 3).



**Fig.3** : Les étapes suivies pour l'obtention des différents isolats à partir d'eau de puits. Le schéma qui suit résume les différentes étapes suivies pour sélectionner les meilleurs souches (allant du prélèvement d'eau de puits jusqu'aux tests *in vivo*).

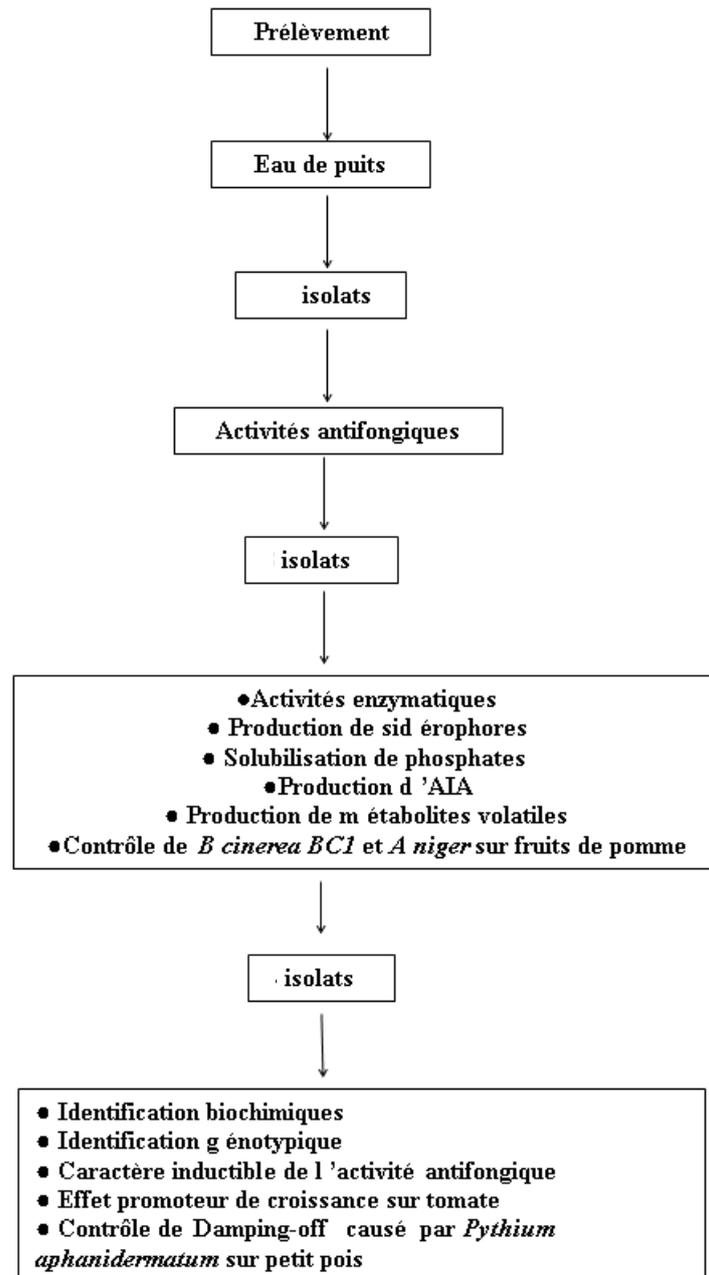
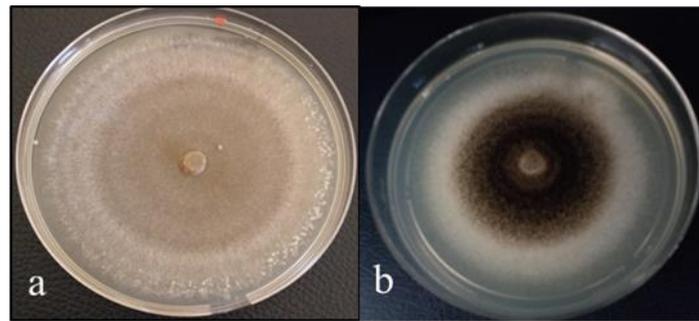


Fig. 4 : Étapes de la sélection des souches bactériennes

### 3.2. Détermination de l'activité antifongique

#### 3.2.1. Les souches fongiques

Les deux champignons utilisés dans le test antifongique sont : *Botrytis cinerea BCI* et *Aspergillus niger brasiliensis* ATCC 9642, fournis par le laboratoire de Mycologie-Université A. Mira de Béjaia-Algérie et l'institut des biosciences et bio-ressources (IBBR) Naples – Italie, respectivement. Les souches fongiques sont cultivées sur milieu gélosé à extrait de malt et des copies sont conservées pour des tests ultérieurs.



**Fig. 5** : Aspect des espèces fongiques sur milieu à extrait de malt  
a) *Botrytis cinerea* (BC1) ; b) *Aspergillus niger brasiliensis*

Le premier test permettant de faire une sélection préliminaire des différents isolats bactériens est basé sur l'effet antagoniste à l'égard de deux champignons phytopathogènes : *Aspergillus niger* et *Botrytis cinerea* par la méthode en double culture.

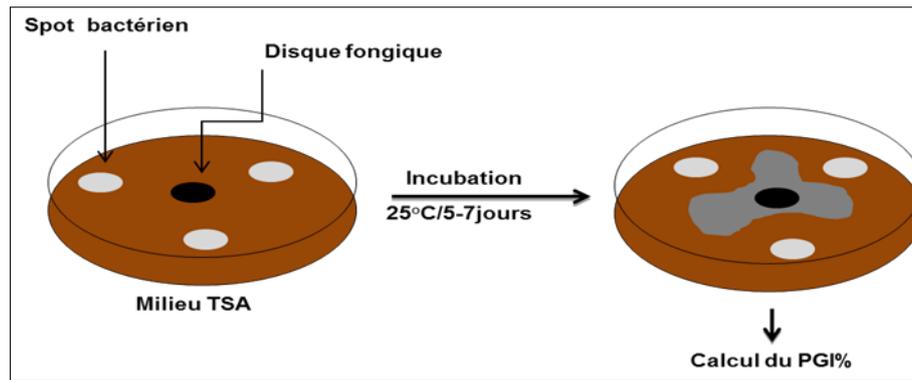
Le test adopté par Ramesh et *al.* (2002) consiste à déposer un disque de 5mm de diamètre d'une culture fongique jeune au centre de la boîte de Pétri contenant le milieu gélosé à extrait de malt. 10µl d'une culture bactérienne jeune sont déposés à une distance de 1.5cm de la périphérie de la boîte de Pétri, avec trois répétitions dans chaque boîte. Chaque test est répété en duplicata. Un témoin négatif contenant des boîtes dépourvues de bactéries antagonistes est préparé en parallèle (Fig.6).

Les boîtes sont incubées à 25°C± 2°C pendant 5jours avec une vérification quotidienne de l'apparition ou non d'une zone d'inhibition. La capacité de chaque isolat bactérien à inhiber la croissance mycélienne est déterminée en calculant le pourcentage d'inhibition de la croissance (PGI%) selon la formule suivante :

$$\text{PGI}\% = \frac{\text{KR} - \text{R1}}{\text{KR}} \times 100$$

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

**R1** : la distance en mm entre le point d'inoculation du champignon phytopathogène et la marge de la colonie contenue dans la boîte de Pétri traitée.



**Fig. 6 :** Mise en évidence de l'inhibition de la croissance mycélienne par les isolats bactériens

### 3.2.2. Inhibition de la germination des spores

Ce test a été lancé à l'égard des spores des deux champignons : *A. niger* et *B. cinerea*, suivant le protocole de Sadfi-Zouaoui et *al.* (2008) comme suit :

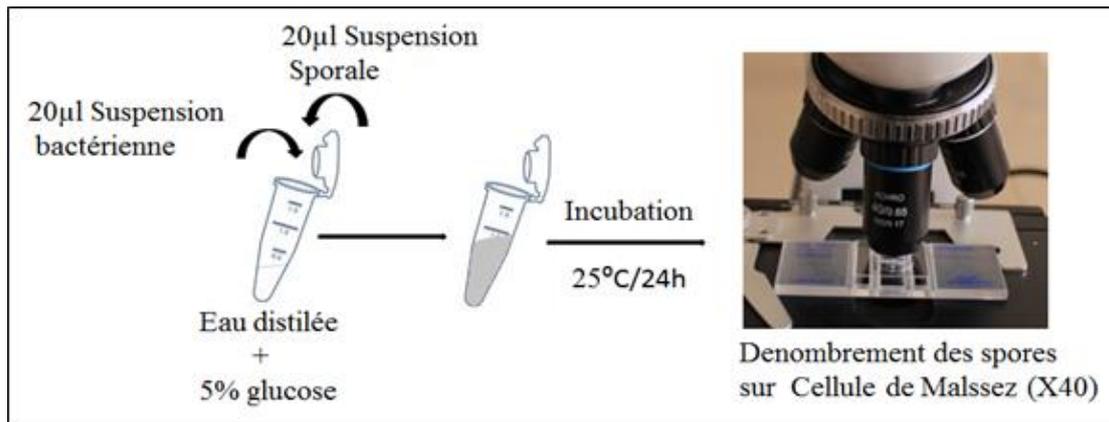
Un tube Eppendorf contenant 1ml d'eau distillée stérile additionnée de glucose à 5% est préparé, 20 $\mu$ l de la suspension sporale de chaque champignon ajusté à 10<sup>6</sup>/ml et le même volume de chaque suspension bactérienne âgée de 24h ajustée à 10<sup>8</sup> UFC/ml sont ajoutés au mélange précédent en toute stérilité. Des tubes Eppendorf préparés en parallèle ne contenant que les spores fongiques ont servi de témoin, le tout est ensuite incubé à 25°C/24h. Le test est répété trois fois. Après incubation, 17 $\mu$ l du mélange sont mis entre une lamelle et une lame de Malassez, et la lecture est faite sous microscope optique à l'objectif  $\times 40$  dans le but de compter le nombre de spores germées sur le total. Ces dernières sont considérées germées quand la longueur de leur tube germinatif est  $\geq 3$ mm.

Le pourcentage des spores germées (PGS%) est calculé suivant la formule ci-dessous : où

$$\text{PGS\%} = \frac{\text{SGT} - \text{SGB}}{\text{SGT}} \times 100$$

SGT : nombre de spores germées dans le témoin

SGB : nombre de spores germées en présence de la bactérie test.



**Fig. 7 :** Inhibition de la germination des spores fongiques (*B. cinerea* et *A. niger*) par les isolats bactériens

### 3.2.3. Effet des substances volatiles sur la croissance mycélienne fongique (Fiddaman, 1993)

La méthode utilisée pour tester l'effet des composés volatils produits pas les isolats bactériens sur la croissance radiale de *B. cinerea* et *A. niger* a été suivie selon la méthode donnée par Dennis et Webster (1971). Une boîte de Pétri contenant la gélose à extrait de malt est inoculée avec un disque fongique de 5mm de diamètre (*B. cinerea* ou *A. niger*). Une autre boîte contenant le milieu PCA estensemencée par stries serrés avec l'antagoniste bactérien. Les couvercles des deux boîtes sont enlevés stérilement et ces dernières sont placées l'une en face de l'autre et scellées avec du parafilm. Une boîte inoculée uniquement avec un disque du pathogène fongique et une autre contenant du PCA vierge sont préparées comme précédemment pour servir de témoin, l'incubation est réalisée à 25°C/7jours. La lecture des résultats consiste à mesurer la croissance radiale du champignon. L'expérience est réalisée en duplicata. Le diamètre de la croissance mycélienne du champignon test dans le traitement par rapport à celui du témoin permet le calcul du pourcentage d'inhibition de la croissance (Percentage of Growth Inhibition) (PGI%) suivant cette formule :

$$\text{PGI}\% = [(a-b)/a] \times 100$$

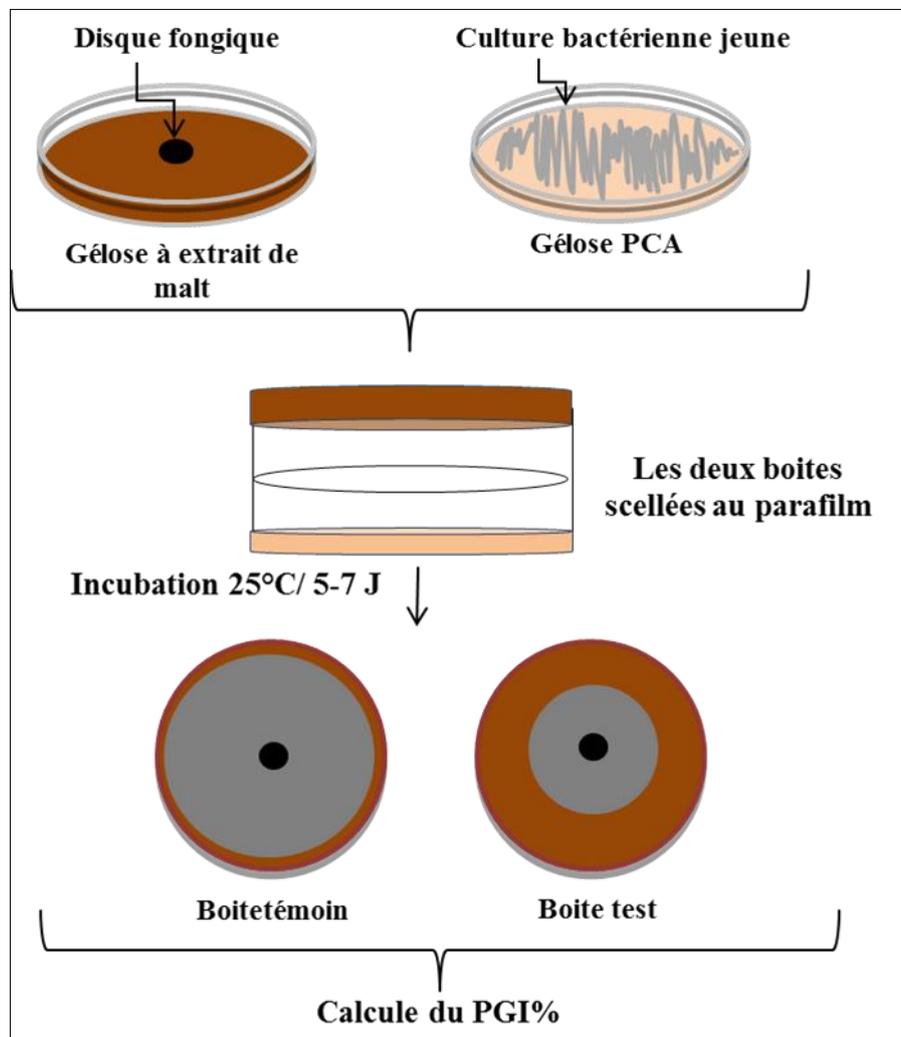
PGI : pourcentage d'inhibition de croissance des champignons testés (%).

a : diamètre moyen du mycélium dans la boîte témoin (cm).

b : diamètre moyen du mycélium dans les boîtes traitées avec les bactéries (cm).

**NB**

La pigmentation et l'aspect (densité) du mycélium aérien et de substrat, la présence ou non de spores sont aussi vérifiés dans ce test.



**Fig. 8 :** Mise en évidence de la production de substances volatiles

### **3.3. Caractérisation métabolique et fonctionnelle (quelques traits PGP impliqués dans le biocontrôle)**

#### **3.3.1. Les activités enzymatiques**

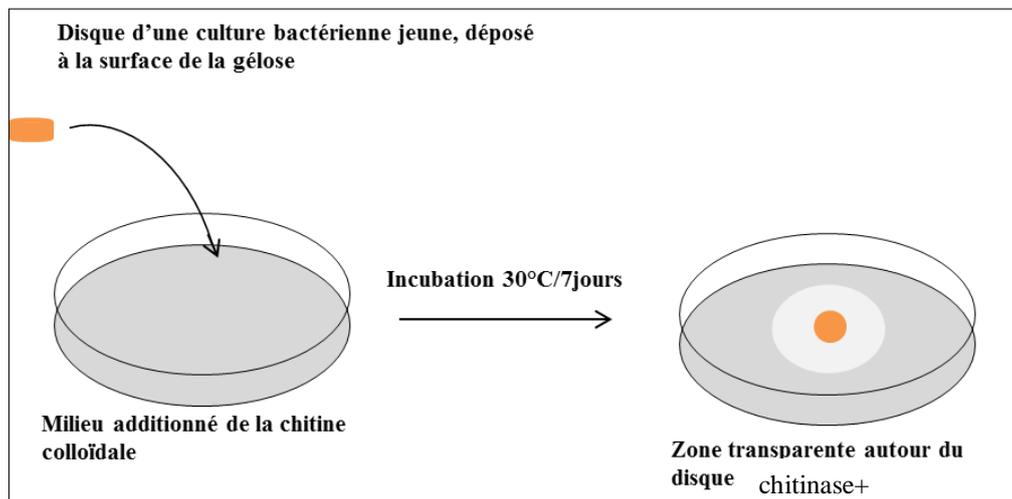
Certaines enzymes produites par les bactéries d'intérêt agricole sont habituellement recherchées, elles sont impliquées dans la stimulation de la croissance des plantes (cellulase, amylase, uréase, estérase et phosphatase) et en parallèle dans l'inhibition de la croissance fongique en particulier par une attaque des composés pariétaux

(chitinase, protéase et lipase). La recherche de ces enzymes a fait l'objet d'une partie de notre étude. Les activités enzymatiques sont mises en évidence sur milieux gélosés en introduisant le substrat de l'enzyme recherchée comme seule source de carbone.

➤ **Chitinase**

Le milieu de culture suivant est utilisé, il est composé de la manière suivante en g/l :  
La chitine colloïdale : 0.8 à 0.6,  $K_2HPO_4$  : 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.

Le milieu estensemencé par la méthode des disques et l'incubation à 30°C dure 7 jours minimum. L'activité chitinasique se manifeste par l'apparition d'un halo transparent autour de ces disques (Kopečný et al., 1996).



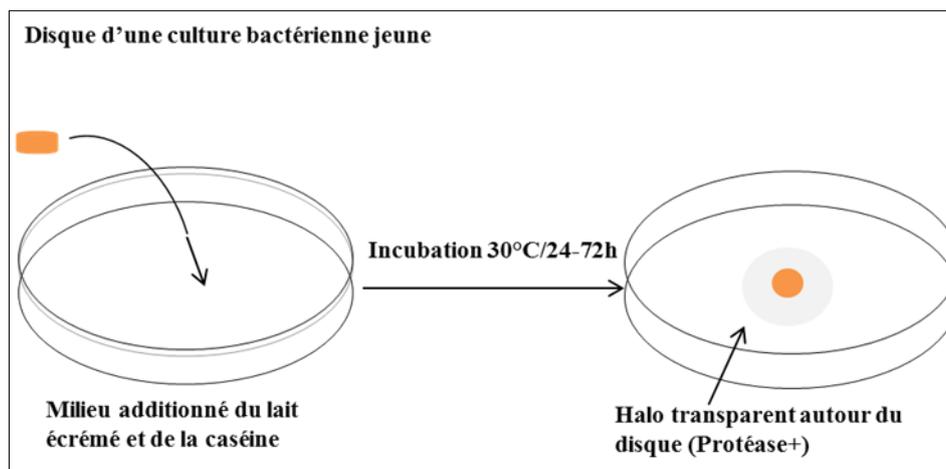
**Fig. 9** : Recherche de la production de la chitinase

**Préparation de la chitine colloïdale**

1g de chitine est suspendu dans 9 ml d' HCl concentré (37%). La solution est laissée sous agitation pendant 2 heures jusqu'à dissolution (apparition d'une couleur brune). Par la suite, elle sera transférée dans une fiole de 250 ml et le volume est complété avec de l'eau distillée. Après un temps de repos (une nuit), le surnageant est décanté et enlevé et le culot est resuspendu dans de l'eau distillée. La procédure de lavage et de décantation est répétée trois fois avec de l'eau de robinet et trois fois avec l'eau distillée. Enfin, le surnageant est éliminé et la chitine décantée est filtrée à l'aide d'un tamis métallique de 0,5 mm. L'effluent est stocké dans une bouteille opaque à 4°C.

➤ **Protéase**

Le milieu de culture contient en g/l : caséine pancréatique (5) ; Extrait de levures (2,5) ; Glucose (1), et Agar (15). Le milieu est ajusté à pH 7 et autoclavé 20 minutes à 120°C. Parallèlement, 100 ml d'une solution du lait écrémé à 10% autoclavée (120°C/10 min) est préparée et ajoutée au milieu. Ce dernier est ensuiteensemencé par la méthode des disques. Les bactéries ayant une activité protéasique positive montrent un halo transparent (Bach et Munch, 2000) (Fig. 10).



**Fig. 10** : Recherche de la production des protéases

➤ **Cellulase**

Pour révéler l'activité cellulase, un repiquage des souches est effectué sur milieu de Carder. (1986) contenant en g/l:  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  (6) ;  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  (3);  $\text{NaCl}$  (0,5);  $\text{NH}_4\text{Cl}$  (1); extraits de levure (3) ; CMC (carboxyméthyl-cellulose) (7) ; Agar (15) pendant 48h/30°C, dans le but d'avoir des cultures jeunes. Les boîtes sontensemencées par la méthode des cylindres d'agar, puis incubées pendant 8 jours à 30°C (Carrim et *al.*, 2006).

Après incubation, une solution de rouge Congo (1%) est ajoutée à la surface des colonies, et 20min plus tard, la surface est inondée avec une solution de  $\text{NaCl}$  à 1M puis laissée au repos une nuit. Par ailleurs, l'apparition d'un halo clair autour des cylindres traduit la présence d'une cellulase extracellulaire.

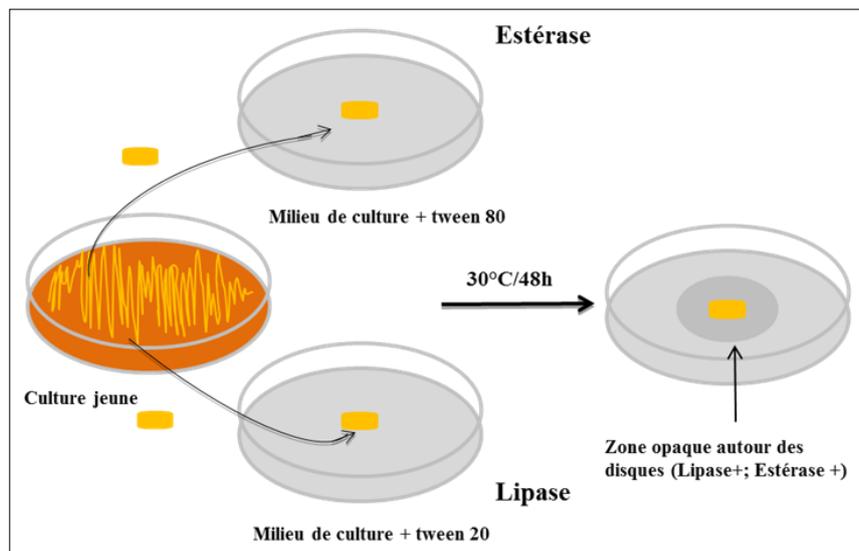
➤ **Estérase**

Le milieu de culture utilisé est celui de Sierra. (1957) cité par Carrim et *al.*(2006). Il contient en g/l : peptone (10) ;  $\text{NaCl}$  (5.0) ;  $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  (0.1) ; Tween 80 (1%, v/v) et

Agar (18). Le pH est ajusté à 7,4. Le milieu estensemencé et incubé à 30°C/48h. La présence d'une activité estérasique se traduit par l'apparition d'un halo clair autour des colonies.

➤ **Lipase**

La recherche de l'activité lipolytique est réalisée de la même manière que l'activité estérasique. Toutefois, le tween 80 est remplacé par le tween 20, et le résultat positif est déterminé par la présence d'un halo clair autour des disques (Carrim et *al.*, 2006). Le schéma suivant illustre la mise en évidence des deux dernières activités.



**Fig. 11 :** Mise en évidence des deux activités estérasique et lipasique

➤ **Amylase**

Afin de mettre en évidence la capacité des souches à dégrader l'amidon soluble, un test d'activité amylasique est réalisé sur gélose à base d'amidon. Le milieu contient en (g/l) : KNO<sub>3</sub> (0,5), K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> (1,0), MgSO<sub>4</sub> (0,2), CaCl<sub>2</sub> (0,1), FeCl<sub>3</sub> (0,001), amidon soluble (10,0), agar (15,0), eau distillée 1000 ml. Le pH est ajusté à 7,2 puis autoclavé à 121°C/30mn. Une solution de lugol (révélateur) est préparée comme suit : 1g d'iode cristallin, 2g de KI, 300ml d'eau distillée. Le tout est mélangé et laissé au repos puis filtré.

Le milieu estensemencé par dépôt d'un disque de 5 mm de chaque souche âgée de 24h à la surface. L'incubation se fait à 30°C/48-72h, puis la solution de lugol préalablement préparée est éparpillée sur toute la surface du milieu, après quelques minutes de contact, l'excès est éliminé et les boîtes sont lavées à l'eau distillée et la lecture est effectuée de la manière suivante:

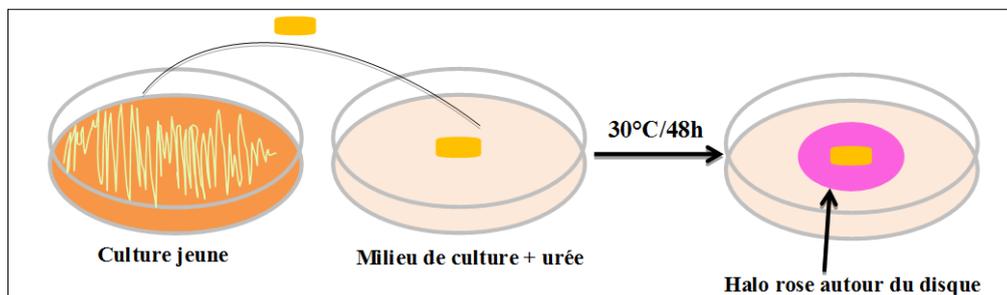
La présence de l'amidon dans le milieu apparaît sous forme d'une couleur bleue noirâtre, ce qui signifie l'absence de l'activité amylasique. En revanche, si l'amidon est hydrolysé, une zone claire apparaîtrait autour des disques d'agar. Ce qui traduit la présence d'une activité amylasique extracellulaire chez les souches (Vinoth Raj et *al.*, 2009)

➤ **Uréase**

Pour préparer le milieu, à 950ml d'H<sub>2</sub>O (CSP): (1g) Peptone, (1g) Glucose, (5g) NaCl, (1.2g) Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, (0,8g) KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, (0,012g) rouge de phénol et (15g) d'agar sont ajoutés.

Le pH du milieu est ajusté à 6,8 puis autoclavé 20 minutes à 120 ° C, 50 ml d'une solution d'urée à 40% préalablement filtrée (0.22µm) sont ajoutés. Enfin le milieu est coulé en boîtes de Pétri (Christensen, 1946).

Les bactéries uréase-positive montrent un halo rose autour de leurs colonies, (Fig. 12).

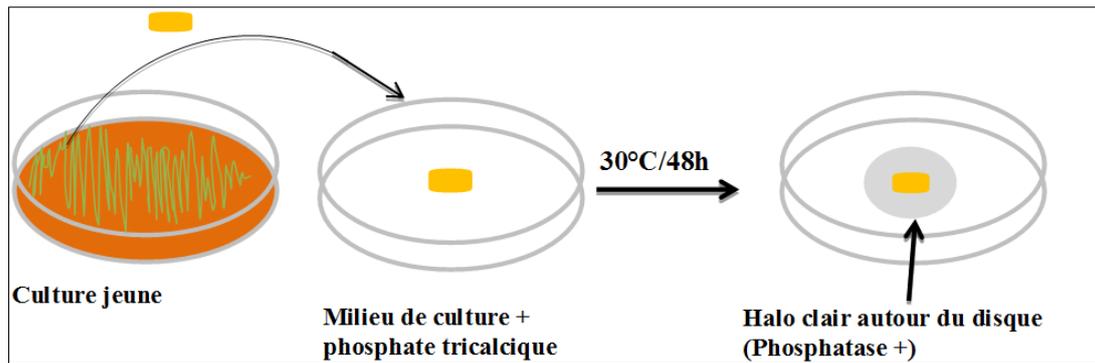


**Fig. 12 :** Recherche de l'activité uréasique

➤ **Phosphatase/ solubilisation du phosphate**

Le milieu de culture contient en g/l : extrait de levure (5) ; glucose (5) ; agar (7,5) et 1l d'eau distillée. Le milieu est autoclavé à 120°C/20min, ensuite, 20 ml d'une solution du phosphate tricalcique (10%) autoclavée est rajoutée.

Les bactéries à activité phosphatasique (YED-P) montrent un halo transparent autour de leurs colonies (Peix et *al.*, 2001).



**Fig.13 :** Recherche de l'activité phosphatasique

### 3.3.2. Production de sidérophores

Le protocole proposé par Schwyn et Neilands, (1987) pour la recherche des protéines fixatrices du fer a été adopté. Le milieu est composé de :

#### ●Partie solide

1.3 g de tampon PIPES piperazine-N, N'-bis (2-ethanesulfonic acid) sont dissous dans 60 ml d'eau distillée. Le pH est ajusté à 6,8 et le volume du milieu est complété à 80 ml, puis additionné de 1.5 g d'agar. Le milieu est enfin autoclavé à 121°C/30 min.

#### ●Solution CAS

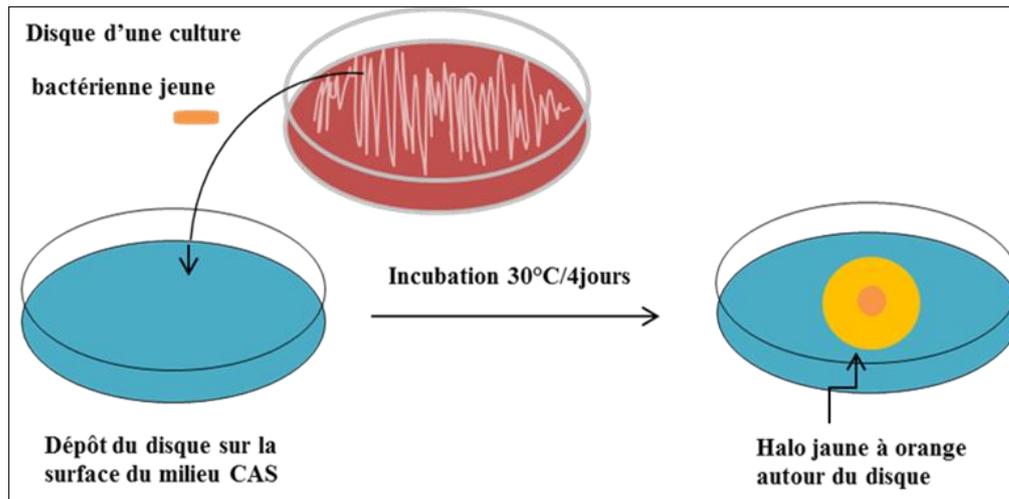
**Solution (1) :** 60,5 mg de Cromoazurol S (CAS) sont dissous dans 50 ml d'eau distillée. Une solution stock de  $\text{FeCl}_3 \times 6\text{H}_2\text{O}$  (100 mM) est parallèlement préparée.

**Solution (2) :** 100  $\mu\text{l}$  de la solution stock sont dilués dans 9,9 ml de HCl (10 mM) à 37%.

**Solution (3) :** 72,9 mg de HDTMA (bromure d'héxadécyl-triméthyl- ammonium) sont suspendus dans 40 ml d'eau distillée.

Les trois solutions sont mélangées comme suit (1+2) + 3x HDTMA. Le mélange est recouvert avec du papier aluminium pour empêcher la dégradation de la CAS et la solution stock est autoclavée puis conservée à 4°C.

Le protocole expérimental est illustré dans la figure suivante :

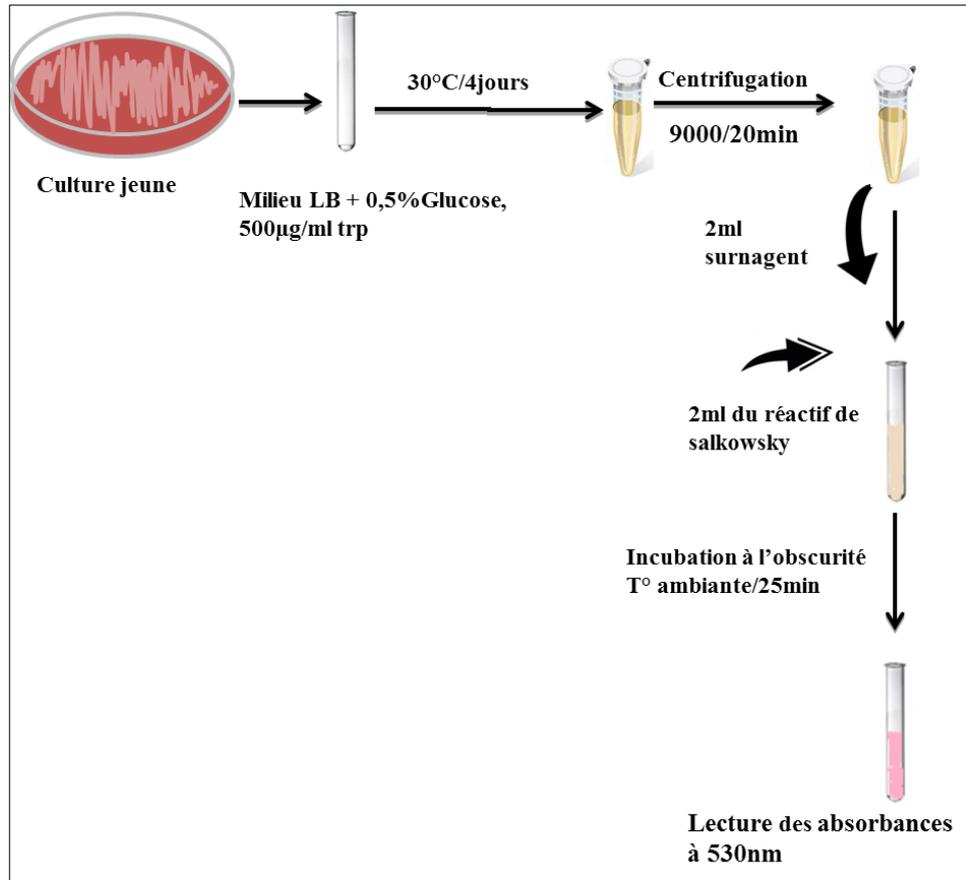


**Fig. 14 :** Recherche de production de sidérophores

### 3.3.3. Production de l'acide indole acétique (AIA)

Ce test permet de voir la capacité de la bactérie à produire la phytohormone (auxine) *in vitro*, cela à partir de l'indole produit par désamination et hydrolyse de tryptophane présent dans le milieu de culture (Guiraud et Galzy, 1980).

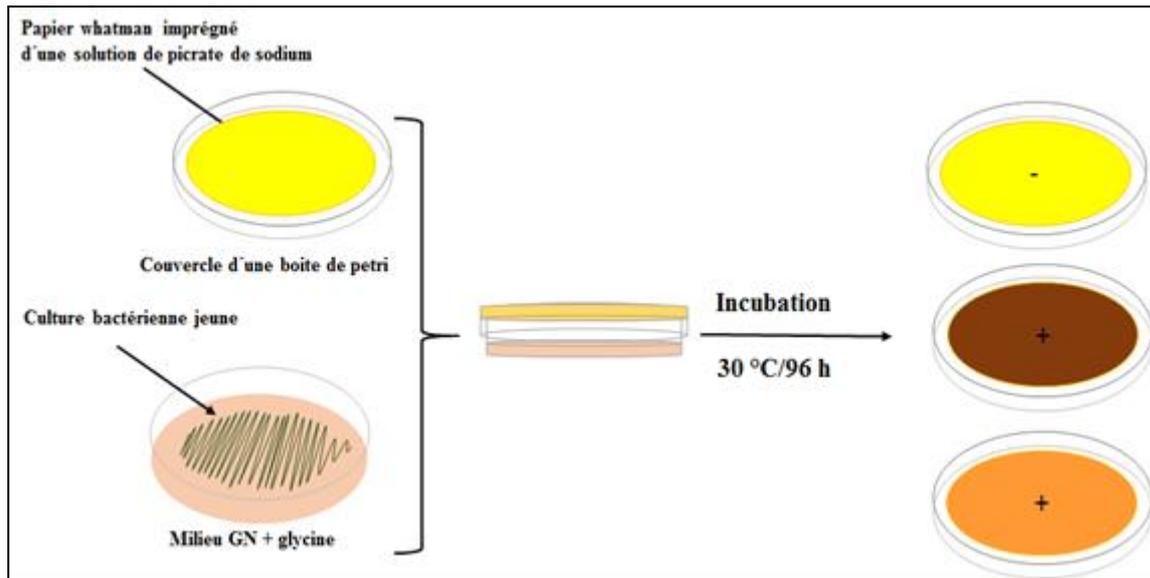
La production de l'AIA est déterminée en utilisant la technique standard (Bric et *al.*, 1991). Les souches bactériennes sont cultivées dans le bouillon Luria Bertani (LB) (en g/l ; NaCl 4, tryptone 10, extrait de levure 5) additionné de 0.5% de glucose et 500µg/ ml de tryptophane, puis incubées avec une agitation continue (100rpm/30°C/3jours). 5ml de chaque culture sont centrifugés à 9000g/20min, puis 2ml de réactif de Salkowsky (2% de FeCl<sub>3</sub> 0,5 M dans de l'acide perchlorique à 35%) sont mélangés avec le même volume de surnageant de culture précédente. Le mélange est ainsi incubé à l'obscurité et à température ambiante pendant 25min. La production d'AIA qui est traduite par le développement d'une couleur rose est mesurée par spectrophotométrie (530nm) et les valeurs sont obtenues par extrapolation sur une courbe standard préalablement préparée en utilisant une solution pure d'AIA à différente concentration (Annexe II).



**Fig. 15 :** Recherche de la production d'Acide Indole Acétique (AIA).

### 3.3.4. Production de cyanure d'hydrogène (HCN)

La production d'HCN est détectée selon la méthode de Lorck. (1948). Une gélose nutritive est additionnée d'une solution de glycine à 4.4g/l préalablement stérilisée par filtration (0.22µm), le tout est versé dans des boîtes de Pétri de 9cm de diamètre, après solidification, des cultures bactériennes jeunes sont ensemencées par des stries sérés. Les couvercles sont recouverts du côté interne par un papier Whatman imprégné d'une solution de picrate de sodium (1% d'acide picrique, et 2% de carbonate de sodium (Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>)). Les boîtes sont sellées avec du parafilm avant incubation à 30°C/4 jours. Un changement de la couleur jaune du papier Whatman (initialement fourni par la solution du picrate de sodium) à une couleur orange, rouge, brun, ou brun rougeâtre est enregistré comme indication d'un potentiel cyanogénique faible, modéré ou fort des isolats bactérien respectivement (Fig. 16).

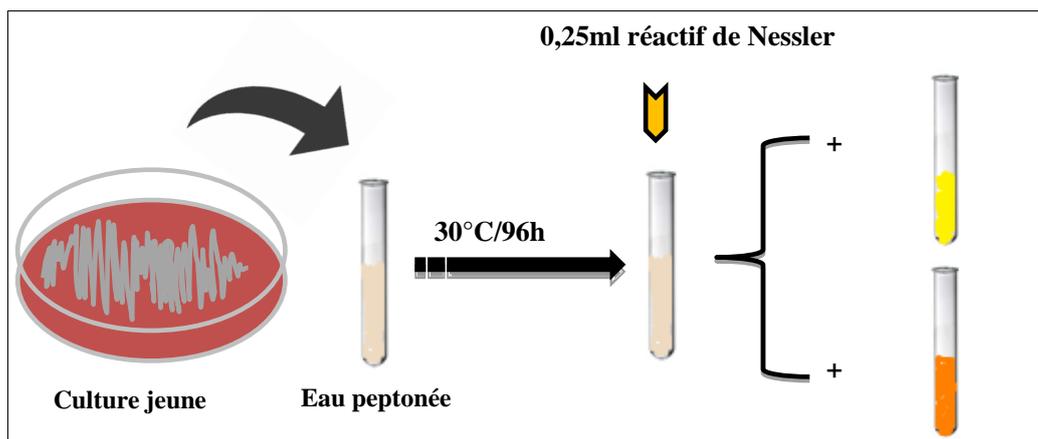


**Fig. 16 :** Mise en évidence de la production de cyanure d'hydrogène

(+) : présence d'HCN ; (-) : absence d'HCN

### 3.3.5. Production d'ammoniac ( $NH_3$ )

La production d'ammoniac à partir des composés organiques utilisant le réactif de Nessler est testé dans l'eau peptonée. Des cultures bactériennes jeunes sont inoculées dans des tubes contenant 5ml d'eau peptonée, après incubation à 30°C/48h, 0.25ml de réactif de Nessler sont ajoutés dans chaque tube. L'apparition d'une couleur brune à jaune indique la production d'ammoniac (Capuccino and Sherman, 1992) (Fig. 17).



**Fig. 17 :** Recherche de la production d'ammoniac

### 3.4. Activité fongistatique/fongicide des souches bactériennes

Les boîtes montrant de claires zones d'inhibition dans le test en double culture sont laissées sur paillasse pendant 70 jours pour évaluer l'évolution de l'activité inhibitrice à l'égard des champignons pathogènes en fonction du temps, en présence d'une boîte témoin (De Cal et *al.*, 1987). Après 70 jours, si l'activité antifongique est restée intacte, un disque mycélien est pris de la zone d'interaction entre le champignon et la bactérie et déposé ensuite à la surface d'une autre boîte vierge d'extrait de malt, et les boîtes sont incubées à 25°C. L'apparition d'un mycélium de nouveau à partir des disques est une preuve que l'activité inhibitrice est fongistatique, dans le cas contraire celle-ci est dite fongicide.

### 3.5. Contrôle de *Botrytis cinerea* BC1 et *Aspergillus niger* sur fruits de pomme avec blessure du fruit

Les huit isolats bactériens sont testés pour leur capacité à inhiber la croissance fongique de deux champignons précédemment cités sur les fruits d'une variété locale de pomme (Golden Delicious). Les différentes étapes suivies pour réaliser ce test sont représentées ci-dessous :

Choisir les fruits avec soin (exemptes de blessures et de pourriture, même calibre, et même stade de maturation)



Désinfecter la surface du fruit avec immersion pendant 1 à 2min dans l'eau de Javel (2%), puis rincer 2 fois avec de l'eau distillée stérile.



Sécher à température ambiante pendant 2heures



Blesser le fruit dans la zone équatoriale avec 1 à 4 puits (3mm largeur×3mm profondeur) selon sa taille



Inoculer 30µl de l'antagoniste bactérien ( $1 \times 10^8$  cellules/ml) dans chaque trou

Pour le témoin, mettre 30µl d'eau distillée stérile

Laisser à température ambiante pendant 2heures



Rajouter dans chaque puits 15 µl de la suspension du pathogène ; pour *Botrytis cinerea* : ( $2 \times 10^4$  spores/ml), *Aspergillus niger* : ( $1 \times 10^5$  spores/ml)



Incubation des fruits à 20°C, 95 à 98% RH (humidité relative)

Incubation de 4 à 6 jours



La pourriture est évaluée quand 90-100 % des blessures du contrôle sont infectées.

**NB:** Chaque test a subit 5 répétitions, et dans chaque répétition 6 fruits sont impliqués.

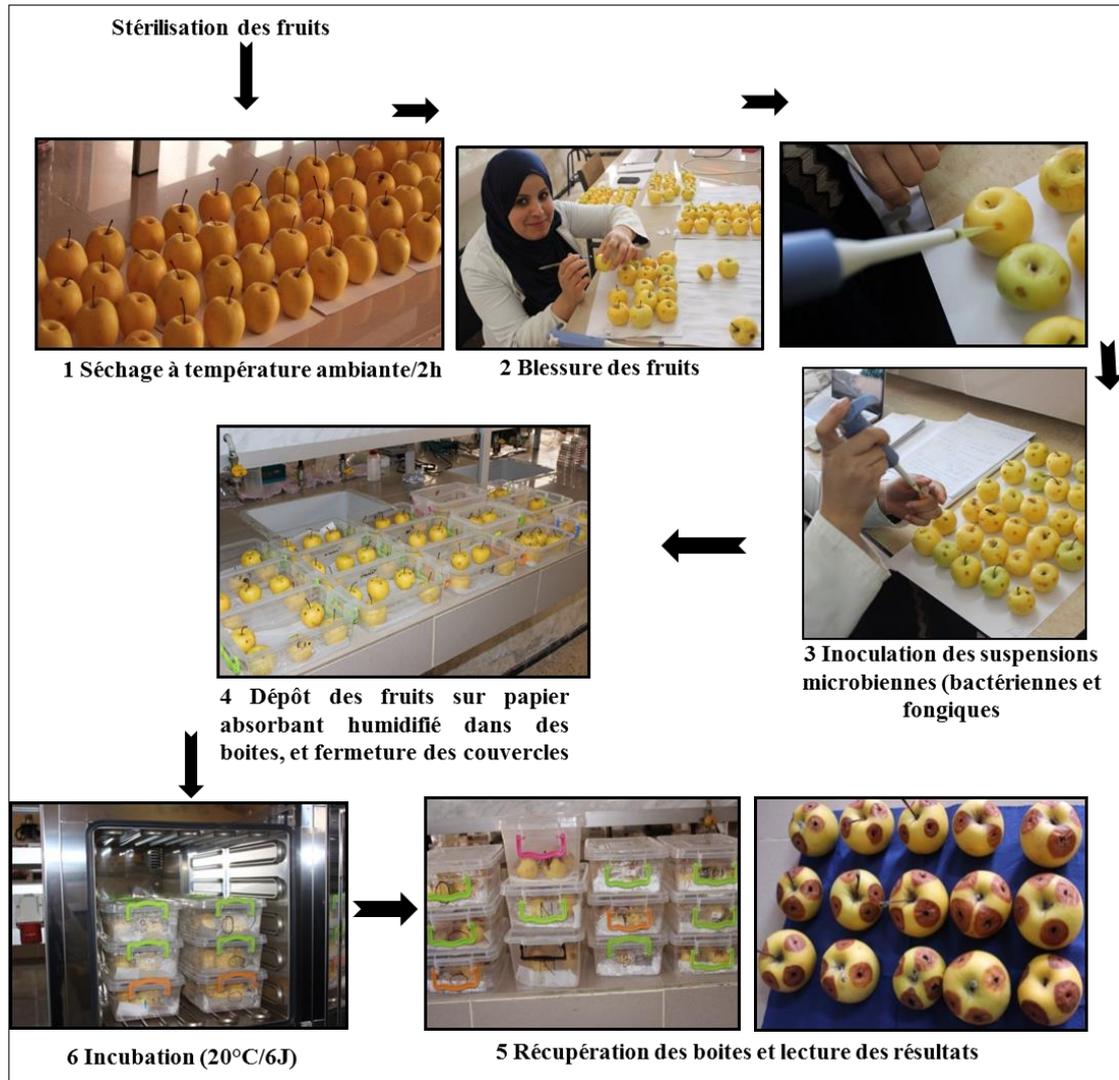
Les blessures infectées sont évaluées quotidiennement et les données sont transformées en pourcentages d'inhibition suivant cette formule :

$$IA = (T - A / T) \times 100$$

T : nombre de blessures infectées dans le contrôle ;

A : nombre de blessure infectées inoculées avec l'antagoniste et le pathogène.

Les résultats sont enregistrés après 3 et 6 jours d'incubation.



**Fig. 18 :** Les différentes étapes du test d'activité antifongique sur pomme

Les résultats des activités recherchées ont permis de sélectionner quatre isolats (B, C, D, et N) qui seront soumis aux tests suivants :

- caractérisation phénotypique et génotypique,
- effet promoteur de croissance sur tomate,
- contrôle de la fonte des semis causée par *Pythium aphanidermatum* sur petit pois.

## **Partie II. Caractérisation des isolats sélectionnés**

### **1. Courbes de croissance des isolats bactériens**

10ml de milieu LB stérile sont mis dans des Erleins de 50 ml. Des inocula bactériens sont préparés en ensemençant une colonie de chaque isolat (B, C, D, M, N, O, P et K) dans le milieu précédent. L'incubation est faite à 30°C/150rpm/24h. Une première absorbance à 600nm est prise à  $t_0$  avant incubation puis, des prélèvements sont effectués à un intervalle du temps bien précis (1h, 4h, 6h, 7h, 24h, 29h, 48h, 53h, 60h, et 65h). Des courbes de croissance (DO en fonction du temps) sont tracées.

### **2. Identification phénotypique**

Les isolats sélectionnés sur la base des tests précédemment cités sont phénotypiquement caractérisés selon l'aspect des colonies, le Gram, la catalase, l'oxydase, la mobilité (Guiraud and Galzy, 1980).

### **3. Identification phylogénique**

L'ADN génomique total a été isolé à partir des huit souches en utilisant le PureLink® Genomic DNA Mini Kit (*In vitro* gen/Thermo Fisher Scientific, USA). L'amplification de l'ADNr 16S a été réalisée en utilisant Phusion Green hot Start II high-Fidelity DNA Polymerase (Thermo Fisher Scientific, USA) avec 25ng de l'ADN génomique comme modèle et les amorces universelles 27F (5'-GAGTTTGATCCTGGCTCAG-3') et 1492R (5'-GGTTACCTTGTTACGACTT-3') (Edwards et al., 1989; Stackebrandt and Liesack, 1993). La PCR a été réalisée avec les conditions suivantes : un cycle à 98°C pendant 30sec, 35 cycles à 98°C pendant 10s, 54°C pendant 30s, et 72°C pendant 45s, et un cycle final à 72°C pendant 7min. Après amplification, les produits de réaction ont été analysés sur un gel d'agarose à 1.0%. Le séquençage d'ADN a été réalisé sur les deux brins en utilisant les amorces d'amplification chez Eurofins Genomics Ebersberg, Allemagne. Les séquences obtenues ont été soumises à une analyse BLAST sur la base de données NCBI (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) et alignées à l'aide du programme MUSCLE contenu dans le programme CLC Main Workbench 7.8.1 program

(QIAGEN Aarhus, Denmark). L'analyse phylogénétique de la vraisemblance maximale (ML) a été effectuée en utilisant le programme MEGA 6.0 avec le meilleur modèle de substitution de nucléotides identifié pour les données set (K2+G+I) (Tamura et *al.*, 2013).

Le support statistique pour les différentes branches internes a été évalué par rééchantillonnage d'amorce (1000 répliques d'amorce). Finalement, des arbres consensuels d'amorces ont été construits.

➤ **Extraction d'ADN génomique total**

Le protocole suivi est celui des bactéries à Gram négatif. Le bain mari est chauffé jusqu'à 55°C, la suspension bactérienne est incubée 24h/30°C, pour récolter jusqu'à  $2 \times 10^9$  de cellules par centrifugation, le culot est resuspendu dans 180 µl de Pure Link Genomic tampon de lyse. 20 µl de protéinase K sont additionnés au mélange précédent pour lyser les protéines suivi d'un bref tourbillonnement (vortex). Les tubes sont ensuite incubés à 55°C avec une agitation (vortex) occasionnelle jusqu'à une lyse complète (30min jusqu'à 4h). Le lysat obtenu est additionné de 20 µl d'RNase A, puis mixé par vortex, et ensuite incubé à température de laboratoire pendant 2min. 200 µl du tampon de lyse sont ajoutés et le tout est mixé bien par vortex jusqu'à l'obtention d'une solution homogène. 200 µl d'éthanol (96-100%) sont rajoutés au lysat, puis agités pendant 5secondes jusqu'à l'obtention d'une solution homogène pour passer immédiatement au protocole de purification suivant :

➤ **Protocole de purification**

La procédure de purification est désignée pour purifier l'ADN génomique en utilisant la procédure de centrifugation sur « Colonne spin » à centrifuger dans un temps total de 10-15min. 640 µl de lysat sont mis dans la Colonne spin. Cette dernière est centrifugée à 10.000g /1min à température ambiante. La colonne est récupérée est mise dans un tube de collection propre additionné du kit, puis 500µl du tampon de lavage « 1 » préparés avec de l'éthanol sont ajoutés dans la colonne, le tout est ensuite centrifugé à 10000g/1min à température ambiante. La colonne est récupérée puis mise dans un tube de collection neuf additionné du kit. 500µl du tampon de lavage « 2 » préparés avec de l'éthanol sont additionnés, le tout est centrifugé à la vitesse maximale 3 mn à température ambiante. La colonne est aussi récupérée est remise dans un tube de micro-centrifugation stérile de 1.5ml. 25-200µl du tampon d'élution sont ajoutés dans la colonne. Le volume d'élution adapté est choisi, puis le tout est

incubé à température ambiante pendant 1min et une centrifugation de la colonne à la vitesse maximale pendant 1min à température ambiante est réalisée. Ainsi, le tube contient de l'ADN génomique purifié.

➤ **Quantification d'ADN (µg/ml)**

Pour déterminer la concentration de l'ADN extrait à partir de chaque souche, le kit Quant-iT™ ; le dye et le tampon sont récupérés du frigo et laissés à température ambiante avant utilisation. Deux tubes pour les standards et un tube pour chaque échantillon à analyser sont préalablement préparés et la solution (Quant -iT™) est obtenue par dilution du réactif Quant -iT™1 /200 dans le tampon Quant -iT™. 200µl de la solution sont requis pour chaque échantillon et chaque étalon. Le dosage effectué selon le tableau ci-dessous :

**Tableau IV** : Mélanges réactionnels pour la quantification d'ADN

	<b>Standard (tubes de dosage)</b>	<b>Échantillons (tubes de dosage)</b>
<b>Volume de la solution du travail</b>	190µl	180-199µl
<b>Volume du standard</b>	10µl	-
<b>Volume de l'échantillon à ajouter</b>	-	1-20 µl
<b>Volume total dans chaque tube à essai</b>	200 µl	200µl

Les tubes sont Vortexés pendant 2 à 3 secondes, puis incubés pendant 2min à T° ambiante, ensuite, mis dans le fluoromètre Qubit pour réaliser les lectures. Ces dernières sont multipliées par le facteur de dilution pour déterminer la concentration de l'échantillon d'origine.

#### **4. Identification biochimique**

L'identification biochimique de l'isolat N est effectuée sur galerie API 50CHB/E. cette dernière comporte 50 tests révélant l'utilisation de différentes sources de carbone, le type de métabolisme, la production d' H<sub>2</sub>S et la réduction des nitrates. De plus ; les tests classiques concernant la recherche des enzymes (catalase ; oxydase ; esculine hydrolase et gélatinase) sont effectués.

Un tube de bouillon nutritif (5ml) est ensemencé avec une colonie de l'isolat bactérien, puis incubé à 28°C/24h. 50µl de la pré-culture est resuspendu dans 5 ml du bouillon nutritif neuf et incubé à nouveau à 28°C/24h. Ensuite, 1,5 ml de la suspension bactérienne est mis dans un tube Eppendorf et centrifugé à 8000 rpm/2min. 600 µl de surnageant sont récupérés puis additionnés de 600 µl du réactif CHB/E. 200µl du mélange de couleur rouge sont par la suite déposés dans chaque cupule de la galerie API 50. Enfin, la galerie est incubée à 28°C et la lecture est faite après 24 h puis 48 h d'incubation sur la base de la couleur finale :

Couleur rouge = résultat négatif,

Couleur jaune = résultat positif,

Couleur noire = production d'H<sub>2</sub>S,

Couleur orange = résultat +/-.

Les résultats sont comparés à ceux des autres souches par calcul du pourcentage de similitude.

### Partie III : Effet des isolats B, C, D et N sur la croissance de la tomate et des petits pois dans un sol contaminé par *Pythium aphanidermatum*

#### 1. Effet promoteur de croissance sur tomate

Des plants de tomate [*Solanum lycopersicum* L. ; cv. Naxos F<sub>1</sub> (Nunhems)] âgés de 30 jours sont transplantés dans des pots (8l) en plastique contenant un sol autoclavé inoculé avec des suspensions de cellules bactériennes, le témoin est dépourvu de bactéries. L'inoculum bactérien est préparé dans des flacons de 1 litre contenant le milieu liquide Luria- Bertani (annexe I), incubé pendant 48h à température ambiante sous agitation à 150 rpm. Le milieu colonisé est centrifugé à 8000 g/5min, le surnageant est éliminé et le culot est resuspendu dans l'eau. La suspension de cellules est ajustée à une  $DO_{600nm} = 0.6$  et a servi d'inoculum.

La souche de *Pseudomonas protegens* CHA0 généreusement fournie par Christoph Keel, Université de Lausanne, Suisse, et la souche de *Pseudomonas* sp. DSMZ 13134, contenue dans le produit commercial Proradix® (SourconPadena, Allemagne) ont servi de souches de référence dans les expériences. Un plan de randomisation est appliqué sur un total de 4 blocs (pots), chacun avec 12 plantes. 20 jours après l'implantation, le poids frais de la partie aérienne des plants de tomate a été mesuré afin d'évaluer l'effet promoteur de croissance des plants de tomate par les souches bactériennes (Fig.19).



**Fig. 19 :** Test de croissance sur tomate montrant la mise en place des pots dans la serre

## 2. Contrôle de Damping-off causé par *Pythium aphanidermatum* sur petit pois

La semence de petit pois (*Pisum sativum* L. cv. Sprinter) est cultivée dans des pots en plastique de 8 litres contenant du sol autoclavé inoculé avec la souche *Pythium aphanidermatum* IPSP-GB556 et la suspension de cellules bactériennes. Les pots inoculés avec le pathogène mais pas les bactéries, ou non inoculés ont servi de témoins. Aussi *Pseudomonas protegens* CHA0 et *Pseudomonas* sp. DSMZ 13134 sont inclus dans l'expérience. L'inoculum de *P. aphanidermatum* est préparé selon le protocole de Bates et al. (2008), et utilisé pour inoculer le sol à un taux de 5% (V/V). Les inocula bactériens sont préparés comme décrit précédemment, et l'inoculation a été réalisée suivant la même procédure. Un modèle de plan de randomisation complet avec 4 blocs (pots), chacun avec 20 graines a été utilisé. 16 jours après le semis, le pourcentage d'émergence de la plante est déterminé et leur poids frais total est mesuré.

## 3. Analyse statistique

Un modèle binomial (GENMOD procédure) est utilisé pour analyser les données d'émergence des plantes, et des comparaisons multiples des moyennes basées sur la plus petite différence significative ( $P < 0.05$ ), sont réalisées en utilisant SAS/STAT v. 9.0 (SAS Institute, Cary, NC). Toutes les autres données sont soumises à l'analyse de variance one-way (ANOVA), et pour les comparaisons multiples, au test Fisher LSD ( $P < 0.05$ ), en utilisant Graph Pad Prism v. 6.01 software.

Les résultats des tests *in vivo*, précédemment cités ont abouti à la sélection de la souche N pour ses meilleurs effets promoteur de croissance de tomate, et de petits pois dans le sol contaminé.

La souche N fera l'objet des tests de la dernière partie du travail à savoir ;

- Extraction et purification partielle des protéines membranaires,
- Effet de ces fractions protéiques sur quelques champignons phytopathogènes,
- Vérification de l'effet fongicide ou fongistatique de ces fractions sur les mêmes champignons cibles,
- Tester l'effet des PM-R30 sur *Aspergillus niger* sur fruits de deux variétés de tomate.

**Partie IV : *Extraction et purification partielle des protéines membranaires responsables de l'activité antifongique***

**1. La localisation des composés antifongiques et les tests d'induction**

Des essais sur boîtes de pétri sont réalisés pour étudier la localisation des composés antifongiques produits par les souches bactériennes sélectionnées (B, C, D et N), en utilisant *A. niger* comme le champignon modèle. Le champignon est ensemencé sur milieu gélosé TSA (Trypticase Soja Agar) par stries et incubé à 28°C jusqu'à sporulation. Le choix des souches bactériennes examinées (B, C, D et N) a été fait sur la base des résultats du test d'antagonisme à l'égard d'*A. niger* en double culture.

Tout d'abord, les filtrats extracellulaires obtenus à partir des cultures bactériennes de 24 heures des quatre souches sont déposés à la surface de boîtes de Pétri contenant le milieu TSA ensemencées préalablement avec des spores fongiques. Après incubation, aucune inhibition de la croissance mycélienne n'a été détectée ce qui nous a laissé suggérer que les molécules responsables de l'activité de ces molécules ne sont pas extracellulaire.

**1.1. *Localisation des composés antifongiques***

Afin de vérifier si l'activité antifongique est confinée à des compartiments cellulaires spécifiques, les fractions de protéines de surface et de protéines intracellulaires ont été préparées et testées. Encore une fois, aucune inhibition de la croissance n'a été mise en évidence. Les résultats obtenus avec ces deux tests (filtrats et contenu intracellulaire) suggèrent que ces bactéries pourraient exercer leur activité antifongique uniquement en présence du champignon (données non présentées). Par conséquent, nous avons mis en place des expériences d'induction en exposant les cultures bactériennes au champignon pour une éventuelle induction des composés de l'activité antifongique.

## **1.2. Préparation des fractions de protéines intracellulaires et membranaires de surface**

La préparation des fractions de protéines intracellulaires et membranaires de surface est effectuée selon le protocole de Gogliettino et *al.* (2010) avec quelques modifications. Les suspensions bactériennes récupérées après l'expérience de Co-incubation sont centrifugées à 8000rpm/45min et les culots sont resuspendu dans le tampon de lyse (50mM Tris-HCl, pH 7.5, 2Mm EDTA, 1mM PMSF). Les cellules sont lysées sur le coup par sonication (4 cycles avec 60s d'impulsion et 60s hors tension) en utilisant un sonicateur (Soniprep-B. Braun Labsonic U). Les cellules non lysées sont éliminées par centrifugation à 13000rpm pendant 30min. Le surnagent représente la fraction intracellulaire. La fraction de protéines membranaires de surface est préparée par lavage des culots cellulaires deux fois avec le tampon Tris-HCl, 50mM /pH 7.5, suivi par une resuspension dans le même tampon et solubilisation par incubation à 37°C/15min, en présence de 1% Triton X-100. Le matériel insoluble a été enlevé par centrifugation à 13000rpm à 4°C pendant 30min, et les surnageants collectés (fractions membranaires) sont récoltés. Les fractions intracellulaires et membranaires sont stérilisées par filtration à 0.22µm, par la suite les filtrats (30µg de chaque fraction) sont inoculés dans 3 puits formés dans la gélose TSA où les spores fongiques sontensemencées par stries serrés. Les boites sont incubées à 28°C. Les mêmes expériences sont également réalisées pour les fractions de protéines intracellulaires et membranaires de surface obtenues à partir des cellules bactériennes cultivées sans une co-incubation avec le champignon. La concentration en protéines a été déterminée par la méthode de Bradford (Bradford, 1976).

## **2. Test d'induction en présence d'*Aspergillus niger***

### ***2.1. Localisation, extraction, et essais de purification des molécules responsables de l'activité antifongique de *Pseudomonas* sp.***

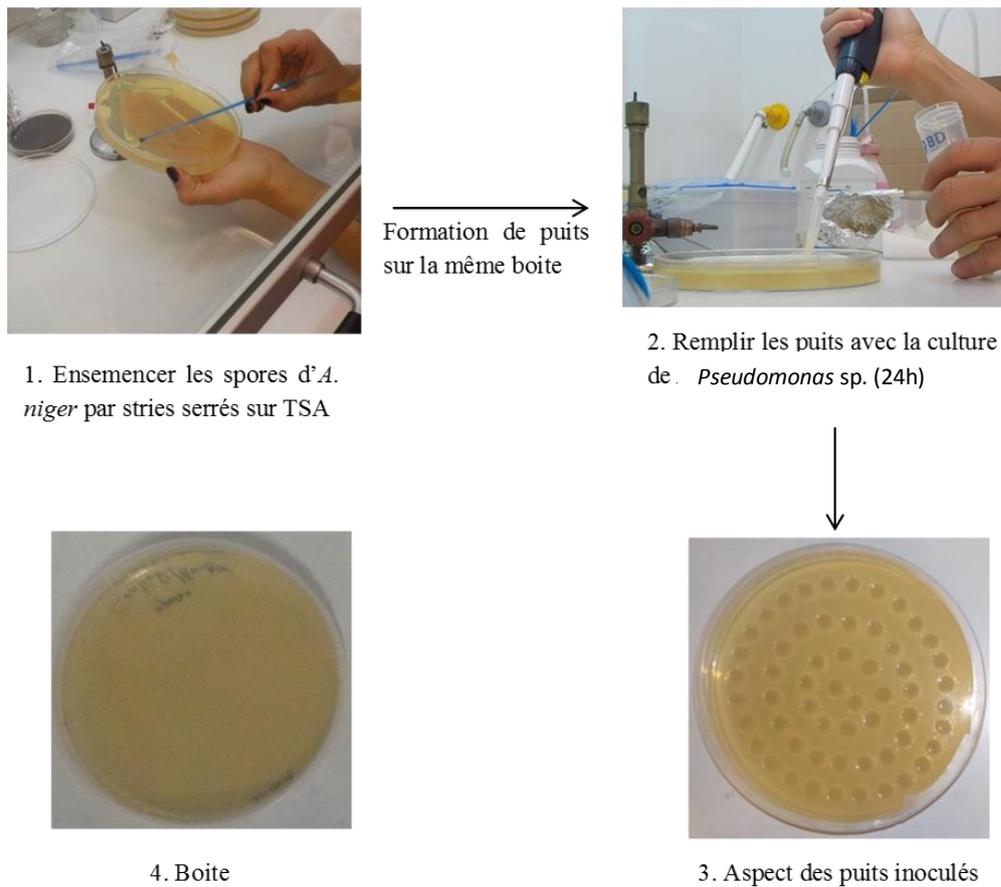
Sur la base des résultats du test *in vivo* sur petits pois précédemment réalisé (taux de germination et poids frais de la partie aérienne) en présence du champignon *Pythium aphanidermatum*, la souche N (identifiée comme *Pseudomonas* sp.) a montré les meilleures activités, ainsi, cette souche sera exploitée dans cette dernière partie pour la localisation, l'extraction et essais de purification des molécules responsables de cette activité antifongique.



**Fig. 20 :** *Pseudomonas* sp.

### **2.2. Le test d'induction**

Comme cité précédemment dans la deuxième partie du travail, dans le but d'induire la production de molécules antifongiques, la souche de *Pseudomonas* sp. et le champignon *Aspergillus niger* doivent êtreensemencés sur la même boîte sur gélose TSA. Pour cela, les spores fongiques sontensemencées en stries serrés sur toute la surface de la boîte, la suspension bactérienne cultivée 24h/30°C/ 180rpm/ (DO= 4.2) est inoculée dans les puits formés dans la même boîte (Fig. 21). Une boîteensemencée uniquement avec les spores du champignon est préparée en parallèle comme témoin.



**Fig. 21** : Induction de production de molécules antifongiques par une co- inoculation de *Pseudomonas* sp. et *A. niger* sur milieu TSA.

### 2.3. Localisation des composés antifongiques et leur production en fonction du temps

Les fractions intracellulaires et extracellulaires sont récupérées, stérilisées avec des filtres de 0.22 $\mu$ m puis testées à l'égard du champignon *Aspergillus niger* sur boite. Des lectures sont faites après 12h, 24h et 48h d'incubation à 25°C. Les fractions protéiques membranaires sont également extraites et testées à l'égard de même champignon cible pour vérifier leurs implications dans l'activité antifongique. Le suivi de l'activité est réalisé après 12h, 24h et 48h d'incubation.

Le diagramme suivant illustre les étapes suivies pour l'extraction et la purification des protéines membranaires.

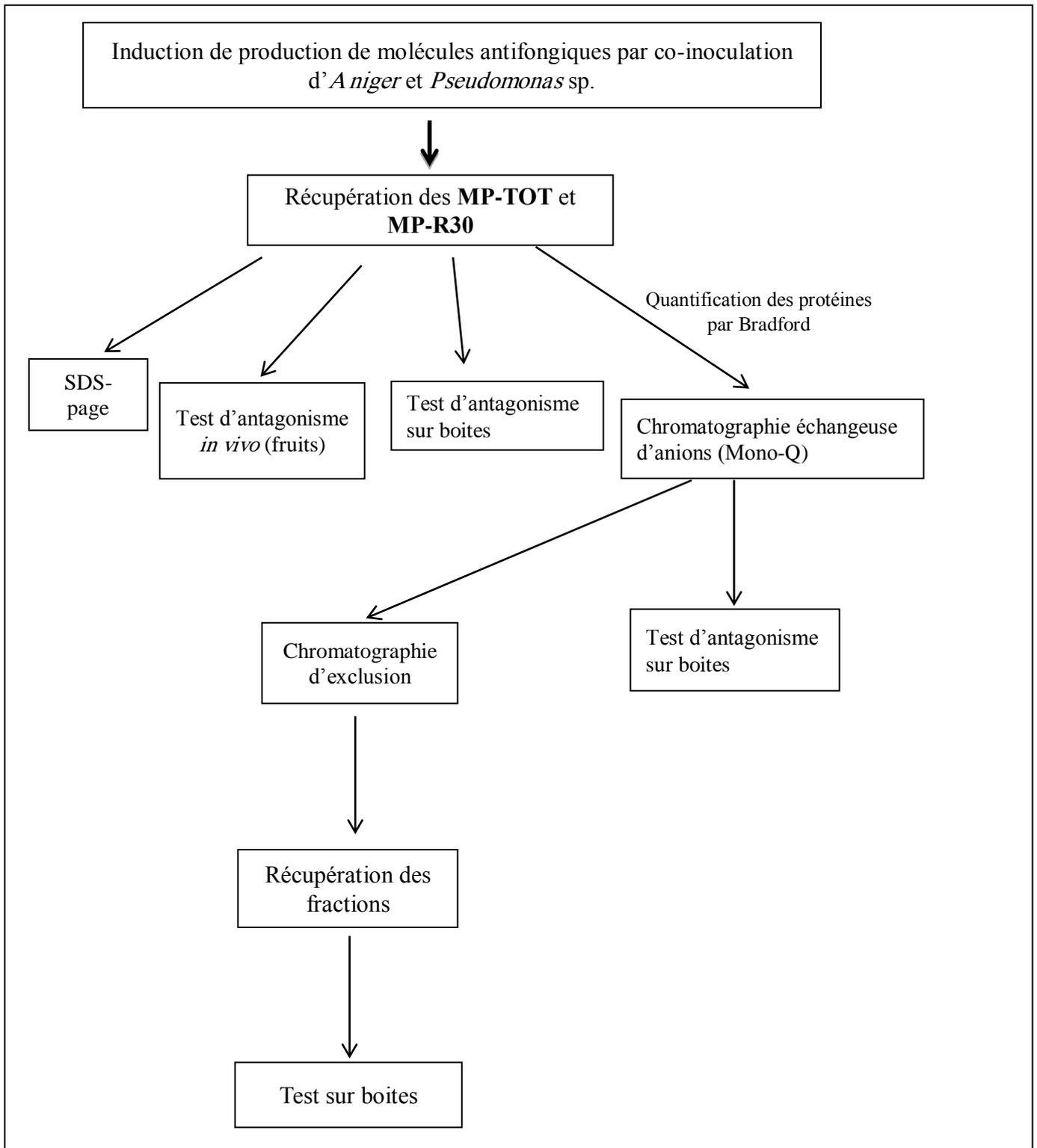
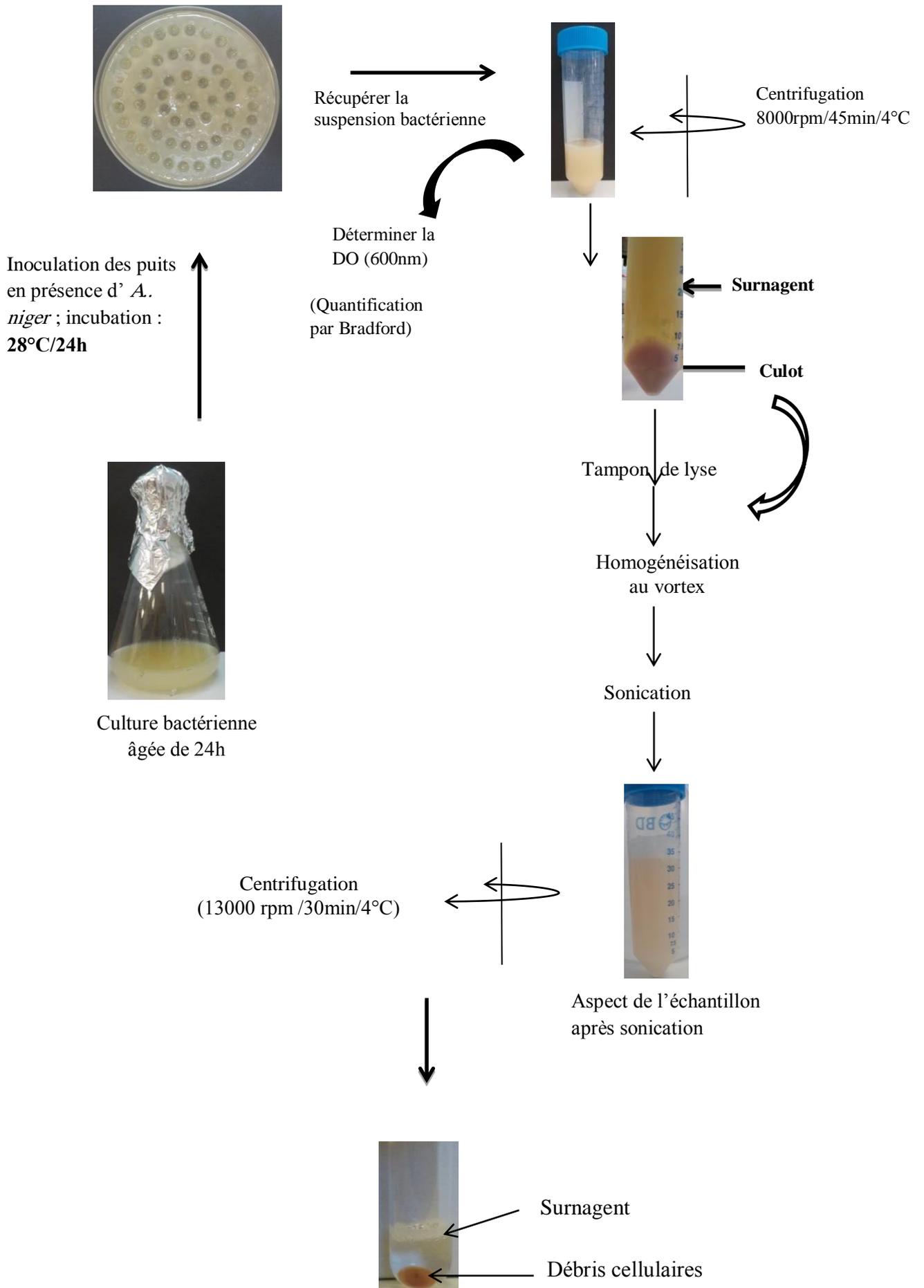


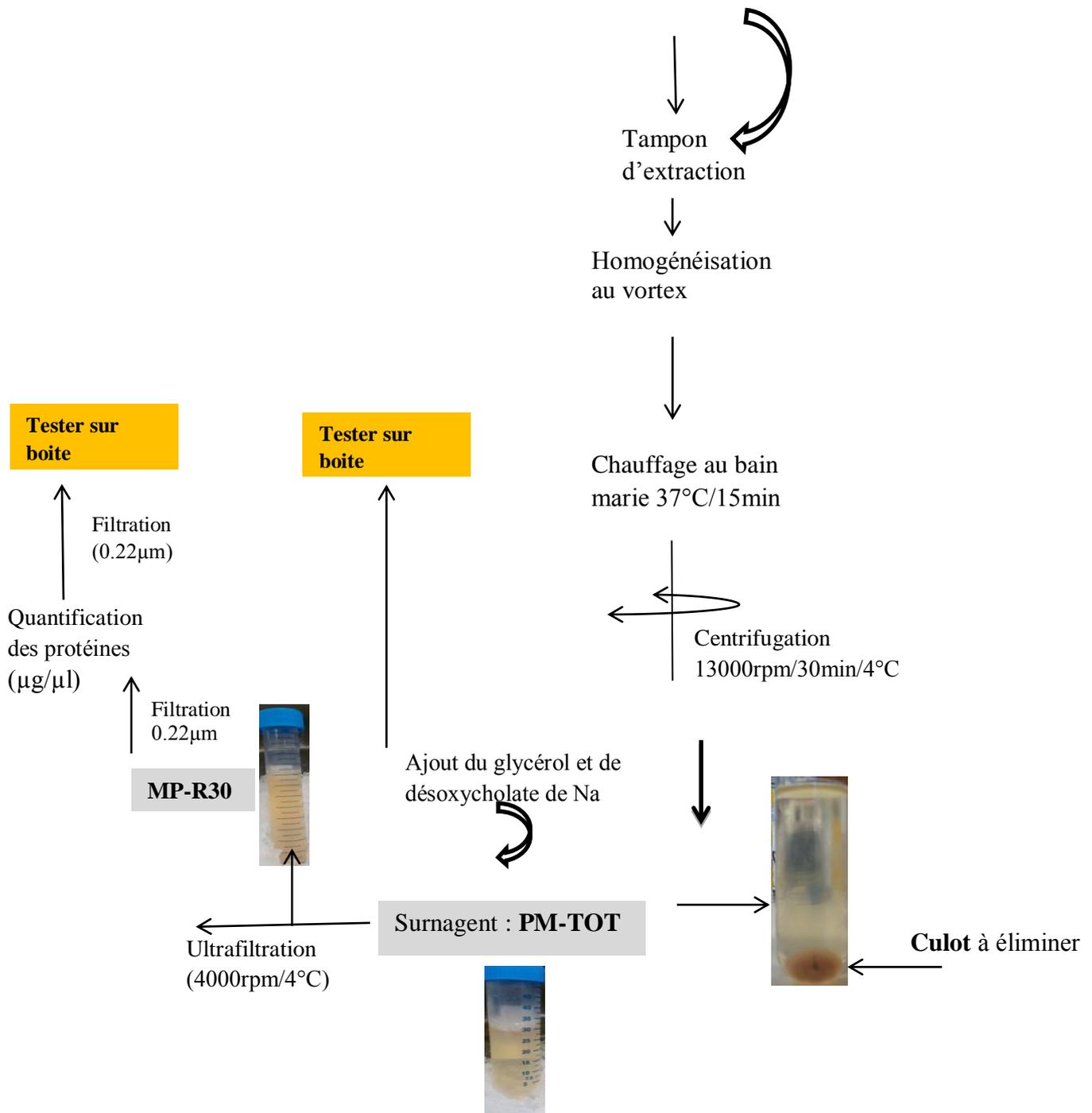
Fig. 22 : Etapes suivies pour l'extraction et la purification des protéines membranaires

***2.4.Extraction des protéines membranaires totales (PM-TOT) et des protéines membranaires retenues à un cut-off de 30KDa (PM-R30).***

Le contenu des puits précédemmentensemencés par la suspension bactérienne est récupéré après 48h d'incubation, le temps nécessaire pour observer une bonne croissance mycélienne dans la boîte témoin (champignon seule). Un volume de 2ml sert pour déterminer la DO, le reste est centrifugé à 8000rpm/45min/4°C. Le surnagent composé du contenu extracellulaire est éliminé et le culot composé du contenu intracellulaire et les membranes protéiques est bien resuspendu dans le tampon d'extraction (annexe V), puis vortexé pour bien homogénéiser le contenu de tube Falcon. Le contenu de tube a subi une sonication (6 cycles au minimum) puis une deuxième centrifugation à 13000rpm/30min/4°C, le surnagent contenant les cellules non lysées et le contenu intracellulaire est éliminé et le culot retenu contient les protéines membranaires. Ce dernier est resuspendu dans le tampon d'extraction (composition en annexe), puis vortexé pour une bonne homogénéisation et ensuite chauffé au bain mari (37°C/15min) pour subir une troisième centrifugation (13000rpm/30min/4°C). Le culot (débris cellulaires) est cette fois ci éliminé et le surnagent retenu contient les protéines membranaires totales (PM-TOT) à lesquelles sont additionnés le Glycérol et le détergent désoxycholate de sodium (éviter la formation des agrégats). Une fraction est testée telle qu'elle sur milieu TSA à l'égard du champignon cible et le reste est resuspendu dans des centricons (cut-off des filtres 30KDa) pour subir une ultrafiltration (4000rpm/4°C). Le volume retenu dans les filtres du centricons est considéré comme les protéines membranaires avec un poids moléculaire supérieur à 30KDa (PM-R30). La quantification des protéines retenues est réalisée par extrapolation sur courbe d'étalonnage (DO en fonction des concentrations de BSA(Bradford) (annexe IV).

Le schéma ci-dessous résume les différentes étapes suivies depuis l'induction jusqu'à l'obtention des PM-TOT et des PM-R30.





**Figure 23** : Protocole suivi pour l'extraction des protéines membranaires totales (PM-TOT) et des protéines membranaires retenues à un cut-off de 30KDa (MP-R30) à partir d'une culture de *Pseudomonas* sp.

### **2.5. La SDS-PAGE**

L' SDS-page est réalisée dans le but de visualiser le profil protéique des fractions récupérées durant les étapes de purifications. La première concerne les protéines membranaires totales et les protéines membranaires retenues à un cut-off de 30KDa, et la deuxième SDS page est effectuée pour les fractions protéiques récupérées après une chromatographie échangeuse d'anions et / ou une chromatographie d'exclusion.

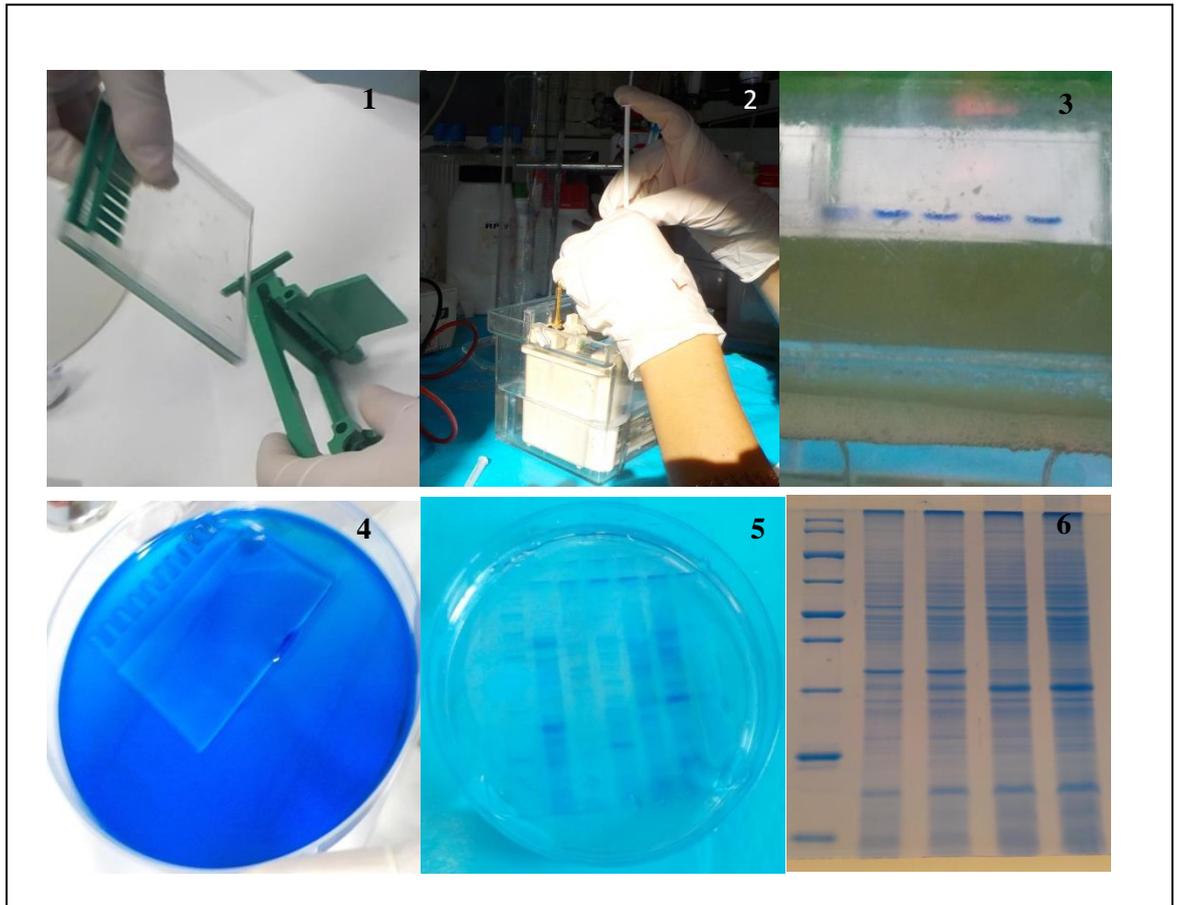
### **2.6. Electrophorèse SDS page pour les PM-TOT et les PM-R30**

En principe, le gel de l' SDS page est composé de deux gels ; un dit préparatif (upper) à 4% pour un volume de 5ml et un autre dit séparatif (lower) à 12% pour un volume de 10ml (annexe III). Après solidification, le gel est rincé à l'eau distillée puis humidifié et conservé au frigo pour une utilisation ultérieure.

2. Préparation du tampon de migration (running buffer) (annexe VIII),
3. Récupération du gel, et rinçage des puits avec le tampon d'élution pour éliminer l' SDS,
4. Préparation des échantillons par ajout de glycérol, SDS,  $\beta$ -mercaptoéthanol et le tampon Tris-HCl (annexe VIII),
5. Chauffage des différentes fractions dans le tampon à 95°C/15min pour leur dénaturation,
6. Injection du marqueur et des échantillons dans leurs puits correspondants ; les protéines membranaires totales (MPT-TOT) et celles retenues à 30KDa sont injectées à deux concentrations différentes à raison de 15  $\mu$ g et 30  $\mu$ g respectivement,
7. Mise en marche du dispositif,
8. Coloration du gel au bleu de coomassie, pendant 1min, élimination du colorant et rajout du décolorant (Acide trichloroacétique TCA) sous une douce agitation,
10. Décoloration finale et observation des bandes.

Le même protocole SDS-page est suivi pour visualiser les bandes de protéines contenues dans les fractions protéiques récoltées après une chromatographie échangeuse d'anions et une chromatographie d'exclusion.

La figure suivante résume les principales étapes suivies lors d'une SDS page dénaturante :



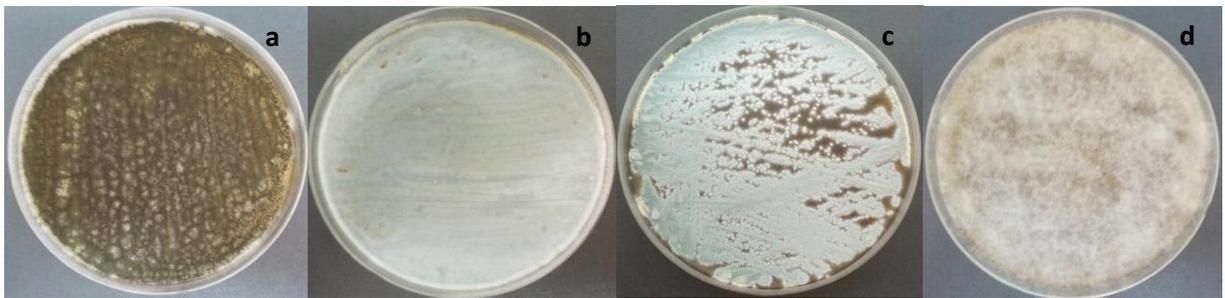
**Fig.24 :** Etapes de purification sur électrophorèse SDS-page  
1.préparation du gel ; 2. Injection du marqueur et des échantillons ; 3. Migration des bandes ;  
4. Coloration au bleu de coomassie ; 5. Décoloration par l'acide chloridrique ; 6.Visualisation  
des bandes de protéines après migration.

### 3. Effet de milieu de culture sur l'activité antifongique

Deux milieux de cultures sont choisis pour le test d'antagonisme à l'égard d'*A. niger* par les protéines membranaires totales (PM-TOT) et celles retenues à un cut-off de 30KDa à savoir, la gélose TSA (pH7) et le milieu gélosé à extrait de malt (pH 5.4). Les spores fongiques sontensemencées en stries serrées, et 200  $\mu$ l de chaque fraction protéique sont inoculées dans les puits formés dans la gélose, après une incubation de 3jours à 25°C, le choix définitif du milieu pour les tests ultérieurs est fait sur la base des résultats de ce test.

#### 4. Effet des PM-TOT et PM-R30 à l'égard d'autres champignons phytopathogènes cibles

Afin de vérifier la spécificité des champignons à induire la production de molécules antifongiques par la souche de *Pseudomonas* sp. les protéines membranaires totales et celles retenues à un cut-off de 30KDa extraites de cette dernière sont testées à l'égard de 4 autres champignons phytopathogènes à savoir une autre espèce algérienne d'*Aspergillus niger*, *Alternaria* sp., *Penicillium* sp. et *Botrytis cinerea* représentés de gauche à droite respectivement (Voir figure ci-dessous).



**Fig. 25:** Aspect des quatre souches fongiques sur gélose à Extrait de Malt.  
**a.** *Aspergillus niger* ; **b.** *Alternaria* sp. ; **c.** *Penicillium* sp. ; **d.** *Botrytis cinerea*

Le test est réalisé en ensemençant par stries serrés les spores fongiques dans les boîtes TSA testées et témoins. Les PM-TOT/et PM-R30 sont stérilisés par filtration à 0.22 $\mu$ m avant leurs dépôt dans des puits de 7mm de diamètre réalisés dans la même boîte. Le suivi de l'apparition ou non (claire zone d'inhibition) d'une croissance mycélienne est réalisé quotidiennement en comparant à la boîte témoin. La mesure du diamètre de la zone d'inhibition est faite pour les boîtes positives.



1. Ensemencer les spores fongiques par stries serrés

Formation des puits dans la boîte teste



2. Inoculer les puits avec 200µl de PM-TOT / et PM-R30 de *Pseudomonas sp.*

**Fig. 26 :** Effet des PM-TOT et PM-R30 sur la croissance mycélienne de quelques champignons phytopathogènes sur gélose TSA

## 5. Séparation du contenu des fractions protéiques par chromatographie

Après une co-incubation d'*A. niger* et *Pseudomonas sp.* sur TSA (induction de production de molécules antifongiques), les étapes d'extraction sont suivies comme citées précédemment jusqu'à l'obtention des fractions protéiques membranaires. Les protéines membranaires retenues à un cut-off de 30KDa (PM-R30) ont subi une deuxième centrifugation, puis une filtration stérilisante à 0.22µm avant injection.

### 5.1. Chromatographie d'exclusion

Un échantillon contenant les fractions protéiques (PM-R30) est injecté dans une colonne de chromatographie d'exclusion à base du gel de silice (BioSuite 450, 13mm SEC) ; pré-équilibrée avec du tampon Tris-HCl, 25mM ; pH 7.5/NaCl 50mM et 0.1% de désoxycholate de sodium et connectée à un système UFLC (Shimadzu). Les fractions de 0.1ml chacune, sont éluées avec un tampon Tris-HCl ; pH 7.5, 50mM avec un débit de 0.5ml/min.

L'activité antifongique des fractions est vérifiée sur boîte à l'égard du champignon *A. niger* ; la (es) fraction (s) active (s) est (sont) injectée (s) de nouveau dans une colonne de chromatographie échangeuse d'anions.

**5.2. Chromatographie échangeuse d'anions**

L'échantillon protéique est chargé dans la colonne de la chromatographie d'échange d'anions (BioSuite 10µm AXC), équilibrée avec le tampon Tris-HCl 25mM additionné de désoxycholate de sodium 0.1%, et connectée au même système. La protéine est éluée avec un gradient linéaire d'NaCl (0-0.5 M) à un flux/vitesse de 0.800ml/min.

Les fractions d'intérêt sont dialysées contre un tampon Tris-HCl pH 7.5 et conservées avec du glycérol et le désoxycholate de sodium 0.1%.

**5.3. La dialyse**

Cette étape de purification est réalisée sur les fractions protéiques récoltées de la chromatographie échangeuse d'anions, elle a pour but l'élimination des molécules de chlorure de sodium (NaCl) avant de les faire tester sur boîtes. Pour cela, chaque gamme de fractions récoltées est récupérée dans un tube Falcon, puis transvasée dans son boudin de dialyse correspondant (cut-off de 10000 KDa).

**Exemples :**

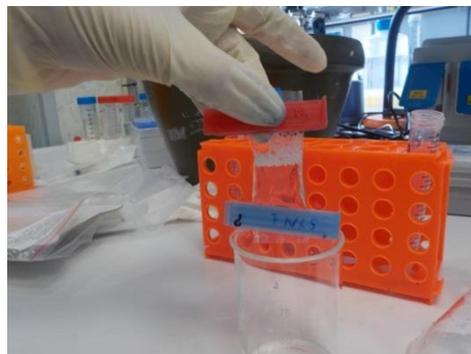
Dans le cas de la première (MonoQ) chromatographie échangeuse d'anions, les gammes de fractions protéiques récoltées et les volumes qui leurs correspondent sont représentés comme suit :

4-26-----	11.5ml	(fraction 1)
27-38-----	6ml	(fraction 2)
39-44-----	3ml	(fraction 3)
45-64-----	10ml	(fraction 4)

Dans la deuxième MonoQ les fractions 1, 2, 3, 4, 5 et 6 sont récupérées comme suit :

4-55-----	11.5ml	(fraction 1)
56-72-----	6ml	(fraction 2)
73-79-----	3ml	(fraction 3)
80-100-----	10ml	(fraction 4)
101-117-----	11.5ml	(fraction 1)
118-143-----	6ml	(fraction 2)

Les boudins contenant les fractions récoltées sont plongés dans un tampon de contre dialyse (20 ml du tampon Tris-HCl complété à 2l avec de l'eau distillée stérile), sous une douce agitation dans une chambre réfrigérée pendant une heure. Le contenu des boudins est récupéré dans des tubes Eppendorf, puis additionné de glycérol et de détergent désoxycholate de sodium. Ensuite, ultrafiltré sur plusieurs reprises pour éliminer le tampon dans des centricons (30KDa) à 4000rpm/45min/4°C, en commençant avec un volume initial de fraction de 4ml. Enfin, les fractions sont stérilisées à l'aide des filtres de 0.22µm puis les appliquées sur boîtes à l'égard d'*Aspergillus niger* en présence d'un témoin négatif.



**Fig. 27** : Boudin de dialyse contenant les fractions protéiques

## **6. Test d'antagonisme des fractions issues des deux chromatographies sur boîtes**

Les fractions protéiques récoltées de la chromatographie d'exclusion et d'échangeuse d'anions sont également testées sur milieu TSA à l'égard de champignon model *A. niger* comme précédemment effectué avec les PM-TOT et les PM-R30, en présence de boîtes témoins. Après une filtration stérilisante à 0.22µm, et une incubation de 48h à 25°C, les résultats obtenus pour les fractions B et D de la chromatographie d'exclusion et les fractions 2, 3 et 4 de la chromatographie échangeuse d'anions sont représentés sur les figures 58 et 61 respectivement.

## **7. Effet antifongique des fractions protéiques membranaires**

### ***7.1. Test d'antagonisme des MP-R30 à l'égard d'A. niger sur fruits de tomate***

Deux variétés de tomate provenant de Naples (Italie) sont choisies (même calibre et même stade de maturation) pour ce test. Les fruits sont préparés et traités exactement

de la même façon que les fruits de pomme (Golden Delicious) précédemment citées dans la première partie du travail à raison de 4 puits par fruit. Les fruits tests sont inoculés en premier lieu avec 10 $\mu$ l de la fraction concentrée (7.35 $\mu$ g/ $\mu$ l) de MP-R30 filtrées à 0.22 $\mu$ m et les fruits pris comme contrôle sont inoculés avec une goutte d'eau distillée stérile, après 2h à température de laboratoire, 15 $\mu$ l de la suspension sporale ( $1 \times 10^5$ ) sont ajoutés à chaque puits, et le tout est incubé à 25°C/6jours (Fig. 28). La lecture est faite en notant l'intensité de la pourriture causée aux alentours des puits inoculés et la quantité du mycélium et de spores produite dans les fruits tests et témoins.

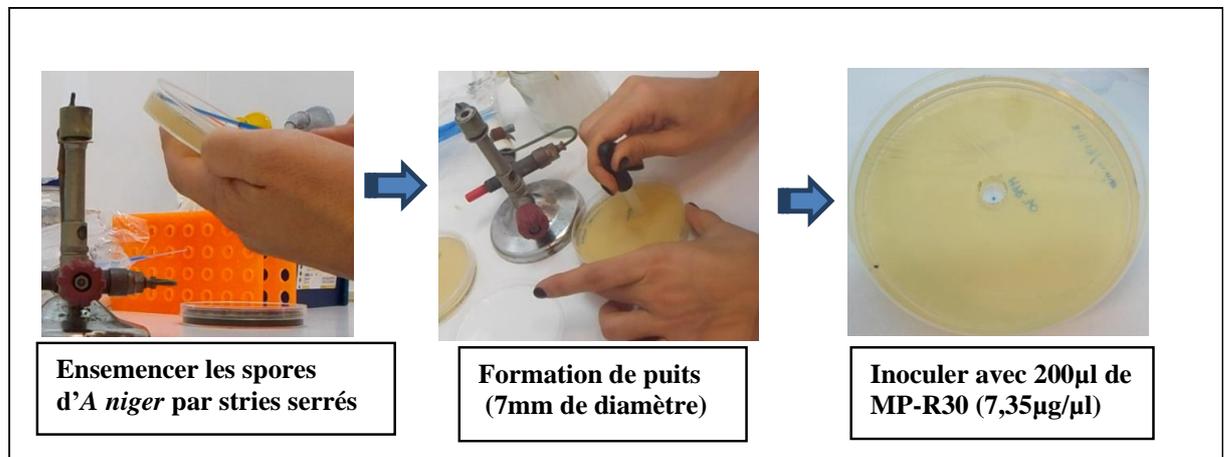


**Fig. 28 :** Les étapes du test d'antagonisme des PM-R30 à l'égard d'*A.niger* sur fruits de tomate : **a.** Désinfection avec de l'eau de javel 2%, **b.** Rinçage avec de l'eau distillée stérile, **c.** Séchage à température ambiante/2h, **d.** Formation des trous (3mm×3mm), **e.** Inoculation de la suspension protéique (MP-R30) et fongique, **f.** Incubation 25°C/6jours.

### **7.2.Effet des PM-R30 (7.35 $\mu$ g/ $\mu$ l) à l'égard d'*A. niger* sur gélose TSA**

Les PM-R30 sont testées à nouveau à l'égard d'*A. niger* sur milieu TSA en présence de boîtes témoins mais avec la même concentration testée *in vivo* sur fruits de tomate

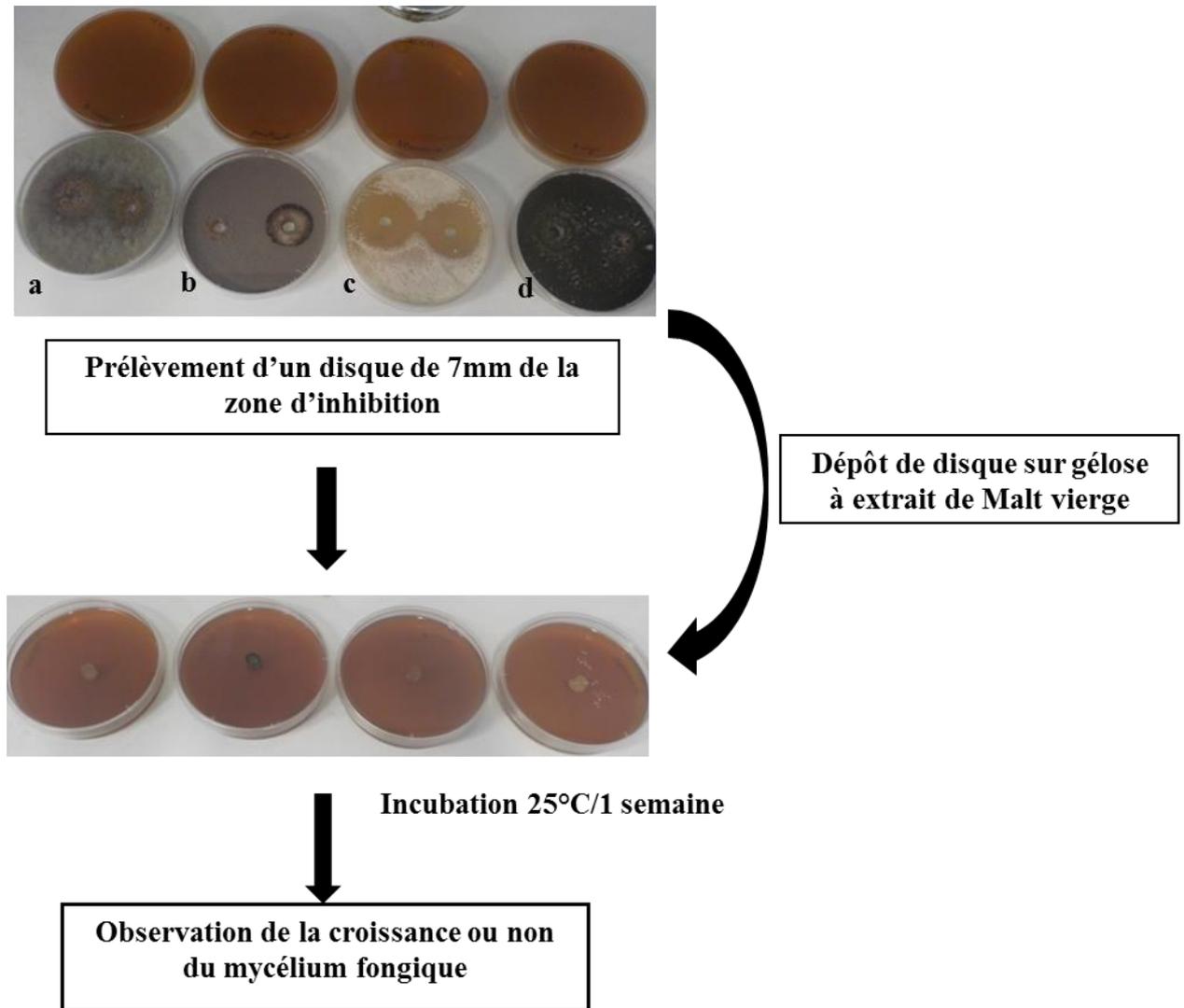
(7.35 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ ), à titre de comparaison. (Vérification de l'efficacité des PM-R30 pour leur effet antagoniste *in vitro* et *in vivo*).



**Fig. 29** : Effet des PM-R30 (7.35 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ ) sur la croissance mycélienne d'*A. niger*.

### **7.3. Confirmation de l'effet fongicide ou fongistatique des fractions protéiques à l'égard d'autres champignons cibles**

Un disque d'agar de 7mm de diamètre est pris directement de la zone d'inhibition apparues suite à l'action précédente des fractions protéiques membranaires totales et PM-R30 sur les champignons (*A. niger*, *B. cinerea*, *Penicillium* sp. et *Alternaria* sp.) et déposé à nouveau sur la surface de milieu gélosé vierge à extrait de malt. Les boîtes sont scellées avec du parafilm et portées à incubation à 25°C, puis un suivi de la croissance mycélienne est effectué pendant une semaine. Une absence totale de la croissance indique un effet fongicide, dans le cas contraire l'effet est dit fongistatique (Fig. 30). Les étapes suivies sont montrées ci-dessous.



**Fig. 30** : Effet fongicide ou fongistatique des fractions protéiques membranaire à l'égard des champignons cibles.  
**a** : *Botrytis cinerea* ; **b** : *Penicillium* sp. ; **c** : *Alternaria* sp. ; **d** : *Aspergillus niger*.

## **8. Effet des substances volatiles produites par la souche *Pseudomonas* sp. sur les quatre espèces fongiques**

En plus de la production de molécules antifongiques de nature protéique, la souche de *Pseudomonas* sp. est testée pour une éventuelle production des molécules inhibitrices de la croissance fongique de nature volatile, pour cela, elle est testée à l'égard des quatre champignons cités précédemment. Les étapes du protocole suivi sont précédemment décrites dans la section 3.2.3.

## Partie I. Criblage de bactéries à critères de Biocontrôle

### 1. Prélèvement d'échantillons et isolement de bactéries

Dans le but de rechercher des bactéries à effet PGP et antifongique, des isollements sont effectués à partir d'un puits à usage agricole, au village Djebira Bejaia-Algérie, nous avons sélectionné 8 isolats bactériens sur la base des tests d'antagonisme en double culture à l'égard de deux champignons phytopathogènes à savoir *A. niger* et *B. cinerea* sur milieu gélosé à extrait de malt. Suite aux résultats de recherche de quelques traits PGP et les tests d'antagonisme à l'égard de ces deux champignons sur fruits de pomme (variété Golden Delicious), 4 isolats sont sélectionnés sur la base de leurs meilleures activités à savoir : B, C, D et N. Ces derniers sont par la suite identifiés par séquençage de leur ADNr 16S, et sont affiliés soit à l'espèce : *Serratia quinivorans* avec une ressemblance de 99.86% pour l'isolat C, et à des variantes de *Pseudomonas protegens CHA0* avec un pourcentage de similitude de 99.93 pour les isolats ; B, D et N. Les genres *Pseudomonas* et *Serratia* ont été déjà rapportés dans plusieurs travaux comme bactéries efficaces contre les pathogènes de plantes (Kamil et al. 2007 ; Khare et al., 2010 ; Bensidhoum et al., 2016; Rai et al., 2016) par compétition pour l'espace et les nutriments, mais aussi par stimulation des systèmes de défense des plantes et en produisant des métabolites toxiques pour les champignons phytopathogènes (Timmusk, 2003 ; De Vleeschauwer et Höft, 2007).

Dans un travail réalisé par Wojciech Przemieniecki (2015), une souche de *Pseudomonas* sp.SP0113 provenant d'un environnement aquatique partiellement fermé a été identifiée comme PGPB. Les tests de laboratoire révèlent que PS0113 a de multiples traits PGP, y compris la solubilisation du phosphate minéral, la capacité d'ammonification qui augmente la disponibilité de l'azote pour les plantes via le système racinaire, et l'activité phosphatase qui joue un rôle important dans la minéralisation organique du phosphore.

### 2. Caractères physico-chimique

#### ➤ pH

La pénurie d'eau de bonne qualité pour l'irrigation est une préoccupation majeure dans les régions arides et semi-arides en raison de la concurrence avec la population urbaine. L'échantillon d'eau a subi une mesure du pH. La valeur enregistrée par le pH mètre est de 7.06. Cette valeur est similaire à celle enregistrée par Bensidhoum et al. (2016) sur des

échantillons prélevés de la même région. Valdez-Aguilar et *al.* (2009) ont décrit l'effet de l'augmentation de la salinité de l'eau d'irrigation et du pH sur la croissance et la valeur esthétique de trois cultivars d'une plante ornementale, les résultats ont montré que ces plantes sont sensibles à une conductivité d'eau d'irrigation supérieur à  $4\text{dSm}^{-1}$  et que la réduction de la croissance est importante quand le pH d'eau d'irrigation est 7.8 comparé à 6.4. Selon Brunton et Ourimbah (2011) ; le pH de la majorité des eaux naturelles est situé entre 5 et 8. Le pH généralement accepté pour l'eau d'irrigation se situe entre 5,5 et 7.5. Des valeurs entre 5.0 et 7.0 sont préconisés par Cox (1995). Le pH d'eau de puits à partir duquel est effectué notre prélèvement se situe dans cette gamme, ce qui suggère qu'elle est adéquate pour l'irrigation.

### ➤ *Conductivité électrique*

La conductivité électrique est directement proportionnelle à la quantité de solides (sels minéraux) dissous dans l'eau. Ainsi plus la concentration en solide dissouts sera importante, plus la conductivité sera élevée. D'après Rai. (2017), la conductivité électrique est considérée comme un indicateur de la salinité, plus un échantillon est salé plus il est inductible, un échantillon salin doit avoir une valeur de conductivité dépassant  $4\text{dSm}^{-1}$ . Ce même auteur a étudié le consortium conductivité/teneur en matière organique, une corrélation négative a été constatée. Ainsi, plus la conductivité électrique d'un échantillon augmente, plus son contenu en matière organique diminue. Le seuil de salinité de la majorité des cultures maraichères est faible (allant de 1 à  $2,5\text{dSm}^{-1}$ ), et la tolérance végétale aux sels diminue lorsque l'eau saline est utilisée pour l'irrigation (Almeida Machado et Serralheiro, 2017). Une diminution de la biomasse végétale, de la surface foliaires et de la croissance a été observée dans différentes cultures maraichères sous stress salin (Almeida Machado et Serralheiro, 2017). La conductivité électrique enregistrée pour l'eau de puits et de  $3.01\text{dSm}^{-1}$ , cette valeur reste inférieur à la valeur maximale tolérée pour une eau d'irrigation.

L'acidité ou l'alcalinité d'une eau peut affecter la croissance des plantes. Ces dernières sont négativement affectées par la salinité de plusieurs façons, le plus important d'entre eux est qu'il limite la capacité des plantes à absorber l'eau. Ainsi, les plantes flétriront et commenceront à mourir. Le point auquel cela arrive dépend du type de plante, le stade de croissance ; en particulier au moment de la germination et au stade de semis lorsque les plantes sont les plus sensibles (Brunton and Ourimbah, 2011).

### **3. Recherche des bactéries à caractère PGP et productrices de métabolites antifongiques**

Les isolats bactériens sont sélectionnés sur la base de leurs critères phénotypiques sur gélose ordinaire PCA, à savoir ; la forme, la taille, la couleur et l'aspect des colonies obtenues après incubation à 30°C/ 7jours. Au total, 55 isolats sont apparus différents à l'œil nu, ces derniers sont repiqués et purifiés sur milieu PCA neuf. Des colonies de couleur verte et vert jaunâtre fluorescent ont été observées, ceci présume la présence de certains isolats du genre *Pseudomonas*.

#### **3.1. Détection de quelques propriétés antagonistes**

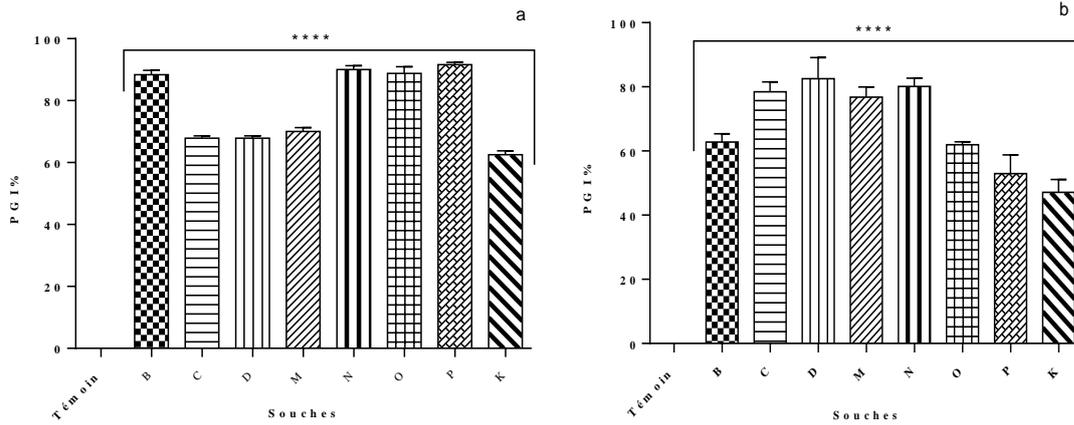
##### **3.1.1. Inhibition de la croissance mycélienne**

Les 55 isolats ont fait l'objet du test d'antagonisme en double culture à l'égard des deux souches de champignons phytopathogènes ; *Botrytis cinerea* BCI et *Aspergillus niger*. Le suivi quotidien de la croissance mycélienne, pendant 7 jours, en présence de boîtes témoins a montré que 8 isolats (B, C, D, M, N, O, P et K) ont les résultats les plus intéressants à inhiber le développement mycélien. La mesure de diamètre des zones d'inhibition a permis de calculer les PGI% (pourcentage d'inhibition de la croissance mycélienne) pour les deux champignons cibles.

La figure 31 montre les valeurs des PGI% obtenus à l'égard des deux champignons phytopathogènes par les huit isolats. Le pourcentage d'inhibition le plus faible est obtenu avec l'isolat K (62,5%), tandis que les deux valeurs les plus importantes sont obtenues avec les deux isolats P et N avec 91,67 et 90% d'inhibition respectivement à l'égard d'*Aspergillus niger*. Dans le cas de *B. cinerea*, les valeurs de PGI% minimales et maximales obtenues sont 47,09 et 82,5% enregistrées par les isolats K et D respectivement. On remarque que l'isolat N montre la valeur de PGI% la plus proche de la valeur maximale avec 80,16% d'inhibition.

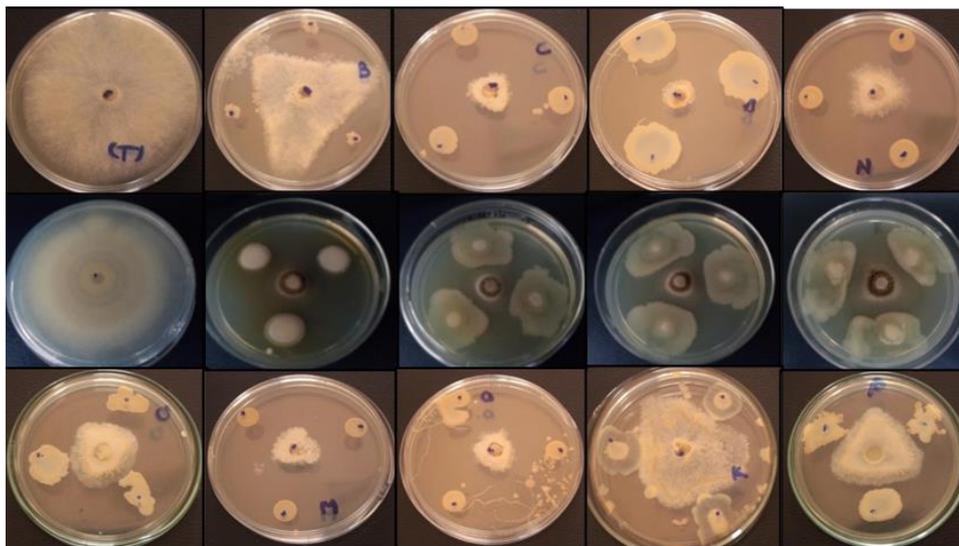
Aucune différence significative n'a été remarquée entre les isolats concernant l'inhibition des deux champignons.

Ces résultats apparaissent meilleurs que ceux obtenus par Przemieniecki et *al.* (2015) où le pourcentage d'inhibition de croissance le plus élevé obtenu à l'égard des champignons phytopathogènes par le test en double culture été seulement de 38%.



**Fig. 31** : Pourcentage d’inhibition de la croissance (PGI%) d’*Aspergillus niger* (A) et *B. cinerea* (B) par les isolats B, C, D, M, N, O, P, K sur gélose à extrait de malt.  
 \*\*\*\* : différence significative (p<0.0001)

La figure ci-dessous montre quelques exemples de résultats positifs obtenus sur gélose TSA.



**Fig. 32** : Activités antifongiques *in vitro* à l’égard de *B. cinerea* et *A. niger* des huit isolats bactériens. Les champignons et les bactéries sont inoculés dans le milieu gélosé à extrait de malt.

Dans ce présent travail, des activités antifongiques intéressantes sont obtenues *in vitro* par les huit isolats à l’égard des deux pathogènes de plantes. Les valeurs des pourcentages d’inhibition varient entre 47.09 à 82.5% et entre 62.5 à 91.67% pour *B. cinerea* et *A. niger* respectivement. Le même auteur rapporte que la bactérie du genre *Pseudomonas* possède un potentiel élevé de fixer l’azote, solubiliser le phosphate, produire des phytohormones et de coloniser le système racinaire de plusieurs plantes.

La majorité des enzymes produites par les bactéries sont les déshydrogénases, les phosphatases, les uréases, les catalases, les protéases et les cellulases (Przemieniecki et *al.*, 2015).

L'application des fongicides chimiques en agriculture provoque de graves problèmes de pollution pour l'environnement et des soucis à court et à long terme sur la santé humaine. En outre, leurs efficacités diminuent continuellement en raison de l'émergence de souches pathogènes résistantes (Handelsman et Stabb, 1996 ; Zhu et *al.*, 2007). Ainsi l'utilisation de microorganismes antagonistes ou leurs métabolites actifs comme une alternative écologiquement durable aux produits chimiques constitue une approche non négligeable (Haggag et Mohamed, 2007).

Toutes les souches sélectionnées inhibent la croissance fongique *in vitro* dans le test en double culture, contre *A. niger* et *B. cinerea*. Ce qui est surprenant c'est que cette activité n'est mise en évidence que lorsque les bactéries sont cultivées au préalable en présence des phytopathogènes cibles dans le même milieu, ceci suggère un effet d'induction de la production de métabolites antifongiques par les champignons.

L'inhibition de la croissance des pathogènes *in vitro* et la formation des zones d'inhibition semblent être dues aux métabolites libérés par les bactéries antagonistes dans le milieu de culture (Essghaier et *al.* 2012). Des travaux antérieurs ont révélé que les bactéries les plus actives appartiennent au groupe des G- en particulier les bactéries du genre *Pseudomonas* (Rangarajan et *al.*, 2001 ; Jousset et *al.*, 2006 ; Weller, 2007 ; Sandhya et *al.*, 2010), ce qui coïncide avec nos résultats où les huit meilleurs isolats appartiennent en majorité au genre *Pseudomonas*. Les genres bactériens comme *Enterobacter*, *Erwinia*, *Burkholderia*, *Stenotrophomonas* et *Rhizobium* sont rapportés comme étant efficaces contre plusieurs champignons phytopathogènes. Cependant, les bactéries appartenant au genre *Pseudomonas* sont les plus étudiées dans le contrôle biologique des champignons (Nzungize et *al.*, 2012, Rai et *al.*, 2016), ce qui renforce nos résultats.

La présence d'une zone d'inhibition sans contact physique entre l'antagoniste et la cible suggère la sécrétion de substances inhibitrices diffusibles non volatiles, ce qui est confirmé par la détection des anomalies au niveau des hyphes et des spores des champignons testés à partir de la zone d'interaction ou la région proche (Thongkamngam and Jaenaksorn, 2017).

Selon Sagaon et *al.* (2011), les bactéries exercent leurs activités antifongiques à travers la production d'enzymes lytiques extracellulaires, sidérophores, acide salicylique, antibiotiques, et des métabolites volatiles comme le cyanure d'hydrogène. Ils ont expliqué l'absence ou la

diminution d'une activité par la perte de ou des molécule (s) active (s) dans le processus d'extraction (ce qui est le cas des enzymes et des composés volatiles), et que la présence de la bactérie est nécessaire pour l'action des substances responsables de l'inhibition et pourraient être associées aux enveloppes bactériennes (Sagahón et al., 2011).

Selon Couillerot et al., (2009), de nombreuses souches de *P. fluorescens* montrent un effet incontestable dans le contrôle biologique des phytopathogènes, en particulier au niveau des racines des plantes à travers leurs synthèses de composés antimicrobiens, entre autre ; l'HCN, phénazine, et les surfactants. Ces métabolites secondaires inhibent la croissance des phytopathogènes *in vitro*. Des résultats obtenus par ces mêmes auteurs ont exhibé que quand les filtrats des cultures sont inoculés en boîtes avec les suspensions sporales fongiques, aucun développement de colonies n'est observé, les boîtes montrent des tubes germinatifs anormaux avec des hyphes non issus des cellules enflées.

Des résultats similaires sont obtenus par Rai et al. (2016), rapportant que *Pseudomonas protegens* (souche RhiNA) exerce une puissante inhibition de la croissance mycélienne lorsqu'elle est confrontée aux champignons *B. cinerea*, *A. niger*, *Mucor* sp. et *A. flavus*. Cette capacité est attribuée à la diversité des métabolites produits.

Selon Afsharmanesh et al. (2006), l'activité antagoniste des *Pseudomonas* est due à leur production de métabolites antifongiques comme : l'HCN, les sidérophores et les protéases. Manwar et al. (2004) ajoutent de leurs parts qu'un *Pseudomonas* sp. produit un sidérophore type pyoverdine présentant une bonne activité antifongique à l'égard des champignons pathogènes. Une inhibition maximale due à la production des sidérophores a été observée contre *A. niger*, cette activité est conservée même après une dilution de 10fois. Ces activités antagonistes *in vitro* des *Pseudomonas* contre les phytopathogènes suggèrent leur capacité de servir comme agent de lutte biologique.

Il est bien documenté que les *Pseudomonas* fluorescents sont connus pour leur large production de métabolites secondaires qui ont un double effet envers les plantes : effet promoteur de croissance et inhibiteur des phytopathogènes.

Selon Akkim et al. (2013), des isolats de *Pseudomonas* fluorescents agissent comme PGPR et agents de biocontrôle et sont efficaces *in vitro* par leur production d'AIA, de sidérophores fixateurs du fer, de cyanure d'hydrogène (HCN) et de substances volatiles.

La variabilité de l'activité antagoniste des souches de *Pseudomonas fluorescens* à l'égard de quelques champignons phytopathogènes suggère une diversité dans les mécanismes impliqués dans le biocontrôle (Toua et al., 2013). Dans ce même travail, ces auteurs concluent que les résultats *in vitro* et *in vivo* renforcent l'hypothèse que l'antagonisme est le mécanisme le plus

important pour le contrôle biologique des maladies ; mais, les composés antimicrobiens incriminés ne sont pas encore isolés et identifiés. Le surnagent de culture de cette bactérie possède un pouvoir inhibiteur plus grand contre les pathogènes fongiques par rapport aux sidérophores purs.

### 3.1.2. Inhibition de la germination des spores fongiques

Les huit isolats sont testés pour leur activité antagoniste à l'égard d'*A. niger* et *B. cinerea* grâce à leur pouvoir inhibiteur de germination des spores, observé sous microscope optique à l'aide d'une lame de Malassez en présence de lames témoins.

A l'exception de l'isolat K montrant un taux d'inhibition de la germination de 49,89%, tous les autres isolats inhibent entièrement la germination des spores de *B. cinerea* (100%), tandis qu'environ 10% uniquement de spores qui n'ont pas germé en absence de bactéries antagonistes (fig.33B). Dans le cas d'*A. niger*, la germination des spores est réduite de 20% en présence de souches testées, par contre, 100% des suspensions sporales non traitées (contrôle) ont germé (fig. 33A).

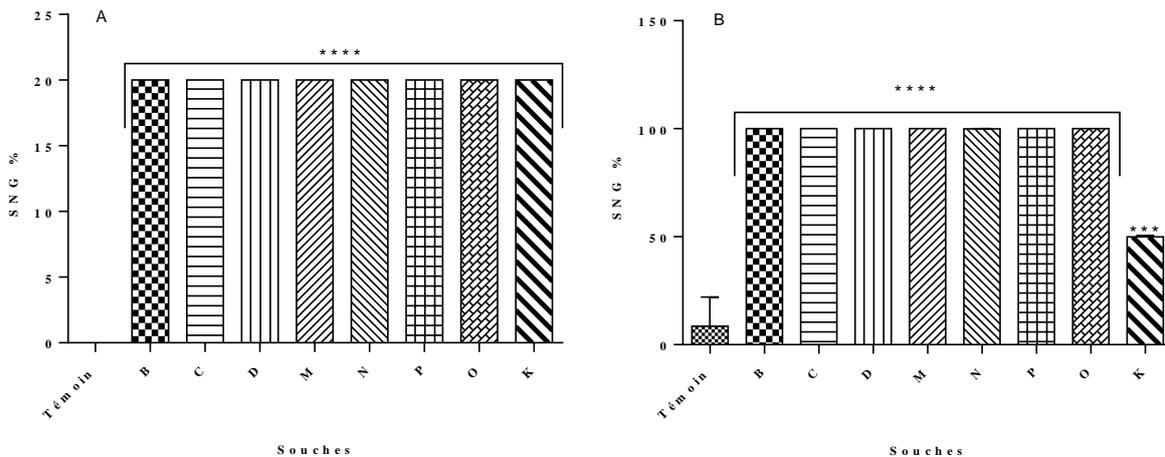


Fig. 33 : Inhibition de la germination des spores par les huit isolats bactériens.

A : *A niger* ; B : *Botrytis cinerea*

\*\*\* :  $p \leq 0.0005$ , \*\*\*\* :  $p \leq 0.0001$

Selon Calvo et al. (2007), l'inhibition de la germination des spores du pathogène cible a été observée lors d'une interaction directe entre l'antagoniste et le pathogène, (un contact de cellules à cellules) mais pas lorsqu'un filtre membranaire, permettant l'échange de nutriments et de métabolites, sépare la bactérie et le champignon. Dans ce même travail, l'antagoniste bactérien a complètement inhibé la germination des spores de *B. cinerea* et d'*A. niger*. D'après eux, le mécanisme exact par lequel cet antagoniste inhibe la germination des spores

n'est pas encore clair, vu que les mécanismes diffèrent d'un champignon à l'autre. Mais dans le cas de *B. cinerea*, ce phénomène pourrait s'expliquer par une éventuelle stimulation des bactéries par des nutriments endogènes provenant des conidies de ce pathogène. La prise de ces nutriments pourrait inhiber donc la germination des spores (Guinebretiere et al., 2000). En l'occurrence, la fixation de l'antagoniste aux hyphes du pathogène a été suggérée comme facteur important dans la compétition pour les nutriments, c'est le cas de l'antagoniste *Enterobacter cloacea* et *Rhizopus stolonifer* en pêche (Wilson et al., 1987).

Une autre explication de la tendance d'adhésion d'une bactérie antagoniste aux hyphes fongiques et aux spores peut être aussi due à la présence d'une protéine majeure de la membrane externe de la bactérie. Un autre facteur qui doit être pris en considération est la présence de substances extracellulaires favorisant l'agrégation cellulaire et l'inhibition de la germination et de l'élongation de l'hyphe germinatif fongique. Un autre test *in vitro* effectué par (Huang, 2005) a montré que la chitinase possède un effet inhibiteur sur la germination des conidies d'une espèce fongique de *Botrytis*.

Dans leur étude, Morandi et al. (2000) ont prouvé l'efficacité des agents de biocontrôle à réduire l'infection due à l'agent de la pourriture grise, et ont obtenu des pourcentages d'inhibition de germination et de sporulation de *B. cinerea* allant de 25-41% et plus de 99%, respectivement. Lim et al. (1991) ont rapporté qu'une souche de *Pseudomonas* produit des enzymes lytiques, des antibiotiques, des substances toxiques et une chitinase extracellulaire inhibant la croissance mycélienne. Selon ces mêmes auteurs, les enzymes lytiques inhibent la croissance mycélienne et la germination des spores et dans certains cas, lysent les tubes germinatifs. Une corrélation positive a été obtenue entre la production des sidérophores et l'inhibition de la germination des spores fongiques (Elad and Bakker, 1985).

### 3.1.3. Synthèse de substances volatiles

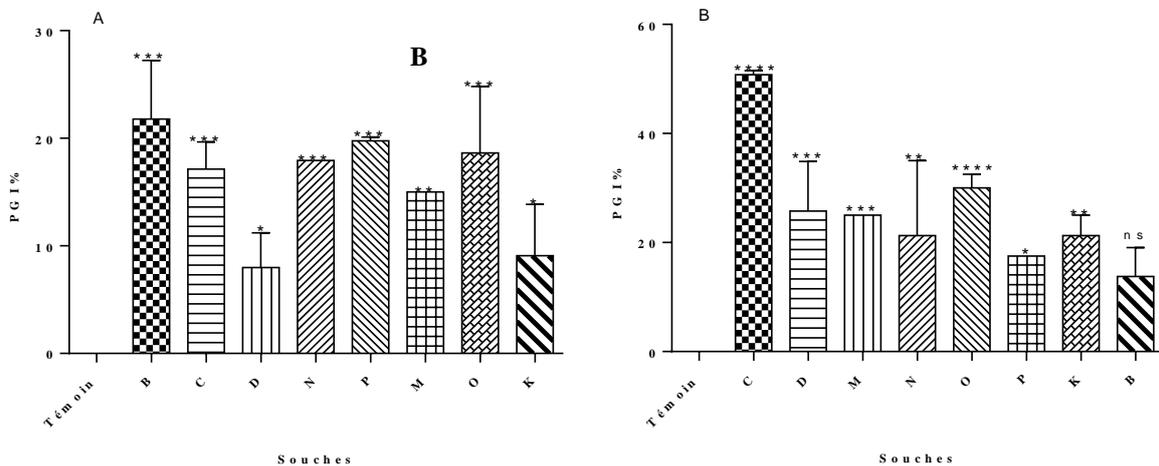
Dans cette expérience, aucun contact physique ne doit exister entre le pathogène et la bactérie antagoniste. La mesure de la croissance radiale du mycélium fongique sur boîtes de Pétri en présence et en absence des isolats bactériens a permis de calculer les PGI% (pourcentage de l'inhibition de croissance). Les résultats sont représentés dans la figure 34, pour les deux champignons cibles à savoir : *B. cinerea* et *A. niger*.

La réduction de la croissance mycélienne d'*A. niger* sous l'effet de la production de substances volatiles a varié de 7.98% comme valeur minimale pour l'isolat D à 21.79%

obtenu avec l'isolat B (fig. 34A). En outre, l'isolat C a montré les meilleurs résultats à l'égard de *B. cinerea* avec 50.8% d'inhibition. 13.75% seulement sont obtenus avec l'isolat B comme la valeur la plus faible parmi tous les isolats testés (fig. 34B). Des différences significatives sont obtenues entre les groupes à l'égard des deux champignons. Des résultats similaires sont obtenus par (Essghaier et al., 2008), en testant l'effet de la production de métabolites volatiles sur la croissance de *B. cinerea*, tous les isolats testés ont révélé un effet inhibiteur mais avec des pourcentages d'inhibition variables. Ce même auteur a décrit le rôle indispensable des substances volatiles chez certaines bactéries dans le biocontrôle à côté des enzymes lytiques  $\beta$  (1-3) Glucanase, cellulase, protéase, et chitinase.

En plus de leur effet sur la diminution de la croissance radiale fongique, les substances volatiles produites exhibent un effet sur l'aspect du mycélium et le taux de sporulation aussi. L'aspect et la couleur du mycélium (aérien et de substrat) sur boîtes sont différents par rapport au témoin non traité.

Dans le cas d'*A. niger* par exemple, le témoin montre la présence d'un mycélium aérien dense et élevé avec des spores sur toute la surface de la boîte. Les boîtes testes présentent un mycélium aérien faible et aplati et de couleur blanchâtre avec absence totale de spores. En renversant les boîtes, le fond apparaît d'une couleur blanc- jaunâtre par rapport au contrôle qui a un aspect grisâtre (Fig. 67).



**Fig. 34 :** PGI% d'*A. niger* (A) et *B. cinerea* (B) suite à la production de substances volatiles par les huit isolats  
 ns : Non significative ( $p \geq 0,05$ ) ; \* :  $p \leq 0,05$ , \*\* :  $p \leq 0,005$ , \*\*\* :  $p \leq 0,0005$ , \*\*\*\* :  $p \leq 0,0001$

Pour plusieurs années, la sécrétion d'enzymes extracellulaires est associée aux capacités de lutte biologique des bactéries productrices. En l'occurrence, certaines enzymes bactériennes sont capables de détruire les spores fongiques affectant ainsi leur germination et inhibant leur

croissance mycélienne (Bouizgarne, 2013). Certains travaux ont signalé l'implication des bactéries du genre *Pseudomonas* dans l'inhibition de la croissance mycélienne fongique (Edwards et al., 1998 ; Mansoor et al., 2007 ; Peighami-Ashnaei et al., 2009 ; Hernández-Salmerón et al., 2017). Dans leur expérience, Nagarajkumar et al. (2004) ont testé 14 souches de *P. fluorescens in vitro* à l'égard des champignons pathogènes. En plus de leur production de chitinase, sidérophores, acide salicylique et  $\beta$ -1,3 glucanase, ces souches apparaissaient productrices d'HCN.

Tous les processus précédemment cités nécessitent une proximité intime ou encore un contact physique entre les partenaires. Néanmoins, les bactéries sont aussi capables d'inhiber les champignons pathogènes à distance. Un exemple classique est celui de la production de composés volatiles antifongiques, comme la production du poison respiratoire toxique : le cyanure d'hydrogène (HCN), il est produit en quantités différentes par différentes souches d'espèces de *Pseudomonas*, mais aussi d'autres bactéries (Weisskopf, 2013).

Cantore et ses collaborateurs ont décrit en 2015 l'effet de la production des molécules volatiles entre autre l'ammoniac par les bactéries du genre *Pseudomonas* et leur induction de l'inhibition de la croissance mycélienne *in vitro*.

Le travail de Ghodsalavi et al. (2013) sur les bactéries rhizosphérique a confirmé la dominance des *Pseudomonas* sp. parmi les autres PGPR. Ces bactéries ont été testées pour leur capacité de produire les sidérophores, l'acide indole acétique (AIA), le cyanure d'hydrogène (HCN), les lipases et les protéases *in vitro*. Parmi ces PGPR, celles du genre *Pseudomonas* ont montré le potentiel le plus élevé de sidérophores, d'AIA, de lipase et protéase, l'antibiotique de nature volatile et l'HCN. Selon Ramette et al. (2003), le cyanure d'hydrogène (HCN) est un composé antimicrobien à large spectre impliqué dans le contrôle biologique des maladies des racines par de nombreux *Pseudomonas* fluorescents associés aux plantes. De plus, Zhu et al. (2007) ont souligné la présence de corrélation négative entre la germination des chlamydospores et l'inoculation par *Pseudomonas* sp. ou son sidérophore de type pyoverdines.

En outre, des composés volatiles tels que l'ammoniac et l'HCN pourraient être impliqués dans l'inhibition de la croissance mycélienne (Trivedi et al., 2008 ; Vanitha et Ramjegathesh, 204). Toujours avec Islam et al. (2012), des composés organiques volatiles microbiens sont impliqués dans l'initiation de certains changements biochimiques du métabolisme des plantes, d'où l'inhibition de la synthèse des protéines. De plus, Ramette et al. (2003) ont signalé que la production d'HCN par *Pseudomonas fluorescens* est reconnue comme efficace dans le

traitement biologique des maladies racinaires, en inhibant la cytochrome-oxydase C terminale dans la chaîne respiratoire fongique et en causant de graves dommages dans le métabolisme fongique.

La publication de Weisskopf et *al.* (2013) a résumé les différents modes d'actions des composés volatiles sur les champignons phytopathogènes comme suit : inhibition partielle (fongistatique) ou totale (fongicide) de la croissance mycélienne, inhibition de la croissance de tube germinatif, distorsion morphologique, inhibition de la germination des spores et rétraction du protoplaste. Ces mêmes auteurs rapportent l'effet de molécules volatiles sur la pigmentation mycélienne fongique. Ainsi, Zhao et *al.* (2011) ont publié la capacité d'une souche de *Paenibacillus polymyxa* BMP-11 de produire trois composés volatiles, et ces derniers inhibent fortement la croissance mycélienne de huit phytopathogènes fongiques, en induisant des anomalies morphologiques. Dans ce même travail, ces auteurs ont trouvé qu'un de ces composés prévient la production de pigments par les champignons testés. Ils ont aussi inhibé la germination des spores de *Botrytis cinerea*, ce qui leur permet d'être utilisés comme fongicides. Des résultats similaires sont obtenus par Liu et *al.* (2008), en testant l'effet des substances volatiles produites par quatre souches de *Bacillus* sur les champignons pathogènes cibles.

### 3.2. Caractérisation métabolique et fonctionnelle

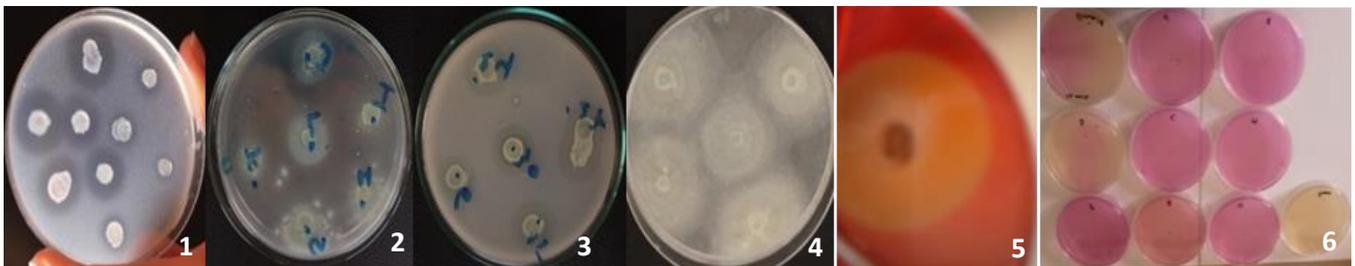
#### 3.2.1. Les activités enzymatiques

Le test préliminaire des activités enzymatiques sur les 55 isolats a permis la sélection des huit suivant : B, C, D, M, N, O, P et K qui ont fait l'objet des tests ultérieures. Différentes activités enzymatiques sont recherchées sur boîtes, les activités testées sont : les protéases, les lipases, les cellulases, les chitinases, les estérases, les amylases et les uréases. Dans le tableau ci-dessous sont présentés les différents résultats obtenus. A l'exception de l'activité cellulastique et amyliastique là où on a observé une absence d'activité pour certains isolats, les huit isolats ont montré des résultats positifs pour le reste, à savoir ; estérases, chitinases, protéases, lipases et uréases, qui sont présentés dans le tableau V. Aucun isolat n'a produit l'amylase. 50% des isolats sont faibles pour leur production de cellulases. Pour les activités positives, les résultats varient entre faible, moyen et bon d'un isolat à l'autre. L'aspect des boîtes après incubation est représenté sur la figure 35.

**Tableau V.** Résultats des différents tests d'activités enzymatiques testés pour les huit isolats

Isolat	Cellulase	Lipase	Estérase	Protéase	Chitinase	Amylase	Uréase
<b>B</b>	-	++	+++	++	++	-	++
<b>C</b>	+	++	+++	+	+++	-	+++
<b>D</b>	+	++	+++	+	+++	-	+
<b>M</b>	+	++	+++	++	+	-	+++
<b>N</b>	-	++	+++	+	+	-	+++
<b>O</b>	-	++	+++	++	+++	-	+++
<b>P</b>	+	++	+++	++	+	-	+++
<b>K</b>	-	++	+++	++	+	-	+++

+++ : activité élevée ; ++ : activité moyenne ; + : activité faible ; - : pas d'activité

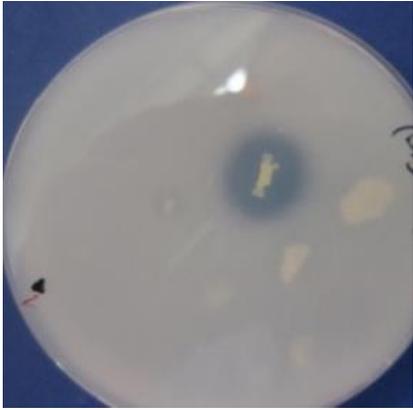


**Fig. 35 :** Aspect des résultats positifs d'activités enzymatiques testées sur boîtes  
1: chitinase ; 2: lipase ; 3: protéase ; 4: estérase ; 5: cellulase; 6: uréase.

### 3.2.2. Solubilisation du phosphate

La capacité d'une souche à solubiliser les phosphates inorganiques ( $Ca_3(PO_4)_2$ ) sur milieu solide se traduit par l'apparition d'un halo clair autour des colonies. Les résultats obtenus après incubation montrent que l'isolat « C » est le seul qui a solubilisé le substrat présent dans le milieu. Aucune zone d'éclaircissement n'a été observée avec les autres. Les résultats obtenus avec les huit isolats figurent dans le tableau suivant :

**Tableau VI :** Résultats de solubilisation du phosphate sur milieu solide

Isolats	Résultats	Aspect
B	-	
C	+	
D	-	
M	-	
N	-	
O	-	
P	-	
K	-	

**3.2.3. Production de sidérophores**

La production de ces molécules chélatrices du fer sur milieu gélosé Chrom Azurol S (CAS) se traduit par une apparition d'un halo jaune à orange autour des disques bactériens. Le diamètre du changement de la couleur ne montre pas de différences entre les isolats et l'activité apparaît bonne dans toutes les boîtes. Le tableau suivant montre les résultats obtenus avec les différents isolats, et sur la boîte sont illustrés des exemples de résultats positifs et d'autres négatifs.

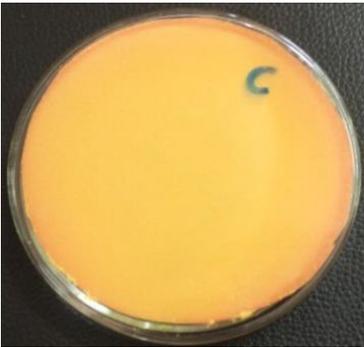
**Tableau VII :** Production de sidérophores sur milieu CAS

Isolats	Résultats	Aspect
B	+++	
C	+++	
D	+++	
M	+++	
N	+++	
O	+++	
P	+++	
K	+++	

**3.2.4. Production de cyanure d'hydrogène (HCN)**

Le changement de la couleur du papier Whatman imprégné de la solution de picrate de sodium révèle la capacité de tous les isolats à produire un antibiotique de nature volatile qui est l'HCN (Lim et *al.*, 2005). La différence des quantités produites se traduit par une différence dans l'intensité de la couleur du papier (brunâtre pour les isolats M, N, C et D et orange pour le reste) par rapport au témoin qui a gardé la couleur jaune. Les résultats de ce test sont résumés dans le tableau ci-dessous.

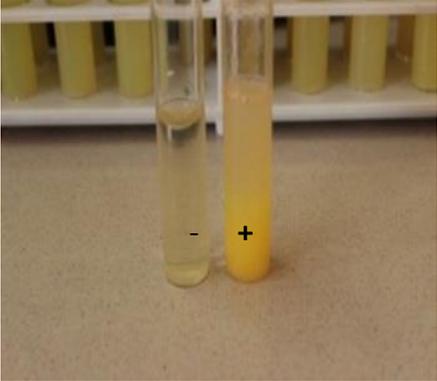
**Tableau VIII.** Résultats de production du cyanure par les huit isolats testés

Isolats	Résultats	Aspect
<b>B</b>	+	
<b>C</b>	+++	
<b>D</b>	+++	
<b>M</b>	+++	
<b>N</b>	+++	
<b>O</b>	++	
<b>P</b>	++	
<b>K</b>	++	

**3.2.5. Production d'ammoniac**

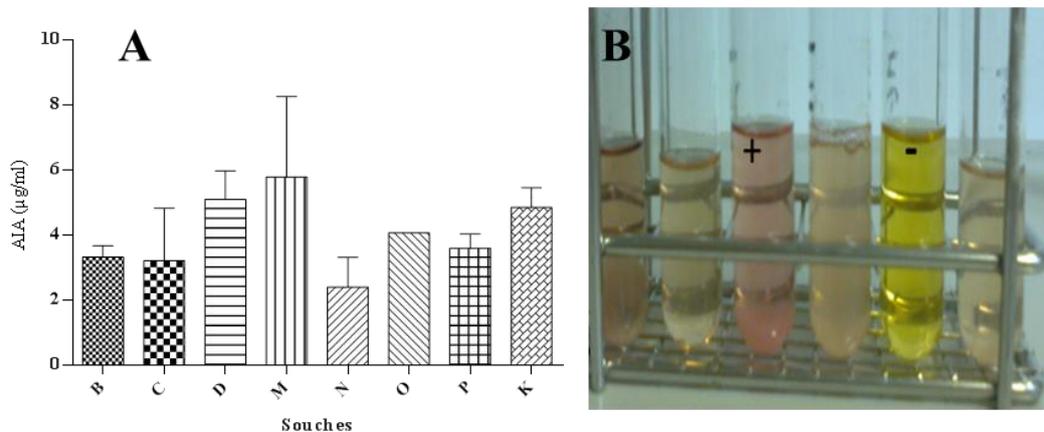
L'aspect des tubes après inoculation et incubation et l'ajout du réactif de Nessler a révélé une différence par rapport au témoin non inoculé. Tous les tubes apparaissent de couleur jaunâtre, ce qui confirme la production de NH<sub>3</sub> par les huit isolats. Le tableau suivant résume les résultats obtenus.

**Tableau IX.** Résultats de la capacité des différents isolats à produire l'ammoniac (NH<sub>3</sub>)

Isolats	Résultats	Aspect
B	+	
C	+++	
D	+++	
M	+++	
N	+++	
O	++	
P	++	
K	++	

**3.2.6. Synthèse d'AIA phytohormone**

Les auxines sont les phytohormones les plus synthétisées et sont ainsi les plus étudiées. La synthèse de l'AIA est mise en évidence *in vitro* par ensemencement du milieu liquide Luria Bertani additionné du tryptophane comme substrat. La production d'auxine (AIA) est observée dans 100% des isolats avec des concentrations différentes, ce qui se traduit par des intensités variables de la couleur rose dans les tubes après 30min d'incubation (B). Comme montré dans la figure 36A, l'isolat M produit la quantité la plus élevée avec  $5.78 \pm 1.80 \mu\text{g/ml}$ , tandis que la valeur minimale est de  $2.40 \pm 0.65$  et elle est produite par l'isolat N.



**Fig. 36 :** Production d'AIA par les 8 isolats

A : concentrations produite en µg/ml ; B : aspects de quelques tubes positif et négatifs.

La majorité des travaux sur le biocontrôle des champignons pathogènes des plantes sont concentrés sur l'utilisation de bactéries du genre *Pseudomonas* ou *Bacillus*. Cependant le développement des produits de lutte biologique à partir d'isolats appartenant au genre *Serratia* est aussi important, ce genre agit par antibiose, parasitisme impliquant la production d'enzymes lytiques (chitinase, protéase,  $\beta(1,3)$  glucanase) qui peuvent lyser les cellules pariétales du pathogène, compétition pour les nutriments et le fer en sécrétant des sidérophores et l'induction des mécanismes de défense de la plante (De Vleeschauwer and Höfte, 2007). Des travaux antérieurs ont rapporté que *Pseudomonas* et *Serratia* sont parmi les PGPR les plus dominant dans la rhizosphère, et que les protéases, lipases, l'HCN extracellulaires peuvent contribuer à l'inhibition et l'élimination des maladies fongiques (Ghodsalavi et al., 2013).

Les bactéries appartenant au genre *Pseudomonas* sont connues sous le nom de PGPB pour de nombreuses cultures (pomme de terre, radis, betterave à sucre, laitue, etc.). Leur efficacité élevée en tant que biostimulants et agents de lutte biologique est due à leur capacité à produire des antibiotiques, phytohormones, enzymes hydrolytiques, sidérophores et autres métabolites d'intérêt agricole, assurant leur forte antibiose, compétition et parasitisme (Tri Wahyudi et al., 2011). Les souches sélectionnées dans cette étude sont capables de synthétiser un grand nombre de ces métabolites, ce qui pourrait expliquer leur efficacité à l'égard des champignons pathogènes cibles et la stimulation de la croissance des plants de tomate et ceux des petits pois infectés (résultats présentés dans la prochaine partie du travail).

Selon Velusamy et Kim. (2011), une forte corrélation a été observée entre le potentiel chitinolytique bactérien et leur lyse de mycélium fongique *in vitro*. Les PGPB privent les champignons pathogènes d'un élément essentiel comme le fer qui est chélaté par les sidérophores (Lim et al., 2005).

Gohel et al. (2006) ont précisé que les microorganismes producteurs de chitinases et des protéases pourraient provoquer une lyse pariétale des cellules fongiques, contribuant à l'élimination des agents pathogènes. Autrement, Suresh et al. (2010) et Raaijmakers et al. (2002) ont démontré la capacité de *Pseudomonas fluorescens* à promouvoir la croissance par la production de l'HCN, des sidérophores, des protéases, des agents antimicrobiens et la solubilisation du phosphate.

Les sidérophores, l'HCN, la Pyrrolnitrine, la phénazine, le 2,4- diacétyl-phloroglucinol, les enzymes lytiques (chitinase, cellulase, protéase etc.), la production d'autres antibiotiques par les bactéries appartenant au genre *Pseudomonas* et leur efficacité contre les champignons

pathogènes sont largement rapportés (Raaijmakers et al., 2002 ; Al-Hinai et al., 2010 ; Suresh et al., 2010 ; Bensidhoum et al., 2016). En outre, Islam et al. (2012) ont justifié l'effet inhibiteur de certains *Pseudomonas* antagonistes par la capacité d'inhiber le fonctionnement intégral de certains composants des cellules pariétales fongiques, altérant ainsi la perméabilité des membranes cellulaires.

Les sidérophores sont des ligands de faible poids moléculaire qui sont produits par les organismes comme des agents chélateurs du fer lorsque la forme disponible de ce dernier est limitée (Höfte and Bakker, 2007 ; Saha et al., 2015). Ces métabolites fournissent des avantages compétitifs à l'organisme producteur pour l'absorption du fer (Suresh et al., 2010). Selon Bensidhoum et al. (2016), la production de sidérophores bactériens stimule indirectement la croissance des plantes grâce à l'inhibition des phytopathogènes et la compétition pour les ressources en fer ferrique dans les sols.

L'AIA est de loin la phytohormone la plus courante et la plus étudiée. Il affecte l'élongation racinaire des plantes, le processus de nodulation, la division et la différenciation cellulaire et stimule la germination des graines et des tubercules (Maleki et al., 2010). Cette phytohormone contrôle également la croissance végétative, la photosynthèse, la formation des pigments et la biosynthèse de divers métabolites, assurant la stimulation de la croissance des plantes et la résistance aux conditions stressantes (Glick, 2012). Ponmurugan et Gopi (2006) ont mis en évidence le rôle des *Pseudomonas* producteurs d'AIA dans le développement des racines des petits pois et, par conséquent, d'autres paramètres de croissance des plantes.

Quantitativement, l'AIA est l'auxine la plus naturelle produite par les bactéries. En outre, une corrélation positive a été rapportée par Basharat et al. (2009) concernant la production *in vitro* des auxines par les bactéries du sol et leur capacité à favoriser la croissance des plantes dans différentes circonstances. Cependant, Baca et Elmerich (2007) ont signalé que la réponse des plantes aux bactéries productrices d'AIA dépend de plusieurs paramètres tels que l'espèce végétale et la quantité produite.

Des concentrations élevées en AIA peuvent causer l'effet inverse (inhibition) sur la croissance des plantes, ce qui a été remarqué par Malik and Sindhu, (2011) sur le pois chiche après enrobage des graines par des isolats de *Pseudomonas* producteurs de quantités significatives en AIA.

Les cultures absorbent le phosphore sous forme d'ions de phosphate soluble. La solubilité de phosphate est inhibée par la présence du fer et d'aluminium dans les sols acides et du calcium dans les sols neutres et alcalins, cela conduit à la fixation du phosphore et le rendant donc inaccessible aux plantes cultivées. Les bactéries solubilisant le phosphate (phosphobactéries)

secrètent une sorte d'acides organiques qui agissent sur les phosphates insolubles et les convertissent en une forme soluble, fournissant ainsi du phosphore à la plante (Ponmurugan et Gopi, 2006).

Les phosphobactéries améliorent la croissance des plantes en raison de la biosynthèse de substances de croissance des plantes plutôt que de leur action de libération du phosphore. Les résultats sur la production de substances stimulatrices de la croissance ont indiqué que toutes les souches de phosphobactéries aussi capables de produire des phytohormones comme l'AIA et GA<sub>3</sub> *in vitro*.

Selon Lim et al. (2005), la chitinase produite par une souche de *Serratia plymuthica* C48 a inhibé la germination des spores et l'allongement de tube germinatif chez *B. cinerea*. La capacité de produire des chitinases extracellulaires est considérée comme cruciale pour que *Serratia marcescens* agisse comme antagoniste contre *Sclerotium rolfii*. Ce même auteur a rapporté que la chitinase extracellulaire et la laminarinase synthétisées par *Pseudomonas stutzeri* digèrent et lysent le mycélium de *F. solani*, c'est le cas de *Serratia plymuthica* IC14 à l'égard de *S. sclerotiorum* et *B. cinerea* sous l'effet de protéases et autres substances de biocontrôle.

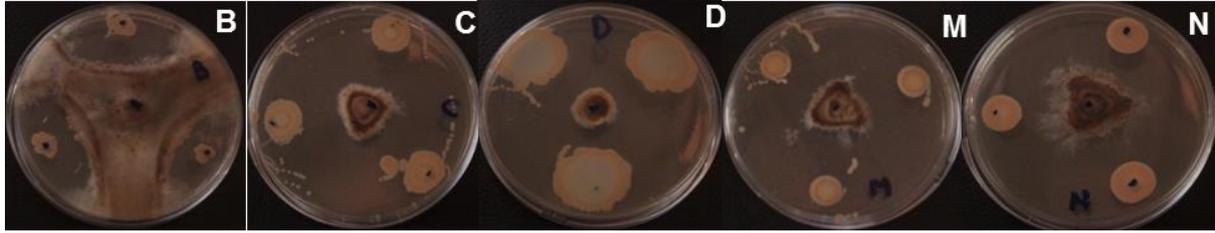
En plus de leur assimilation de la chitine comme source de carbone et d'azote, les bactéries produisent des chitinases pour hydrolyser les parois cellulaires fongiques (Chang et al., 2003). Les chitinases, les  $\beta$  (1,3 Glucanase), les protéases, et les lipases sont les principales enzymes produites par quelques PGPB agents de biocontrôle capables de lyser les cellules fongiques (Glick and Bashan, 1997). Plusieurs travaux ont déjà décrit l'implication des sidérophores, d'autres métabolites secondaires, et des enzymes lytiques induites par les PGPB dans le mécanisme de contrôle à l'égard des pathogènes des plantes (Ladwal et al., 2012).

### **3.3. Effet des isolats bactériens sur la croissance fongique après 70jours d'incubation : activité fongicide/ fongistatique**

Les boîtes ayant montré des résultats positifs dans le test d'antagonisme en double culture avec les 8 bactéries à l'égard des deux champignons phytopathogènes *B. cinerea* et *A. niger* sont laissées sur paille pendant 70jours. Le résultat montre que les zones d'inhibition ont persisté durant cette période (la croissance mycélienne est complètement arrêtée), ce qui explique que l'effet des bactéries sur les deux champignons n'est pas influencé par le facteur temps. La figure suivante montre quelques résultats obtenus à l'égard de *B. cinerea*.

Les disques fongiques sont prélevés de la zone d'inhibition de la croissance mycélienne des deux champignons et redéposés sur gélose d'extrait de malt vierge. Après incubation, une

réapparition d'un jeune mycélium a eu lieu, donc, l'effet inhibiteur est observé juste en présence de la souche bactérienne teste. L'activité est dite fongistatique et non fongicide.



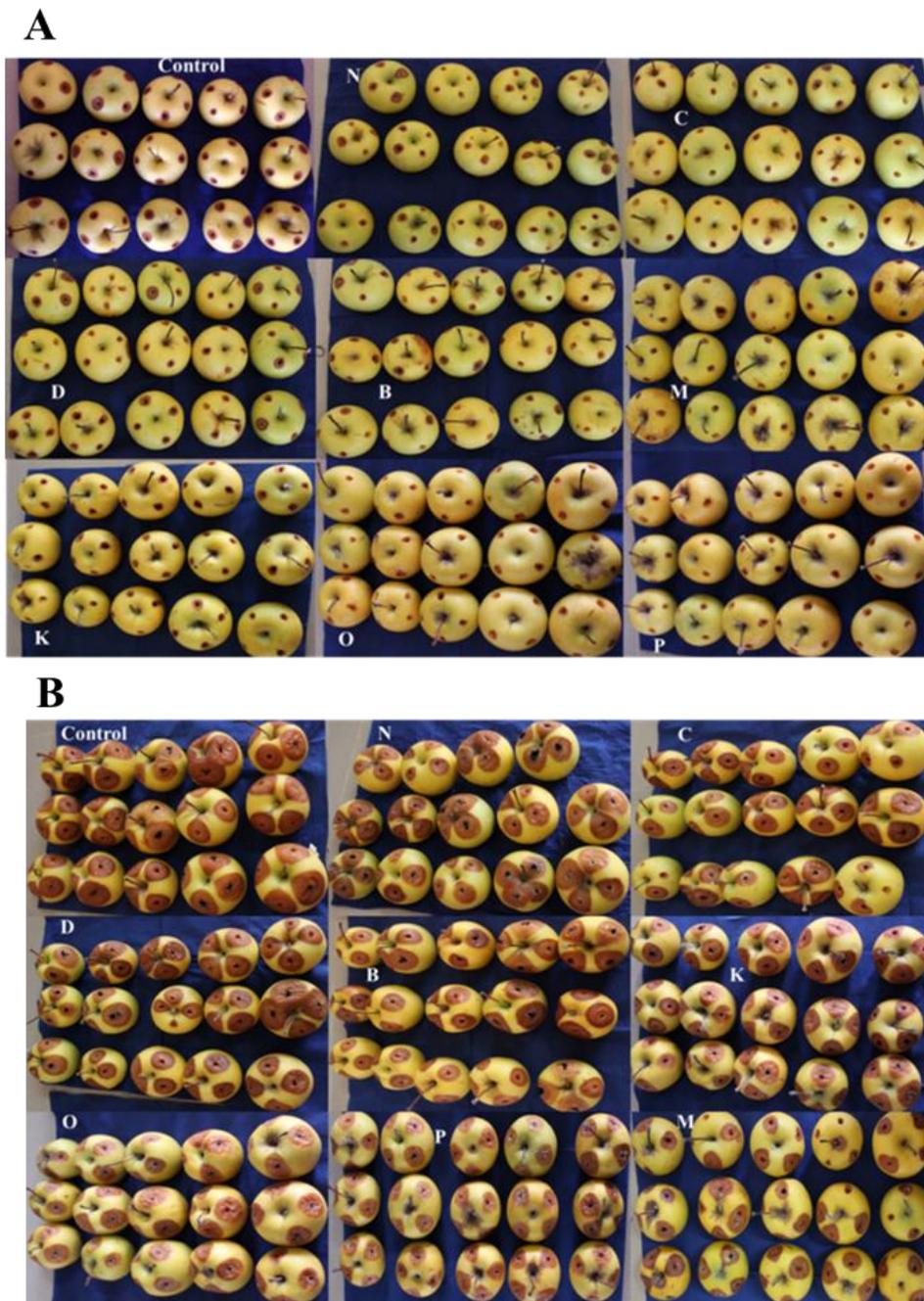
**Fig. 37 :** Aspect de quelques résultats de test d'antagonisme en double culture après 70 jours d'incubation à l'égard de *B. cinerea*.

B : isolat B ; C : isolat C ; D : isolat D ; M : isolat M ; N : isolat N.

D'après De Cal et *al.* (1987), l'activité antagoniste d'un composé libéré par un agent antifongique augmente dans le temps jusqu'à atteindre sa valeur maximale pour diminuer par la suite. Une activité qui dure dans le temps est un indice d'une synthèse continue de molécules antifongique, ou d'une diminution de la vitesse de métabolisme de ces dernières par les champignons. Selon les mêmes auteurs, la persistance de l'activité jusqu'à 70 jours à température ambiante est un indice que les molécules antifongiques ne sont pas influencées par les facteurs externes comme le pH et la température pendant cette période. Bensidhoum, (2016) a suivi l'activité antagoniste de la souche S5LiBe de *Pseudomonas protegens* à l'égard de *Botrytis cinerea* pendant 10 jours d'incubation. L'auteur a constaté que l'activité dure en fonction du temps, ce qui signifie que les substances produites par la souche bactérienne gardent leur efficacité pendant toute la période d'essai.

### **3.4. Contrôle de *Botrytis cinerea* BCI et *Aspergillus niger* sur fruits de pomme**

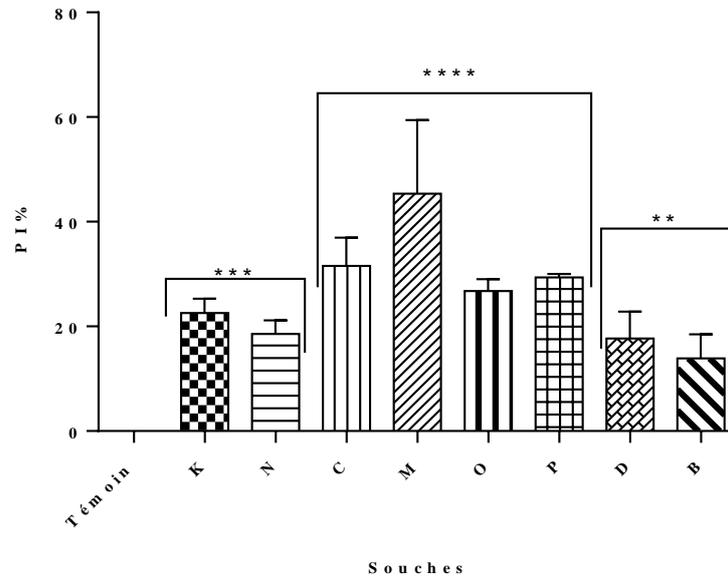
La variété locale de pomme Golden Delecious est infectée séparément par les suspensions sporales des deux champignons à savoir ; *A. niger* et *B. cinerea* en présence et en absence des suspensions bactériennes des huit isolats. Les résultats obtenus sont transformés en pourcentage d'inhibition de croissance PGI% (Fig. 38). La mesure de diamètre des zones pourries aux alentours des blessures est effectuée chaque jour pendant une période de 6 jours. La figure suivante montre les résultats obtenus à l'égard d'*A. niger* après 3 et 6 jours d'incubation. Les antagonistes bactériens ont moyennement inhibé la propagation des pourritures dues aux deux champignons à partir des lésions provoquées sur fruits de pomme.



**Fig. 38** : Zones pourries sur fruits de pomme attequés par *Aspergillus niger* en présence et en absence des huit isolats incubés à 25°C.  
**A** : après 3jours d'incubation ; **B** : après 6 jour d'incubation.

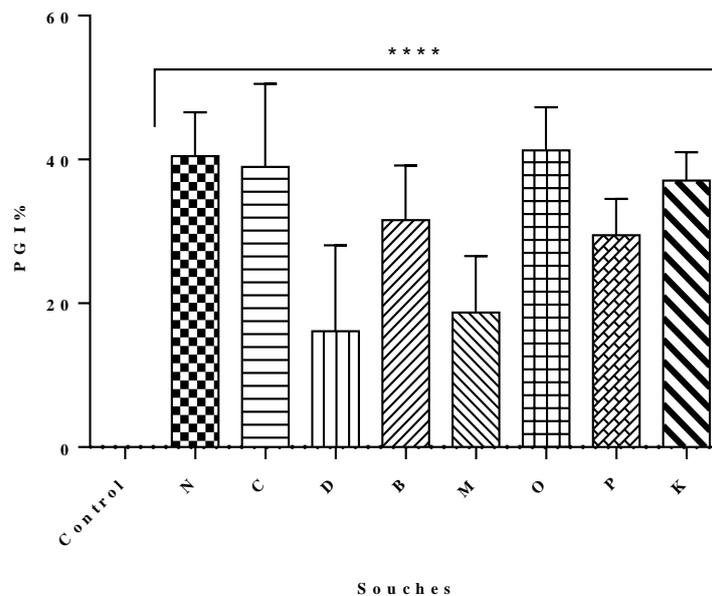
Les pourcentages d'inhibition de la croissance (PGI%) sont variables d'un isolat à l'autre mais restent dans le même intervalle entre les deux champignons. Dans le cas de la contamination par *B. cinerea*, l'isolat D a montré la réduction de l'infection la plus faible avec seulement 16.12% comparée à l'isolat O avec 41.3% comme valeur maximale. Les

pourcentages d'inhibition de croissance d'*A. niger* varient de 13,92% comme valeur minimale obtenue avec l'isolat B à 45,36% suite à l'effet protecteur de l'isolat M. Ces résultats sont illustrés sur les figure 39 et 40 ci-dessous. Des différences significatives sont observées entre les groupes à l'égard d'*A. niger*, contrairement à *B. cinerea* où aucune différence n'est remarquée à  $p < 0.001$ .



**Fig. 39 :** Pourcentage d'inhibition de la croissance (PGI%) d'*A. niger* sur fruits de pomme par les huit isolats.

\*\* :  $p \leq 0.005$ , \*\*\* :  $p \leq 0.0005$ , \*\*\*\* :  $p \leq 0.0001$



**Fig. 40 :** Pourcentage d'inhibition de croissance (PGI%) de *Botrytis cinerea* sur fruits de pomme par les huit isolats. \*\*\*\* ; ( $p < 0.001$ ).

Les blessures superficielles des fruits causées pendant la récolte et les manutentions ultérieures constituent le moyen idéal pour l'infection par les pathogènes. Ces sites de blessure sont généralement riches en nutriments (glucose, molécules dérivées) qui sont disponibles pour le pathogène (Spadaro and Droby, 2016).

Les pertes post-récoltes causées par les maladies fongiques sont le facteur majeur limitant la durée de conservation des pommes, qui sont traditionnellement contrôlées par l'application des fongicides de synthèse (He et al., 2003). La détérioration des fruits et légumes après récolte cause souvent des pertes allant de 25-50% de cultures récoltées (Wilson et al., 1991).

Ces dernières années, le contrôle biologique des maladies post-récolte des fruits est devenu un domaine de recherche important (Calvo et al., 2007). C'est une alternative fiable pour remédier aux résistances, causées par l'application de plusieurs fongicides chimiques, et aux risques toxicologiques possibles (Calvo et al., 2007). Les blessures sont un environnement idéal pour les antagonistes car elles fournissent un substrat humide et riche en nutriments. Parmi les bactéries G-, le genre *Pseudomonas* et *Serratia* sont rapportés comme agents efficaces de biocontrôle, contre les maladies de plusieurs fruits provoquées principalement par les deux agents pathogènes post-récolte de la pomme : *B. cinerea* et *Penicillium expansum* (Janisiewicz and Korsten, 2002 ; Calvo et al., 2007).

Dans ce présent travail, les huit isolats inoculés sur fruits de pomme sont apparus efficaces pour inhiber la croissance fongique avec des valeurs de PGI% allant de 13.92, à 45.36% d'*A. niger* et entre 16.12 à 41.3% de *B. cinerea*. Les bactéries du genre *Pseudomonas* et *Serratia* sont bien connues pour leurs activités antagonistes à l'égard de *B. cinerea* agent de la pourriture grise de la pomme grâce à leur production d'enzymes chitinolytiques (Velusamy et Kim, 2011).

L'application de *Pseudomonas cepacia* sur pomme variété, Golden Delicious a prouvé que son principal mode d'action est la production de Pyrrolnitrine, un puissant composé antifongique, permettant l'altération du pouvoir pathogène de *B. cinerea* et *Penicillium expansum* sur ce fruit (Janisiewicz et Roitman, 1988). Les blessures sont créées à la récolte et pendant la manutention post-récolte et le traitement (Vero et al., 2002). En plus de l'apparition de zones pourries, une légère odeur de cidre peut être associée à cette pourriture grise (Xiao and kim, 2008). Dans l'étude réalisée par Lima et al. (1999), plusieurs couples entre autre : pomme- *A. niger* et pomme-*B. cinerea* sont testés, où tous les antagonistes

inoculés ont colonisé rapidement les blessures. Certaines espèces antagonistes ont la capacité d'envahir rapidement les blessures sur fruits, et leurs modes d'action est principalement basé sur l'antibiose ; la compétition pour l'espace et les nutriments ; l'interaction physique directe avec les hyphes fongiques ; la production d'enzymes lisant les parois cellulaires et l'induction du processus de résistance par production d'éthylène, des phénols, des phytoalexines et des lignines (Wilson et *al.*, 1991 ; Lima et *al.*, 1999 ; Nakvi, 2004). Un antagoniste efficace peut également fournir une résistance à l'hôte indirectement en changeant l'environnement chimique ou osmotique au niveau des sites de blessure pour favoriser l'antagoniste sur le pathogène (Wilson et *al.*, 1991).

Dans une expérience similaire réalisée par Roberts. (1990) sur une variété de pomme Golden Delicious précédemment désinfectée et blessée par piqure sur la surface et traitée ( $2.10^4$  de spores fongique et  $10^4$  à  $10^5$  de cellules de *Cryptococcus laurentii*), a montré que le développement de la pourriture grise causée par *B. cinerea* a été significativement réduit comparativement au contrôle. L'efficacité de l'antagoniste est comparable à celle de l'antifongique commercial « Bénomyl ».

Le travail réalisé par Rai et *al.* (2016) sur l'efficacité de *Pseudomonas protegens RhiNA* contre la pourriture grise d'une souche de *B. cinerea BCI* sur fruits de pomme Golden Delicious a abouti à un pourcentage d'inhibition de 32.63% par rapport au contrôle inoculé seulement avec les spores fongiques. Ce pourcentage correspond à une surface de propagation de la pourriture avoisinant  $529.74\text{mm}^2$  en absence de RhiNA, par rapport à  $172.823\text{mm}^2$  seulement dans les fruits tests, ce qui démontre l'efficacité de cette souche bactérienne à éliminer la souche virulente de *B. cinerea*. Cette efficacité serait due à l'antibiose, la compétition pour les nutriments et l'espace, production d'antibiotiques, enzymes lytiques, parasitisme direct et induction des mécanismes de résistance chez l'hôte (Wilson et *al.*, 1991).

Dans une expérience réalisée par Janisiewicz et Korsten (2002), un antagoniste a réduit la taille des lésions causées par la pourriture grise de la pomme de plus de la moitié, et son efficacité d'action est due à sa production de l'exo- 1,3 glucanase. Parallèlement, l'étude de Nune et *al.* (2002) sur certains agents antagonistes des maladies post-récolte majeures sur la pomme variété Golden Delicious à température et pression atmosphérique variables, confirme l'efficacité de cet antagoniste à protéger les fruits contre la pourriture grise et bleue sous froid dans plusieurs conditions d'atmosphère avec des pourcentages d'inhibition allant de 80 à 100%. L'efficacité des antagonistes bactériens sur les plaies du fruit était liée à leur croissance

et à leurs propriétés nutritionnelles (Guinebretiere et *al.*, 1999). La compétition pour les substances nutritives en particulier les acides aminés pourrait être un mécanisme principal de l'activité de biocontrôle de l'antagoniste à l'égard de la pourriture sur les fruits de pomme récoltés (Bencheqroun et *al.*, 2007).

La co-inoculation des fruits de pomme avec *Pseudomonas fluorescens* et *Bacillus subtilis* a diminué le degré de la pourriture causée par *Botrytis cinerea* avec des pourcentages allant de moins de 35 à 100% et de moins 65 à 100% après 10 et 20 jours d'incubation respectivement (Peighami-Ashnaei et *al.*, 2009). Un travail réalisé par Essghaier et *al.* (2008) a montré que l'application des antagonistes bactériens à la place des fongicides chimiques sur fruits induisait une réduction allant de 50 à 91.66% de *Botrytis cinerea*. Il faut seulement souligner qu'il y a peu de travaux qui sont réalisés sur le biocontrôle d'*A. niger* sur fruits de pomme.

Zamani et *al.* (2009) ont testé l'effet de la souche bactérienne *Pantoea agglomerans* sur le champignon *Penicillium digitatum* (agent de la pourriture verte) responsable de pertes considérables post-récoltes du fruit de citron, la bactérie a réduit l'infection avec 75% par rapport au fongicide chimique « Imazazil » ayant donné 87% de réduction.

Une bactérie ayant les meilleurs résultats d'antagonisme *in vitro* n'est pas forcément la plus efficace *in vivo*. C'est le cas de la souche de *Bacillus J9* qui n'inhibait pas *B. cinerea in vitro* sur milieu PDA, mais elle réduisait la pourriture grise sur les fruits de fraise en post-récolte ou sur tomate sous serre (Essghaier et *al.*, 2012). De plus, les auteurs stipulent que l'efficacité d'un antagoniste doit être d'abord testée *in vivo* et pas *in vitro*. Ce qui corrobore avec nos résultats, où on observé que les souches ayant les meilleurs pourcentages d'inhibition de *B. cinerea* et *A. niger in vitro* sur gélose à extrait de malt ne présentent pas les mêmes résultats d'inhibition sur la pourriture sur fruits de pomme causées par les même champignons.

## Partie II. Caractérisation des souches sélectionnées

### 1. Courbes de croissance des huit isolats bactériens

La croissance bactérienne a été suivie pour les huit isolats sur milieu liquide LB pendant 65h d'incubation/30°C à 150rpm, et les résultats des courbes de croissance (DO en fonction du temps) sont illustrés dans les figures suivantes.

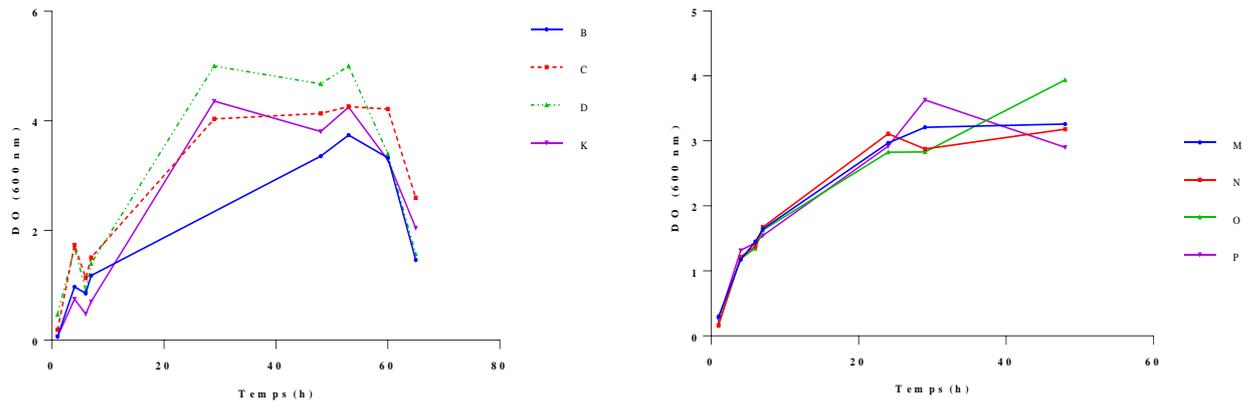


Fig. 41 : Courbes de croissance des huit isolats

Tracer les courbes de croissance des isolats bactériens est une étape importante pour situer la phase de production maximale de molécules antifongiques.

Les résultats montrent que les isolats B, C, D et K atteignent leur phase stationnaire de croissance aux alentours de 24h d'incubation, des résultats similaires sont obtenus pour les souches M, N, O et P qui montrent un intervalle de croissance maximale situé entre 24h et 30h (avant 30h d'incubation toutes les souches sont en phase stationnaire), pour cela, les tests d'activité ultérieurs seront appliqués sur des souches âgées de 24h d'incubation.

### 2. Identification phénotypique et phylogénique des huit isolats bactériens

Sur la base des résultats du test d'antagonisme en double culture, huit isolats sont sélectionnés, et suite aux autres tests concernant les différents traits PGP et le test d'antagonisme sur fruits de pomme obtenus dans la première partie du travail, quatre isolats sont sélectionnés à savoir ; B, C, D et N. L'observation au microscope optique montre des cellules sous forme de bacilles, mobiles, Gram négatif, les tests d'oxydase et catalase sont positifs pour tous les isolats. Une identification génétique par séquençage de l'ARN16S a eu

lieu. Selon Przemieniecki et al. (2015), un test de catalase et d'oxydase positifs plus une coloration de Gram négative est une caractéristique des bactéries du genre *Pseudomonas*.

Selon Felsenstein (1981), l'arbre phylogénétique est calculé par le maximum de vraisemblance, et la similitude des séquences est calculée par la méthode de la matrice des distances (Saitu and Nei, 1987).

Les séquences d'ADNr 16S des isolats B, C, D et N sont alignées à l'aide du programme MUSCLE, et les arbres phylogénétiques sont construits à l'aide du programme MEGA 6.0 par un échantillonnage de 1000 paires de base. Un arbre phylogénétique avec les 30 meilleurs BLAST commun réussi pour les séquences B, D et N est représenté dans la figure 42A ; et l'arbre phylogénétique avec les 30 meilleurs BLAST pour la séquence C est représenté dans la figure 42B.

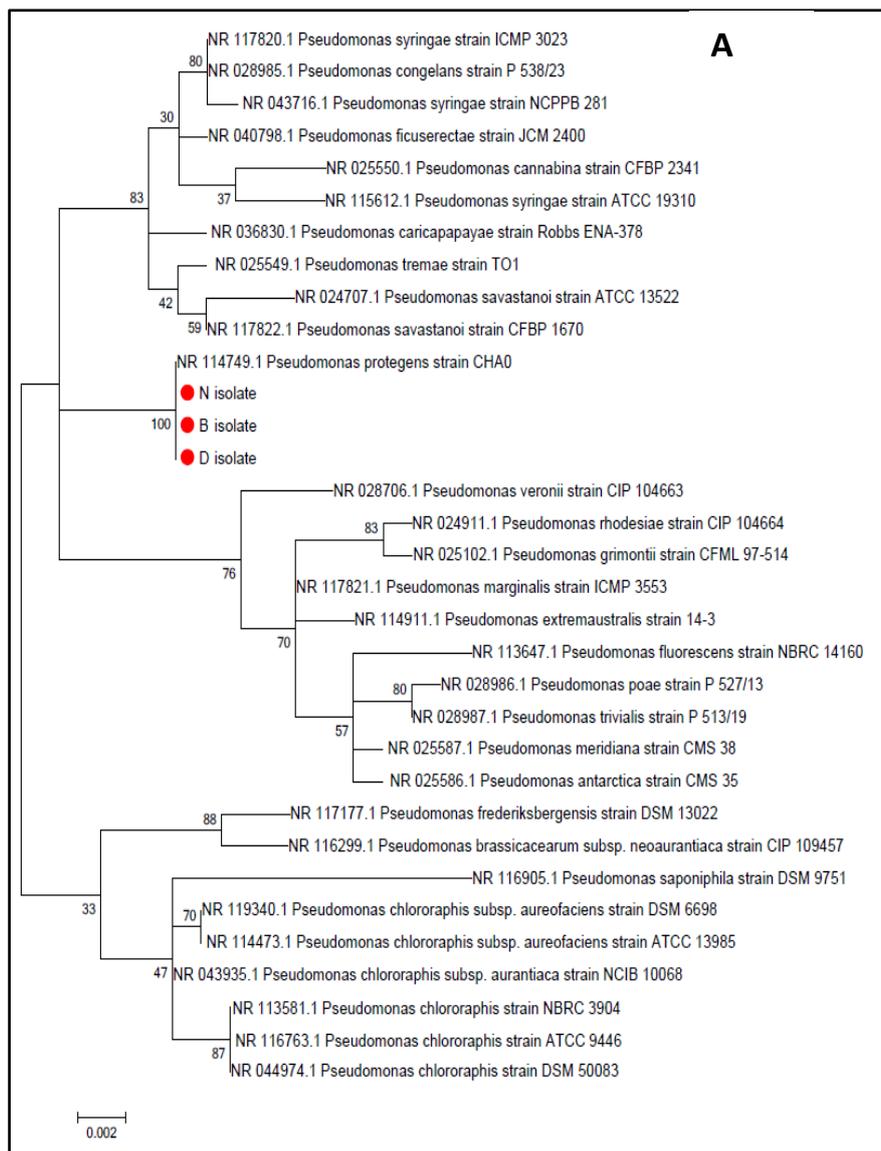
Les séquences obtenues avec les isolats B, D, et N ont permis de les affilier au genre *Pseudomonas*, tandis que la séquence de l'isolat C a montré une similitude élevée avec le genre *Serratia*. De plus, l'analyse phylogénétique a révélé que les séquences du gène d'ARNr 16S des isolats B, D et N présentent un pourcentage de similitude de 99,93% avec *Pseudomonas protegens CHA0* (Fig. 42A). D'autre part, l'isolat C s'est révélé le plus proche de la souche *Serratia quinivorans* LMG 7887 et *Serratia quinivorans* 4364 (99,86% de similitude) (Fig. 42B).

Ces dernières années les génomes d'un grand nombre de souches de *Pseudomonas* ont été séquencés, montrant une hétérogénéité génomique importante et fournissant des informations adaptées pour les études génomiques, qui aident à comprendre la diversité génomique et génétique démontrées par les souches de ce groupe (Garrido-Sanz et al., 2016). Le groupe des *P. fluorescents* contient plusieurs espèces (*P. brassicacearum*, *P. protegens*, *P. chlororaphis*, et *P. fluorescens*) qui sont décrites comme PGPR grâce à leur capacité d'éliminer les maladies des plantes causées par les pathogènes (Garrido-Sanz et al., 2016). En rassemblant quelques critères phénotypiques et d'autres analyses génotypiques (ARN16s, les gènes codants pour les protéines, hybridation ADN/ADN et sidérotypage), Ramette et al. (2011) ont réussi à regrouper des souches de *Pseudomonas* dans un nouveau groupe appelé *Pseudomonas protegens* sp. nov.

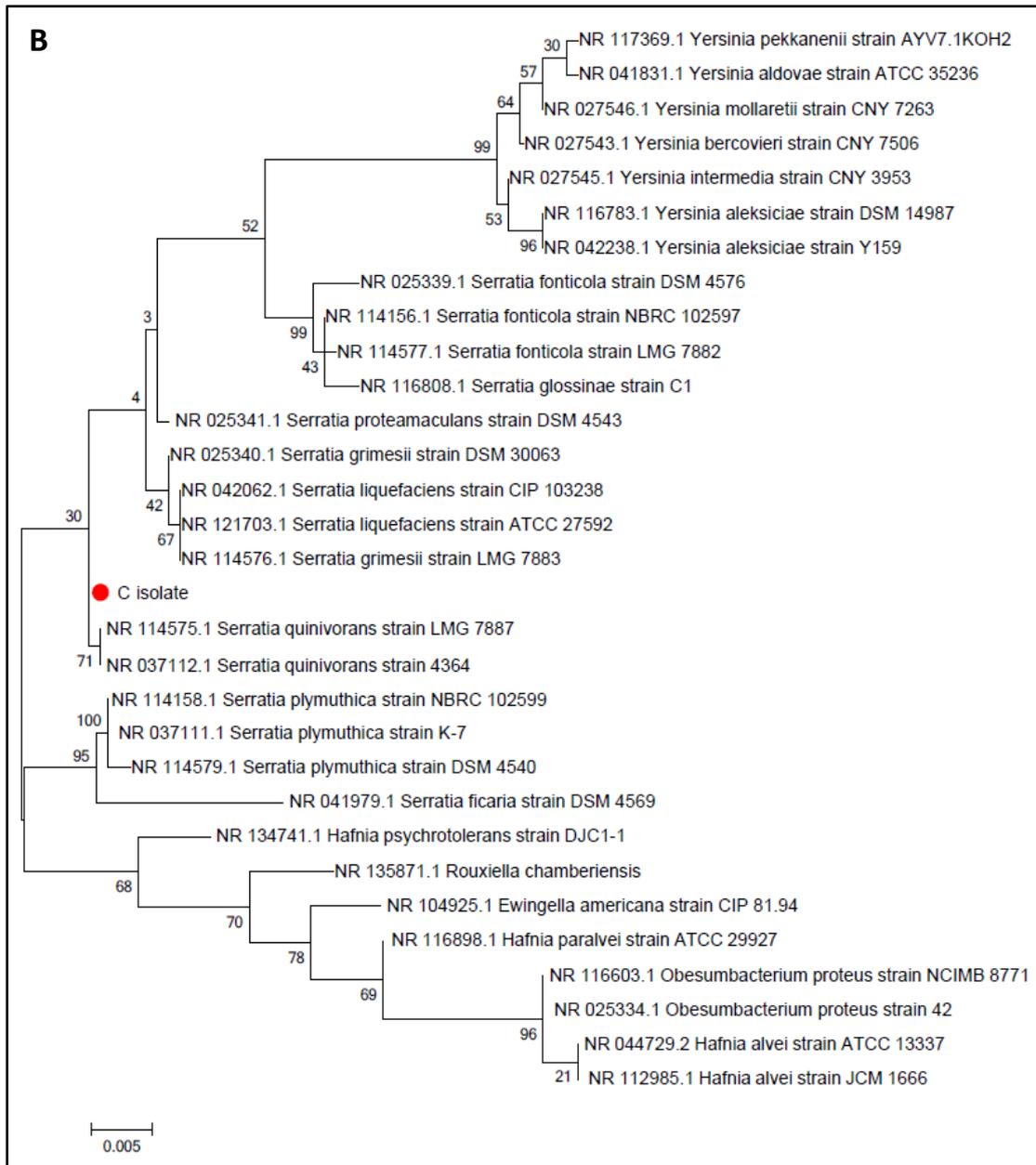
L'identification moléculaire montre que la majorité des bactéries G- sont incluses dans le genre *Pseudomonas*. Plusieurs espèces de ce genre à savoir ; *Pseudomonas fluorescens*, sont utilisées comme agents de biocontrôle des pathogènes du sol, en raison de leur capacité de coloniser les racines des plantes. Certains d'entre eux peuvent avoir un effet promoteur sur la

croissance en raison de cette propriété d'inhiber le développement de microorganismes phytopathogènes (Nagarajkumar et al., 2004).

Le genre *Serratia* appartient à la famille des Enterobacteriaceae, dans les gammaproteobacteries, la seule espèce de *Serratia* reconnue dans la 8<sup>ème</sup> édition de Bergey's Manuel était *Serratia marcescens*. En 1977, dans leur article sur la taxonomie de *Serratia*, Grimont et ses collègues ont décrit quatre espèces du genre *Serratia* : *Serratia marcescens*, *S. liquefaciens*, *S. plymuthica*, et *Serratia marinorubra* (Maintenant appelé *Serratia rubidaeae*). De nos jours, les espèces reconnues du genre *Serratia* sont *S. marcescens*, le complexe *S. liquefaciens* (*S. liquefaciens*, *S. proteamaculans*, et *S. grimesii*) et les espèces dites, espèces inhabituelles de *Serratia* : *Serratia ficaria*, *S. fonticola*, *S. odorifera*, *S. plymuthica*, *S. rubidaea*, et *S. entomophila* (De Vleeschauwer and Höfte, 2007).



**Fig. 42A :** Arbre phylogénétique des séquences d'ADNr16s des souches N, B et O) basé sur la comparaison de la séquence du gène d'ADNr 16s avec celles d'autres espèces proches



**Fig. 42B :** Arbre phylogénétique des séquences d'ADNr16s de la souche C basé sur la comparaison de la séquence du gène d'ADNr 16s avec celles d'autres espèces proches

➤ **Concentration en ADN génomique total des quatre souches**

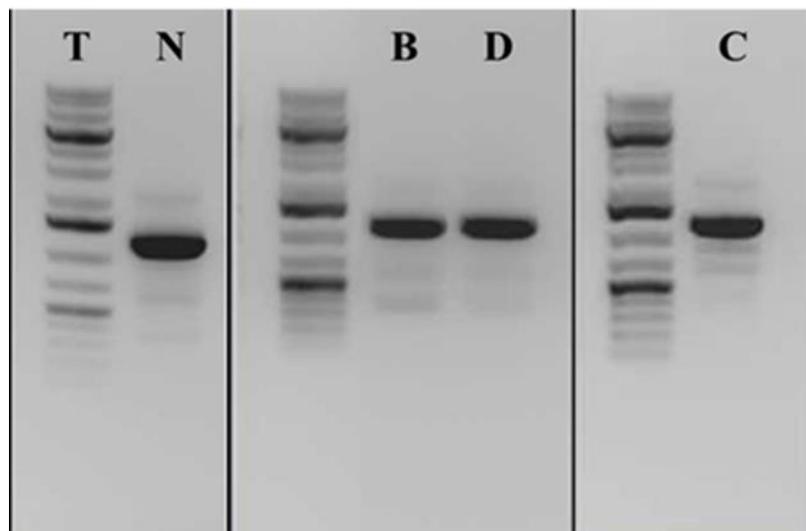
Après extraction et purification, la concentration d'ADN est déterminée avant chaque étape d'amplification par PCR. Les valeurs obtenues pour les quatre isolats sont représentées dans

le tableau ci-dessous. Le profil de séparation des fractions d'ADN génomique de chaque souche est effectué sur gel d'agarose.

**Tableau X.** Concentrations d'ADN génomique totale des isolats B, C, D et N

Isolats	concentration d'ADN (µg/ml)
B	42,9
C	79,5
D	64,7
N	41,8

Ce tableau indique les quantités d'ADN génomique extraites des quatre souches, utilisées comme matrice pour la PCR pour amplifier les gènes d'ARN 16s pour l'analyse phylogénétique.



**Fig. 43 :** Profil de l'ARN16s des quatre isolats sur gel d'agarose  
T: marqueur moléculaire (1Kba).

La visualisation des bandes d'ARN aux rayons UV après migration sur gel d'agarose (Fig.43) a révélé chez les quatre souches des bandes de taille moléculaire de 1300pb,

### **3. Identification biochimique de la souche N (*Pseudomonas sp.*) sur galerie API 50 CHB/E**

Le comportement de la souche N vis-à-vis des 50 différents substrats est mis en évidence sur galerie API 50 CHB/E. Après 48h d'incubation à 30°C, le changement de couleur dans chaque cupule est noté et les résultats obtenus sont illustrés dans le tableau suivant :

**Tableau XI.** Résultats des tests biochimiques de la souche N (*Pseudomonas* sp.) sur galerie PI 50 CHB/E.

numéro	code	nom complet	Souche N
0	0	témoin	-
1	GLY	Glycérol	+
2	ERY	Erythritol	+
3	DARA	D-arabinose	+
4	LARA	L-arabinose	+
5	RIB	D-ribose	+
6	DXYL	D-xylose	-
7	LXYL	L-xylose	+
8	ADO	D-adonitol	+
9	MDX	B-methyl-xyloside	+
10	GAL	D-galactose	+
11	GLU	D-glucose	+
12	FRU	D-fructose	+
13	MNE	D-mannose	+
14	SBE	L-sorbose	+
15	RHA	L-rhamnose	+
16	DUL	Dulcitol	+
17	INO	Inositol	+
18	MAN	D-mannitol	+
19	SOR	D-sorbitol	+
20	MDM	Méthyl- $\alpha$ D mannopyranoside	+
21	MDG	Méthyl- $\alpha$ D- glucopyranoside	+
22	NAG	N-acétyl glucosamine	+
23	AMY	Amygdaline	+
24	ARB	Arbutine	+
25	ESC	Esculine citrate de fer	+

26	SAL	Salicine	+
27	CEL	D-cellobiose	+
28	MAL	Maltose	+
29	LAC	D-lactose	+
30	MEL	D-melibiose	+
31	SAC	D -sacharose	+
32	TRE	D-tréhalose	+
33	INU	Inuline	+
34	MLZ	D-mélézitose	+
35	RAF	D-raffinose	+
36	AMD	amidon	+
37	GLYG	Glycogène	+
38	XLT	B gentiobiose	+
39	GEN	Xylitol	+
40	TUR	D-turanose	+
41	LYX	D-lyxose	+
42	TAG	D-tagatose	+
43	DFUC	D-fucose	+
44	LFUC	L-fucose	+
45	DARL	D-arabitol	+
46	LARL	L-arabitol	+
47	GNT	Gluconate	-
48	2KG	2 céto-gluconate	-
49	5KG	5 céto-gluconate	+

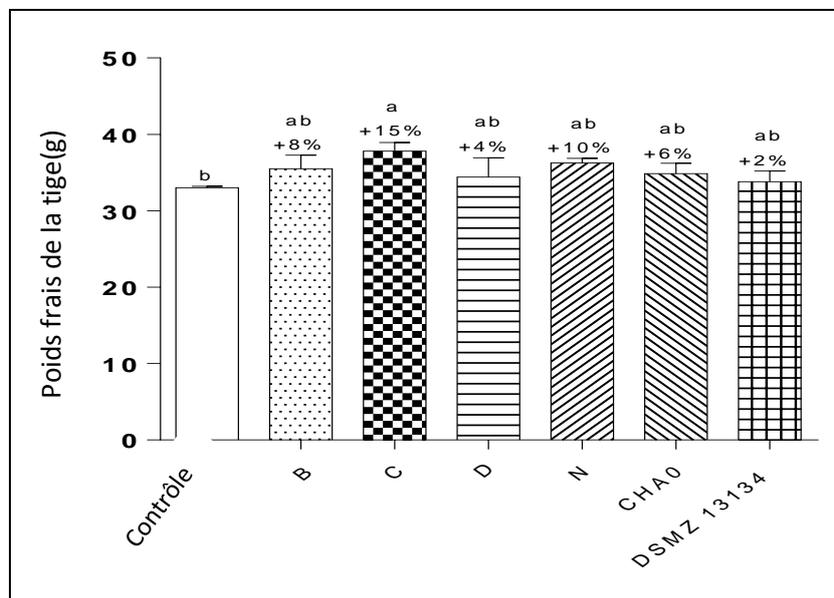
La souche analysée a pu dégrader et assimiler plusieurs substrats grâce à sa large activité enzymatique et son efficacité d'assimilation. Elle a utilisé 94% des substrats testés. La souche analysée peut utiliser des substrats de diverses origines dans divers habitats, ce qui en fait un concurrent efficace des phytopathogènes.

Les *Pseudomonas* sp. sont des bactéries ubiquistes dans les sols agricoles, ils possèdent de nombreux caractères qui les rendent bien adaptés comme agents de biocontrôle et stimulateurs de la croissance. Ces bactéries utilisent rapidement les exsudats des semences et des racines et produisent un large spectre de métabolites (antibiotiques, sidérophores, substances volatiles et les substances régulatrices de croissance), concurrencent agressivement avec d'autres microorganismes et s'adaptent facilement au stress environnemental (Weller, 2007). Sont connus pour leurs diverses enzymes produites (phosphatase, protéase...etc.) leur permettant d'utiliser différents substrats (Schmidt, 1969). *P. fluorescens* est une bactérie de forme bâtonnet, G-, mobile avec des flagelles polaires, aérobie obligatoire, il produit un pigment fluorescent, oxyde le glucose, possède une catalase et une cytochrome oxydase, saprophyte et non pathogène et colonise le sol, l'eau douce et l'eau de mer, le feuillage et les sédiments (O'sullivan et O'ggara, 1992 ; Hamamoto et al., 1994). Il a des besoins nutritionnels simples et capable de bien croître dans des sels minéraux en présence de l'une des sources de carbone largement connues (Ganeshan et Kumar, 2005).

**Partie III : Effet des isolats B, C, D et N sur la croissance de la tomate et des petits pois dans un sol contaminé par *Pythium aphanidermatum***

**1. Effet stimulateur de croissance sur plants de la tomate**

L'effet PGP exercé par les 4 souches bactériennes a été évalué sur tomate cultivée en pots sous serre, par mesure du poids frais de la partie aérienne après 20 jours d'inoculation du sol par chacun de ces isolats par rapport aux pots témoins. La souche C a augmenté considérablement le poids frais de la tomate (+15%) comparée au témoin non inoculé. une différence significative est remarquée par rapport aux autres souches inoculées y compris les souches de référence (CHA0 et DSMZ13134) (Fig. 44). Les autres souches bactériennes, B, D et N, et les deux souches commerciales (CHA0 et DSMZ13134) ont montré également un effet stimulateur sur le poids frais de la partie aérienne de la tomate avec des pourcentages allant de 2 à 10% comme valeur maximale obtenue avec la souche N (10%) comparant avec le témoin non inoculé, mais aucune différence significative n'est observée entre elles à  $p < 0.05$ .



**Fig. 44:** Effet promoteur de croissance sur plants de tomate cultivés en pots. *Pseudomonas protegens* CHA0 et *Pseudomonas* sp. DSMZ13134 sont incluses comme souches de référence. Les barres avec les différentes lettres sont significativement différentes selon le test LSD ( $p < 0.05$ ).

Sur la figure 45, sont montrés quelques résultats du test de la croissance sur plants de tomate en pots sous serre.



**Fig. 45 :** Effet PGP des souches bactériennes sur plants de tomate en pots sous serre

Selon les résultats *in vitro* et sous serre obtenus par Ghodsalavi et *al.* (2013), les PGPR producteurs de l'AIA et des sidérophores peuvent améliorer la croissance des plantes. Les résultats obtenus dans la première partie avec les différentes activités enzymatiques, la solubilisation du phosphate, la synthèse de sidérophores chélatrices du fer et la production de quantités intéressantes de la phytohormone AIA et d'ammoniac permettent de qualifier les 4 souches de bonnes productrices de molécules impliquées dans la stimulation de la croissance, ce qui peut être un appui pour les résultats trouvés *in vivo*. Les PGPB affectent positivement la croissance des plantes en produisant des métabolites comme les régulateurs de croissance qui affectent directement leur développement en facilitant l'apport des nutriments (Ruchi et *al.*, 2002). Parmi ces métabolites, la phytohormone AIA est très répandue chez les bactéries associatives des plantes (Patten et Glick, 2002).

Un grand nombre de bactéries, y compris les espèces de *Pseudomonas*, *Azospirillum*, *Azotobacter*, *Klebsiella*, *Enterobacter*, *Alcaligenes*, *Arthrobacter*, *Burkholderia*, *Bacillus*, et *Serratia* ont été citées pour leur effet stimulateur de croissance (Bharucha et *al.*, 2013).

*Pseudomonas* sp. a été décrit comme PGPB grâce à sa capacité d'améliorer la croissance des plantes et d'assurer la protection des cultures contre les phytopathogènes (Rai et *al.*, 2016). Les *Pseudomonas* fluorescents ont un potentiel de synthétiser différents métabolites secondaires avec diverses activités PGP qui augmentent la fertilité du sol et stimulent leur croissance (Ruchi et *al.*, 2002). Les enzymes telles que les chitinases, protéases, amylases, et

uréases sont connues pour leur important rôle dans la dégradation de la matière organique et la fertilisation des sols (Nabti et *al.*, 2014).

Selon Zhang et *al.* (2017), certaines bactéries solubilisant le phosphate, en plus de leur production de sidérophores et d'AIA, se sont révélées comme de bonnes stimulatrices du poids sec des tiges et des racines de la tomate. Ces résultats corroborent avec les notre, car parmi les 4 souches, *Serratia* sp. (C) est la seule solubilisant le phosphate sur boîte. Les traits PGP incluant l'AIA, l'ammoniac, les sidérophores, et le cyanure d'hydrogène (HCN), ont été évalués sur deux souches solubilisant le phosphore et leur effet sur la croissance des plants de tomate sous serre. Les deux souches ont remarquablement amélioré la taille des plantes, la longueur des racines, le poids sec des racines et des tiges (Walpolaeet Yoon, 2013).

Les bactéries synthétisent les auxines afin de perturber les processus physiologiques de l'hôte pour leur propre bénéfice. L'inoculation avec des bactéries productrices d'AIA augmente la vitesse de germination, aide la production de longues tiges, de longues racines, avec des poussées latérales très développées possédant un nombre accru de poils, et une teneur élevée en chlorophylle, ce qui va se répercuter sur la croissance végétale, cette même étude suggère que les bactéries produisant l'AIA, sont aussi des biofertilisants efficaces favorisant la croissance des plantes (Mohite, 2013). L'effet de la production d'AIA sur la croissance des plantes en pot a été également étudié par Reetha et *al.* (2014) sur semence d'oignon. Les résultats ont montré une augmentation de la longueur racinaire, et des tiges, du poids frais et sec des racines et des tiges par rapport au contrôle. La stimulation de la croissance grâce à la production d'AIA a été aussi démontrée par Bharucha et *al.* (2013). L'isolat produisant la quantité maximale est un isolat de *Pseudomonas putida* UBI.

Des bactéries isolées d'un sol rhizosphérique à Bejaia- Algérie ont montré de multiples traits PGP (diverses enzymes lytiques, AIA, sidérophores), et une fois testées sur semences de tomate dans des pots sous serre, 4 souches ont stimulé efficacement la longueur de la tige des plants avec des valeurs en cm de 9.212, 9.280, 9.362 et 9.858 respectivement contre 6.40 seulement pour le contrôle non inoculé (Tabli et *al.*, 2004). Batoool et Hasnain (2005) ont démontré l'efficacité d'une souche de *Serratia* à améliorer la longueur des tiges, des racines des plantules.

La capacité de *Serratia* sp. à stimuler la croissance des plantes pourrait être expliquée par sa production de l'AIA, la biosynthèse des sidérophores et sa capacité de solubiliser le phosphate, comme cela a été décrit pour la plupart des bactéries ayant un potentiel de croissance sur les plantes (Glick, 2012 ; Ngoma et *al.*, 2012 ; Tozlu et *al.*, 2012 ; Nabti et *al.*, 2014).

L'isolat N (*Pseudomonas* sp.) a montré les meilleurs résultats par rapport aux autres souches testées pour les deux paramètres : germination des semences de petits pois et poids frais de la partie aérienne des plants cultivés dans un sol contaminé préalablement par le champignon *Pythium aphanidermatum*. Cette bactérie a ainsi fait l'objet de la dernière partie de ce travail à savoir la localisation, l'extraction et la purification partielle de la ou les molécules responsables de cette activité antifongique.

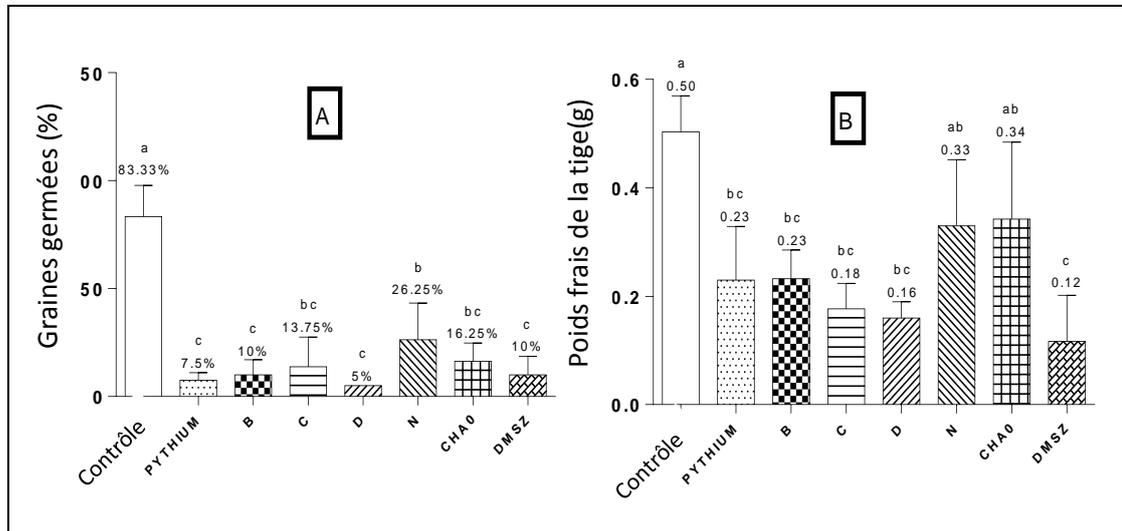
### **2. Contrôle de Damping-off (fonte des semis) causé par *Pythium aphanidermatum* sur petit-pois**

Le genre *Pythium* est un oomycète pathogène des plantes, très répandu, causant des pourritures au niveau des semences en près ou poste émergence, appelée fonte des semis, plus la pourriture des racines dans plusieurs espèces de plantes (Windstan et Nelson, 2008 ; Kagreyama et Nelson, 2002).

Les souches bactériennes B, C, D et N sont évaluées pour le contrôle de la fonte des semis causée par *Pythium aphanidermatum* sur petits pois en déterminant l'émergence des plantes, 16 jours après le semis des graines dans un sol inoculé avec l'oomycète cité précédemment. L'infection par *Pythium* a réduit considérablement l'émergence de petits pois qui est de 83.3% dans le témoin non inoculé et seulement 7.5% dans le sol inoculé avec le pathogène (Fig. 46A). Toutes les souches bactériennes, à l'exception de la souche D, réduisent les symptômes de la maladie comparée au contrôle, mais cette réduction n'est significative que pour la souche N. Dans le sol inoculé avec cette dernière, l'émergence des plantes été de 26.3% (une augmentation de 7 fois par rapport au contrôle inoculé par l'agent pathogène). L'efficacité de la souche N a dépassé celle des souches de référence DSMZ 13134 et CHA0, qui ont un effet stimulateur sur la germination des graines de 2 et 4.3fois, respectivement. Les souches B et C ont montré une augmentation non significative d'émergence (2.7 et 3.7 fois, respectivement).

Dans le sol inoculé avec le pathogène, les plantes qui sont apparus au-dessus du sol ont également montré une réduction de 54% du poids frais (0.23g/plante) comparées au contrôle non inoculé (0.50g/plante - figure 46B). L'augmentation du poids de la plante a été observée lors de l'inoculation du sol avec les bactéries, ça concerne les souches N et CHA0, où le poids frais des parties aériennes a augmenté de 43% et 48%, respectivement, bien qu'une telle augmentation n'ait pas été statistiquement significative par rapport au témoin inoculé par le *Pythium* seul. Une variation nulle ou négative dans le poids a été observée dans les pots

inoculés avec les autres souches (B, C et D). Tous ces résultats obtenus sont résumés dans la figure 47 qui montre un exemple de résultat de test de germination de petits pois obtenu avec la souche N, dans un sol infecté par le champignon seul (Fig. 47a) et un autre en présence de *Pythium aphanidermatum* et inoculé avec la même souche bactérienne (Fig. 47b).



**Fig. 46 :** Contrôle de Damping-off causé par *Pythium aphanidermatum* sur petit pois : émergence de plante (A) et poids frais (B). *Pseudomonas protegens* CHA0 et *Pseudomonas* sp. DMSZ 13134 sont inoculés comme souches de référence.



**Fig. 47 :** Germination des graines de petit pois dans un sol infecté avec *Pythium aphanidermatum* et inoculé avec la souche N. A gauche, le témoin négatif (présence de *Pythium aphanidermatum* seul). A droite, sol infecté avec le champignon et inoculé avec la souche N.

Les oomycètes agents pathogènes du sol, comme le genre *Pythium*, causent la fonte des semis et la pourriture des racines, endommageant ainsi les jeunes plants de plusieurs cultures horticoles et maraichères sous serre et en plein champs (Khabbaz, 2014 ; Zalte et al., 2016).

En outre, *P. aphanidermatum* est l'espèce la plus répandue et la plus agressive du genre *Pythium*, étant impliquée dans des pertes sévères des cultures les plus importantes sur le plan économique (céréales, légumes, légumineuses) (Levenfors, 2003 ; Agrios, 2005 ; Nwaga et al., 2007 ; Dimova et al., 2010 ; Parveen et Sharma, 2015). Il infecte les graines, les semis, les tiges des plantes, les fruits et les racines, induisant la fonte des semis avant ou après émergence, la chute des feuilles et la mort des plantes (Rankin et Paulitz, 1994 ; Uzuhashi et al., 2010 ; Múera et Hausbeck, 2016).

Dans cette étude, la germination des graines de petits pois en présence de *Pythium aphanidermatum* a augmenté de +13.75% dans un sol inoculé avec la souche N par rapport au témoin non traité. Le poids frais de la partie aérienne des plants est amélioré avec +43%. Cette dualité fonctionnelle (stimulation de la croissance et le biocontrôle) attribuée à l'espèce *Pseudomonas* pourraient s'expliquer par sa capacité de : produire la phytohormone AIA, synthétiser des sidérophores, solubiliser le phosphate tricalcique. La synthèse d'antibiotique Pyrrolnitrine et la production d'enzymes chitinolytiques et protéolytiques, sont suggérées comme facteurs clé dans l'élimination des pathogènes (Kamensky et al., 2003). Brurberg et al. (1996) ont rapporté que les bactéries appartenant au genre *Serratia* sont connues pour leur haute efficacité dans la dégradation de la chitine. Elles produisent jusqu'à cinq enzymes chitinolytiques différentes lors de l'induction avec ce substrat. Les enzymes dégradant la chitine inhibent la croissance fongique en hydrolysant leurs parois cellulaires contenant cette molécule (Kamil et al., 2007 ; Velusamy et Kim, 2011). Il a été démontré qu'un mutant déficient en chitinase (Chi A) de *Serratia marcescens* a réduit l'inhibition de l'allongement de tube germinatif fongique et le biocontrôle de la fusariose (flétrissement causé par *Fusarium*) sur plants de petits pois dans une expérience réalisée sous serre (Lo, 1998).

Plusieurs expériences sont réalisées dans le but de lutter contre les phytopathogènes fongiques, entre autre *Pythium* sp. Un exemple d'expérience est celle effectuée par Abdel-Kader et al. (2012), où plusieurs microorganismes antagonistes (levures, bactéries, champignons) appliqués directement sur la semence ou par trempage du sol sont testés contre plusieurs phytopathogènes causant la pourriture racinaire des légumes sous serre y compris *Pythium* sp. Les résultats montrent une réduction significative des symptômes de la maladie dans les lots traités par les agents biologiques par rapport aux lots témoins.

En outre, Parveen et Sharma (2015) ont révélé que les espèces de *Pythium* ne sont pas spécifiques à l'hôte. Leurs zoospores résistantes sont capables d'infecter les racines en croissance, leur pouvoir de germination est très élevé grâce à leur capacité d'utiliser les

exsudats ou de leur exposition aux substances volatiles des graines ou des racines. L'agent phytopathogène *Pythium* produit plusieurs zoospores qui leur permet de réinfecter rapidement et continuellement les racines en croissance, ainsi, les cultures traitées chimiquement peuvent être exposées à des vagues d'infections répétées tout au long de la saison de culture (Nzungize et al., 2011).

D'après Vanitha et Ramjegathesh (2014), l'application des agents de biocontrôle contre *Pythium aphanidermatum* peut indirectement stimuler la croissance des plantes pour une longue période en persistant dans le sol, ce qui leur donne plusieurs avantages par rapport aux produits chimiques. Kagreyama et Nelson (2002) ont également montré que certaines espèces de *Pseudomonas* éliminent les maladies provoquées par *Pythium* à travers la biosynthèse d'antibiotiques et la colonisation de l'espace racinaire (Zalte et al., 2016).

L'étude réalisée par Kraus et Loper (1992) a révélé que la souche *Pseudomonas(pf-5)* a significativement augmenté l'émergence des plants de concombre (+60%) dans un sol contenant une souche de *Pythium* sp. Ceci est dû à la capacité de cette bactérie de rentrer en compétition pour les nutriments nécessaires pour la germination des spores, et à leur sécrétion de métabolites antifongiques dans le sol. Il a été démontré que les agents de lutte biologique protègent les semences contre cet agent pathogène, en empêchant l'initiation de la germination des spores fongiques (Windstam et Nelson, 2008). Les mêmes auteurs ont rapporté qu'un *Pseudomonas* déficient de sidérophores a perdu sa capacité à inhiber le champignon du genre *Pythium*. Par ailleurs, plusieurs espèces du genre *Serratia* se sont révélées comme bactéries chitinolytiques. Ces dernières présentant un tel caractère sont considérées comme agents efficaces de biocontrôle contre diverses maladies, y compris celles causées par les espèces de *Pythium* (Velusamy et Kim, 2011).

L'application des bactéries du sol capables de concurrencer les oospores dans leur germination pour les sources solubles d'azote et du carbone peut réduire leur germination et le niveau de la maladie. Une telle inhibition de la croissance des agents pathogènes pourrait également être attribuée à l'antibiose, au parasitisme, à la production de chitinases, entraînant la dégradation de la paroi cellulaire fongique suite à la lyse du mycélium (El-Mohamedy et El-Mougy, 2009).

Dans notre étude, en présence de *Pythium* seul (témoin), le nombre de graines germées est très faible. Selon Khabbaz et Abbasi (2014), la fonte des semis, est caractérisée par des graines moisies ou pourris sous-sol avant leur émergence immédiatement après infection lorsque l'humidité pénètre dans le tégument ou lorsque le radical commence à s'étendre, ce qui entraîne des semis pauvres et inégaux. La forte activité antagoniste de l'isolat N

(*Pseudomonas* sp.) à l'égard de la souche de *Pythium aphanidermatum* pourrait être attribuée à sa production de sidérophores, de protéases, de chitinases et d'AIA (Nzungize et al., 2012 ; Khabbaz et Abbasi, 2014). Des résultats similaires sont obtenus avec des souches de *Pseudomonas* lorsqu'elles sont appliquées comme agents de lutte biologique contre la fonte des semis des petits pois causée par *Pythium*, et la pourriture des racines par *Aphanomyces* (Abdel Kader et al., 2012).

Dans une expérience réalisée en pot, la souche de *Pseudomonas* sp. OG a amélioré la croissance du pois-chiche et des haricots en augmentant la taille des parties aériennes de la plante, des racines et la biomasse végétale (Przemieniecki et al., 2015).

Des tests sur les *Pseudomonas* fluorescents ont abouti à des corrélations positives entre la production d'HCN *in vitro* et la protection de concombre contre *Pythium ultimum*, et la tomate contre *Fusarium oxysporum*. L'inhibition directe de champignon par l'HCN était le mécanisme d'action utilisé par les bactéries (Ramette et al., 2003).

Dans leur travail, Kagreyma et Nelson (2002) ont expliqué la relation existante entre les exsudats des graines et l'activation de la capacité inhibitrice d'un agent de biocontrôle à l'égard de *Pythium*, d'après eux ; contrairement à d'autres semences, la semence des petits pois possède un taux d'exsudation élevé. Les exsudats des semences des plantes comme la carotte, le maïs, la laitue, les petits pois, le radis et l'orge sont généralement plus stimulateurs de *Pythium ultimum* que les exsudats du coton, concombre, tournesol, et de tomate. La nature des exsudats est aussi un facteur stimulateur ou inhibiteur de l'infection. Un exemple d'*Enterobacter cloacaea* qui apparaît actif uniquement sur les plantes contenant dans leurs exsudats de faible niveau de carbohydrates (Kagreyma et Nelson, 2002). Une expérience similaire a été réalisée par Zalte et al. (2016) sur tomate, en étudiant l'effet de *Pseudomonas fluorescens in vitro* et sous serre à l'égard de *Pythium aphanidermatum* et évaluant leur effet sur l'émergence des plantules, la longueur des tiges et la longueur des racines.

Nelson et al. (2004) ont rapporté que des cultures de la même espèce peuvent réagir différemment avec les agents de biocontrôle. Cette explication peut nous laisser comprendre les résultats différents obtenus sur la germination et le poids frais sous serre dans le sol infecté avec *Pythium aphanidermatum*. Des résultats similaires sont obtenus par King et Parke (1993) sur les mêmes cultivars de légumineuses. La composition des exsudats de semences est la clé pour ce phénomène. Les plantes comme le maïs et les petits pois ont un taux d'exsudation élevé. Le plus important par contre, est l'effet stimulateur des exsudats sur la germination des spores de *P. ultimum*. Les mêmes auteurs ont révélé que les exsudats des semences de petits pois sont plus stimulateurs de *Pythium* que les exsudats d'autres plantes.

Quant à notre étude, les différences obtenues entre les quatre souches pour les deux paramètres : germination et poids frais peuvent être expliquées par l'effet bactérien (Nelson et al., 2004). Puisque le glucose, qui est un sucre dominant dans les exsudats des petits pois est connu pour réprimer la  $\beta$ - oxydation du métabolisme des lipides chez *Escherichia coli* (Nelson et al., 2004), on peut déduire que les sucres retrouvés dans les exsudats de notre variété de petit pois peuvent aussi réprimer cette même enzyme ou d'autres retrouvées chez les quatre souches testées et réduisent ainsi l'efficacité du biocontrôle. Une souche de *Streptomyces* testée à l'égard de *Pythium* s'est avérée capable de détruire les oospores et les parois cellulaires des hyphes fongiques (Levenfors, 2003).

La meilleure activité stimulatrice de l'isolat N (*Pseudomonas* sp.) sur la germination et le poids frais de la partie aérienne des petits pois par rapport aux autres souches dans le sol infecté par *Pythium*, pourrait être expliquée par l'inhibition de la croissance mycélienne fongique et la production d'HCN et de sidérophores (Ramjegathesh, 2014). Il a été rapporté par Howell et al. (2003) que l'inhibition de la croissance de *Pythium* sur petits pois est due à la production d'un facteur toxique par les agents du biocontrôle.

L'efficacité de *Pseudomonas fluorescens* à l'égard des champignons phytopathogènes *in vivo* pourrait être expliquée par leur activité antagoniste et leur compétitivité. Cette souche réduit la croissance mycélienne et réduit d'une manière significative la germination des conidies et l'élongation de tube germinatif. Il s'agit d'une synthèse d'antibiotiques (Phénazine, Pyrolnitrine et 2, 1 –Diacétylphloroglucinol), HCN, d'enzymes lytiques capables d'altérer les parois cellulaires fongiques et autres métabolites secondaires, en plus de sa capacité d'induire la résistance systémique chez les plantes, ce qui va assurer une protection contre une large gamme de champignons cibles (Toua et al., 2013).

cinq souches de *Pseudomonas* produisent des quantités appréciables de chitinases et cellulases, et ont exhibé une inhibition de la croissance de *Pythium aphanidermatum*. L'inhibition de la croissance fongique n'est pas corrélée avec la dégradation des parois cellulaires, ce qui suggère que d'autres composés antifongiques sont aussi impliqués (Sindhu et Dadarwal, 2001). Plusieurs espèces de *Pseudomonas* productrices de chitinases et de cellulases ont inhibé la croissance de plusieurs espèces fongiques, mais l'inhibition de *Pythium aphanidermatum* n'est pas toujours corrélée avec la production de chitinases (Sindhue et Dadarwal, 2001). Une souche de *Pseudomonas fluorescens* produit un antibiotique pyoluteorine actif à l'égard de *Pythium* protégeant ainsi les plantes de la fonte des semis (O'sullivan et O'gara, 1992). quatre souches de *Pseudomonas* entre autre *CHA0* sont testées sur petit pois pour leur effet antagoniste à l'égard de *Pythium ultimum*, l'inoculation

par *Pythium* a réduit les poids des racines et des tiges, la longueur des racines. L'effet de ce dernier a été réduit par les souches de *Pseudomonas* avec des pourcentages de croissance variables (Naseby et *al.*, 2001).

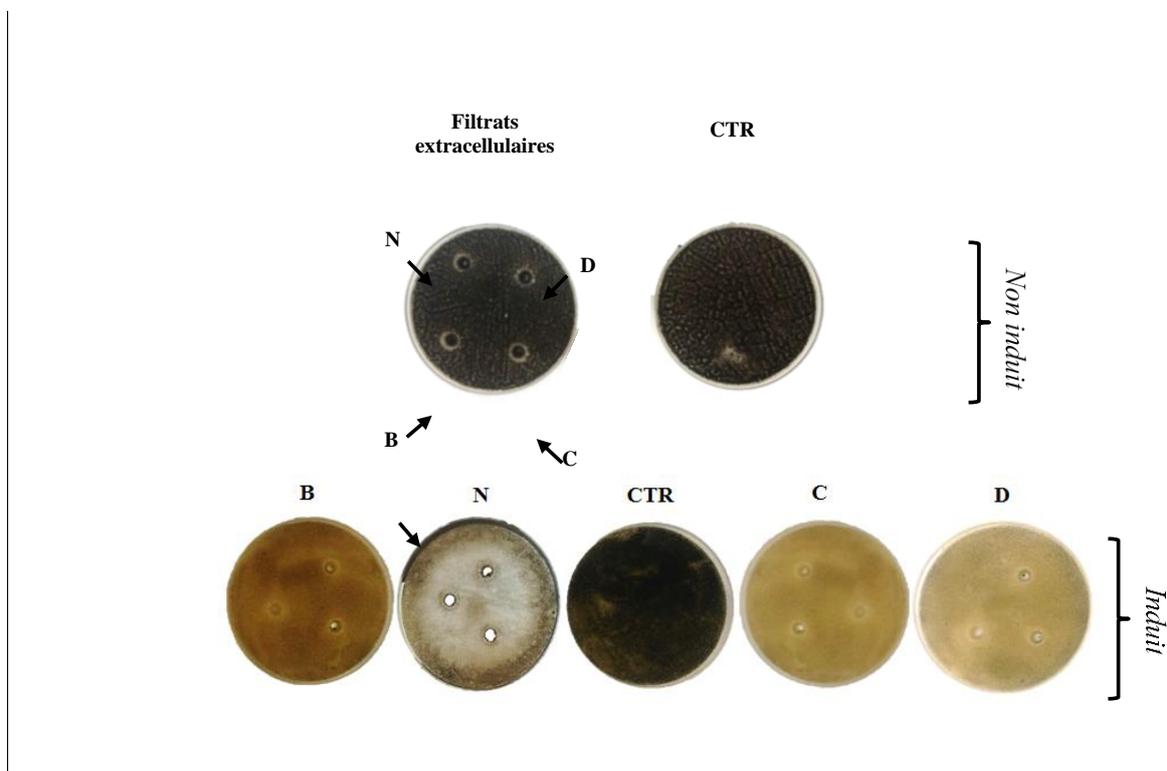
Selon Sangeetha et *al.* (2009), un mélange d'antagonistes produit souvent un effet inhibiteur plus important que la souche antagoniste appliquée seule, à condition que ce mélange choisi soit compatible.

**Partie IV : Extraction et purification partielle des protéines membranaires responsables de l'activité antifongique**

**1. Localisation des composés antifongiques et les tests d'induction**

Le surnagent de culture des quatre isolats (B, C, D, N) déposé en spot à la surface de milieu TSAensemencé préalablement en stries serrées avec la suspension sporale d'*A. niger* n'a montré aucun effet antifongique (croissance mycélienne observée après incubation à 25°C), (Fig.48, panneau supérieur), pareil pour les fractions des protéines de surface et des protéines intracellulaires préparées et testées. L'exposition des cultures bactériennes au champignon pour une éventuelle induction de la production de molécules antifongiques a donné des résultats impressionnants : les préparations extracellulaires et à membranes de surface ont montré des activités antifongiques significatives lorsqu'elles étaient testées sur le champignon, ce qui suggère le caractère inductible de leur activité antifongique (Fig. 48, panneau inférieur).

En outre, la fraction extracellulaire obtenue à partir de la souche N était la plus active (Fig. 48, panneau inférieur), montrant la zone d'inhibition antifongique typique.



**Fig. 48 :** Activité antifongique à l'égard d'*A. niger* des filtrats extracellulaires obtenus des cultures bactériennes des souches; B, N, C et D. **CTR,** *A. niger* contrôle.

Le caractère inductible de l'activité antifongique a été cité dans quelques travaux, entre autre, celui d'Essghaier et al. (2012), rapportant la capacité d'une souche de *Bacillus J9* à inhiber l'agent responsable de la pourriture grise causée par *B. cinerea* suite à la production de quelques enzymes à effet antifongiques à savoir : la chitinase et la protéase uniquement en présence du pathogène. Dans un autre travail, la production de la chitinase est induite par la présence de spores autoclavées de *B. cinerea* (Essghaier et al., 2009).

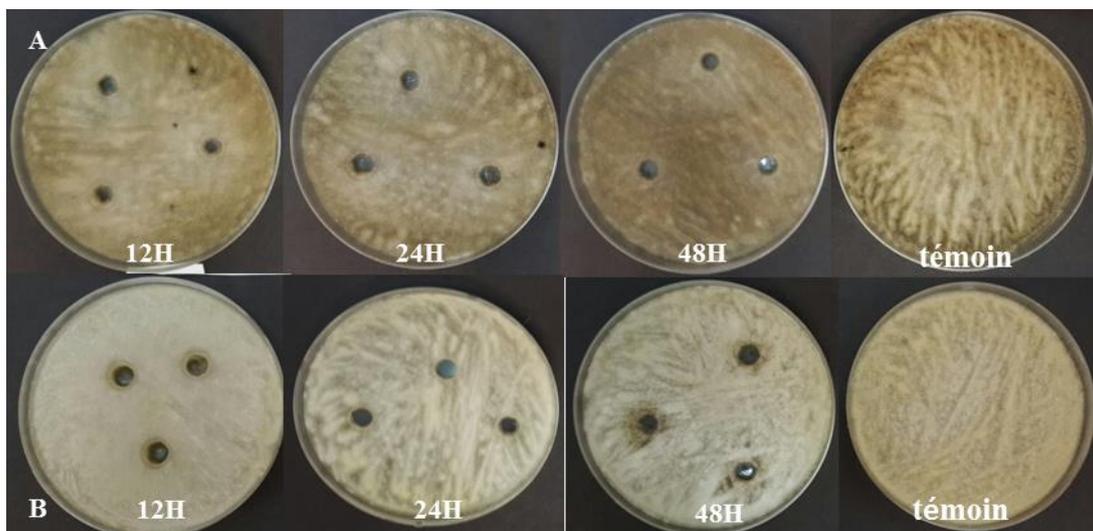
## 2. Localisation, extraction, et essais de purification des molécules responsables de l'activité antifongique de *Pseudomonas* sp.

Les résultats de la deuxième partie de cette étude ont apporté des données supplémentaires concernant l'activité antifongique *in vitro*, l'apparition de zones d'inhibition suite à la production de molécules antifongiques n'est possible que si la souche N est en contact direct avec le champignon cible.

### 2.1. Essais préliminaires de localisation de molécules antifongiques

#### 2.1.1. L'activité du contenu intra et extracellulaire sur milieu TSA à pH 7

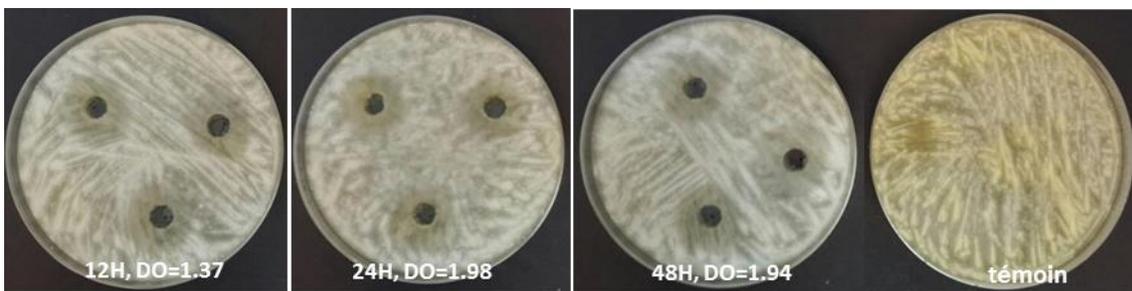
Le test est réalisé avec des fractions extraites des cultures bactériennes de *Pseudomonas* sp. âgées de 12, 24 et 48h d'incubation à l'égard d'*Aspergillus niger*. Les résultats ne montrent aucune zone d'inhibition aux alentours des puits inoculés avec le contenu intra ou extracellulaire (aucune différence par rapport au contrôle), ce qui signifie que ces fractions n'ont aucun effet sur la croissance mycélienne fongique (Fig.49).



**Fig. 49:** Résultats du test d'activité antifongique des deux fractions : intracellulaire (A), et extracellulaire (B), de la souche N, à l'égard d'*A. niger*, après 12, 24 et 48h d'incubation.

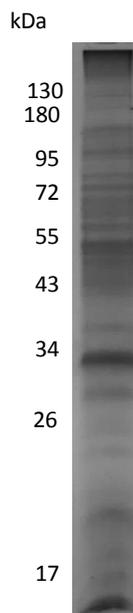
**2.1.2. Essais d'activité des fractions protéiques membranaires sur milieu TSA à pH 7**

Les fractions sont extraites à partir des cultures de la souche N (*Pseudomonas* sp.) âgées de 12, 24 et 48h d'incubation et testées par inoculation de 200µl (1mg/ml) dans chaque puits (trois répétitions par boîte), en présence de boîtes témoins (*A. niger* seul). Les résultats obtenus cette fois-ci montrent de claires zones d'inhibition aux alentours des puits, ce qui prouve que les molécules responsables de l'activité antifongique sont de nature protéique localisées au niveau de la membrane cellulaire (Fig. 50). Vu les valeurs des densités optiques qui diminuent après 24h d'incubation, les tests d'antagonisme ultérieurs seront appliqués sur la souche de *Pseudomonas* sp. âgée de 24h qui est considérée en phase stationnaire.



**Fig. 50 :** Activités antagonistes des fractions membranaires totales de la souche N à l'égard d'*A. niger*. Les fractions sont obtenues à partir des cultures âgées de 12, 24 et 48h d'incubation respectivement. La boîte à droite est le contrôle.

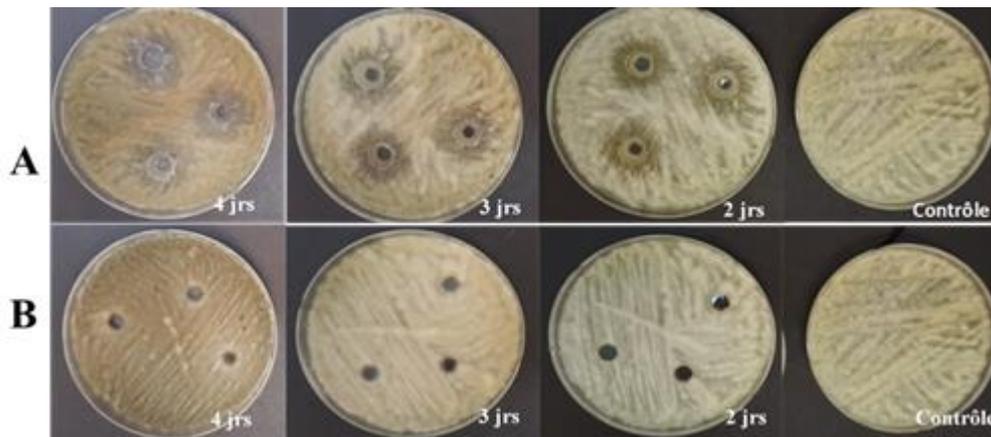
Les protéines membranaires totales (PM-TOT) obtenues à partir d'une culture âgée de 24h ont subi une électrophorèse SDS-Page. Le profil protéique est illustré dans la figure qui suit. L'aspect des bandes sur le gel montre que les fractions protéiques membranaires de la souche analysée contiennent une multitude de protéines avec différent poids moléculaire.



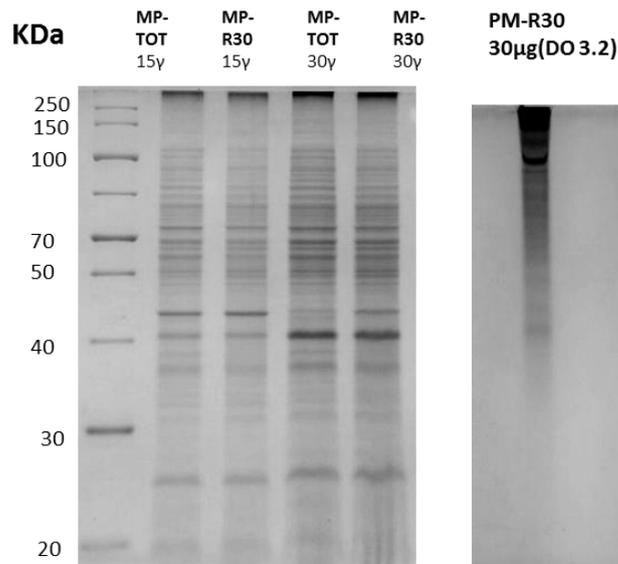
**Fig. 51 :** SDS-page sur gel de polyacrylamide révélant le profil protéique des protéines membranaires totales d'une culture de 24h de *Pseudomonas* sp.

2.1.3. Ultra filtration des protéines membranaires totales

Après un test d'induction en présence du champignon cible, les protéines membranaires totales (2mg) issues d'une culture de 24h de *Pseudomonas* sp. (DO=1.3) ont subi une ultrafiltration (4000rpm/4°C) dans des centricons (cut-off des filtres =30KDa), le filtrat (MP-F30) et le retentât (MP-R30) sont testés comme précédemment. La figure 52 montre les résultats obtenus après 2, 3 et 4 jours d'incubation. Les PM-R30, DO 3.2 ont subi Une SDS-page (12%) et une autre page native (10%) (Fig.53).



**Fig. 52 :** Résultats de l'activité antagoniste des protéines membranaires à l'égard d'*A. niger*. **A :** protéines membranaires filtrées (MP-F30) ; **B :** protéines membranaires retenues (MP-R30) après 2, 3 et 4 jours d'incubation.

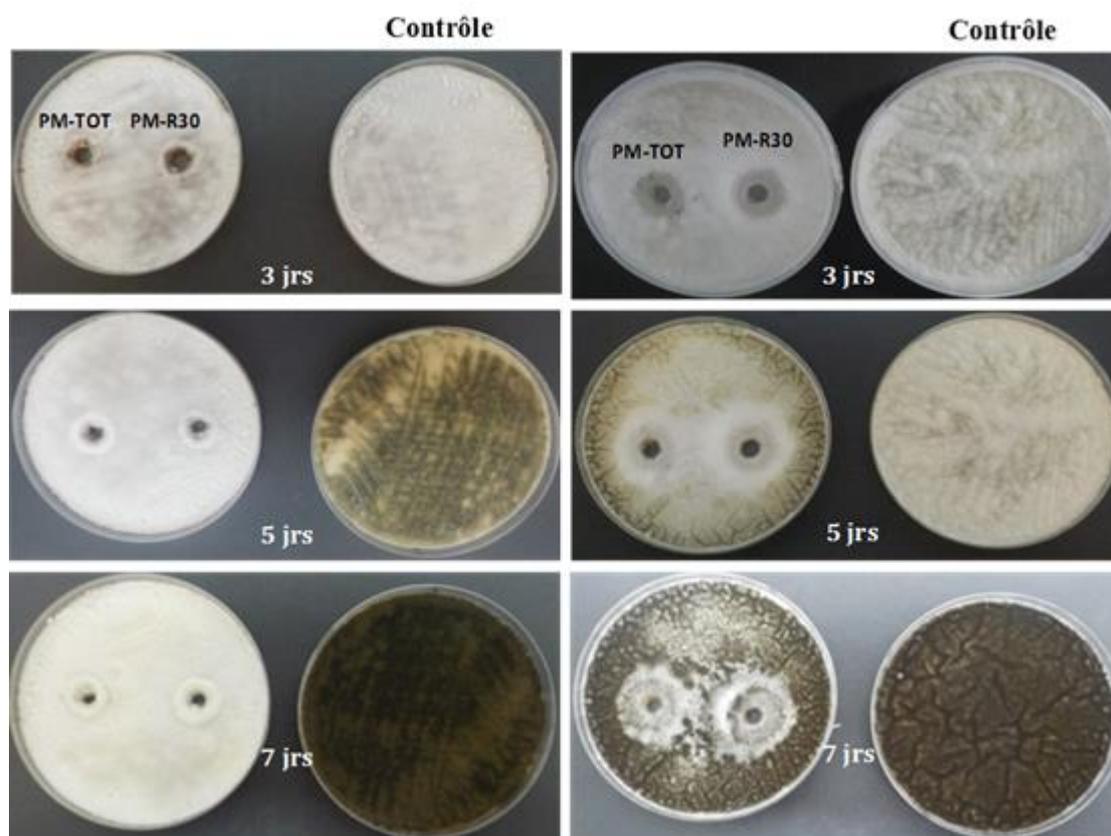


**Fig. 53 :** Une native-page (10%) des PM-R30 (à droite), et une SDS-page (12%) à gauche des PM-TOT et PM-R30.

Les résultats de cette étape de purification permettent de conclure que les protéines membranaires responsables de l'activité antifongique ont un poids moléculaire dépassant les 30KDa.

## **2.2. Effet de milieu de culture sur l'activité antifongique des PM-TOT et des PM-R30 à l'égard d'*A. niger***

Les PM-TOT (1.156µg/µl) et les PM-R30 (2.210µg/µl) sont testés comme précédemment à l'égard d'*A. niger*, mais sur deux milieux à savoir ; gélose d'extrait de malt et gélose TSA dans le but de choisir le meilleur pour cette activité.



**Fig. 54 :** Activité antifongique des PM-TOT et PM-R30 à l'égard d'*A. niger*.

à droite sur milieu TSA pH 7, à gauche sur milieu gélosé d'extrait de malt pH 5,6. La lecture est faite après 3, 5 et 7 jours d'incubation.

Les résultats obtenus montrent de claires zones d'inhibition sur milieu TSA, et ce résultat persiste durant toute la période d'incubation, ce qui signifie une inhibition de la croissance mycélienne par les fractions protéiques testées par rapport au témoin. Sur gélose d'extrait de malt, les fractions protéiques ont inhibé la sporulation du champignon par rapport au contrôle, par contre la croissance mycélienne n'a pas été influencée. Cette différence dans les résultats

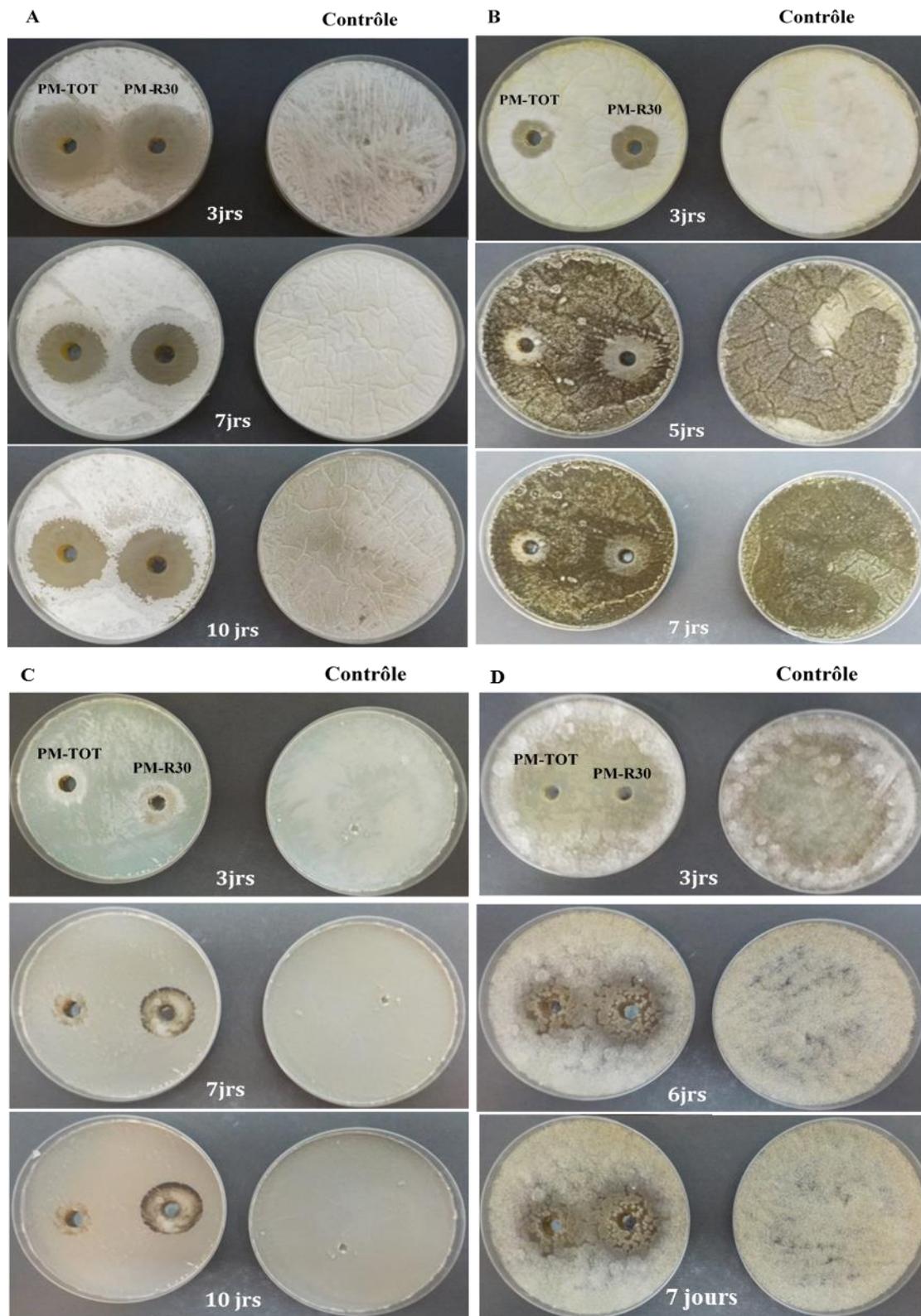
du test d'antagonisme constatée dans les deux milieux peut être expliquée par la différence de leur pH et l'acidité du milieu de la gélose d'extrait de malt qui peut inhiber l'activité protéique.

Suite à ces résultats, le milieu de culture qui sera utilisé dans les tests d'antagonismes ultérieurs est le milieu gélosé TSA.

*Pseudomonas fluorescens* possède de multiples mécanismes d'antagonisme et une stable production d'agents antifongiques dans des conditions variables de croissance (Anand et Kulothungan, 2010). Selon les résultats de Mafia et al. (2009), l'effet inhibiteur de la croissance mycélienne d'un agent de biocontrôle diffère selon le type de PGPR et le milieu de culture. Il a été précédemment démontré que l'action antagoniste des souches de *Pseudomonas fluorescens* semble ne pas être spécifique de l'agent pathogène mais plutôt dépend du milieu de culture (Toua et al., 2013). Cette constatation peut être appliquée aussi sur les métabolites produits par ces agents de biocontrôle. Un travail réalisé par Bar-Shimon et al. (2004) a montré que la production d'une exo-  $\beta$  (1,3) glucanase, chitinases et protéases est stimulée par la présence des fragments de cellules pariétales fongiques ou la présence de glucose dans le milieu de culture.

### 2.3. Effet des PM-TOT et PM-R30 sur la croissance d'autres champignons-cibles

Des diamètres de zones d'inhibition variables sont obtenus à l'égard des quatre champignons (une autre espèce d'*A. niger*, *Alternaria* sp., *Penicillium* sp. et *B. cinerea*), ceci révèle que l'effet antifongique et le phénomène d'induction ne sont pas spécifiques. Cette différence peut être expliquée par la variabilité génétique entre les souches fongiques. Les résultats sont enregistrés quotidiennement, et les figures ci-dessous représentent les résultats obtenus après 3 à 10 jours d'incubation dans les mêmes conditions.



**Fig. 55 :** Activité antifongique des PM-TOT et PM-R30 à l'égard de quelques champignons phytopathogènes sur milieu TSA /25°C, en présence de boîtes témoins.  
 A: *Alternaria* sp.; B: *A. niger*; C: *Penicillium* sp.; D: *B. cinerea*.

Ces Résultats positifs obtenus par les PM-TOT et les PM-R30 extraites après un test d'induction en présence d'*A. niger* (souche modèle) testées à l'égard d'autres cibles

fongiques, confirment que l'induction de la production des molécules à activité antifongique n'est pas spécifique à une espèce fongique particulière, ce qui permet de considérer la souche d'*A. niger* testée dans les parties précédentes aussi comme modèle de la cible dans les tests d'antagonisme en double culture qui viennent.

La production de métabolites secondaires comme les antibiotiques, les sidérophores, le cyanure d'hydrogène, et les enzymes mycolytiques (protéases, lipases) extracellulaires, font partie des mécanismes le plus souvent utilisés par *Pseudomonas fluorescens* pour l'élimination des champignons (Anand et kulothungan, 2010).

Selon le même auteur, une souche de *Pseudomonas fluorescens* est testée à l'égard d'*A. niger* a montré la production de métabolites secondaires comme l'acide salicylique et les substances volatiles comme l'HCN, des protéases, des lipases et des sidérophores chélateurs de fer.

Les résultats de la recherche des différents traits PGP ont exhibé la capacité de la souche N (*Pseudomonas* sp.) de produire les enzymes lytiques (protéases, lipases, chitinases, estérases, cellulases et uréases), ainsi que la production de sidérophores chélateurs du fer, le cyanure d'hydrogène, la production d'ammoniac et d'AIA. Les PM-TOT et les PM-R30 ont présenté un effet inhibiteur de la croissance mycélienne fongique des 4 champignons précédemment testés, ce qui signifie que ces protéines ne sont pas spécifiques d'une cible bien précise.

Le genre *Pseudomonas* est l'un des genres bactériens Gram négatif les plus diversifiés, isolé de diverses sources à savoir ; les plantes, le sol et l'eau. Il est caractérisé par sa capacité de croître dans des milieux simples au détriment d'une grande variété de composés organiques simples. Plusieurs souches de ces bactéries produisent des métabolites qui peuvent être des sidérophores chélateurs du fer, ce qui rend cet élément non disponible pour les pathogènes ou des molécules antibiotiques qui sont considérées comme une clé importante dans l'élimination des maladies fongiques (Battu and Reddy, 2009).

D'autres métabolites peuvent interférer avec la croissance des pathogènes et/ ou leurs activités, les enzymes lytiques qui sont capables d'hydrolyser une large variété de composés polymères : chitine, protéines, cellulose, et hémicellulose (Pal and Gardener, 2006).

*Serratia marcescens* est connue pour sa production de chitinases et  $\beta$  (1,3) glucanases inhibant la croissance fongique (Pal and Gardener, 2006). Ces enzymes peuvent juste stresser et/ ou lyser les parois cellulaires des microorganismes en décomposant leurs constituants. L'HCN bloque efficacement la voie du cytochrome oxydase, il est hautement toxique pour tous les microorganismes aérobies, on pense que la production d'HCN par certains *Pseudomonas* fluorescents est impliquée dans l'élimination de certains pathogènes racinaires.

L'élimination de *Pythium ultimum* est assurée par la production de composés volatiles qui est l'ammoniac (Pal et Gardener, 2006). Bien qu'il soit clair que les agents de biocontrôle peuvent libérer plusieurs composés différents dans leur milieu environnant, les types et les quantités produites dans les systèmes naturels en présence et en absence des maladies des plantes n'ont pas été bien documentés (Pal et Gardener, 2006).

Les sidérophores sont des protéines de faible poids moléculaire (0.5 à 1.5KDa) chélatant le fer et d'autres métaux, contribuant à l'élimination des pathogènes (Anand et Kulothungan, 2010). Dans cette présente étude, les PM-TOT extraites de la souche N (*Pseudomonas* sp.) filtrées dans des centricones de 30KDa n'ont montrées aucune activité antifongique pour le filtrat, l'activité a été observée uniquement avec les protéines retenues dans le filtre, donc ces protéines actives ont un poids moléculaire dépassant les 30 KDa. Ce résultat permet d'écarter la possibilité que les protéines actives appartiennent à la classe des sidérophores. Les pigments hydrosolubles produits par *Pseudomonas fluorescens* ont été montrés comme imitateur des caractères de sidérophores (Anand et Kulothungan, 2010).

Des métabolites antifongiques sont isolés d'une souche de *Pseudomonas aurantiaca*, puis séparés par plusieurs étapes de chromatographie. Une fois appliqués sur boîte, ils ont exhibé une forte activité antifongique à l'égard d'une variété de champignons phytopathogènes (Park et al. 2013). *Pseudomonas* est l'une des espèces de PGPR produisant de large variété de métabolites bioactifs jouant un rôle vital dans la protection des cultures (Fernando et al., 2005). L'activité antifongique est mesurée suite à la production de protéases, hydrolyse de la caséine, amylase, cellulase et pectinases (Sheeba et al., 2017).

Des enzymes chitinasiques sont séparées par une chromatographie d'exclusion, l'activité antifongique est réalisé à l'égard de plusieurs champignons testés entre autre *B. cinerea*, ces enzymes chitinasiques agissent en provoquant une croissance mycélienne anormale, des anomalies morphologiques, apparition de zones nécrotiques dans le mycélium, lyse des bouts des hyphes, inhibition de la germination des spores (division cellulaire), effet sur l'élongation des hyphes (Lorito et al., 1992). L'action d'une chitinase purifiée à partir d'une souche de *Streptomyces* sur le mycélium de *F. oxysporum* est effectuée par la lyse de la paroi fongique et l'inhibition de la germination des spores (Dewi et al., 2017).

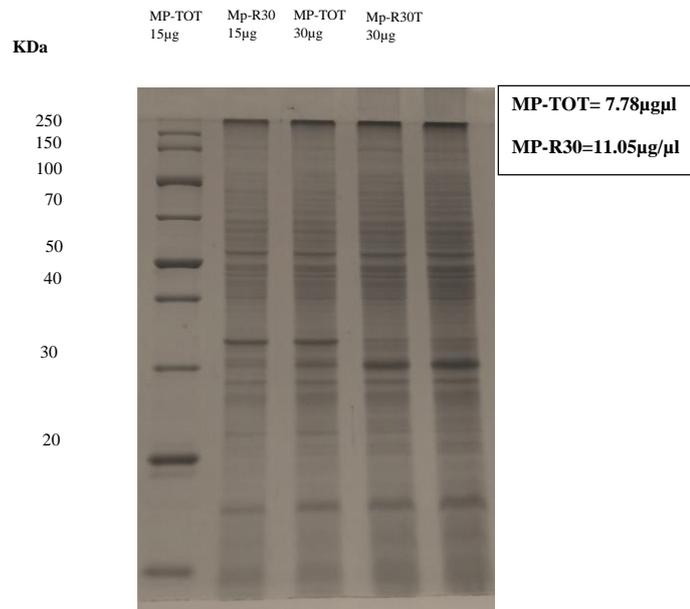
Dans certains cas, il y'a un effet synergique entre les activités enzymatiques. L'endochitinase produit une lyse importante des tubes germinatifs, une induction de changements morphologiques, l'apparition d'une augmentation jusqu'à un gonflement plutôt qu'une lyse de tubes germinatifs et une fois il y'a un effet synergique de deux chitinasés, l'inhibition est

accompagnée d'une distorsion des hyphes, d'une forte vacuolisation et gonflement et d'une lyse des hyphes (Lorito et *al.*, 1992). Les chitinases réduisent promptement la croissance mycélienne ce qui coïncide avec l'apparition des zones nécrotiques et une mortalité élevée des hyphes (Lorito et *al.*, 1992). Ces effets sont observés une fois appliqués à l'égard des champignons contenant de la chitine dans leur paroi.

Les résultats indiquent que le mélange des enzymes hydrolytiques avec des modes d'action complémentaires peut être nécessaire pour une efficacité maximale, et ça induit une augmentation de l'inhibition fongique *in vitro* (Lorito et *al.*, 1992). Une protéine antifongique produite par *Bacillus licheniformis* a été purifiée par précipitation au sulfate d'ammonium et une chromatographie sur colonne Sephadex G-47, cette protéine purifiée a inhibé la croissance de certains champignons phytopathogènes parmi eux *A. niger*, elle est caractérisée comme monomère d'un poids moléculaire de 31KDa (Cui et *al.*, 2012).

#### **2.4. Séparation des PM-TOT (7.78µg/µl) et des PM-R30 (11.05µg/µl) de *Pseudomonas* sp. sur électrophorèse SDS page**

La figure suivante montre le profil obtenu après migration des deux protéines (PM-TOT, PM-R30) injectées avec deux quantités différentes et la visualisation sur gel des bandes contenant les fractions.

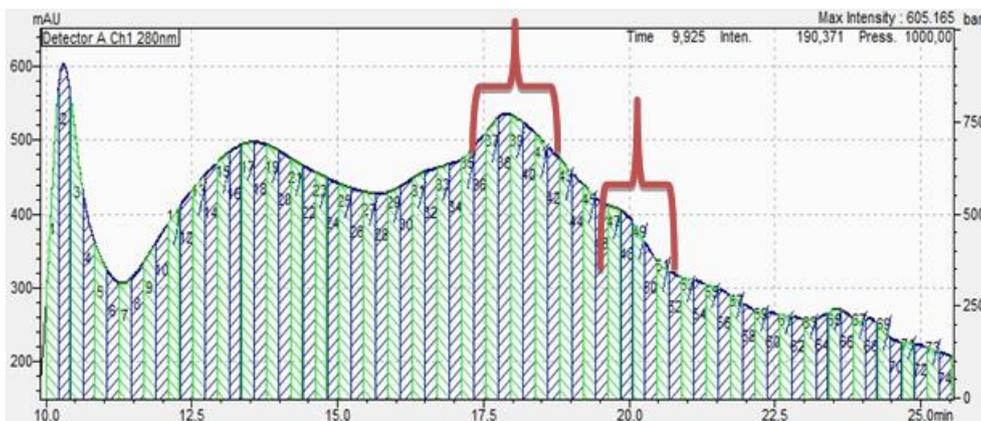


**Fig. 56 :** Electrophorèse SDS-page des PM-TOT et des PM-R30 sur gel de polyacrylamide pour la révélation du profil protéique de chaque fraction. Chaque fraction est inoculée avec deux quantités (15µg et 30µg).

Après migration, chaque fraction a montré une multitude de bandes qui sont visualisées sur le gel, ce qui suggère que les PM-R30 et les PM-TOT injectées sont composées d'un mélange de protéines, et que d'autres techniques de purification (chromatographie d'exclusion, échangeuse d'anions...) plus précises pour obtenir des profils en bandes moins chargées sont nécessaires.

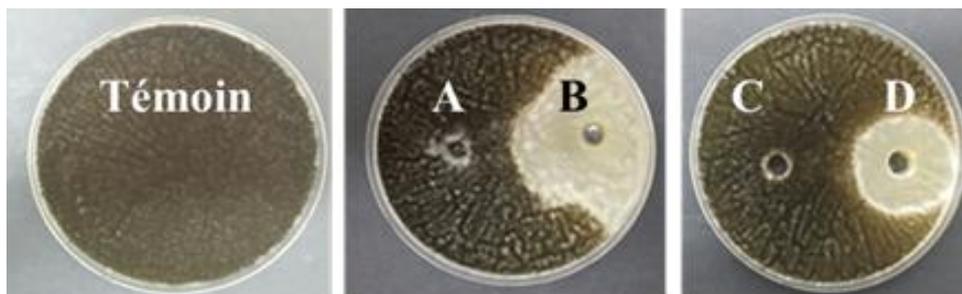
### 2.5. Chromatographie d'exclusion des PM-R30

La première chromatographie réalisée est celle d'exclusion. Le chromatogramme présente des pics non séparés, ce qui signifie que les molécules protéiques d'intérêt ne sont pas purifiées. Les fractions récupérées et testées *in vitro* sont : FrA, FrB, FrC et FrD. Les deux fractions actives sont signalées avec des accolades sur la figure 57.



**Fig. 57 :** Chromatogramme de la chromatographie d'exclusion des PM-R30. La partie contenant les deux fractions récoltées sont représentées en accolades.

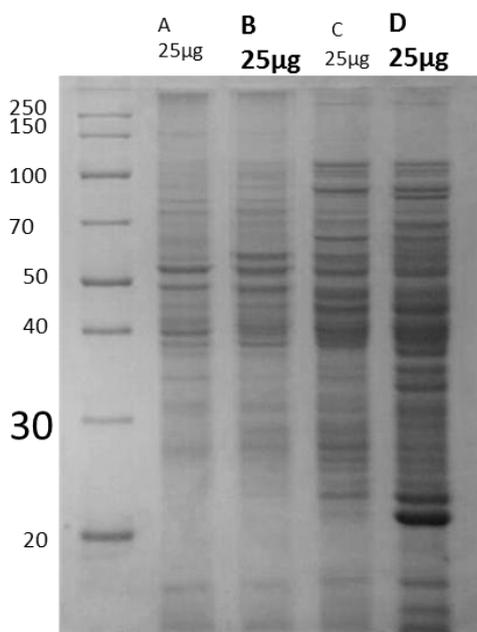
Les quatre fractions collectées ont subi une filtration stérilisante à 0,22 $\mu$ m, puis inoculées dans des puits en milieu TSA préalablementensemencées avec les spores fongiques d'*A. niger* en présence de boîtes témoins. Les fractions A et C n'ont montré aucune activité et les deux fractions actives B et D ont montré de claires zones d'inhibition, ce qui prouve que ces deux mélanges protéiques contiennent des fractions de fonctions encore inconnues, inhibant la croissance mycélienne de ce champignon. Les résultats obtenus sont illustrés sur la figure 58.



**Fig. 58 :** Résultats de l'effet des fractions A, B, C, et D, collectées d'une chromatographie d'exclusion sur la croissance mycélienne d'*A. niger* sur milieu TSA.

## 2.6. SDS-Page 12%

Une partie des fractions protéiques collectées de la chromatographie d'exclusion est injectée dans le gel de polyacrylamide 12%, le profil des bandes après migration est présenté sur la figure 59 ci-dessous.



**Fig. 59 :** Electrophorèse SDS-page des fractions A, B, C et D issus d'une étape de chromatographie d'exclusion.

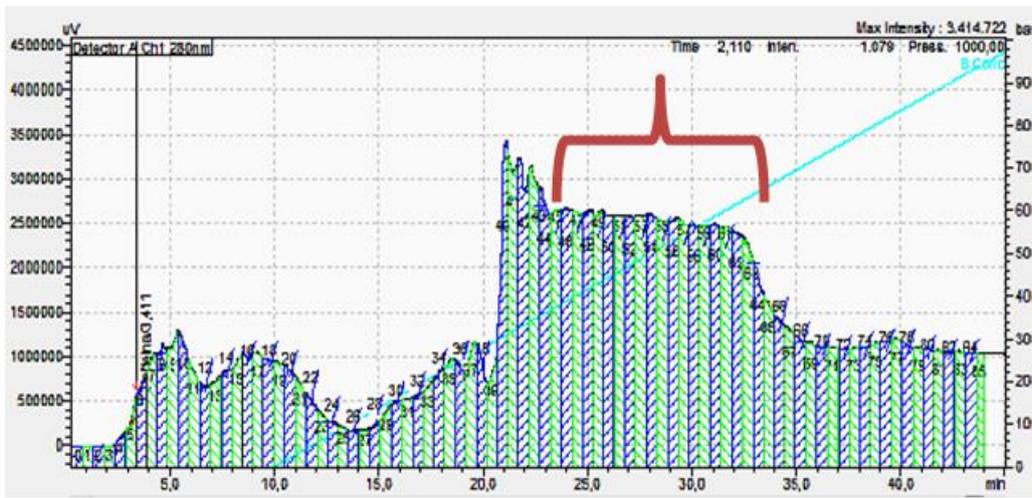
L'aspect des bandes obtenues après migration montre que les fractions des PM-R30 collectées après une étape de chromatographie d'exclusion contiennent un mélange de protéines, ce qui nécessite d'autres étapes de purification.

## 2.7. Chromatographie échangeuse d'anions (Mono Q) des PM-R30

Les résultats obtenus suite à l'injection des PM-R30 dans la colonne de la chromatographie échangeuse d'anions a permis de collecter 5 fractions nommées : Fr1, Fr2, Fr3, Fr4 et Fr5

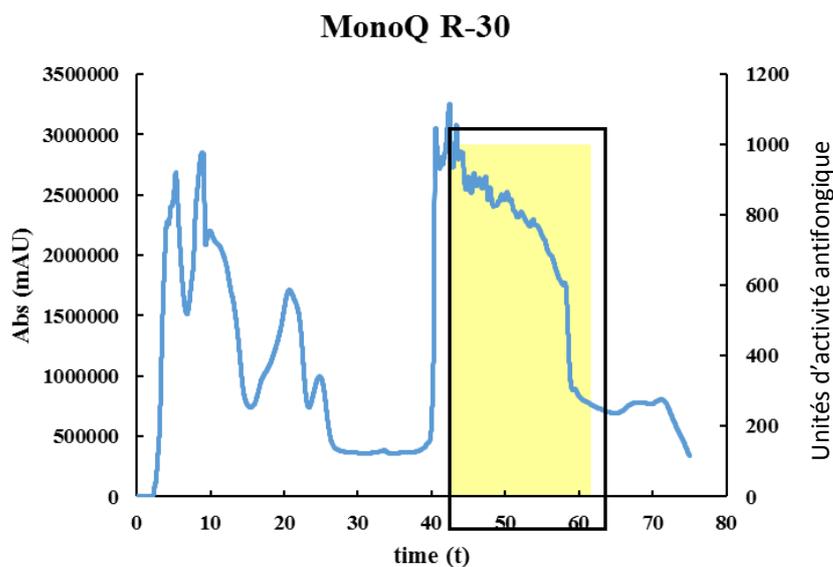
suite au chromatogramme obtenu. La partie montrée en rouge sur le chromatogramme représente la fraction active (Fig.60). Chaque fraction a subi une dialyse puis une filtration à 0.22µm dans le but de les tester sur boîte à l'égard d'*A. niger* sur milieu TSA. Les résultats obtenus montrent que la fraction 4 est la seule active avec apparition de claire zone d'inhibition (Fig. 62).

Une électrophorèse SDS-page sur gel de polyacrylamide à 12% est réalisée sur les fractions collectées comme précédemment avec la chromatographie d'exclusion. Le profil en bandes visualisées après migration est illustré sur la figure 63.



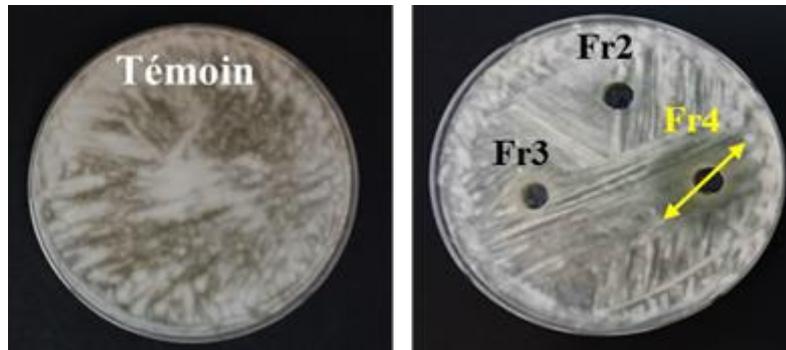
**Fig. 60 :** Chromatogramme de la chromatographie échangeuse d'anions des PM-R30. L'accolade rouge montre l'intervalle de la fraction active.

Le pic responsable de cette activité est zoomé comme suit :



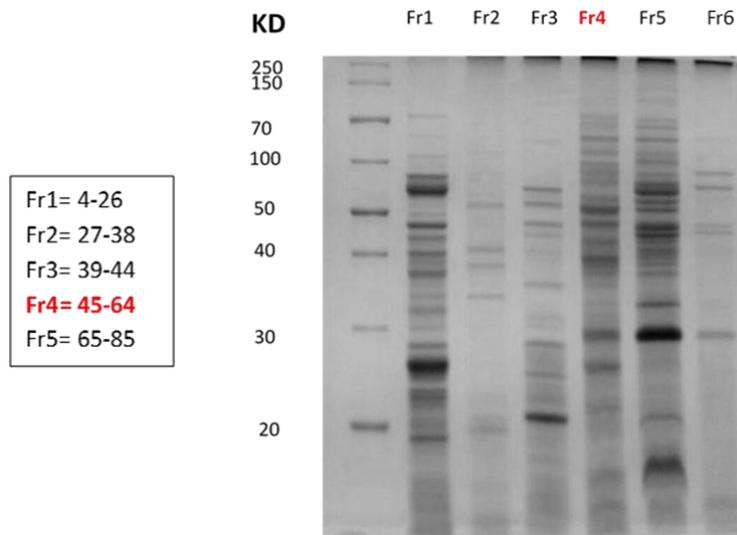
**Fig. 61 :** Chromatogramme montrant l'intervalle de la fraction 4 active. La zone remplie en jaune reflète le pic contenant la fraction active (Fr4).

Les résultats obtenus suite à l'application de ces fractions *in vitro* sur TSA en présence du témoin à l'égard d'*A. niger* sont présentés dans la figure 62.



**Fig. 62 :** Résultats de l'effet des fractions 2, 3 et 4 collectées d'une chromatographie échangeuse d'anions sur la croissance mycélienne d'*A. niger* sur milieu TSA. Les fractions 2 et 3 n'ont montré aucune activité. De claire zone d'inhibition est par contre obtenue avec la fraction 4.

Ces résultats prouvent que la/ou les protéines actives sont présentes dans la fraction Fr4. Mais cette fraction est composée d'un mélange de plusieurs protéines, selon le nombre de bandes visualisées sur son profil de migration sur électrophorèse SDS-page



**Fig. 63 :** SDS-page 12% des fractions de PM-R30 collectées d'une étape de chromatographie échangeuse d'anions. La fraction (4) active est mentionnée en couleur.

D'après les résultats des deux techniques chromatographiques et l'aspect des bandes sur le gel de l' SDS-page, il est évident que la /ou les molécules responsable (s) de l'activité antifongique de la souche de *Pseudomonas* sp. sont de nature protéiques mais ne sont pas encore purifiées. D'autres étapes de purification sont en cours de réalisation.

Plusieurs molécules de nature protéique peuvent être impliquées dans les activités antagonistes par les agents de biocontrôle à l'égard des champignons phytopathogènes. Deux molécules au minimum apparaissent actives à l'égard d'*A. niger* obtenues suite à la chromatographie échangeuse d'anions, une fraction apparaît active parmi celles collectées de la chromatographie d'exclusion.

L'activité antifongique des fractions protéiques membranaires de la souche de *Pseudomonas* sp. pourrait être due à la présence d'enzymes comme les protéases et les glucanases inhibant la croissance mycélienne, ou les chitinases et les cellulases provoquant une lyse et une fragmentation des cellules pariétales fongiques (Manidipa et al., 2013). Les souches de *Pseudomonas* sp. produisent des exo- protéases et des chitinases jouant un rôle dans le biocontrôle (Mercado-Blanco, 2015).

L'apparition de trois différentes fractions actives obtenues à partir des deux chromatographies explique que les protéines actives sont de différentes fonctions, une chose qui n'est pas surprenante pour les bactéries du genre *Pseudomonas* connu pour leur richesse en enzymes mycolytiques, ce qui a été confirmé par le criblage de la souche N (variante de *Pseudomonas protegens*) sur la base des traits PGP et de biocontrôle. Une relation positive a été observée entre l'activité chitinasique et l'activité antifongique des isolats de *P. fluorescens* chitinolytiques (Bouizgarne, 2013).

Les souches de *Pseudomonas* sp. ont inhibé fortement la croissance fongique grâce à la production de la chitinase et de la  $\beta$  (1,3) glucanase. Des mécanismes divers et multiples sont adoptés par le même antagoniste pour éliminer les différents phytopathogènes.

Une chitinase partiellement purifiée a induit un éclatement important des extrémités des hyphes de *Rhizoctonia solani*. C'est le cas de *Serratia plymutica* IC14 ayant des activités : chitinasique, protéasique et produisant des antibiotiques et des sidérophores pyrrolnitrine (Sindhu et al., 2016). Cette souche protège *in vitro* contre *B. cinerea*. Des souches de rhizobactéries incluant *P. fluorescens* et *P. putida* inhibent la croissance fongique *in vitro*. Elles produisent le cyanure d'hydrogène (HCN), les sidérophores, les protéases et la  $\beta$  (1,3) glucanase.

Les antibiotiques peuvent agir sur les champignons phytopathogènes des plantes par action fongistatique, en inhibant la germination des spores, en lisant le mycélium fongique, ou en exerçant des effets fongicides (Sindhu et al., 2016).

Une souche de *Pseudomonas fluorescens* 114 isolée des sédiments d'une rivière produit une protéase avec un poids moléculaire de 47 KDa, stable à pH 7-9 et son activité d'hydrolyser la caséine est optimale entre un pH de 6.5 à 10 (Hamamoto et al., 1994).

Une protéase extracellulaire est extraite à partir d'une bactérie marine. Cette enzyme d'un poids moléculaire de 71KDa, et son activité maximale est observée à un pH neutre (Huston et al., 2004). Ces résultats coïncident avec les notre, car le milieu de culture utilisé pour le test est le milieu TSA avec un pH neutre.

Il est également constaté que les souches de *Trichoderma* produisent des protéases actives sur *B. cinerea*. Ces protéases agissent en inactivant les enzymes hydrolytiques produites par ce champignon. Ces dernières coupent les enzymes hydrolytiques en chaînes peptidiques et / ou en ses constituants d'acides aminés et détruisent ainsi leur capacité d'agir sur les cellules pariétales des plantes (Howell et al., 2003). Ces même auteurs rapportent que les glucanases et les chitinases produites par l'agent de biocontrôle sont responsables de l'élimination des pathogènes des plantes. Ces enzymes fonctionnent en brisant les polysaccharides comme la chitine et la  $\beta$  (1,3) glucane responsables de la rigidité des parois cellulaires fongiques, détruisant ainsi l'intégralité des parois cellulaires. Aussi, la production d'une endo- chitinase de 42 KDa permettant à l'agent de biocontrôle de pénétrer et de détruire les hyphes du champignon phytopathogène.

Al Banna et al. (2016) ont testé les protéines solubles totales extraites d'une souche de *Bacillus* à l'égard de quelques champignons pathogènes des plantes. L'apparition de zones d'inhibitions sur boîte a été justifiée par la présence de chitinases dans le mélange protéique. Ils ont aussi interprété cette activité par la production d'endotoxines. La souche N a montré *in vitro* sa capacité de produire des protéases, des chitinases et des lipases. Ces enzymes peuvent être la cause des activités antifongiques observées sous l'action des PM-TOT. Ces mêmes auteurs ont révélé que l'inhibition de la croissance fongique sous l'action de métabolites toxiques peut être due à une augmentation de la vitesse de respiration, en justifiant ça par un non couplage de la phosphorylation oxydative et la respiration dans les cellules fongiques. D'autre part, Zhang et Yuen (2000), ont étudié le rôle d'une chitinase dans le biocontrôle de *Bipolaris sorokiniana*, Une fraction de haut poids moléculaire (78KDa) a montré une activité chitinolytique et elle est plus inhibitrice que la fraction de faible poids moléculaire. Une fois chauffée, la fraction chitinolytique perd son activité chitinase accompagnée de la perte de la majorité des propriétés antifongiques (Sindhu et al., 2009). Une chitinase extraite et purifiée d'une souche de *Bacillus subtilis* TV-125A a montré des zones d'inhibition une fois appliquée *in vitro* à l'égard de 4 champignons phytopathogènes en particulier le champignon *Fusarium culmorum* (Senol et al., 2014).

Une molécule de nature protéique a été extraite d'un isolat bactérien marin et a été criblée à l'égard de dix champignons phytopathogènes. La protéine concentrée est partiellement purifiée par précipitation au sulfate d'ammonium suivie d'une TLC et une électrophorèse sur gel. L'analyse SDS- page a exhibé des bandes protéiques correspondant à 34KDa et 71KDa (Dhinakaran et al., 2012).

Hammama et al. (2013) ont partiellement purifié une chitinase sur DEAE-Sépharose échangeuse d'anions. Le poids moléculaire de cette chitinase partiellement purifiée est trouvé aux alentours de 30KDa par électrophorèse SDS-page. Son pH optimum d'activité est de 6.5. Elle a présenté un large spectre d'activité à l'égard de tous les champignons phytopathogènes testés. Le même type d'enzyme a été extrait d'une autre souche marine, après sa purification par une chromatographie échangeuse d'ion sur DEAE - sépharose, suivie d'une électrophorèse SDS- page, son poids moléculaire est fixé à 60KDa avec un pH optimum d'activité allant de 5 à 7,5. Cette chitinase purifiée et testée *in vitro* et elle s'est révélée inhibitrice de la croissance d'*A. niger*, *A. oryzae*, *Penicillium oxysporum*, *Rhizoctonia solani*, *Candida albicans* et *Fusarium solani* (Frag et al., 2016). Une autre chitinase isolée d'une souche de *Burkholderia cepacia KH2* est purifiée par DEAE-Sépharose, CL-6B, son poids moléculaire a été estimé sur une SDS-page à 34KDa. Cette enzyme est apparue active à des pH de 4 à 6 et son pH optimum est de 4.5 (Ogawa et al., 2002).

Les enzymes bactériennes purifiées et leurs métabolites sont aussi synergiques à l'égard des pathogènes fongiques, cet effet synergique semble avoir un rôle plus efficace chez certaines espèces de *Pseudomonas*, les enzymes dégradant les parois cellulaires inhibent la croissance mycélienne et la germination des spores (Lorito et al., 1994 ; Woo et al., 2002). La dégradation enzymatique des parois cellulaires permet aux toxines surtout celles du haut poids moléculaire d'atteindre leurs cibles plus efficacement qu'en absence d'enzymes (Woo et al., 2002). Un exemples de ces enzymes ; une endo-chitinase de 42KDa et une  $\beta$ -(1,3) glucosidase ayant une action fongicide (Woo et al., 2002).

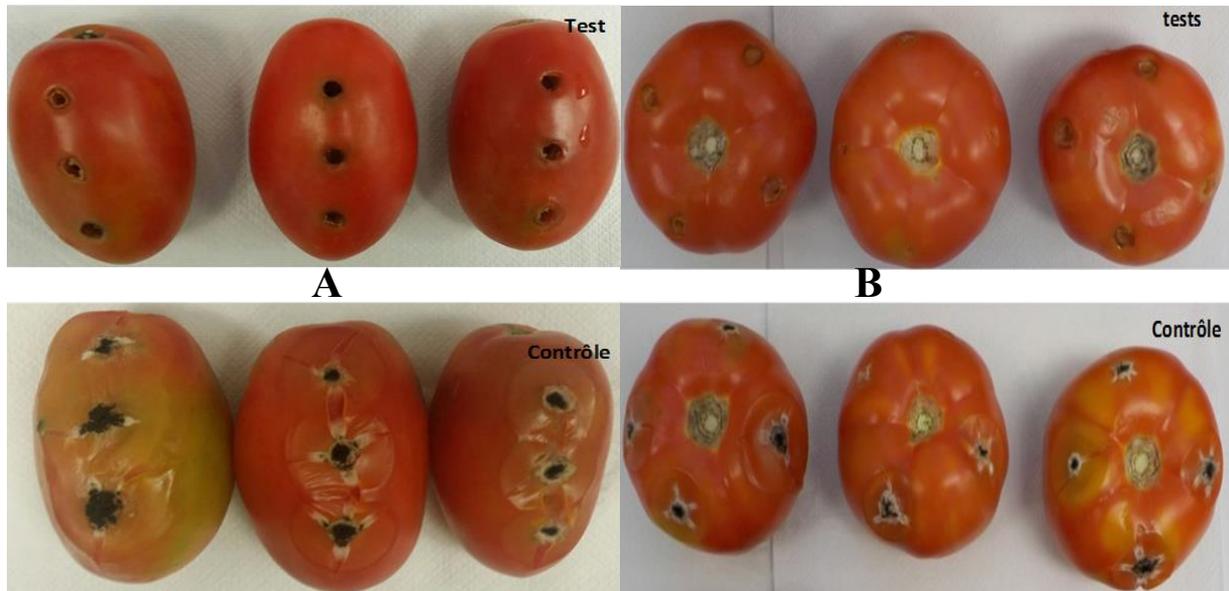
Après une purification partielle, le surnagent de culture d'une souche de *Candida oleophila* connu comme agent de biocontrôle a montré la présence d'une exo-  $\beta$ - (1,3) glucanase (30KDa), de chitinases (200KDa) et de protéases (60KDa) sur SDS-page (Bar-Shimon et al., 2004). Une chitinase isolée de *Gliocladium virens* avec un poids moléculaire de 41KDa a été testée pour son effet sur la germination des conidies et l'élongation de tube germinatif de *B. cinerea in vitro*. L'enzyme a inhibé la germination des spores de champignon test et a endommagé les cellules pariétales, ce qui a engendré un enfllement des extrémités des hyphes (Di Pietro et al., 1993).

### 3. Effet antifongique des fractions protéiques membranaires

#### 3.1. Effet des PM-R30 (7.35µg/µl) à l'égard d'*A. niger* sur fruits de tomate

Le test d'antagonisme *in vivo* à l'égard d'*A. niger* est réalisé sur deux variétés de tomate locales de Naples. La réduction de l'infection est réussie avec des valeurs variables au niveau des deux variétés.

Après 6 jours d'incubation, l'observation des fruits de tomate traités (inoculation des spores fongiques et des PM-R30) exhibent une différence claire par rapport au contrôle (Fig. 64). Les blessures sur les fruits témoins montrent une apparition d'une large pourriture par rapport aux fruits tests avec un nombre plus élevé de spores.

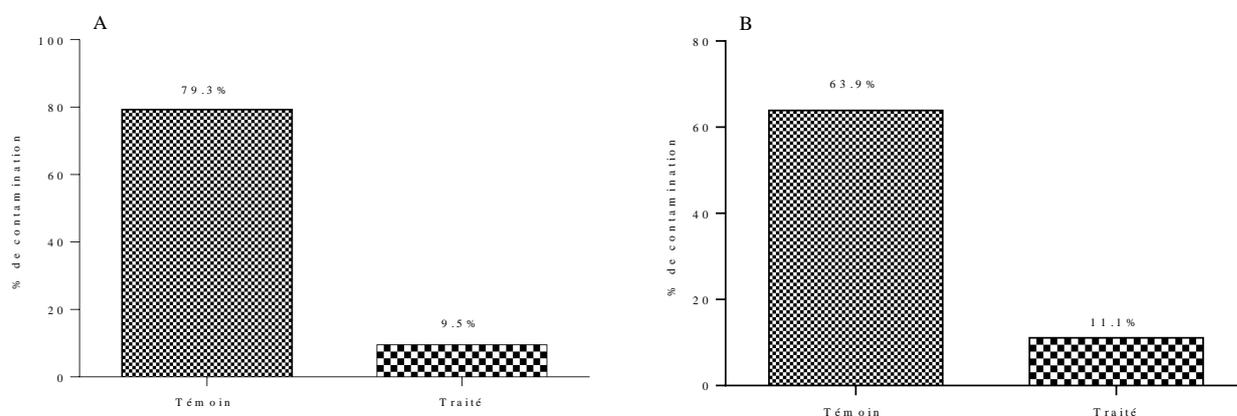


**Fig. 64 :** Développement de lésions sur fruits de deux variétés de tomate A et B, contaminés par les spores d'*A. niger*, traités ou non avec les PM-R30 après 6 jours d'incubation.

Les résultats de calcul du pourcentage de contamination basé sur l'apparition d'une claire zone de pourriture, un bon développement mycélien avec production de spores dans les fruits tests et témoins montrent des valeurs de 9.5/79.30% et 11.10/63.90 pour le couple (test/contrôle) des deux variétés A et B respectivement (Fig. 65).

On a constaté que les fractions protéiques retenues à un cut-off de 30KDa (PM-R30) montrent de bons résultats à l'égard d'*A. niger* suite au calcul de pourcentage de contamination de fruits

des deux variétés de tomate, donc l'activité antagoniste n'est pas influencée par le facteur de variété.



**Fig.65 :** Pourcentage de contamination des fruits de tomate des deux variétés (A et B) infectés par *A. niger* après 6 jours d'incubation en présence et en absence des PM-R30.

La tomate (*Lycopersicon esculentum* L.) est parmi les cultures de légumes les plus importantes au monde. C'est un aliment sain grâce à sa valeur nutritionnelle particulière. C'est l'un des légumes frais les plus cultivés en pépinières pour ses fruits. Elle est attaquée par plusieurs pathogènes fongiques qui lui causent de sérieuses maladies (Maheshwari et Vidhya, 2016). Les fruits de ce légume feront ainsi un modèle pour tester l'efficacité de notre mélange protéique à l'égard d'*A. niger* au laboratoire.

Après 6 jours d'incubation des fruits de tomate à 25°C dans des boîtes humidifiées, les endroits inoculés avec uniquement les spores fongiques (contrôle) ont montré un stade très avancé de l'infection (beaucoup de mycélium et de spores dans les trous) par rapports aux fruits traités en plus avec les MP-R30 (testes).

Beaucoup de travaux sont publiés sur l'application des agents de biocontrôle sur le vivant pour inhiber la croissance de phytopathogènes fongiques (Janisiewicz, 1988 ; Bar-Shimon et al., 2004 ; Etebarian, 2006 ; Omar et al., 2007 ; Zamani et al., 2009 ; Donmez et al., 2011 ; Khleekorn et Wongrueng, 2014). Certains travaux ont cité l'application des solutions protéiques pour lutter contre des maladies fongiques *in vivo*, c'est le cas de Howell (2003) qui a expliqué l'efficacité de ces mélanges protéiques à désactiver partiellement les enzymes hydrolytiques du pathogène et réduisent ainsi la sévérité de la maladie de 56 à 100%. Ce même auteur rapporte qu'un mélange de plusieurs enzymes peut être nécessaire pour une lyse plus efficace des cellules pariétales fongiques, ce qui corrobore avec nos résultats, le fait que les PM-R30 appliquées sont encore un mélange de protéines. Aussi une combinaison des

chitinases et d'antibiotiques apparaît plus efficace que si ces composés sont appliqués séparément (Di Pietro et al., 1993; Schirmböck et al., 1994 ; Lu et al., 2008 ).

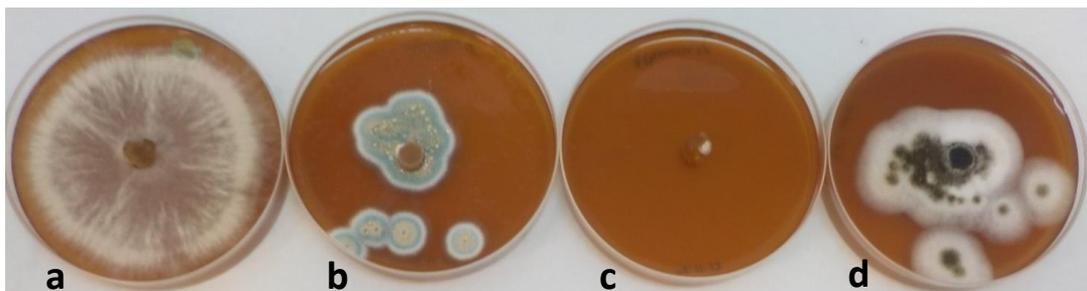
Une protéase alcaline isolée d'une souche d'*Aureobasidium pullulans*, un microorganisme antagoniste des pathogènes des fruits en post-récolte a été testée à l'égard de *Penicillium expansum*, *B. cinerea*, *Molinilia fructicola* et *Alternaria alternata* sur fruits de pomme (Golden Delicious). La molécule apparaît plus efficace dans le contrôle des trois premiers champignons par rapport à *Alt. alternata*. Toutefois, l'importance de l'activité dépend de la concentration de l'enzyme et la durée de conservation du fruit. Cette étude a montré la capacité de cette enzyme à garder son activité pour quelques jours dans les blessures du fruit, donc elle pourrait être appliquée comme un traitement post-récolte avec une activité antimicrobienne pour les fruits en une courte période de conservation (Banani et al., 2014). La réponse des pathogènes pour ces molécules varie selon la composition des parois cellulaires (Woo et al., 2002). Sur la surface des feuilles d'haricot, la protéase (obtenue du milieu de culture liquide de *Trichoderma harzianum*) a induit une réduction allant de 56 à 100% de la sévérité de la maladie causée par *B. cinerea* (Elad and Kapat, 1999). La souche de *Bacillus FZB24* produit des métabolites inhibant *phytophthora infestans* en réduisant leur développement structural et en diminuant leur biomasse dans les tissus de feuilles par 83%, ce qui a permis une réduction de plus de 70% de la sévérité de la maladie causée par ce pathogène (Dehne, 2012).

La pyrrolnitrine est un antibiotique à large spectre d'action isolé la première fois à partir de *Pseudomonas pyrocinia*. Il inhibe la croissance des champignons en bloquant le système respiratoire. Cet antibiotique s'avère efficace contre *B. cinerea*. Il est testé pour le contrôle des infections des roses en post-récolte par ce champignon. Le trempage des tiges avec 100mg/l réduit le développement des lésions d'environ 90% par rapport à des fleurs témoins non traitées (Ajouz, 2009). *Pseudomonas aeruginosa* produit des biosurfactants glycolipides comme les rhamnolipides qui peuvent réduire la maladie de la pourriture de *Botrytis* sur fruits de raisin. Ce métabolite a été auparavant décrit pour ses propriétés antifongiques directes en inhibant la germination des spores et la croissance mycélienne du champignon, ce qui permet de protéger les raisins contre cette maladie (Compant et al., 2013). Une extraction est faite à partir du surnageant de culture de *Pseudomonas* sp. LN et a permis d'obtenir 3 fractions : EAF, VLC2 et VLC3. Ces dernières sont testées *in vivo* sous serre pour vérifier leur capacité à réduire la surface de lésion du chancre sur feuille de citronnier. Les feuilles traitées avec la fraction CLV3 ont montré une réduction de 40% de la surface des lésions par rapport au contrôle (Murate et al., 2015).

La préparation protéique de la souche de *Streptomyces 138* a réduit d'environ 50% l'incidence de l'antracnose sur fruits de tomate causée par *Colletotrichum coccodes* comparée à un contrôle non traité après 5 jours d'inoculation. Quand la préparation protéique est traitée avec l'EDTA ou le PMSF, l'incidence de l'infection de *C. coccodes* est observée égale à celles des fruits témoins. Aucune différence significative n'a été observée entre l'activité de cette protéase et l'antifongique de synthèse « Bénomyle ». Cette étude a démontré la possibilité d'appliquer les protéases antifongiques obtenues à partir de microorganismes antagonistes comme bio fongicides (Palaniyandi et al., 2013).

### 3.2. Vérification de l'effet fongicide ou fongistatique de la souche N (*Pseudomonas sp.*) à l'égard des souches fongiques : *A. niger*, *B. cinerea*, *Penicillium sp.* et *Alternaria sp.*

Les disques pris de la zone d'inhibition obtenue suite à un test d'antagonisme à l'égard des quatre champignons par la souche N sont déposés à nouveau dans une boîte vierge contenant la gélose d'extrait de malt, après incubation à 25°C/3 jours, l'observation a montré un disque intact pour *Alternaria sp.* et un mycélium qui reprend sa croissance pour les autres disques fongiques. Cela laisse supposer une activité fongicide de la souche N à l'égard d'*Alternaria sp.* et fongistatique dans le cas d'*A. niger*, *B. cinerea* et *Penicillium sp.* Les résultats n'ont pas changé pour *Alternaria sp.* même après une semaine d'incubation, ce qui a confirmé notre supposition (figure 66).



**Fig. 66 :** Vérification de l'effet fongicide ou fongistatique de la souche N à l'égard des quatre champignons phytopathogènes, après 3 jours d'incubation. a : *Botrytis cinerea* ; b : *Penicillium sp.* ; c : *Alternaria sp.* ; d : *Aspergillus niger*.

Parmi les mécanismes fongicides impliqués dans le biocontrôle par l'agent antagoniste *Trichoderma*, Howell et al. (2003) ont cité la capacité de ce dernier à s'enrouler autour des hyphes de champignon cible et sa pénétration, ce qui génère la dissolution du cytoplasme de l'hôte. Quant à l'effet fongistatique, la compétition pour les nutriments disponibles et le mycoparasitisme sont parmi les principaux mécanismes les mieux cités. Ce même

champignon produit un principe létal qui est excrété dans le milieu environnant, par la suite il a été identifié comme toxique et nommé gliotoxine.

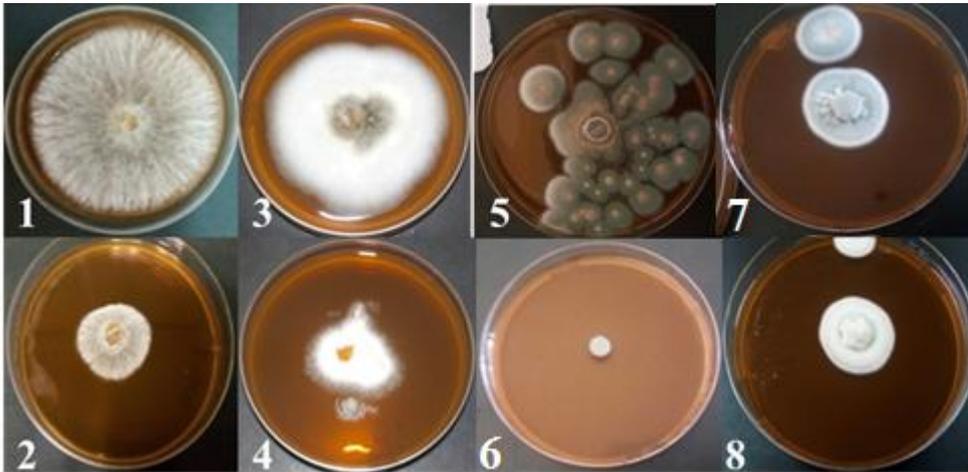
L'effet inhibiteur sur boîte est dû à l'antibiose et à la compétition (Thongkamngam et Jaenaksorn, 2017). Albanna et *al.* (2016) ont constaté la capacité des agents de lutte biologique à produire des substances à effets fongistatiques, après exposition d'une souche d'*Alternaria* sp. à une souche de *Bacillus* sp. Ils ont aussi observé des altérations morphologiques au niveau des hyphes et des spores.

Les composés organiques volatiles peuvent être fongicides ou fongistatiques (Campos et *al.*, 2010). Néanmoins, Mackie et Wheathey (1999) ont démontré que l'effet des composés organiques volatiles sur plusieurs champignons phytopathogènes n'est pas fongicide, et la persistance des effets dus à l'adsorption des composés organiques volatiles sur gélose, indique que les composés actifs sont hydrosolubles. L'effet inhibiteur des substances volatiles secondaires est fongistatique. L'inhibition de la croissance mycélienne est concomitante avec la réduction de la synthèse de certaines protéines, la croissance mycélienne et la synthèse protéique ont repris lorsque les antagonistes ont été retirés (Humphris et *al.*, 2002).

#### **4. Effet des substances volatiles produites par *Pseudomonas* sp. (N) sur la croissance fongique**

Après incubation, les boîtes sellées sont séparées et l'observation de l'aspect du mycélium dans les boîtes tests montre une nette différence par rapport au contrôle (champignon seul). Dans le cas d'*A. niger* une bonne croissance du mycélium aérien est observée avec abondance de spores à la surface surtout aux alentours de disque, le bas de la boîte apparaît de couleur grisâtre. Tandis que pour la boîte teste, le mycélium aérien n'apparaît pas trop développé avec une faible croissance radiale (PGI%=65.71%) et de couleur blanchâtre (absence totale de spores). Dans le cas de *B. cinerea*, la croissance radiale et celle du mycélium aérien dans la boîte test sont très réduites (61.17% d'inhibition) par rapport au contrôle où le mycélium aérien est développé et atteint la périphérie de la boîte après 3 jours d'incubation. Pour le champignon *Alternaria* sp., l'inhibition de la croissance mycélienne n'est pas très importante (18.57%), mais l'effet inhibiteur sur la sporulation apparaît clair ; le mycélium apparaît blanchâtre en présence de la souche N. Aucune croissance mycélienne n'est observée avec le champignon *Penicillium* sp. sous l'effet des substances volatiles de la souche teste (100% d'inhibition), par rapport au contrôle qui montre une bonne croissance mycélienne et abondance de spores.

Les résultats obtenus pour les quatre champignons sont représentés sur la figure ci-dessous :



**Fig. 67 :** Effet des substances volatiles sur la croissance mycélienne après 3jours d’incubation

**1 :** Contrôle *Aspergillus niger*; présence d’un mycélium aérien très développé avec une abondance de spores surtout aux alentours de disque.

**2 :** Test *A. niger* ; mycélium aérien réduit de couleur blanche avec une absence totale de spores.

**3 :** Contrôle *B. cinerea*; présence du mycélium aérien avec une très bonne croissance radiale,

**4 :** Test *B. cinerea* ; mycélium aérien très réduit avec une faible croissance radiale.

**5 :** Contrôle *Penicillium* sp. ; mycélium aérien très développé avec abondance de spores,

**6 :** Aucune croissance mycélienne n’est observée à partir du disqueensemencé pour le contrôle de *Penicillium* sp.

**7 :** Contrôle *Alternaria* sp. ; mycélium aérien dense, avec présence de spores,

**8 :** Test *Alternaria* sp. ; croissance radiale moins développée par rapport au témoin avec absence totale de spores.

D’après ces résultats, on conclut que l’activité antifongique de *Pseudomonas* sp. à l’égard des champignons pathogènes précédemment cités est due à un effet additif de molécules de nature protéique et d’autres substances volatiles. D’après les valeurs des PGI% obtenus, on déduit que l’effet antagoniste varie pour la même bactérie à l’égard de champignons cibles différents.

Récemment, il est devenu claire qu’à côté des substances diffusibles, les bactéries émettent une variété de composés volatiles dans l’atmosphère. Ces composés volatiles sont de faible poids moléculaire et ne dépassant pas les 300Da (Ossowicki et *al.*, 2017). Au cours de ces

dernières années, il a été démontré que ces substances volatiles non seulement capables de favoriser la croissance des plantes, mais aussi inhibent fortement la croissance fongique (Weisskopt, 2013).

Les molécules de nature volatile comme l'HCN et l'ammoniac sont rapportées dans plusieurs travaux pour leur effet toxique sur les microorganismes cibles. Nagamani *et al.* (2017) ont cité que les métabolites volatiles toxiques comme l'éthylène, le cyanure d'hydrogène, les aldéhydes et les cétones ont un effet significatif sur la réduction de la croissance radiale des pathogènes testés. Le degré de l'inhibition varie d'une souche à une autre.

La différence dans les PGI% des champignons cibles obtenus suite à l'effet des métabolites volatiles peut être expliquée par la différence dans la capacité de tolérer la toxicité des produits libérés par les souches testées (Kumar *et al.*, 2017). Des résultats variables aussi sont constatés dans cette étude avec nos champignons suite au contact avec les composés volatiles libérés par la souche N.

La production des substances volatiles comme l'HCN, l'éthylène, l'ammoniac, joue un rôle dans l'inhibition des spores fongiques (Sindhu *et al.*, 2009). Des composés volatiles organiques libérés par la souche de *Pseudomonas donghnensis P482* possèdent de fortes activités antifongiques et anti-oomycètes. Parmi ces molécules volatiles, le Diméthylsulfide, S- méthyl thioacétate, méthyl thiocyanate, diméthyltrisulfide, et l'HCN sont cités comme de puissants inhibiteurs de l'extension des hyphes et leurs biomasse (Ossowicki *et al.*, 2017). Longbottom *et al.* (2014) ont révélé que l'effet des molécules antifongiques nécessite un mécanisme d'efflux ATP- dépendant et que ces molécules organiques volatiles affectent la désintégration de la membrane externe des cellules microbiennes. Chandra *et al.* (2016) ont également testé la capacité de plusieurs isolats de *Pseudomonas sp.* à produire des substances promotrices de la croissance des plantes et impliquées dans le biocontrôle. Tous les isolats testés ont montré une réduction de la croissance fongique grâce à la production de composés volatiles.

La production de ces métabolites secondaires affecte la croissance mycélienne à plusieurs degrés, la respiration, en parallèle avec la synthèse de protéines. Ces protéines peuvent avoir une fonction enzymatique et les mécanismes impliqués sont encore mal-connus (Humphris *et al.*, 2002). L'effet des substances volatiles sur l'activité des laccases et des tyrosinases est plus intense que celle des chitinases et  $\beta$ - (1,3) glucanase (Fialho *et al.*, 2011). Zou *et al.* (2007) ont constaté dans leur étude que les substances volatiles produites par quelques espèces bactériennes ont un effet fongistatique en inhibant la germination des spores et la croissance mycélienne des espèces fongiques.

Sur les 14 souches de *Pseudomonas* testées, 10 produisent des composés organiques volatiles inhibant ainsi, la germination des sclérotés, les ascospores et la croissance mycélienne de *Sclerotinia sclerotiorum in vitro*. Leur effet est fongicide car un disque mycélien prélevé de la boîte teste et resuspendu dans une boîte vierge, n'a pas montré une croissance à nouveau (Fernando et al., 2005). Il a été observé que la souche *P. fluorescens CHA0* libère le cyanure d'hydrogène et inhibe la croissance de *Thielaviopsis basicola* (Voisard et al., 1989).

En outre, plusieurs paramètres affectent la quantité et la composition des molécules volatiles produites par les microorganismes, il s'agit ; des conditions de culture ; de l'état physiologique du microorganisme producteur ; de la disponibilité d'oxygène ; de l'humidité ; de la température et du pH (Schmidt et al., 2005). La germination des spores fongiques et la croissance mycélienne peuvent être inhibées par les composés volatiles bactériens, ces composés ont aussi la capacité de changer la morphologie des champignons, et l'activité enzymatique. La sensibilité aux composés volatiles peut fortement varier entre les espèces fongiques et l'importance de l'inhibition dépend de l'interaction bactérie-champignon. La sensibilité élevée des oomycètes (exemple *Pythium*) aux substances volatiles peut être liée à la composition et à la structure de leur paroi cellulaire.

A ce jour cependant, très peu de détails sont connus sur la résistance fongique aux substances volatiles (Schmidt et al., 2005). Par ailleurs, une souche de *Bacillus* et une autre de *Pseudomonas* sont testées pour leurs composés volatiles produits à l'égard d'une souche d'*Aspergillus flavus* par la méthode en double culture. Les résultats ont révélé une inhibition significative de ce champignon par rapport au contrôle, les substances volatiles en question ont inhibé remarquablement la croissance mycélienne, la sporulation et la germination des conidies (Mannaa et al., 2017). Des études plus approfondies réalisées par Giorgio et al. (2015) sur l'effet des métabolites volatiles purifiés sur les champignons pathogènes ont montré une granulation du cytoplasme des hyphes, suivie d'une altération ultra-structurale des organites cellulaires, principalement : les membranes, les mitochondries et le réticulum endoplasmique. D'après ces auteurs, les membranes sont apparues comme les premières cibles des composés volatiles bactériens.

## Conclusion

Dans ce travail, la sélection des bactéries est effectuée au préalable sur la base de la présence de meilleurs traits PGP et la production de substances antifongiques, il s'agit donc de la synthèse d'enzymes lytiques (chitinases, lipases, protéases, phosphatase, uréases), la production de la phytohormone AIA, la synthèse de sidérophores chélatrices du fer, et les substances antifongiques de nature volatile, comme l'HCN et l'ammoniac.

Pour une sélection plus poussée, ces différentes bactéries sont identifiées biochimiquement et génétiquement puis testées *in vivo*, sur deux étapes : effet sur le poids frais des plants de tomate et effet stimulateur de la croissance et la germination des petits pois. Les résultats ont révélé que la souche N (Variante de *Pseudomonas protegens*) est meilleure que la souche commerciale utilisée comme souche de référence « *Pseudomonas protegens CHA0* ». Des essais sur les filtrats de culture de cette souche *in vitro* à l'égard des champignons phytopathogènes ont montré la nécessité d'un contact préalable entre les deux (l'activité antifongique est inductible).

Plusieurs essais d'extraction et de purification des molécules à rôle antifongique confirment qu'il s'agit de molécules protéiques, avec un poids moléculaire qui dépasse 30 KDa. A l'exception des sidérophores ayant un faible poids moléculaire, et les antibiotiques qui sont en majorité des peptides ou polypeptides.

Une fois appliquées sur la croissance mycélienne des champignons *A. niger*, *B. cinerea*, *Penicillium* sp. et *Alternaria* sp., les PMR-30 ont montré un effet fongicide à l'égard du dernier champignon.

Pour vérifier la spécificité ou non de l'activité en question, les PM-R30 (protéines membranaires retenues à un poids moléculaire dépassant les 30 KDa) sont testées *in vitro* à l'égard d'autres champignons phytopathogènes cibles, de claires zones d'inhibition sont obtenues pour chaque test.

Cette même fraction est testée pour vérifier sa capacité de réduire la pourriture causée par *A. niger* sur les fruits de deux variétés de tomate ; les résultats ont également exhibé des pourcentages de réduction de la pourriture de 63.9 et 79.30 % pour les deux variétés contre 11.1 et 9.5% pour les deux témoins inoculés avec les spores fongiques seules respectivement.

En guise de perspectives ;

- Tester la souche N (*Pseudomonas protegens*) pour ses activités insecticides, et ses effets sur la bio-remédiation (résistances aux métaux lourds), vu que des souches de *P. protegens* isolées déjà du même puits ont montré des résultats intéressants,
- Identification de / des molécule (s) protéiques responsable (s) de l'activité antifongique,
- Elargir la gamme des plantes testées soit pour la souche soit pour les molécules protéiques extraites,
- Exploiter ce mélange protéique ou la molécule pure dans l'industrie comme biopesticide.

Références bibliographiques

**Abdel-Kader M.M., El-Mougy N.S., DE Aly M. and Lashin. 2012.** Different approaches of bio-control agents for controlling root rot incidence of some vegetables under greenhouse conditions. *Int. J. Agric. For.*, 1 :115–127.

**Adam A. 2008.** Elicitation de la résistance systémique induite chez la tomate et le concombre et activation de la voie de la lipoxygénase par des rhizobactéries non-pathogènes. Thèse de doctorat en Science. Université de Liège, Centre Wallon de Biologie Industrielle, Belgique, 165p.

**Adesemoye A. O. and Egamberdieva D. 2013.** Beneficial Effects of Plant Growth-Promoting Rhizobacteria on Improved Crop Production: Prospects for Developing Economies *In* D.K. Maheshwari et al. (eds.), *Bacteria in Agrobiolgy: Crop Productivity*. P.45 -63.

**Afsharmanesh H. Ahmadzadeh M. and Sharifi-Tehrani A. 2006.** Biocontrol of *Rhizoctonia solani*, the causal agent of bean damping –off by fluorescent pseudomonads. *Commun Agric Appl Biol Sci.* 71 (3Pt B): 1021-9.

**Agrios G.N. 2005.** *Plant Pathology*, fifth ed. Elsevier Academic Press, New York.

**Ahmadzadeh M. and Sharifi Tehrani A. 2009.** Evaluation of fluorescent pseudomonads for plant growth promotion, antifungal activity against *Rhizoctonia solani* on common bean, and biocontrol potential. *Biol. Control*, 48 : 101–107.

**Ahouangninou C. Fayomi B. E. and Martin T. 2011.** Évaluation des risques sanitaires et environnementaux des pratiques phytosanitaires des producteurs maraîchers dans la commune rurale de Tori-Bossito (Sud-Bénin). *Cahiers Agricultures* 20 3: 216–222. DOI: 10.1684/agr.2011.0485.

**Ajouz S. 2009.** Estimation du potentiel de résistance de *Botrytis cinerea* à des bio fongicides. Thèse de doctorat. Université d'Avignon et des pays de Vaucluse. 212p.

**Akkim P.R., Nagendran K., Vanitha S., Karthikeyan G. and Raguchander T. 2013.** Fluorescent Pseudomonads mediated disease management of *Macrophominaphaseolina* inciting *Coleus forskohlii* (Briq.), a root rot pathogen. *Afric. J. Agric. Res.*, 8 38: 4787-4797.

**Al Banna L. Khyami-Horani H. Sadder M. and Abu Zahra S. 2016.** Efficacy of some local *Bacillus thuringiensis* isolates against soil borne fungal pathogens. *Afr. J. Agric. Res.*, 11 19: 1750-1754.

**Alabouvette C. Schippers B. Lemanceau P. and Bakker P.A.H.M. 1998.** Biological Control of *Fusarium* Wilts towards Development of Commercial Products p15-36 In Greg J. Boland; L David KuyKendall (eds.), Plant Microbe Interactions and Biological Control.

**Al-Hinai, A.H., Al-Sadi, A.M., Al-Bahry, S.N., Mothershaw, A.S., Al-Said, F.A., Al-Harathi, S.A., Deadman, M. L., 2010.** Isolation and characterization of *Pseudomonas aeruginosa* with antagonistic activity against *Pythium aphanidermatum*. *J. Plant. Pathol*, 3: 653–660.

**Almeida Machado R.M. and Serralheiro P.R. 2017.** Soil Salinity: Effect on Vegetable Crop Growth Management Practices to Prevent and Mitigate Soil Salinization. *Horticul*, 3 30: 6-13.

**Altieri M.Z., Nicholls C.I. and Fritz M.A. 2005.** Manage insects on your farm: a guide to ecological strategies. Sustainable Agriculture Network, Beltsville, MD.

**Anand R. and Kulothungan S. 2010.** Antifungal metabolites of *Pseudomonas Fluorescens* against Crown Rot Pathogen of *Arachis Hypogaea*. *Ann. of Biolog. Res*, 1 1: 199-207.

**Antoun H. and Prévost D. 2005.** Ecology of Plant Growth Promoting Rhizobacteria. In Siddiqui Z. A. (ed.), *PGPR: Biocont. Biofertil.* p 1-38.

**Baca B.E. and Elmerich C. 2007.** Microbial Production of Plant Hormones. Bacteria and Cyanobacterial Associations. In Elmerich, C., Newton, W. E. (eds.), Associative and Endophytic Nitrogen-fixing Bacteria and Cyanobacterial Associations, pp. 113–143.

**Bach H.J. and Munch J.C. 2000.** Identification of bacterial sources of soil peptidases. *Biol. Fertil. Soils*. 31: 219-224.

**Banani H., Spadaro D.n Zhang D., Matic S., Garibaldi A. and Gullino M.L. 2014.** biocontrol activity of an alkaline serine protease from *Aureobasidium pullulans* expressed in *Pichia pastoris* against four postharvest pathogens on apple. *Inter. J. Food. Microbiol*, 182-183: 1-8.

**Bardgett R. D., Cook R., Yeates G.W. and Denton C.S. 1999.** The influence of nematodes on below – ground processes in grassland ecosystems. *Plant. Soil*, 212:23-33.

**Bar-Shimon M., Yehuda H., Lea Cohen Batia Weiss, Alexandra Kobeshnikov Avinoam Daus, Martin Goldway , Michael Wisniewski. And Drobny S. 2004.** Characterization of extracellular lytic enzymes produced by the yeast biocontrol agent *Candida oleophila*. *Curr. Genet*, 45: 140–148.

**Batool R. and Hasnain S. 2005.** Growth stimulatory effect of *Enterobacter* and *Serratia* Isolated from Biofilms on Plant Growth and Soil aggregation. *Biotechnol*, 4 4: 347-353.

**Bates G.D., Rothrock C.S. and Rupe J.C. 2008.** Resistance of the Soybean Cultivar Archer to *Pythium* Damping-Off and Root Rot Caused by Several *Pythium* spp. *Plant. Di.* 92: 763-766.

**Battu P.R. and Reddy M.S. 2009.** Isolation of secondary metabolites from *Pseudomonas fluorescens* and its Characterization. *Asian J. Research Chem*, 2 1: 26-29.

**Belhadi A., Mehenni M., Reguieg L. and Yakhlef H. 2016.** Pratiques Phytosanitaires des serrotes maraichers de trois localités de l'est des Ziban et leur impact potentiel sur la santé humaine et l'environnement. *Revue. Agric*, 1 09-16.

**Bencheqroun S.K., Bajji M., Massart S., Labhilili M., El Jaafari S and M. Jijakli M.H. 2007.** *In vitro* and *in situ* study of postharvest apple blue mold biocontrol by *Aureobasidium pullulans*: Evidence for the involvement of competition for nutrients. *Postharvest. Biolog. Technol*, 46: 128–135.

**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 A. Mira-Bejaia. 227p.

**Bensidhoum L., Nabti El-H., Tabli N., Kupfers chmied P., Weiss A., Rothballer M., Schmid M., Keel C. et Hartmann A. 2016.** Heavy metal tolerant *Pseudomonas protegens* isolates from agricultural well water in northeastern Algeria with plant growth promoting, insecticidal and antifungal activities. *Eur. J. Soil. Biol.* 75, 38–46.

**Bharucha U., Patel K. and Trivedi U.B. 2013.** Optimization of Indole Acetic Acid Production by *Pseudomonas putida* UBI and its Effect as Plant Growth-Promoting Rhizobacteria on Mustard (*Brassica nigra*). *Agric. Res*, 2 3: 215–221.

**Blakeman J.P and Fokkema N.J. 1982.** Potential for Biological Control of Plant Diseases on the Phyloplane. *Ann. Rev. Phytopathol.* 20: 167-92.

**Boivin G. 2001.** Parasitoïdes et lutte biologique: Paradigme ou panacée ? Centre de recherche et de développement en Horticulture, Agriculture et Agroalimentaire Canada, Vertigo- La revue en sciences de l'environnement sur le web2.

**Boller E.F., Häni F. and Poehling H-M. 2004.** Ecological infrastructures: ideabook on functional biodiversity at the farm level, temperate zones of Europe. IOBCwper, Commission on Integrated Production Guidelines and Endorsement, Switzerland.

**Bouizgarne B. 2013.** Bacteria for Plant Growth Promotion and Disease Management. In D.K. Maheshwari (eds.), Bacteria in Agrobiolgy: Disease Management DOI 10.1007/978-3-642-33639-3\_2, # Springer-Verlag Berlin Heidelberg.

**Bradford, M.M., 1976.** A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem.* 72, 248–254.

**Bric, J. M., Bostock, R. M. and Silverstone, S. E. 1991.** Rapid in Situ Assay for Indole Acetic Acid Production by Bacteria Immobilized on a Nitrocellulose Membrane. *Appl. Environ. Microbiol*, 57 2: 535-538.

**Brunton V. and Ourimbah. 2011.** Irrigation Water quality, Agriculture NSW-Field Vegetables, Primefact 1164 1<sup>st</sup> edition, 1-3.

**Brurberg M.B., Ingolf F. Nes and Vincent G.H.E. 1996.** Comparative studies of chitinases A and B from *Serratia marcescens*. *Microbiol*, 142: 1581–1589.

**Calvo J., Calvente V., de Orellano M.E., Benuzzi D. and Sanz de Tosetti M.I. 2007.** Biological Control of Harvest Spoilage caused by *Penicillium expansum* and *Botrytis cinerea* in apple by using the bacterium *Rhanella aquatica*. *Inter. J. Food Microbiol*, 113: 251-257.

**Campos V.P., de Pinho R.S. C. and Freire E.S. 2010.** Volatiles Produced by Interacting Microorganismes potentially useful for the control of Plant Pathogens. *Ciênc. agrotec. Lavras*, 34 3: 525-535.

**Capuccino J.C. and 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.

**Carrim, A. J. I., Barbosa E.C. and Gonçalves Vieira J.D. (2006).** Enzymatic Activity of Endophytic Bacterial Isolates of *Jacaranda decurrens* Cham. (Carobinha-do-campo). *Braz. Arch. Biolog. Technol*, 49: 353-359.

**Chainharn M. and Lumyong S. 2009.** Phosphate Solubilization Potential and stress tolerance of rhizobacteria from rice soil in Northern Thailand. *World. J. Microbiol. Biotechnol*, 25 305-314.

**Chandra H., Dobhal P., Patni B. and Nautiyal A.R. 2016.** Antagonistic effect of *Pseudomonas* spp. isolated from rhizospheric soil of Picrorhizakurroo (kutki) against phytopathogenic fungi. *Medic. Plants*, 8 4: 328-333.

**Chang W.T., Chen C-S. and Wang S-L. 2003.** An Antifungal Chitinase Produced by *Bacillus cereus* With Shrimp and Crab Shell Powder as a Carbon Source. *Current Microbio*, 47: 102-108.

**Christensen W.B. 1946.** Urea Decomposition as a Means of Differentiating Proteus and Paracolon Cultures from Each Other and from *Salmonella* and *Shigella* Types. *J. Bacteriolog*, 52:461-466.

**Chung K.T. and Ferris D.H. 1996.** Martinus Willem Beijerinck (1851-1931) Pioneer of General Microbiology. *A.S.M News*, 62:10 539-543.

**Compant S., Brader G., Muzammil S., Sessitsch A. and Lebrihi A. 2013.** Use of beneficial bacteria and their secondary metabolites to control grapevine pathogen diseases. *Bio. Control*, Springer Verlag, 58 4: 435-455.

**Compant S., Duffy B., Nowak J., Cle´ment C. and Essai`dAitBarka. 2005.** Use of Plant Growth-Promoting Bacteria for Biocontrol of Plant Diseases: Principles, Mechanisms of Action, and Future Prospects. *Appl. Environ. Microbiol*, 71: 9 4951–4959.

**Costa F.G., Zucchi T.D. and de Melo I.S. 2013.** Biological Control of Phytopathogenic Fungi by Endophytic Actinomycetes Isolated from Maize (*Zea mays* L.), Braz. Zrch. *Biol. Technol*, 56 6: 948-955.

**Couillerot O., Prigent-Combaret C., Caballero-Mellado J. and Moënne-Loccoz.Y. 2009.** *Pseudomonas fluorescens* and closely-related fluorescent pseudomonads as biocontrol agents of soil-borne phytopathogens. J. compilation., *Letters .Appl. Microbiol*, 48: 505–512.

**Cox D. 1995.** Water Quality: pH and Alkalinity, Plant and Soil Sciences, University of Massachusetts, Amherst. The Center for Agriculture, Food and the Environment

**Cui T-B., Chai H-Y and Jiang L-X. 2012.** Isolation and Partial Characterization of an Antifungal Protein Produced by *Bacillus licheniformis* BS-3. *Molecules*, 17: 7336-7347; doi: 10.3390/molecules17067336.

**Danielsson. J. 2008.** *BACILLUS* BASED BIOCONTROL ON BRASSICA. Doctoral Thesis Swedish University of Agricultural Sciences Uppsala, 39p.

**De Cal A., Sagasta E.M. and Melgarejo P. 1987.** Antifungal Substances Produced by *Penicillium frequentans* and Their Relationship to the Biocontrol of *Monilinia laxa*. *Phytopathol*, 78: 888-893.

**De Vleeschauwer D. and Höfte. M. 2007.** Using *Serratia plymuthica* to control fungal pathogens of plants. *AB Reviews: Perspectives in Agriculture, Veterinary Science, Nutrition. Natural. Resources*, 2: 046 1-12.

**Dehne. H- W.2012.** Biological control of leaf pathogens of tomato plants by *Bacillus subtilis* (strain FZB24): antagonistic effects and induced plant resistance. Thèse de doctorat. 155p.

**Dewi T.K., Agustiani D. and Antonius S. 2017.** “Secondary Metabolites Production by Actinomycetes and their Antifungal Activity” *ICBS Conference Proceedings, International Conference on Biological Science (2015)*, KnE Life Sciences, 256–264. DOI 10.18502/cls.v3i4.713.

**Dhinakaran A., Rajasekaran R. and S. Jayalakshmi. 2012.** Antiphytopathogenic activity of bacterial protein of a marine *Corynebacterium sp.* isolated from Mandapam, Gulf of Mannar. *J. Biopest*, 5 (Supplementary): 17-22.

**Di Pietro A., Lorito M., Hayes C.K. and Broadway R.M. 1993.** Endochitinase from *Gliocladium virens*: Isolation, characterization, and Synergistic antifungal activity in combination with gliotoxin. United states. National Technical Information Service.

**DIB H. 2010.** Rôle des ennemis naturels dans la lutte biologique contre le puceron cendré, *Dysaphis plantaginea* Passerini (Hemiptera: Aphididae) en vergers de pommiers. Thèse de Doctorat. Université d’Avignon et des Pays de Vaucluse. 252p

**Dimova M.A., Büttner C., Gabler J., Grosch R., Bar-Yosef B. and Klring, H-P., 2010.** Control of root zone pH is not effective in preventing *Pythium aphanidermatum* disease in cucumber. *J. Plant. Dis. Prot*, 62: 44–247.

**Donmez M.F., Esitken A. Yildiz H. and Ercisli S. 2011.** Biocontrol of *Botrytis cinerea* on strawberry fruit by Plant Growth Promoting Bacteria. *J. Anim. Plant. Sci*, 21 4: 758-763.

**Dyakov Yu. T., Dzhavakhiya V.G. and Korpela.T. 2007.** Comprehensive and Molecular Phytopathology. 1<sup>st</sup> edition, 497p.

**Edreva A. 2004.** A novel strategy for plant protection: Induced resistance. *Cell. Molec. Biolog*, 3: 61-69.

**Edwards S.G., Young J. P. and Fitter A.H. 1998.** Intercations between *Pseudomonas fluorescens* biocontrol agents and *Glomus mosseae*, an arbuscular mycorrhizal fungus with the rhizosphere, *FEMS. Microbiol. Letters*, 166: 297-303.

**Edwards U., Rogall T., Blocker H., Emde M. and Bottger E.C. 1989.** Isolation and direct complete nucleotide determination of entire genes: characterization of a gene coding for 16S ribosomal RNA, *Nucleic. Acids. Res*, 17:7843–7853.

**Elmhirst J. 2006.** Profil de culture des tomates de serre au Canada. Programme de réduction des risques liés aux pesticides. Centre pour la lutte antiparasitaire Agriculture et Agroalimentaire Canada. Agriculture and Agri Food Canada.

**Eilenberg J. 2006.** Concepts and Visions of Biological Control. In J. Eilenberg and H.M.T. Hokkanen (eds.), an Ecological and Social Approach to Biological Control, 1-11.

**Elad Y. and Baker R. 1985.** The role of competition for iron and carbon in suppression of chlamydospore germination of *Fusarium* spp. by *Pseudomonas* spp. *Phytopathol*, 75: 1053–1059.

**Elad Y. and Freeman S. 2002.** Biological control of fungal plant pathogens. In: (eds.) Kempken, F., The Mycota, A comprehensive Treatise on Fungi as Experimental Systems for Basic and Applied Research. XI. Agricultural Applications. Springer, Heidelberg, Germany. pp 93-109.

**Elad Y. and Stewart. 2007.** Microbial control of *Botrytis* spp In Y. Elad, B. Williamson, P. Tudzynski and N. Delen (eds.), *Botrytis: Biology, pathology and control*.

**Elad Y. and Kapat A. 1999.** The Role of *Trichoderma harzianum* Protease in the Biocontrol of *Botrytis cinerea*. *Europ. J. Plant. Pathol*, 105 2: 177-189.

**El-Gamal N. G., Shehata A. N., Hamed E.R. and Shehata H. S.2016.** Improvement of Lytic Enzymes Producing *Pseudomonas fluorescens* and *Bacillus subtilis* Isolates for Enhancing their Biocontrol Potential against Root Rot Disease in Tomato Plants. *Resea. J. Pharma. Biolog. Chemic. Sci*, 7: 1.

**Elmer P. A. G. and Reglinski.T. 2006.** Biosuppression of *Botrytis cinerea* in grapes. *Plant. Pathol*, 55: 155–177.

**El-mohamedy R.S.R. and El-mougy N.S. 2009.** Occurrence of *Pythium* rot of chinese cabbage in egypt and its biocontrol measures. *J. Plant .Protect. Res. Appl. Environ. Microbiol*, 3: 1067–1071.

**Essghaier B., Fardeau M.L., Cayol J.L., Hajlaoui M.R., Boudabous A., Jijakli H. and Sadfi-Zouaoui N. 2009.** Biological Control of Grey Mould in strawberry fruits by halophilic bacteria. *J. Appl. Microbiol*, 106: 833-846.

**Essghaier B., Hedi1 A., HajlaouiM. R., Boudabous A. and Sadfi-Zouaoui. N. 2012.** *In vivo* and *in vitro* evaluation of antifungal activities from a halotolerant *Bacillus subtilis* strain J9. *Afr. J. Microbiolog. Res*,6 19: 4073-4083.

**Etebarian H. R. 2006.** Evaluation of *Trichoderma* Isolates for Biological Control of Charcoal Stem Rot in Melon Caused by *Macrophomina phaseolina*. *J. Agric. Sci. Technol*, 8: 243-250.

**Farag A.M., Abd-Elnabey H.M., Ibrahim H. A.H., El-Shenawy M. 2016.**Purification, characterization and antimicrobial activity of chitinase from marine-derived *Aspergillus terreus*. *Egypt. J. Aqua. Res*, 42: 185–192.

**Felsenstein J. 1981.** Evolutionary trees from DNA sequences: a maximum likelihood Approach. *J. Mol. Evol*, 17: 368-376.

**Fernandez-Acero F.J., Carbu M., Garrido C., Vallejo. I. and M.J Cantoral. 2007.** Proteomic Advances in Phytopathogenic Fungi. *Current Proteomics*, 4: 79-88.

**Fernando W.G.D., Nakkeeran S. and Zhang Y. 2005.** Biosynthesis of Antibiotics by PGPR and its Relation in Biocontrol of Plant Diseases. *In Z. A. Siddiqui (eds.), PGPR: Biocontrol and Biofertilization*, 67–109.

**Fialho M.B., Ferreira L.F.R., Monteiro R.T.R. and Pascholati S.F. 2011.** Antimicrobial volatile organic compounds affect morphogenesis related enzymes in *Guignardia citricarpa*, caused agent of citrus black spot. *Biocon. Sci. Technol*, 21:7 797-807.

**Filonow A. B. 2010.** Role of Competition for Sugars by Yeasts in the Biocontrol of Gray Mold of Apple. *Biocon. Sci. Techno*, 8 2: 243-256

**Filonow A.B.1998.** Role of competition for sugars by yeasts in the biocontrol of gray mold of apple, *Biocon Sci.Technol*, 8: 243-256.

**Fiume F. and Fiume G. 2006.**Biological control of *Botrytis* gray mouldon tomato cultivated in green house. *Comm. Appl. Biol. Sci*, Ghent University, 71/3b.897.

**Flood J. 2010.** The importance of plant health to food security. *Food Sec*, 2:215–231.DOI 10.1007/s12571-010-0072-5.

**Ganeshan G. and Kumar A. M. 2005.** *Pseudomonas fluorescens*, a potential bacterial antagonist to control plant diseases, *J. Plant. Intera*, 1 3: 123-134.

**Garrido-Sanz D., Meier-Kolthoff J.P., Göker M., Martin M., Rivilla R. and Redondo-Nieto M. 2016.** Genomic and Genetic Diversity within the *Pseudomonas fluorescens* Complex. *PLoS ONE* 11: doi: 10.1371/journal.pone.0150183.

**Ghodsalavi B., Ahmadzadeh M., Soleimani M., Madloo P.B and Taghizad-Farid R. 2013.** Isolation and characterization of rhizobacteria and their effects on root extracts of *Valeriana officinalis*. *Aust. J. Crop. Sci.* 7 3: 338-344.

**Gholamnejad J., Etebarian H.R., Sahebani N.A. and Roustae A. 2009.** Characterisation of Biocontrol Activity of Two Yeast Strains from Iran against Blue Mould of Apple in Order to Reduce the Environmental Pollution. *J. Int. Environ. Appli. Sci.* 4 1: 28-36.

**Giorgio A. DeStradis A. Pietro LoCantore and Nicola S. Iacobellis. 2015.** Biocide effects of volatile organic compounds produced by potential biocontrol rhizobacteria on *Sclerotinia sclerotiorum*. *Frontiers in Microbiology*, 6: 1- 13 doi: 10.3389/fmicb.2015.01056.

**Glick B.R. and Bashan Y. 1997.** Genetic Manipulation of Plant Growth Promoting Bacteria to Enhance Biocontrol of Phytopathogens, *Biotechnol Advances*, 15 2: 353-378.

**Glick. B. R. 2012.** Plant Growth-Promoting Bacteria: Mechanisms and Applications. *Hindawi Publishing Corporation Scientifica*. <http://dx.doi.org/10.6064/2012/963401>.

**Gogliettino M., Balestrieri M., Pocsfalvi G., Fiume I., Natale L., Rossi M. and Palmieri G. 2010.** A highly selective oligopeptide binding protein from the archaeon *Sulfolobus solfataricus*. *J. Bacteriol.* 192: 3123–3131.

**Gohel, V., Singh, A., Vimal, M., Ashwini, P., Chhatpar, H.S., 2006.** Bioprospecting and antifungal potential of chitinolytic microorganisms. *Afr. J. Biotechnol.* 2: 54–72.

**Griffiths B. S. 1990.** A comparison of microbial –feeding nematodes and protozoa in the rhizosphere of different plants. *Biol. Fertil Soils.* 9:83-88.

**Grimont P., Grimont F., Dulongderos H.L.C. and Sneath P.H.A. 1977.** Taxonomy of genus *Serratia*. *J. General Microbiol*, 98: 39-66.

**Guinebretiere M. H., Nguyen-the C., Morrison N., Reich M. and Nicot. P. 2000.** Isolation and Characterization of Antagonists for the Biocontrol of the Postharvest

Wound Pathogen *Botrytis cinerea* on Strawberry Fruits. *J. Food. Protect*, 63: 3 386–394.

**Guiraud J. P. and Galzy P. 1980.** L'analyse microbiologique dans les industries alimentaires. Edi Usine.Paris.239p.

**Haggag,W.M. and Mohamed, H.A.-L.A., 2007.** Biotechnological aspects of microorganisms used in plant biological control. *Am.-Eurasian J. Sustain. Agric.* 1: 7–12.

**Hamamoto T., Kaneda M., Horikoshi K. and Kudo T.1994.** Characterization of a Protease from a Psychrotroph, *Pseudomonas fluorescens* 114. *Appl. Environ. Microbiol*, 60 10: 3878-3880.

**Hammami I., Siala R., Jridi M., KtariN., NasriM. and M.A. Triki. 2013.** Partial purification and characterization of chiIO8, a novel antifungal chitinase produced by *Bacillus cereus IO8*.*Appl. Microbiol*, ISSN 1364-5072.

**Handelsman J. and Stabb E.V. 1996.** Biocontrol of Soilborne Plant Pathogens. *The Plant Cell*, 8: 1855-1869.

**Hardie M. and Doyle R. 2012.** Measuring Soil Salinity. *In: S. S. and C. T. A. (eds.) Plant Salt Tolerance: Methods and Protocols, Methods in Molecular Biology vol 913.* Springer Science+Business Media LLC, Netherlands. pp. 415-425

**Harman G.E. and Shoresh. 2007.** The Mechanisms and Applications of Symbiotic Opportunistic Plant Symbionts. *In M. Vurro and J. Gressel (eds.), Novel Biotechnologies for Biocontrol Agent Enhancement and Management.*p131-155.

**He D., Zheng X.D., Yin Y.M., Sun P. and Zhang H.Y. 2003.** Yeast application for controlling apple postharvest diseases associated with *Penicillium expansum*, *Bot. Bull. Acad. Sin.* 44: 211-216.

**Hernández-Salmerón J.E., Moreno-Hagelsieb G. and Santoyo G. 2017.** Genome Comparison of *Pseudomonas fluorescens* UM270 with Related Fluorescent Strains Unveils Genes Involved in Rhizosphere Competence and Colonization. *J.Genom*, 5: 91-98.

**Höfte M. and Bakker P.A.H.M. 2007.** Competition for Iron and Induced Systemic Resistance by Siderophores of Plant Growth Promoting Rhizobacteria. *In Varma, A., Chincholkar, S.B. (eds.), Microbial siderophores.* p121–133.

**Howell C. R. 2003.** Mechanism Employed *Trichoderma* Species in the Biological Control of Plant Diseases: The History and Evolution of Current Concepts. *Plant. Disease*, 87: 1 4-10.

**Hryniewicz K. and Baum. C. 2011.** The Potential of Rhizosphere Microorganisms to Promote the Plant Growth in Disturbed Soils. *In* A. Malik, E. Grohmann (eds.), Environmental Protection Strategies for Sustainable Development, Strategies for Sustainability.

**Huang C-J., Wang T-K., Chung S-C. and Chen C-Y. 2005.** Identification of an Antifungal Chitinase from a Potential Biocontrol Agent, *Bacillus cereus* 28-9. *J. Biochem. Molec. Biolog*, 83 1: 82-88.

**Humphris S.N., Bruce A., Buultjens E. and Wheatley R.E. 2002.** The effects of volatile microbial secondary metabolites on protein synthesis in *Serpula lacrymans*. *FEMS. Microbiol. Lett.* 210: 215-219.

**Huston A.L., Methe B. and Deming J.W. 2004.** Purification, Characterization, and Sequencing of an Extracellular Cold-Active Aminopeptidase Produced by Marine Psychrophile *Colwellia psycherythraea* Strains 34H. *Appl. Environ. Microbiol*, 70 6: 3321-3328.

**Islam M.R., Jeong Y.T., Lee Y.S. and Song C.H., 2016.** Isolation and identification of associated bacterial isolates against soil-borne diseases of tomato and pepper caused by *Sclerotinia sclerotiorum* and *Rhizoctonia solani*. *Pakistan J. Biol. Sci.* 8, 43-48.

**Izallalen M. 1997.** Production des sidérophores chez le rhizobium et leurs rôles dans l'inhibition de certains champignons phytopathogènes. Thèse d'obtention de grade maître en science. Université Laval. 85p.

**James J.R., Tweedy B.G., and Newby L.C. 1993.** Effort by industry to improve the environmental safety of pesticides. *AM. Rev. Phytopathol*, 31: 423-439.

**James R.L., Dumroese R.K. and Wenny D.L. 2002.** Principles and Potential for Biocontrol of Diseases in Forest and Conservation Nurseries. 10p.

**Janisiewicz W.J. and Korsten L. 2002.** Biological Control of Postharvest Diseases of Fruits. *Annu. Rev. Phytopathol*, 40: 411-41.

**Janisiewicz, W. J. and Roitman, J. 1988.** Biological control of blue mold and gray mold on apple and pear with *Pseudomonas cepacia*. *Phytopathol*, 78:1697-1700.

**Janisiewicz W.J. 1988.** Biocontrol of Postharvest Diseases of Apples with Antagonist Mixtures. *Phytopathol*, 78: 194-198.

**Jeon J.S., Lee S-S., Kim H-Y., Ahn T-S. and Song H-G. 2003.** Plant Growth Promotion in Soil by Some Inoculated Microorganisms. *J. Microbiol*, 41 4: 271-276.

**Jijakli M. H., Lepoivre P. and Gre vess. C. 1999.** Yeast species for Biocontrol of Apple Postharvest Diseases: an encouraging case of study for practical use. *In* Mukerji et al (eds.), *Biotechnological Approaches in Biocontrol of Plant Pathogens*, Kluwer Academic / Plenum Publishers, New York. p. 31-49.

**Jijakli M.H. 2011.** *Pichia anomala* in biocontrol for apples 20 years of fundamental research and practical applications. *Antonie van Leeuwenhoek*, 99: 93-105.

**Jourdheuil P., Grison P. and Fraval A. 2002.** La lutte biologique : un aperçu historique. INRA (Institut National de la Recherche Agronomique), Laboratoire de Zoologie, Le Courrier de l'Environnement de l'INRA n°15.

**Jousset A., Lara E., Wall L.G. and Valverde C. 2006.** Secondary Metabolites Help Biocontrol Strain *Pseudomonas fluorescens* CHA0 To Escape Protozoan Grazing, *Appl. Environ. Microbiol*, 72 11: 7083-7090.

**Kageyama K. and Nelson E.B. 2003.** Differential inactivation of Seed Exudate Stimulation of *Pythium ultimum* Sporangium Germination by *Enterobacter cloacae* Influences Biological Control Efficacy on Different Plant Species. *Appl. Environ. Microbiol*, 69 2: 1114-1120.

**Kamensky M., Ovadis M., Chet I. and Chernin L. 2003.** Soil-borne strain IC14 of *Serratia plymuthica* with multiple mechanisms of antifungal activity provides biocontrol of *Botrytis cinerea* and *Sclerotinia sclerotiorum* diseases. *Soil. Biol. Biochem*, 35: 323-331.

**Kamil Z., Rizk M., Saleh M. and Moustafa S. 2007.** Isolation and identification of rhizosphere soil chitinolytic bacteria and their potential in antifungal biocontrol. *Glob. J. Mol. Sci.* 2: 57-66.

**Kannan V.R., Bastas K.K. and Antony R. 2015.** Plant Pathogenic Bacteria An Overview. *In* V.R. Kannan K.K. Bastas (eds.), *Sustainable Approaches to controlling Plant Pathogenic Bacteria*. p1-15.

**Karkaci N. E., MKihal G. S. and Henni J. E. 2010.** Biological Control of *Fusarium oxysporum* f.sp.lycopersici Isolated from Algerian Tomato by *Pseudomonas fluorescens*, *Bacillus cereus*, *Serratia marcescens* and *Trichoderma harzianum*. *Res. J. Agro*, 2:31-34.

**Khabbaz S.E. and Abbasi P.A. 2014.** Isolation, characterization, and formulation of antagonistic bacteria for the management of seedlings damping off and root rot disease of cucumber. *Can .J. Microbiol*, 60: 25-33.

**Khare A., Singh B.K. and Upadhyay R.S. 2010.** Biological Control of *Pythium aphanidermatum* causing damping-off of mustard by mutants of *Trichoderma viride* 1433. *J. Agric. Technol.* 62: 231–243.

**Khleekorn S. and Wongrueng S. 2014.** Evaluation of antagonistic bacteria inhibitory to *Colletotricum museae* on banana. *J. Agric. Technol.*, 10 2: 383-90.

**King E.B. and Parke J.L. 1993.** Biocontrol of *Aphanomyces* root rot and *Pythium* damping-off by *Pseudomonas capacia* AMMD on four pea cultivars. *Plant Dis.* 77: 1185-1188.

**Kloepper J.W. 1994.** Plant Growth Promoting Rhizobacteria. In Okon Y. (eds.), *Azospirillum /Plant Associations*. CRC Press, Boca Raton, FL, pp.137-166.

**Kloepper J.W., Lifshitz R. and Zablutowicz R.M. 1989.** Freelifving bacterial inocula for enhancing crop productivity. *Trends in Biotechnol.*, 7: 39-43.

**Knowles C.J. 1976.** Microorganisms and Cyanide. *Bacteriolo. Reviews* , 40 3: 652-680.

**Konradsen F., Vanser Hoek W., Cole D.C., Hutchinson G., Daisly H., Singh S. and Eddleston M. 2003.** Reducing acute poisoning in developing countries-options for restricting the availability of pesticides. *Toxico*, 192: 249-261.

**Kopečný J., Hodrová B. and Stewart C. S. (1996).** The isolation and characterization of a rumen chitinolytic bacterium. *Lett. Appl. Microbiol.* 23: 195-198.

**Kraus J. and Loper J.E., 1992.** Lack of evidence for a role of antifungal metabolite production by *pseudomonas fluorescens* Pf-5 in biological control of *pythium* damping off of cucumber. *Mol. Plant. Path.* 82: 264–271.

**Kumar M. and Ashraf S. 2017.** Role of *Trichoderma* spp. as a Biocontrol Agent of Fungal Plant Pathogens. In Kumar V., Kumar M., Sharma S., Prasad R. (eds.), *Probiotics and Plant Health*. Springer, Singapore.

**Ladwal A., Bhatia D. and Malik D.K. 2012.** Effect of coinoculation of *Mesorhizobium cicer* with PGPR on *Cicer arietinum*. *Aust. J. Basic Appl. Sci.*, 6 9: 183-187.

**Leroux P. 2007.** Chemical control of *Botrytis* and its resistance to chemical fungicides In Y. Elad, B. Williamson, P. Tudzynski and N. Delen (eds.), *Botrytis: Biology, pathology and control*.

**Levenfors J. 2003.** Soil-borne Pathogens in Intensive Legume Cropping – *Aphanomyces* spp. and root rots. Doctoral thesis Swedish University of Agricultural Sciences Uppsala. 54 p.

**Lim H.S., Kim Y.S. and Kim S.D.1991.** *Pseudomonas stutzeri* YPL-1 Genetic Transformation and Antifungal Mechanism against *Fusarium solani*, an Agent of Plant Root Rot. *Appl. Environ. Microbiol*, 57:510-6.

**Lima G. S., De Curtis A.F. and Arras. G. 1999.** Influence of antagonist, host fruit and pathogen on the biological control of postharvest fungal diseases by yeasts *J. Indus. Microbiol. Biotechnol*, 23: 223–229.

**Liu L., Kleopfer J.W. and Tuzum S. 1995.** Induction of Systemic Resistance in Cucumber against *Fusarium* Wilt by Plant Growth-Promoting Rhizobacteria *Phytopathology*, 85: 695-698.

**Liu W-w, Mu W, Zhu B-y, Du Y-c, Liu F. 2008.** Antagonistic Activities of Volatiles from Four Strains of *Bacillus* spp. and *Paenibacillus* spp. against Soil-Borne Plant Pathogens. *Agricul. Sci. in China*, 7 9: 1104-1114.

**Lo C.T. 1998.** General mechanisms of action of microbial biocontrol agents. *Plant Pathol. Bull.* 7:155-166.

**Lo Cantore P., Giorgio A. and Iacobellis N.S .2015.** Bioactivity of volatile organic compounds produced by *Pseudomonas tolaasii*. *Frontiers in Microbiology*.6: 1-14doi: 10.3389/fmicb.2015.01082.

**Longbottom C.J., Carson C.F., Hammer K. A., Mee B. J. and Riley T. V. 2014.** Tolerance of *Pseudomonas aeruginosa* to *Melaleuca alternifolia* (tea tree) oil is associated with the outer membrane and energy-dependent cellular processes. *J. Antimicrob. Chemoth*, 54: 386–392.

**Lorck, H., 1948.** Production of hydrocyanic acid by bacteria. *Physiol. Plant*, 1: 142-146.

**Lorito M., Harman G.E., Hayes C.K., Broadway R.M., Tronsmo A., Woo S.L. and Di Pietro A.1993.** Chitinolytic enzymes Produced by *Trichoderma harzianum*: Antifungal Activity of Purified Endochitinase and Chitobiosidase, *Phytopathol*, 83: 302-307.

**Lorito M., Peterbauer C., Hayes C.K. and Gary E. Harman. 1994.** Synergistic interaction between fungal cell wall degrading enzymes and different antifungal compounds enhances inhibition of spore germination. *Microbiol*, 140: 623-629.

**Lu C.C., Liu W.C., Qiu J.Y., Wang H.M., Liu. T. and Liu. D.W. 2008.** Identification of an antifungal metabolite produced by a potential biocontrol actinomycetes strain A01. *Braz. J. Microbiol*, 39: 701-707.

**Mackie A.E. and Wheatley R.E. 1999.** Effects and incidence of volatile organic compounds interactions between soil bacterial and fungal isolates, *Soil Biol Biochem*, 31: 375-385.

**Mafia R.G., Alfenas A.C., Maffia L. A., Ferreira E.M., Binoti D. H. B. and Mafia G.M.V. 2009.** Plant growth promoting rhizobacteria as agents in the biocontrol of eucalyptus mini-cutting rot. *Trop. Plant. Pathol*, 34: 1 010-017.

**Maheshwari U.N. and Vidhya K. 2016.** Antagonistic Effect of *Trichoderma* Species against Various Fruit Pathogens. *Int. J. Pharm. Sci. Rev. Res*, 36 1: 167-172.

**Maleki M., Mostafae S., Mokhtarnejad L. and Farzaneh M. 2010.** Characterization of *Pseudomonas fluorescens* strain CV6 isolated from cucumber rhizosphere in Varamin as a potential biocontrol agent. *Aust. J. Crop. Sci*, 9: 676-683.

**Malik D.M. and Sindhu S.S. 2011.** Production of indole acetic acid y *Pseudomonas* sp.: effect of coinoculation with *Mezorhizobium* sp. Ciceron nodulation and plant growth of chickpea (*Cicer arietinum*). *Physiol. Mol. Biol. Plants*, 17 1: 25-32.

**Mandal S. and Ray R.C. 2011.** Induced Systemic resistance in Biocontrol of Plant Diseases In A. Singh et al. (eds.), Bioaugmentation, Biostimulation and Biocontrol, soil Biology. p241-260.

**Manidipa R., Dutta S.G. and Venkata. R.Ch.2013.** Pseudomonads: Potential Biocontrol agents of Rice Diseases. *Res. J. Agri. Forest. Sci*, 1 9: 19-25.

**Mannaa M., Ji Yeon Oh, and Kim K.D. 2017.** Biocontrol Activity of Volatile-Producing *Bacillus megaterium* and *Pseudomonas protegens* against *Aspergillus flavus* and Aflatoxin Production on Stored Rice Grains. *Mycobiol*, 45 3: 213-219.

**Mansoor F., Sultana V. and Ehteshamul-Haques S. 2007.** Enhancement of Biocontrol Potential of *Pseudomonas aeruginosa* and *Paecilomyces lilacinus* against Root rot of Mungbean by a Medicinal plant *Launaea nudicaulis* L. *Pak. J. Bot*, 39 6: 2113-2119.

**Manwar A.V., Khandelwal S.R., Chaudhari B.L., Meyer J.M. and Chinkolkar S.B. 2004.** Siderophore Production by Marine *Pseudomonas aeruginosa* and its Antagonistic Action Against Phytopathogenic Fungi . *Appl. Biochem. Biotechnol*, 118 : 243-251.

**Mathieu C. and Pielain F. 2003.** Prélèvement et préparation des échantillons de terre, *In* Analyse chimique des sols « méthodes choisies » Edition TEC&DOC. p1-22.

**Meena B. 2014.** Biological Control of Pest and Diseases Using Fluorescent Pseudomonads. *In* K. Sahayaraj (eds.), Basic and Applied Aspects of Biopesticides, p17-29.

**Mercado-Blanco J. and Bakker P.A.H.M. 2007.** Interactions between plants and beneficial *Pseudomonas* spp.: exploiting bacterial traits for crop protection. *Antonie Van Leeuwenhoek*, 924:367-89.

**Mercado-Blanco J. 2015.** *Pseudomonas* Strains that Exert Biocontrol of Plant Pathogens. *In* J-L. Romas et al (eds.), *Pseudomonas*, p121-172.

**Mohites B. 2013.** Isolation and characterization of indole acetic acid (IAA) producing bacteria from rhizospheric soil and its effect on plant growth. *J. Soil. Sci. Plant Nutri*, 13 3: 638-649.

**Morandi M. A.B., Sutton J. C. and Maffia L.A. 2000.** Effects of host and microbial factors on development of *Clonostachys rosea* and control of *Botrytis cinerea* in rose. *Europ. J. Plant Pathol*, 106: 439-448.

**Múnera J.D.C. and Hausbeck M.K. 2016.** Characterization of *Pythium* Species associated with greenhouse floriculture crops in Michigan. *Plant. Dis*, 3: 569–576.

**Murate L.S., de Oliveiral A.G., Higashil A.Y., Barazettil A.R., Simionatol A.S., da Silval C.S., Simõesl G.C., dos Santosl I.M.O., Ferreiral M.R., Celyl M.V.T., Nvarrol M.O.P., de Freitas V.F., Nogueira M.A., de Mello J.C.P., Leite Jr R.P. and Andrade G. 2015.** Activity of Secondary Bacterial Metabolites in the Control of Citrus Canker. *Agricul. Sci*, 6: 295-303.

**Nabti E.H., Bensidhoum L., Tabli N., Dahel D., Weiss A., Rothballer M., Schmid M. and 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. *Europ. J. Soil Biolog*, 61: 20-26.

**Nagamani P., Bhagat S., Biswas M.K. and Viswanath K. 2017.** Effect of volatile and non-volatile Compounds of *Trichoderma* spp. against Soil Borne Diseases of Chickpea. *Int. J. Curr. Microbiol. App. Sci*, 6 7: 1486-1491.

**Nagarajkumar M., Bhaskaran R. and Velazhahan R. 2004.** Involvement of secondary metabolites and extracellular lytic enzymes produced by *Pseudomonas*

*fluorescens* in inhibition of *Rhizoctonia solani*, the rice sheath blight pathogen. *Microbiol. Res*, 159: 73–81.

**Naqvi S.A.M.H. 2004.** Diseases of Fruits and Vegetables; Diagnostic and Management, *Kluwer Academic Publishers*, volume I, 690 p.

**Naseby D.C., Way J. A., Bainton N.J. and Lynch J.M. 2001.** Biocontrol of *Pythium* in the pea rhizosphere by antifungal metabolite producing and non-producing *Pseudomonas* strains. *J. Appl. Microbiol*, 90: 421-429.

**Nelson E., Van Dijk. K., Kageyama K. and Windstam S. 2004.** Biological Control of Soilborne Diseases: Important Concepts from a model System. In A. Vanachter (eds.), *Managing Soil-Borne Pathogens*, p115-130.

**Ngoma L., Babalola O. O. and Ahmad. F. 2012.** Ecophysiology of plant growth promoting bacteria. *Scienti. Res. Essays*, 7 47: 4003-4013.

**Noumavo P.A., Agbodjato N.A., Baba-Moussa F.B., Adjanohoum A. and Baba-Moussa L. 2016.** Plant Growth Promoting Rhizobacteria: Beneficial effects for healthy and sustainable agriculture. *Afr. J. Biotechnol.* 15 27: 1452-1463.

**Nunes C., Usall J., Teixido N., Fons E. and Vinas. I. 2002.** Post-harvest biological control by *Pantoea agglomerans* (CPA-2) on Golden Delicious apples. *J. Appl. Microbiol*, 92: 247–255.

**Nwaga D., Fankem H., Essono O.G., Laurette N.N. and Randrianangaly j.S., 2007.** Pseudomonads and symbiotic microorganisms as biocontrol agents against fungal disease caused by *Pythium aphanidermatum*. *Afr. J. Biotechnol*, 3: 190–197.

**Nzungize J., Gepts P., Buruchara R., Buah S., Ragama P., Busogoro J.P. and Baudoin J.P. 2011.** Pathogenic and molecular characterization of *Pythium* species inducing root rot symptoms of common bean in Rwanda. *Afr. J. Microbiol. Res*, 10: 1169–1181.

**Nzungize J.R., Lyumugabe F., Busogoro J.-P. and Baudoin J.-P. 2012.** *Pythium* root rot of common bean: biology and control methods. A review. *Biotechnol. Agro. Soc. Environ*, 3: 405–413.

**Ogawa K., Yoshida N., Kariya K., Ohnishi C. and Ikeda.R. 2002.** Purification and characterization of a novel chitinase from *Burkholderia cepacia* strain KH2 isolated from the bed log of *Lentinusedodes*, Shiitake mushroom. *J. Gen. Appl. Microbiol.* 48: 25–33.

**Omar M.R., El-Samawaty A.M.A and El-Wakil D.A. 2007.** Suppression of *Pythium ultimum* involved in Cotton Seedling Damping-off by *Trichoderma* spp. *Egypt. J. Phytopathol*, 35 2: 111-124.

**Ossowicki A., Jafra S. and Garbeva P. 2017.** The antimicrobial volatile power of the Rhizospheric isolate *Pseudomonas donghuensis* P482. *PLoS ONE* 12(3): e0174362. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0174362>.

**O'sullivan D. J. and O'gara. F. 1992.** Traits of Fluorescent *Pseudomonas* spp. Involved in Suppression of Plant Root Pathogens. *Microbiol. Reviews*, 56: 4 662- 676.

**Pal K.K. and Gardener B.Mc.S. 2006.** Biological Control of Plant Pathogens. *The Plant Health Instructor* DOI: 10.1094/PHI-A-2006-1117-02.

**Palaniyandi S.A., Yang S.H. and Suh J-W. 2013.** Extracellular proteases from *Streptomyces phaeopurpureus* ExPro138 inhibit spore adhesion, germination and appressorium formation in *Colletotrichum coccodes*. *J. App. Microbiol*, 115: 207-217.

**Park, Gwee Kyo, Jong-Hui Lim, Sang-Dal Kim, and Sang Hee Shim. 2012.** Elucidation of Antifungal Metabolites Produced by *Pseudomonas aurantiaca* IB5-10 with Broad-Spectrum Antifungal Activity. *J. Microbiol. Biotechnol*, 22 3: 326–330.

**Parveen T. and Sharma K. 2015.** *Pythium* diseases, control and management strategies: a review. *Int. J. Plant. Anim. Environ. Sci*, 1: 2231–4490.

**Patten C. L. and Glick B. R. 2002.** Role of *Pseudomonas putida* Indoleacetic Acid in Development of the Host Plant Root System. *Appl. Environ. Microbiol*, 68:8 3795–3801.

**Peighami-Ashnaei S., Sharifi-Tehrani A., Ahmadzadeh M. and Behboudi K. 2009.** Interaction of Different Media on Production and Biocontrol efficacy of *Pseudomonas fluorescens* P-35 and *Bacillus subtilis* B-3 against Grey Mould of Apple. *J. Plant. Pathol*, 91 1: 65-70.

**Peighami-Ashnaei S., Sharifi-Tehrani A., Ahmadzadeh M. and Behboudi K. 2009.** Selection of bacterial antagonists for the biological control of *Botrytis cinerea* in apple (*Malus domestica*) and in comparison with application of thiabendazole. *Commun. Agric. Appl. Biol. Sci*, 74 3: 739-43.

**Peix A., Rivas-Boyerero A.A, Mateos P., Rodríguez-Barrueco C., Martínez-Molina E. and Velázquez E. 2001.** Growth promotion of chickpea and barley by a phosphate

solubilizing strain of *Mesorhizobium mediterraneum* under growth chamber conditions. *Soil Biol. Biochem*, 33: 103–110.

**Ponmurugan P. and Gopi C. 2006.** *In vitro* production of growth regulators and phosphatase activity by phosphate solubilizing bacteria. *Afr. J. Biotechnol*, 54: 348–350.

**Przemieniecki S.W., Kurowski T.P. and Karwowska A. 2015.** Plant growth promoting potential of *pseudomonas* sp. Sp0113 isolated from potable Water from a Closed Water Well. *Arch. Biol. Sci. Belgrade*, 6 72: 663-673.

**Raaijmakers J.M., Vlami M. and de Souza J.T. 2002.** Antibiotic production by bacterial biocontrol agents. *Antonie van Leeuwenhoek*, 81: 537–547.

**Rai A. 2017.** Effet du stress salin sur les bactéries du sol : rôle d'extraits dérivés de *Enteromorpha intestinalis*, *Ulva lactuca* et *Opuntia ficu-indica* sur la relation bactérie-plante sous stress salin. Thèse de doctorat 3<sup>ème</sup> cycle. Université Ferhat Abas Sétif 1. 246p

**Rai A., Bensidhoum L., Tabli N., Bouaoud Y., Naili F., Cruz C. et Nabti E. 2016.** A *Pseudomonas Protegens* with High Antifungal Activity Protects Apple Fruits Against *Botrytis Cinerea* Gray Mold. *I.J.S.R.S.T*, 2 6: 227-237.

**Ramette A., Frapolli M., Le Saux M.F., Gruffaz C., Meyer J.M., Défago G. Sutra L. and Moëgne-Loccoz Y. 2011.** *Pseudomonas protegens* sp . nov., widespread plant producing the biocontrol compounds 2, 4- diacetylphloroglucinol and pyoluteorin. *Syst. Appl. Microbiol*, 34:180-188.

**Rangarajan S., Loganathan P., Saleena L.M. and Nair S. 2001.** Diversity of pseudomonads isolated from different plant rhizospheres. *J. ppl. Microbiol*, 91: 742-749.

**Rankin L. and Paulitz T.C. 1994.** Evaluation of rhizosphere bacteria for biological control of *Pythium* root rot of greenhouse cucumbers in hydroponic culture. *Plant. Dis*, 78: 447–451.

**Reetha S., Bhuvaneshwari G., Thamizhiniyan P. and Mycin T.R. 2014.** Isolation of indole acetic acid (IAA) producing rhizobacteria of *Pseudomonas fluorescens* and *Bacillus subtilis* and enhance growth of onion (*Allimcepa.L*). *Int. J. Curr .Microbiol. App. Sci*, 3 2: 568-574.

**Roberts R.G. 1990.** Postharvest Biological Control of Gray Mold of Apple by *Cryptococcus laurentii*. *Phytopathol*, 80: 526-530.

**Ruchi K. R., Kumar A., Kumar A., Patil S., Thapa S. and Kaur M . 2002.** Evaluation of plant growth promoting attributes and lytic enzymes production by Fluorescent *Pseudomonas* diversity associated with Apple and Pear. *Int. J. Scienti. Publi*, 2 2: 1-8.

**Sadfi-Zouaoui N., Hannachi I., Andurand D., Essghaier B., Boudabous A. and Nicot P. 2008.** Biological control of *Botrytis cinerea* on stem wounds with moderately halophilic bacteria. *World. J. Microbiol. Biotechnol*, 24: 2871–2877.

**Sagahón I.P., Reyes M.A.A., Rojas H.V.S., Cuenca A.A., Jurado A.T., Alvarez, I.O.C. and Flores Y.M. 2011.** Isolation of bacteria with antifungal activity against the phytopathogenic fungi *Stenocarpella maydis* and *Stenocarpella macrospora*. *Int. J. Mol. Sci*, 12: 5522–5537.

**Saha M., Sarkar S., Sarkar B., Sharma B.K., Bhattacharjee S. and Tribedi P. 2015.** Microbial siderophores and their potential applications: a review. *Environ. Sci. Pollut. Res.* <http://dx.doi.org/10.1007/s11356-015-4294-0>.

**Saitou N. and Nei M. 1987.** The Neighbor joining method: a new method for reconstructing phylogenetic stress. *Mol. Biol. Evol*, 4:406-425.

**Sandhya V., Ali S.Z., Grover M., Reddy G. and Venkateswarlu B. 2010.** Effect of Plant growth promoting *Pseudomonas* spp. on compatible Solutes, antioxidant status and plant growth of maize under drought stress. *Plant Growth Regul*, 62: 21-330.

**Sangeetha G., Usharani S. and Muthukumar A. 2009.** Biocontrol with *Trichoderma* species for the management of postharvest crown rot of banana. *Phytopathol. Mediterr*, 48: 214–225.

**Savary S., Ficke A., Aubertot J-N. and Hollier C. 2012.** Crop losses due to diseases and their implications for global food production losses and food security. *Food. Sec.* DOI 10.1007/s12571-012-0200-5.

**Schirmböck M., Lorito M., WangY-L., Hayes C. K., INCI Arisan-Atac, Scala F., Harman G.E. and Kubicek C.P 1994.** Parallel Formation and Synergism of Hydrolytic Enzymes and Peptaibol Antibiotics, Molecular Mechanisms Involved in the Antagonistic Action of *Trichoderma harzianum* against Phytopathogenic Fungi. *Appl. Environ.Microbiol*, 60-12: 4364-4370.

**Schmidt N.J., Gee P.S., Dennis J. and Lennette. A.E. H. 1969.** Enzymes Produced by a *Pseudomonas* Species Which Inactivate Inhibitors of Certain Viral Hemagglutinins I. Identification and Purification of a Proteinase and Phospholipase C. *Appl. Microbiol*, 18 3: 500-508.

**Schmidt R., Cordovez V., de Boer W.R., Raaijmakers J. and Garbeva P. 2015.** Mini Review, Volatile affairs in microbial interactions. *Int. Soc. Microb. Ecol*, 9: 2329 – 2335.

**Schwyn B. and Neilands J.B. 1987.** Universal Chemical Assay for the Detection and determination of Siderophores. *Anal. Biochem*, 160: 47-56.

**Senol M., Nadaroglu H., Dikbas N. and Kotan R. 2014.** Purification of Chitinase enzymes from *Bacillus subtilis* bacteria TV-125, investigation of kinetic properties and antifungal activity against *Fusarium culmorum*. *Anal. Clini. Microbiol. Antimicrob*, 133:35. Open access.

**Sheeba J., Dhamotharan R. and Baskar K. 2017.** Isolation, Screening and Characterization of Plant Growth Promoting Bacteria and their Antifungal Effect on *Rhizoctonia Solani* (J.G. Kühn 1858). *Adv. Plants. Agric. Res*, 7 5: 00269. DOI: 10.15406/apar.2017.07.00269.

**Sindhu S.S. and Dadarwal K. R. 2001.** Chitinolytic and cellulolytic *Pseudomonas* sp. antagonistic to fungal pathogens enhances nodulation by *Mesorhizobium* sp. *Cicerin* chickpea. *Microbiol. Res*, 156: 353–358.

**Sindhu S.S., Rakshiya Y.S. and Sahu.G. 2009.** Biological Control of Soilborne Plant Pathogens With Rhizosphere Bacteria. *Biol. Control. Soilborne Plant Pathogens*. 311- 330.

**Sindhu S.S., Sehrawat A., Sharma R. and Dahiya A. 2016.** Biopesticides: Use of Rhizosphere Bacteria for Biological Control of Plant Pathogens. *Def. Life Sci. J*, 01 2: 135-148.

**Singh H., Jaiswal V., Singh S., Tiwari S.P., Singh B. and Katiyar D. 2017.** Antagonistic compounds producing Plant Growth Promoting Rhizobacteria; a Tool for Management of Plant Disease. *J. Adv. Microbiol*, 34: 1-12.

**Sivasakthi S., Usharani G. and Saranraj P. 2014.** Biocontrol Potentiality of plant growth promoting bacteria (PGPR) - *Pseudomonas fluorescens* and *Bacillus subtilis*: A review. *Afr. J. Agri. Res*, 9 16: 1265-1277.

**Smeesters E., Chouinard G. and Gagnon. S. 2000.** Méthodes alternatives de lutte chimique en pomiculture ‘Principales Techniques Applicables au Québec. ISBN2-550-37101-1.

**Somers E., Venderleyden J. and Srinivasan M. 2004.** Rhizosphere bacterial signaling: a love parade beneath our feet. *Crit. Rev. Microbiol*, 30: 205-240.

**Son D., Somda I., Legreve A. and Schiffers B. 2017.** Pratiques phytosanitaires des producteurs de tomates du BurkinaFaso et risques pour la santé et l'environnement. *Cah.Agric*, 26, 25005.DOI: [10.1051/cagri/2017010](https://doi.org/10.1051/cagri/2017010).

**Spadaro B.H.D., Matic Z.D., Garibaldi S. A. and Gullino. M. L. 2014.** Biocontrol activity of an alkaline serine protease from *Aureobasidium pullulans* expressed in *Pichia pastoris* against four postharvest pathogens on apple. *Int.J.Food. Microbiol.*, 182 183: 1-8.

**Spadaro D. and Droby S. 2016.** Development of biocontrol products for postharvest diseases of fruit: The importance of elucidating the mechanisms of action of yeast antagonists. *Trends. Food. Sci. Technol.*, 47: 39-49.

**Stackebrandt E. and Liesack W. 1993.** Nucleic acids and classification, *In* M. Goodfellow and A.G. O'Donnell (eds.), Handbook of new bacterial systematics Academic Press, London, England p152–189.

**Stewart P. and Globig. S. 2011.** Phytopathology in plants. Apple Academic Press Inc, 331p, ISBN 978-1-926692-80-7.

**Suresh, A., Pallavi, P., Srinivas, P., Praveen Kumar, V., Jeevan Chandra, S., Ram Reddy, S., 2010.** Plant growth promoting activities of fluorescent pseudomonads associated with some crop plants. *Afr. J. Microbiol. Res*, 14:1491–1494.

**Tabli N., Nabti E.H., Dahel D., Mokrane N., Manyani H., Dary M. and Megias M.G. 2014.** Impact of Diazotrophic Bacteria on Germination and Growth of Tomato, with Bio-control Effect, Isolated from Algerian Soil. *J. Eco. Heal. Env*, 2: 1, 1-7.

**Tamura K., Stecher G., Peterson D., Filipski A. and Kumar S. 2013.** MEGA6: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Version 6.0, *Mol. Biol. Evol*, 30: 2725–2729.

**Thakur D.S. Kaur M. and Shyam V. 2013.** Role of Fluorescent Pseudomonas in reduction of the use of chemical pesticides and fungicides in normal and replant sites of apple and pear. *Asi. J. Bio.Sci.*, 8 2: 259-266.

**Thongkamngam T. and Jaenaksorn T. 2017.** *Fusarium oxysporum* (F221-B) as Biocontrol Agent against Plant Pathogenic Fungi *in vitro* and in Hydroponics. *Plant Protect. Sci.*, 53 2: 85-95.

**Timmusk S. 2003.** Mechanism of action of the plant growth promoting bacterium *Paenibacillus polymyxa*. Dissertation. Acta Universitatis Upsaliensis. Uppsala. ISSN 1104-232X. ISBN 91-554-5802-5.

**Toé AM. 2010.** Étude pilote des intoxications dues aux pesticides agricoles au Burkina Faso. Secrétariat de la Convention de Rotterdam, 94 p. Disponible sur : [www.pic.int/Portals/5/download.aspx?d=UNEP-FAO-RC-SHPFsPilotstudyBurkina.Fr.pdf](http://www.pic.int/Portals/5/download.aspx?d=UNEP-FAO-RC-SHPFsPilotstudyBurkina.Fr.pdf).

**Tuad., Benchabane M., Bensaid F. and Bakour. R. 2016.** Evaluation of *Pseudomonas fluorescens* for the biocontrol of *fusarium* wilt in tomato and flax. *Afr. J. Microbiol. Res*,7: 48 5449- 5458.

**Tozlu E., Karagöz K., Babagil G. E., Diziklisa T. and Elmhirst J. 2006.** Profil de la culture des tomates de serre au Canada. Programme de réduction des risques liés aux pesticides Centre pour la lutte antiparasitaire Agriculture et Agroalimentaire Canada. *Agric. Agri. Food. Canada*. p50.

**Tri Wahyudi A., Astuti R.P., Widyawati A., Meryandini A., Nawangsih A.A., 2011.** Characterization of *Bacillus* sp. strains isolated from rhizosphere of soybean plants for their use as potential plant growth for promoting Rhizobacteria. *J. Microbiol. Antimicrob*, 3: 34–40.

**Trivedi P., Pandey A. and Palmi L.M.S. 2008.** *In vitro* evaluation of antagonistic properties of *Pseudomonas corrugata* . *Microbiolog. Res*, 163: 329-336.

**Tsegaye Z., Assefa F. and Beyene D. 2017.** Properties and Application of Plant Growth Promoting Rhizobacteria. *Int. J. Curr. Trend. Pharmacobiol. Med. Sci.*2 1: 30-43.

**Uzhashi S., Tojo M., and Kakishima M. 2010.** Phylogeny of the genus *Pythium* and description of new genera. *Mycoscience*, 51: 337–365.

**Valdez-Aguilar L.A., Grieve C.M., Poss J. A. and Layfield D.A. 2009.** Salinity and Alkaline pH in Irrigation Water Affect Marigold Plants: II. Mineral Ion Relations. *Hort.Science*, 44 6: 1226-1735.

**Van Driesche R.G. and Bellows T.S. 1996.** Biological Control. Chapman and Hall, New York.

**Van Loon L.C. and Bakker P.A.H.M. 2005.** Induced Systemic Resistance as a Mechanism of Disease Suppression by Rhizobacteria. *A. Siddiqui (eds.), PGPR: Biocontrol and Biofertilization*, p39-66.

**Van Loon L.C., Bakker P.A.H.M. and Pieters C.M.J. 1998.** Systemic Resistance Induced by Rhizosphere Bacteria . *An. Rev. Phytopathol*, 36: 453-483.

**Vanitha S. and Ramjagathesh R. 2014.** Bio control potential of *Pseudomonas fluorescens* against Coleus Root Rot Disease. *Plant. Pathol. Microbiol.* 5 1: doi:10.4172/2157-7471.1000216.

**Velusamy P. and Kim K.Y. 2011.** Chitinolytic activity of *Enterobacter* sp. KB3 antagonistic to *Rhizoctonia solani* and its role in the degradation of living fungal hyphae. *Int. Res. J. Microbiol*, 6: 206–214.

**Vero S., Mondino P., Burgueno J., Soubes M. and Wisniewski M. 2002.** Characterization of biocontrol activity of two yeast strains from Uruguay against blue mold of apple. *Postharvest. Biolog. Technol*, 26: 91–98.

**Vessey J.K. 2003.** Plant Growth Promoting rhizobacteria as Biofertilizers. *Plant. Soil.* 255: 571-586.

**Vincent C. and Coderre D. 1992.** La lutte biologique. Gaëtan Morin, Québec, Canada.

**Vinoth Raj S., Kanikkai Raja A., Babu Vimalanathan A., Manoj G. Tyagi, Naman Hirenkumar Shah, Johnson Amala Justin N.A., Infant Santhosh B. and Sathiyaseelan K. 2009.** Study of starch degrading bacteria from kitchen waste soil in the production of amylase by using paddy straw. *Rec. Rese. Sci. Technol*, 1 1: 008–013.

**Walpolo B. C. and Yoon M.H. 2013.** Isolation and characterization of phosphate solubilizing bacteria and their co-inoculation efficiency on tomato plant growth and phosphorous uptake. *Afr. J. Microbiol. Res.* 7 3: 266-275.

**Walters D a. 2009.** Introduction In D. Walters (eds.), Biological control agents in plant disease control, p13-18.

**Walters D b. 2009.** Managing crop disease through cultural practices. In D. Walters (eds.), Disease Control in crops: Biological and Environmentally Friendly Approaches Blachwell Publishing Ltd. ISBN: 978-1-405-16947-9.

**Wei G., Kloepper J. W. and Tuzun. S. 1991.** Induction of Systemic Resistance of Cucumber to *Colletotricum orbiculare* by Select Strains of Plant Growth-Promoting Rhizobacteria. *Phytopathol*, 81: 1508-1512.

**Weisskopf L. 2013.** The potential of bacterial volatiles for crop protection against phytopathogenic fungi. In A. Méndez-Vilas (eds.), Microbial pathogens and strategies for combating them: science, technology and education, p1352-1363.

**Weller D. M. 2007.** *Pseudomonas* biocontrol agents of soilborne pathogens: Looking back over 30 years. *Phytopathol*, 97:250-256.

**Whipps J. 2001.** Microbial interactions and growth in the rhizosphere. *J. Exp. Bot.* 52: 487-511.

**Whipps J. M. and McQuilken M.P. 2009.** Biological control agents in plant disease control. In D. Walters (eds.), Biological control agents in plant disease control, p39-61.

**Wilson C.L., Wisniewski M.E., Biles C.L., Mc Laughlin. R., Chalutz. And Droby. S. 1991.** Biological control of post-harvest diseases of fruits and vegetables: alternative to synthetic fungicides. *Crop. Protection*, 10: 172-177.

**Wilson C.L., Franklin J.D. and Pusey P.L. 1987.** Biological Control of *Rhizopus* rot of peach with *Enterobacter cloacae*. *Phytopath*, 77: 303-305

**Winding A., Binnerup S.J. and Pritchar H. 2004.** Non –target effects of bacterial biological control agents suppressing root pathogenic fungi, *FEMS Microbiol.Ecol*, 47: 129-141.

**Windstam S. and Nelson E. B. 2008.** Temporal Release of Fatty Acids and Sugars in the Spermosphere: Impacts on *Enterobacter cloacae*-Induced Biological Control. *Appl. Environ. Microbiolo.* 4292–4299 74: 14.

**Woo S., Fogliano V., Scala F. and Lorito M. 2002.** Synergism between fungal enzymes and bacterial antibiotics may enhance Biocontrol. *Antonie van Leeuwenhoek*, 81: 353-356.

**Woo S.L. and Lorito M. 2007.** Exploiting the Interactions between Fungal Antagonist Pathogens and the Plant for Biocontrol. P. 107-130. In Vurro M. and Gresse J. (eds.), Novel Biotechnologies for Biocontrol Agent Enhancement and Management, p2-26.

**Xiao C. L. and Kim Y. K. 2008.** Postharvest fruit rots in apples caused by *Botrytis cinerea*, *Phacidiopycnis washingtonensis*, and *Sphaeropsis pyriputrescens*. online *Plant. Health. Progress*, doi: 10, 1094/PHP -2008-0919-01-DG.

**Xu S.J., Hong S.J., Choi W. and Kim.B.S. 2014.** Antifungal Activity of *Paenibacillus kribbensis* Strain T-9 Isolated from Soils against Several Plant Pathogenic Fungi. *Plant. Pathol. J*, 30 1: 102-108.

**Yigit F. and Dikilitas M. 2007.**Control of *fusarium* wilt of Tomato by combination of fluorescent *Pseudomonas*, Non-pathogen *Fusarium* and *Trichoderma arzianum*T-22 In Greenhouse Conditions. *Plant. Pathol. J*, 6: 159-163.

**Zalte A. A., Gade R. M. and Shitole A.V. 2016.** Effect of Biocontrol Agents and Fungicides on Damping off Disease of Tomato. *Nat. environ. Assoc*, 112: 759-762.

**Zamani M., SharifiTehrani.A., Ahmadzadeh M., Hosseininaveh V. and Mostofy Y. 2009.** Control of *Penicillium digitatum* on orange fruit combining *Pantoea agglomerans* with hot sodium bicarbonate dipping. *J. Plant. Pathol*, 91 2: 437-442.

**ZHANG J., WANG P., FANG L., ZHANG Q., YAN C. and CHEN J. 2017.**Isolation and Characterization of Phosphate-Solubilizing Bacteria from Mushroom Residues and their Effect on Tomato Plant Growth Promotion. *Polish J. Microbiol*, 66: 1 57–65.

**Zhanh Z. and Yuen G.Y. 2000.** The role of Chitinase production by *Strotrophomonas maltophilia* strain C3 in biological control of *Bipolaris sorokiniana*. *Phytopathol*, 90: 384-389.

**Zhao L.J., Yang X.N., Li X.Y., Mu W. and Liu F. 2011.** Antifungal, Insecticidal and Herbicidal Properties of Volatile Components from *Paenibacillus polymyxa* Strain *BMP-11*.*Agric. Sci in China*, 10: 728-736.

**Zhu S.S., Liu X.L., Wang Y., Wu X.H., Liu P.F., Li J.Q., Yuan S.K. and Si N.G. 2007.** Resistance of *Pseudoperonospora cubensis* to flumorph on cucumber in plastic houses. *Plant. Path*, 56: 967–975.

**Zou C.S., Mo M-H., Gu Y-Q., Zhou J-P. and Zhang K-Q. 2017.** Possible contributions of volatile-producing bacteria to soil fungistasis. *Soil. Biol. Biochem*, 38: 2371-2379.

**Annexe I. Composition des milieux de culture utilisés (pour un litre de milieu)**➤ **Gélose nutritive (GN)**

<b>Composition</b>	<b>Quantité (g)</b>
Peptone	5
Extrait de viande	1
Extrait de levure	2
NaCl	5
Agar	7.5
pH	7.2±0.2

➤ **Luria Bertani (LB)**

<b>Composition</b>	<b>Quantité (g)</b>
NaCl	5
Tryptone	10
Extrait de levure	5
pH	7.2±0.2

➤ **Potato Dextrose Agar (PDA) :**

<b>Compositions</b>	<b>Quantité (g)</b>
Pomme de terre	200
Glucose	20
Agar	15
pH	5.4±0.2

➤ **Milieu Trypticase de soja (TSA)**

<b>Composition</b>	<b>Quantité (g)</b>
Peptone de caséine	15

---

Peptone de soja	5
NaCl	5
Agar	15
pH	7.2±0.2

---

➤ **Agar à l'extrait de malt (EM)**

---

<b>Compositions</b>	<b>Quantité (g)</b>
Extrait de malt	30
Peptone mycologique	5
Agar	15
pH	5.4± 0.2

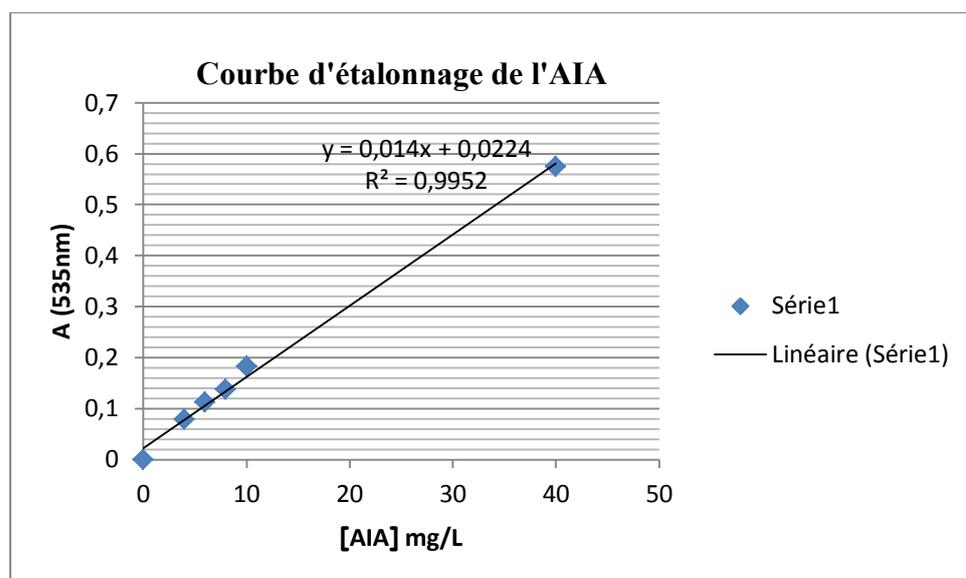
---

➤ **Gélose de Dénombrement (PCA)**

---

<b>Compositions</b>	<b>Quantité (g)</b>
Glucose	1
Tryptone	5
Extrait de levure	2.5
Agar	12
pH	7.0±0.2

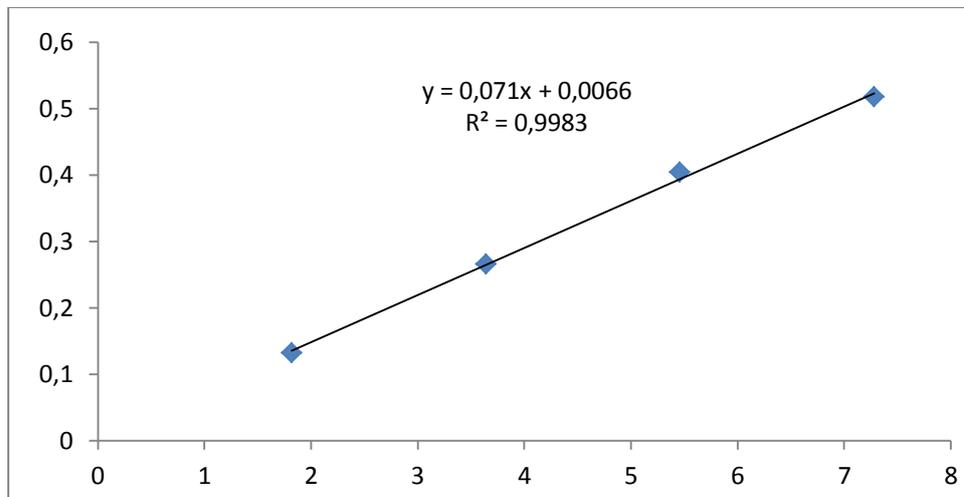
---

**Annexe II.** Courbe d'étalonnage d'AIA

Courbe d'étalonnage

**Annexe III.** Composition du gel de séparation (12%) ; pour un volume de 10ml, et de préparation (4%) ; pour un volume de 4ml de l'SDS page.

<b>Composition (Lower) 12%</b>	<b>Volume (µl) 10ml</b>	<b>Composition (Opper) 4%</b>	<b>Volume (µl) 5ml</b>
H <sub>2</sub> O	4340	H <sub>2</sub> O	3170
Bis- Acrylamide (40%)	3000	Bis- Acrylamide (40%)	500
TRIS-HCl pH8.8, 1.5M	2500	TRIS-HCl pH6.8, 0.5M	1250
SDS 10%	100	SDS 10%	50
APS	50	APS	25
TEMED	10	TEMED	5

**Annexe IV.** Courbe d'étalonnage de Bradford pour le dosage de protéinesCourbe d'étalonnage: DO= f [BSA]  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ **Annexe V.** Tampon de lyse et d'extraction des protéines membranaires

<b>Tampon de lyse</b>	<b>concentration finale</b>
Tris-HCl 1M, pH 7.5.....	50mM
EDTA 100mM.....	2mM
PMSF 60Mm.....	1mM
dH <sub>2</sub> O qsp.....	1000ml

<b>Tampon d'extraction</b>	<b>concentration finale</b>
Tris-HCl pH 7.5 1M.....	50mM
TRITON 20%.....	1%
dH <sub>2</sub> Oqsp.....	1000ml

Les teneurs varient selon le volume total de notre échantillon.

**Annexe VI. Composition de tampon A et B de la chromatographie****Tampon A**

Tampon Tris-HCl 25mM, pH 7.5, détergent ; désoxycholate de sodium 0.1%

**Tampon B**

Tampon Tris-HCl 25mM, pH 7.5+ détergent ; désoxycholate de sodium 0.1% ; NaCl 0.5M.

**Annexes VII. Composition de décolorant du gel pour une SDS-page dénaturante**

Méthanol.....50ml

Acide acétique.....75ml

Le volume est complété à 1L avec de l'eau distillée stérile

**VIII. Tampon pour une SDS-page dénaturante**

**Tampon de l'échantillon:** 62.5mM Tris-HCl, pH 6.8, 20% Glycérol, 2% SDS, 5%  $\beta$ -Mercaptoéthanol.

Eau distillée.....3.0ml

Tris-HCl, 0.5M, pH6.8.....1.0ml

Glycerol.....1.6ml

SDS10%.....1.6ml

$\beta$  –Mercaptoéthanol.....0.4ml

0.5%(w/v) bleu de Bromophénol (dans l'eau).....0.4ml

Diluer l'échantillon au moins 1 :4 avec tampon, chauffer à 95°C pendant 4minutes.

**Tampon de migration:** 1×= 25mM Tris, 192mM glycine, 0.1% SDS, pH 8.3.

Tris base.....45.0g

Glycine.....216.0g

SDS.....15.0g

## **Publications**

**Tabli Nassira.**, Rai Abdelwahab., Bensidhoum Leila., Palmieri Gianna., Gogliettino Marta., Cocca Ennio., Consiglio Carmela., Cillo Fabrizio., Bubici Giovanni et Nabti Elhafid 2017. Plant growth promoting and inducible antifungal activities of irrigation well water-bacteria. *Biological Control*. 117 78-117.

**Tabli Nassira.**, Nabti Elhafid. et Dahel Djamila. 2014. Isolement de bactéries rhizosphérique de la côte ouest de la wilaya de Bejaia et leur impact sur l'amélioration de la croissance de la tomate. *Revue Agro-Ecologie*. 02 : 02 1-7.

**Tabli Nassira**, Nabti El-H, Dahel D, Mokrane N, Manyani H, Dary D et Megias M. G. 2014. Impact of diazotrophic bacteria on germination and growth of tomato, with bio-control effect, isolated from Algerian soil. *Journal of Ecology of Health and Environment*.2: 1 1-7.

Nabti Elhafi. Et **Tabli Nassira** 2016. Isolement de bactéries rhizosphérique d'intérêt agricole. Editions Universitaires Européennes.104p ISBN-10 : 3639525000.

Rai Abdelwahab, Bensidhoum Leila, **Tabli Nassira**, Bouaoud Yousra, Naili Fatma, Cristina Cruz et Elhafid Nabti. 2016. A *Pseudomonas Protegens* with High Antifungal Activity Protects Apple Fruits against *Botrytis cinerea* Gray Mold. *International Journal of Scientific Research in Science and Technology*. 2: 227-237.

Bensidhoum L., NabtiEl-H., **Tabli N.**, Kupferschmied P., Weiss A., Rothballer M., Schmid M., Keel C. et Hartmann A. 2016.Heavy metal tolerant *Pseudomonas protegens*isolates from agriculturalwell water in northeastern Algeria with plant growth promoting,insecticidal and antifungal activities.European Journal of Soil Biology.75: 38-46.

Bensidhoum Leila., Rai Abdelwahab., **Tabli Nassira.**, Kahouadji Nabila., Khaber Meriem and Nabti Elhafid. 2015. Biological Control of *Botrytis cinerea* by *Bacillus* sp. Strain S7LiBe under Abiotic Stress. *IJSRST* 1: 07- 14.

Nabti Elhafid., Bensidhoum Leila., **Tabli Nassira.**, Dahel Djamila., Weiss Angelo., Rothballer Michael., Schmid Michael and Anton Hartmann 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.

## **Communications**

**Tabli Nassira**, Rai Abdelwahab, Bensidhoum Leila, Palmieri Gianna, Gogliettino Marta, Cocca Ennio, Cillo Fabrizio et Nabti Elhafid. Bacteria from irrigation well-water with high plant growth promoting and biocontrol activities. Séminaire National sur les Application des Sciences de la Nature et de la Vie: Relation avec le Monde Productif. Bejaia, 27-28 Septembre 2017.

**Tabli Nassira**, Nabti Elhafid, Dahel Djamila et Khelloufi Nouria. Isolement de quelques bactéries rhizosphériques ayant un effet stimulateur sur la croissance de la tomate. Séminaire National sur les Substances Bioactives (SNSB 2015). Bejaia., 18 et 19 Novembre. 2015.

**Tabli Nassira**, Nabti El-Hafid et Dahel Djamila. Isolement de bactéries rhizosphérique de la côte ouest de la wilaya de Bejaia et leur impact sur l'amélioration de la croissance de la tomate. 2<sup>ème</sup> colloque national sur la gestion durable des ressources naturelles. Saïda, 13 -14 Mai 2014.

**Tabli Nassira**, Dahel Djamila et Nabti Elhafid. Isolement de quelques bactéries rhizosphériques stimulant la croissance de l'orge et mise en évidence de leur application dans la lutte biologique. 20<sup>ème</sup> Journées Nationales de Microbiologie. Jijel, 12 et 13 Novembre 2014.

**Tabli Nassira**, Nabti El-Hafid, Dahel Djamila, Manyani H, Dary M, et MEGIAS M, G. 2014. Isolement de quelques bactéries productrices d'enzymes et de métabolites d'intérêts industriels. Séminaire International sur les Sciences Alimentaires. Constantine. 14-16 Octobre 2014.

**Tabli Nassira**, Dahel Djamila, Nabti El-Hafid et Mokrane Nadjim. Isolement de bactéries stimulatrices de la croissance de l'orge et mise en évidence de leur effet antifongique contre les phytopathogènes. Séminaire International d'Ecologie Microbienne. Bejaia. 29-30 Octobre 2013.

**Tabli Nassira**, Dahel Djamila, Mokrane Nadjim et Nabti El-Hafid. The Rhizospheric soil of the west coast of Bejaia: a source of Bacteria with bio-fertilizer and bio-fungicide properties (Agriculture importance). 4<sup>th</sup> international Workshop on Industrial Biotechnology. Tlemcen. April 10-11-2013.

**Tabli Nassira**, Dahel Djamila, Mokrane Nadjim et Nabti Elhafid. Le sol rhizosphérique de la côte Ouest de Béjaia ; espace riches en microorganismes à intérêt agricole. Séminaire National sur la Gestion Durable des Ressources Naturelles.Saida le 7 et 8 Mai 2013.

**Tabli Nassira** Nabti Elhafid, Dahel Djamila et Mokrane Nadjim. SCIENTIFIC DAYS IN AGRIFOOD (SDAF-2013). Sousse Tunisie May 24-26.2013

**Tabli Nassira**, Dahel Djamila, Mokrane Nadjim, Nabti El-Hafid. Recherche et Isolement des bactéries de la côte ouest de la wilaya de Bejaia et leur éventuelle application comme agent de biocontrôle. 2<sup>ème</sup> journées des Sciences de la Nature et de la Vie. Bejaia les 07 et 08 Novembre 2012.

**Tabli Nassira**, Dahel Djamila, Mokrane Nadjim et Nabti Elhafid. Recherche de bactéries locales ayant un effet stimulateur de la croissance de la tomate « *Lycopersicum esculentum* Mill ». Journées Internationales de Biotechnologie. Mahdia –Tunisie 19-22 Décembre 2012.

**Tabli Nassira**, Ounzab Nacer, Chougui Nadia. Effet de la maturation sur la composition et l'activité antioxydante du poivron « *Capsicum annuum* .1<sup>er</sup> congrès international de la Société Algérienne de Nutrition. Oran Sheraton Hotel&Towers, 05-06-Décembre 2012.

Khelloufi Nouria, **Tabli Nassira**, Bensidhoum Leila et Nabti Elhafid. Isolement de bactéries osmotolérantes productrices d'enzymes d'intérêt agricoles, associées aux algues marines. Conférence Internationale sur les symbioses végétales et leurs applications biotechnologiques, Agronomiques et environnementales. Université de Khemis Miliana, 19-20 Avril 2016.

Bensidhoum Leila, **Tabli Nassira**, Schmid Michael, Hartmann Anton et Nabti Elhafid. Growth stimulation of barley seedlings by *Pseudomonas protegens* isolated from well water in Bejaia, Algeria. Conférence Internationale sur les symbioses végétales et leurs applications biotechnologiques, Agronomiques et environnementales. Université de Khemis Miliana, 19-20 Avril 2016

Bensidhoum Leila, **Tabli Nassira**, Nabti Elafid, Weiss A, Rothballe M, Schmid M. et Hartmann A. Sélection de quelques rhizobactéries promotrices de la croissance des plantes et agents de biocontrôle. Premier séminaire national sur les substances bioactives. Bejaia, les 18 et 19 Novembre 2015.

Chougui Nadia, **Tabli Nassira** et Ounzab Nacer. Effet de la maturation sur la composition et l'activité antioxydante du poivron « *Capsicum annum* ». 2<sup>èmes</sup> journées des Sciences de la Nature et de la Vie, Bejaia 07 et 08 Novembre 2012.

Nabti Elhafid, Bensidhoum Leila, **Tabli Nassira**, Schmid Michael et Hartmann Anton. Impact de la souche *Pseudomonas* sp. sur la croissance de l'orge sur sol chargé de métaux lourds. Conférence Internationale sur les symbioses végétales et leurs applications biotechnologiques, Agronomiques et environnementales. Université de Khemis Miliana, 19- 20 Avril 2016.

Nabti Elhafid, Bensidhoum Leila, **Tabli Nassira**, Kahouadji Nabila, Khaber Meriem. Et Hartmann Anton. Biological control of *Botrytis cinerea* by *Bacillus* sp and *Pseudomonas* sp under abiotic stress. Premier colloque international de la biologie appliquée (CIBA 2015). Oran. 29 novembre au 01 décembre 2015.

Nabti Elhafid, Bensidhoum Leila, **Tabli Nassira**, Angelo Weiss, Michael Rothballer, Michael Schmid et Anton Hartmann. Screening of *Pseudomonas sp* isolated from wall water as plant growth stimulators and antifungal agent using the marine algae as osmoprotectants. 3<sup>ème</sup> Congrès International de la diversité des plantes. Maroc. 9 au 11 octobre 2015.

Nabti EL-H, Mokrane Nadjim, **Tabli Nassira** et Dahel Djamila. Characterization of osmotolerant *Bacillus* strains using a marine alga as osmoprotectant with antifungal activity. 3<sup>rd</sup> Biodesert International Workshop. Tunisie 11 July, 2012.

Mokrane Nadjim, Nabti Elhafid, **Tabli Nassira**. Dahel Djamila. Diazotrophic Plant Growth Promoting Bacteria isolated from the salt-affected Algerian Rhizospheric soil. 10<sup>th</sup> European Nitrogen Fixation Congress and as satellite the 13<sup>th</sup> BNF-Non-Legumes Symposium, Minich-Allemagne, Septembre 2012.

Nabti Elhafid, Dahel Djamila, Mokrane Nadjim, **Tabli Nassira**, Weiss A, Michael S. et Anton H. Diazotrophic plant growth promoting bacteria isolated from the salt-affected Algerian Rhizospheric soil as biofertilizer and biocontrol agent. 4<sup>th</sup> international Workshop on Industrial Biotechnology. Tlemcen, Algeria April 10-11-2013.



## Plant growth promoting and inducible antifungal activities of irrigation well water-bacteria

Nassira Tabli<sup>a</sup>, Abdelwahab Rai<sup>a,b,c,d</sup>, Leila Bensidhoum<sup>a</sup>, Gianna Palmieri<sup>b</sup>, Marta Gogliettino<sup>b</sup>, Ennio Cocca<sup>b</sup>, Carmela Consiglio<sup>b</sup>, Fabrizio Cillo<sup>c</sup>, Giovanni Bubicic<sup>c</sup>, Elhafid Nabti<sup>a,\*</sup>

<sup>a</sup> Laboratoire de Maitrise des Energies Renouvelables, Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie, Université de Bejaia, 06000 Bejaia, Algeria

<sup>b</sup> Institute of Biosciences and Bio Resources (IBBR), National Research Council (CNR), Naples, Italy

<sup>c</sup> Institute for Sustainable Plant Protection (IPSP), National Research Council (CNR), Bari, Italy

<sup>d</sup> Université de Sétif-1, FSNV, Département de microbiologie, Elbez, 19000 Sétif, Algeria

### ARTICLE INFO

#### Keywords:

*Pseudomonas*

*Serratia*

Biocontrol

Biological Control Agents

Plant Growth Promoting Bacteria (PGPB)

### ABSTRACT

Different bacterial groups in irrigation well water are strongly implicated in soil health and plant development. Herein, 48 bacterial strains were isolated from agricultural well water in northern Algeria. Among them, four strains were selected based on their antifungal potential and their ability to express Plant Growth Promoting traits such as Indole Acetic Acid (IAA), hydrolytic enzymes, siderophores etc. The isolates were identified as *Pseudomonas* sp. (B, D and N strains) and *Serratia* sp. (C strain) by 16S rRNA gene sequencing. Mycelial growth inhibition against *Botrytis cinerea* and *Aspergillus niger* ranged from 60 to 90% for the four strains. Moreover, volatiles compounds emission by the isolates resulted in Plant Growth Inhibition values ranging from 13 to 50%, specifically against *B. cinerea*. Impressively, the strains' antifungal activity showed high inducibility as it was obtained only by the filtered supernatants from bacterial cultures previously in contact with the fungus. Finally, a greenhouse assay, carried out to determine the strains' efficacy in promoting plant growth and protecting seedlings under *Pythium aphanidermatum*-infected soil, revealed that the strain N markedly enhanced pea germination (+250%) and fresh weight (+43%) and tomato fresh weight (+10%). The results constitute an attempt for better use of the bacterial functional diversity from irrigation wells in sustainable agriculture.

### 1. Introduction

The worldwide demographic explosion, together with environmental degradation, has the unfortunate consequence that global food production may soon become insufficient to feed the world's population. It is therefore essential to increase agricultural productivity within the next few decades (Glick, 2012). Both biotic and abiotic stresses in agriculture such as drought, salinity, elevated temperature, metal toxicity, nutrient deficiencies and plant diseases caused by fungi, bacteria, viruses, and nematodes are more to more aggressive and constitute serious problems affecting final yields of the most consumed crops (El Khoury and Makkouk, 2010; Borges et al., 2014). Thus, achieving sustainable crop production to protect the environment and ensure enough food requires strategic measures to manage these ecological stresses such as water scarcity and climate change, commonly related to pathogens development and aggressiveness (Tier, 2008; Haggag et al., 2015). However, better understanding of the mechanisms underlying plant resistance/tolerance-related characters is of a great

help to develop fruitful new agricultural strategies (Borges et al., 2014).

In the last few decades, the application of chemical fertilizers, pesticides, herbicides and fungicides was the dominant tool to enhance plant growth and to control pathogens propagation. However, such approaches have led to soil degradation and resistance emergence in plant-pathogen populations (Pal and McSpadden Gardener, 2006). In addition, the harmful effects of such chemicals on both human health and the environment obliged researchers to seek for secure and eco-friendly alternatives (Reuveni, 1995; El Khoury and Makkouk, 2010). Certain soil bacteria, commonly described as Plant Growth Promoting Bacteria (PGPB), are able to enhance plant yield and to control phytopathogens, constituting the most widely studied and increasingly used tool in modern agriculture. In future, PGPB are expected to replace chemical fertilizers, pesticides and artificial growth regulators that have numerous side effects on sustainable agriculture (Tsegaye et al., 2017).

PGPB can directly affect plant metabolism through nitrogen fixation, mineral solubilization, plant hormones modulation and plant tolerance improvement to abiotic stresses (drought, salinity, nutrient

\* Corresponding author.

E-mail address: [elhnabti1977@yahoo.fr](mailto:elhnabti1977@yahoo.fr) (E. Nabti).

deficiency etc.). PGPB also participate indirectly in preventing phytopathogens development either by competition for space and nutrient occupation or by producing antibiotic metabolites, inducing systemic resistance in the whole plant (Niranjan Raj et al., 2006; Ahmadzadeh and Tehrani, 2009; Suresh et al., 2010; Tri Wahyudi et al., 2011; Beneduzi et al., 2012). Bacteria belonging to genera *Acetobacter*, *Achromobacter*, *Arthrobacter*, *Azoarcus*, *Azospirillum*, *Pseudomonas*, *Serratia*, *Anabaena*, *Acetobacter*, *Clostridium*, *Enterobacter*, *Flavobacterium*, *Frankia*, *Rhizobium* and others are the most used as PGPB for several vegetal species (wheat, rice, pea, chickpea, tomato etc.). In addition, the use of PGPB in the biocontrol of phytopathogenic fungi (*Botrytis*, *Aspergillus*, *Mucor*, *Phytophthora* etc.) is not less adopted (Elad et al., 1996; Limura and Hosono, 1998; Loqman et al., 2009; Glick, 2012; Talibi et al., 2014; Tabli et al., 2014). Unfortunately, as the results obtained in laboratory are not necessarily ensured *in vivo*, the unpredictable character of the most *in vitro*-selected PGPB oblige both scientists and farmers to seek for more competent isolates that are able to ensure better results in soil, a more complex environment than *in vitro* substrates (Przemieniecki et al., 2015).

As water is the most limiting factor for agricultural production, water scarcity could potentially lead to lands abandonment due to economic losses (EEA, 2009). From a microbiological point of view, some bacteria in irrigation well water may constitute potential source of significant metabolic richness with high ability to interact with plants, leading to yields improvement, soil restoration and pathogens biocontrol (Bensidhoum et al., 2016). In addition, PGPB are isolated from different natural sources including soil, plants and mineral waters (Ramadan et al., 2015; Bensidhoum et al., 2016). Herein, we selected four multi PGP- and antagonistic-treats bacteria from an irrigation well water in Northern Algeria. The bacteria were screened for their ability to produce metabolites such as hydrogen cyanide (HCN), ammonia, indole acetic acid (IAA), hydrolytic enzymes, siderophores etc. After identification, the multi-PGP isolates were tested for their *in vitro* ability to inhibit fungal growth and sporulation. The PGP ability of the selected strains was then verified on tomato and pea plants and biocontrol properties against pathogens was confirmed on pea plants growing on *Pythium aphanidermatum*-infected soil.

## 2. Materials and methods

### 2.1. Water sampling

Bacteria were isolated from water samples of an irrigation well located in the region of Djebira in Bejaia, northern Algeria (36°41'59.2"N; 5°04'28.8"E). The samples were transported to the laboratory at 4 °C and bacterial isolation was immediately performed on Plate Count Agar medium (PCA). Thus, the samples were serially diluted (up to 10<sup>-6</sup>) and each dilution served as inoculum for three PCA plates (1 ml/Petri dish). After incubation (72 h at 30 °C), the phenotypically different colonies were purified on the same medium and conserved for further studies.

### 2.2. Fungal strains and growth conditions

The plant pathogenic fungi used in this work were *Botrytis cinerea* BC1, kindly provided by the laboratory of Mycology (University of Bejaia-Algeria), and *Aspergillus niger* ATCC 9642, available at the Institute of Bioscience and Bio-Resources (IBBR)-CNR, Italy. The two fungal strains were revived and purified on Potato Dextrose Agar (PDA) medium before use.

### 2.3. Selection procedure and antifungal activity

Initially, 48 bacterial isolates, obtained from water samples were tested for their antifungal potential against the aforementioned fungal strains, using agar diffusion method as described by Sagahón et al.

(2011). Thus, 5 mm diameter PDA plugs, containing young mycelium of either *B. cinerea* or *A. niger*, were taken from actively growing colonies (4 days old) and then deposited in the plate center of the same medium. 10-μL overnight cultures of each bacterial strain, growing on Luria Bertani broth, were spotted at 1.5 cm from the plate edge (three spots/plate). The plates were sealed with parafilm and incubated for 7 days at 21 ± 2 °C (*B. cinerea*) and 25 ± 2 °C (*A. niger*). Controls without bacteria were used and the experiment was done in duplicates. At the end, the percentage of mycelial growth inhibition (PGI) was calculated according to the following formula: PGI% = KR-R1/KR × 100 (KR is the distance in mm covered by the fungi in the control plate; R1 is the distance in mm between the fungi and the bacterial colony) (Soylu et al., 2005).

Four isolates, selected following the previous test, were phenotypically characterized (cell/colony shape, Gram, catalase, oxidase, mobility) (Guiraud and Galzy, 1980). They were then phylogenetically identified based on their 16S rRNA sequences and used for further studies.

### 2.4. Spore's germination inhibition

The selected strains' ability to inhibit fungal spore's germination was screened by mixing 20 μL of the spore suspension (10<sup>6</sup> spores/mL) with equal volumes of 24 h-old bacterial culture grown in LB medium (10<sup>8</sup> CFU/mL). The mixtures were kept in Eppendorf tubes containing 1 mL of 5% glucose solution, prepared in sterile distilled water. The tubes were incubated at 21 ± 2 °C (*B. cinerea*) and 25 ± 2 °C (*A. niger*) for 24 h. Control tubes with only fungal spores were prepared and the experiment was repeated in triplicate. The spores' germination success was hemocytometrically measured by determining the percentage of spores germination inhibition (SGI%) (Sadfi-Zouaoui et al., 2008).

### 2.5. Antifungal volatiles production

The production of volatile compounds implicated in the strains' antagonistic activities was assayed using the protocol described by Dennis and Webster (1971). A bottom portion of PDA-containing plates was inoculated with 5 mm disc of the pathogen fungi (*B. cinerea* or *A. niger*). A similar bottom portion was streaked with the antagonist. Both bottom plates were placed face to face and sealed with parafilm. Plates without bacteria were used as control. The fungal radial growth was recorded, 7 days later, as compared to the control.

### 2.6. Metabolic and functional characterization

#### 2.6.1. Hydrolytic enzymes secretion

Hydrolytic enzymes production by the selected strains were tested using agar disk methods. The bacterial strains were initially grown on PCA plates for 48 h at 30 °C. Five mm agar discs, containing the obtained cultures, were used to determine cellulolytic (Carder, 1986), esterase (Carrim et al., 2006), lipolytic (Carrim et al., 2006), chitinolytic (Kopečný et al., 1996), proteolytic (Carrim et al., 2006), amylolytic (Vinoth et al., 2009) and ureasic (Christensen, 1946) activities.

#### 2.6.2. Phosphate solubilization

The ability of the four strains to solubilize tricalcium phosphate was tested on Pikovskaya's agar medium, as described by Peix et al. (2001). After 3 days of incubation (30 °C), phosphate-solubilizing bacteria generate transparent halos around colonies.

#### 2.6.3. Siderophores production

The bacterial isolates were assayed for siderophores production on the Chrome Azurol-S agar medium, as described by Schwyn and Neilands (1987). After incubation (30 °C/48–72 h), the development of yellow to orange halo around the colony indicated siderophores

production by the strain.

#### 2.6.4. Indole Acetic acid (IAA) synthesis

IAA production was determined using the protocol originally proposed by Bric et al., (1991). Therefore, the strains were incubated under agitation (100 rpm; 30 °C; 3 days) in LB tubes supplemented with 0.5% glucose and 500 µg/mL L-tryptophan. Five mL of each culture was centrifuged (9000g; 20 min) and 2 ml of Salkowski's reagent (2% 0.5 M FeCl<sub>3</sub> in 35% perchloric acid) was mixed with an equal volume of the culture supernatant. The mixture was then incubated in darkness at room temperature for 25 min. IAA production was spectrophotometrically measured (530 nm) and quantified by extrapolation on a standard curve previously prepared with pure IAA solutions.

#### 2.6.5. Hydrogen cyanide (HCN) production

HCN production was detected according to the method of Lorck (1948). A nutrient agar was supplemented with filter-sterilized glycine solution (4.4 g/L) before to be casted in Petri dishes. The plates' covers were upholstered by Whatman paper impregnated with sodium picrate solution (5% picric addition of 2% anhydrous sodium carbonate acid). Fresh bacterial culture (100 µL) was flooded on the agar using sterile swabs then Petri dishes were sealed with parafilm and incubated at 30 °C for 96 h. The transformation of the yellow color on Whatman paper (initially provided by the solution of sodium picrate) to orange or brown color indicates HCN production by the strain.

#### 2.6.6. Ammonia (NH<sub>3</sub>) production

Freshly grown cultures of the selected strains were inoculated into peptone water-containing tubes (5 mL) and incubated at 30 °C for 48 h. After incubation, 0.25 mL Nessler's reagent was added to each tube. The mixture's color transformation to brown or to yellow indicates ammonia production by the tested bacteria (Cappucino and Sherman, 1992).

#### 2.6.7. Phylogenetic identification

Total genomic DNA from the four bacterial strains was isolated using the PureLink® Genomic DNA Mini Kit (Invitrogen/Thermo Fisher Scientific, USA). Amplification of 16S rDNA was carried out using Phusion Green Hot Start II High-Fidelity DNA Polymerase (Thermo Fisher Scientific, USA) with 25 ng of genomic DNA as template and the universal primers 27F (5'-GAGTTTGATCCTGGCTCAG-3') and 1492R (5'-GGTTACCTTGTTACGACTT-3') (Edwards et al., 1989; Stackebrandt and Liesack, 1993). PCR were performed with the following conditions: one cycle at 98 °C for 30 s, 35 cycles at 98 °C for 10 s, 54 °C for 30 s, and 72 °C for 45 s, and a final cycle at 72 °C for 7 min. After amplification, reaction products were analysed on 1.0% agarose gel. DNA sequencing was carried out on both strands using the amplification primers at Eurofins Genomics (Ebersberg, Germany). The obtained sequences were subjected to BLAST analysis on the NCBI database (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) and aligned using the MUSCLE program contained in the CLC Main Workbench 7.8.1 software package (QIAGEN Aarhus, Denmark). Maximum likelihood (ML) phylogenetic analysis was performed using the program MEGA 6.0 with the best nucleotide substitution model identified for the data set (K2 + G + I) (Tamura et al., 2013). Statistical support for the different internal branches was assessed by bootstrap resampling (1000 bootstrap replications). Finally, bootstrap consensus trees were constructed.

### 2.7. Antifungal activity and induction assays

#### 2.7.1. Induction and antifungal activity assays

The strains' antifungal activity was evaluated against *A. niger*. It was plated on PCA agar and incubated at 28 °C until sporulation. To obtain extracellular filtrates with antifungal activity, bacteria were inoculated on LB broth, incubated (30 °C/180 rpm) then collected 24 h later. Thereafter, the bacterial suspensions were added in holes placed on

PCA plates where the fungus spores were scraped. The bacterial suspensions were withdrawn from the holes after two days of incubation at 28 °C and the samples were centrifuged at 8000 rpm. The obtained cell free supernatants (extracellular fraction) of each isolate were sterilized by filtration, using a 0.22-µm pore diameter membrane, and then 300 µL of the filtrate was added in holes placed on PCA plates where the fungus spores were scraped. The plates were incubated at 28 °C for 72 h. The filtrates with antifungal activity were those that inhibited the growth of the fungus. The same experiments were also performed on the extracellular fractions obtained from the bacterial strains cultured without co-incubation with the fungus, as a control.

#### 2.7.2. Preparation of intracellular and surface-membrane protein fractions

The preparation of intracellular and surface-membrane protein fractions was performed according to Gogliettino et al. (2010) with some modifications. The bacterial suspensions, withdrawn after the co-incubation experiments, were centrifuged at 8000 rpm for 45 min and the pellets were re-suspended in lysis buffer (50 mM Tris-HCl, pH 7.5, 2 mM EDTA, 1 mM PMSF). Cells were lysed by sonication (four cycles with a 60-s pulse and 60 s off) using a Soniprep (B. Braun Labsonic U) and unbroken cells were removed by centrifugation (13,000 rpm at 4 °C for 30 min). The supernatant represents the intracellular fraction. The surface-membrane protein fraction was prepared by re-suspending the cell pellets in 50 mM Tris-HCl (pH 7.5) buffer and solubilizing it by incubation for 15 min at 37 °C in the presence of 1% Triton X-100. Insoluble material was removed by centrifugation (13,000 rpm at 4 °C for 30 min) and the supernatants (membrane fraction) were harvested. The intracellular and membrane fractions were sterilized by filtration, using a 0.22-µm pore diameter membrane, and then the filtrates (30 µg from each fraction) were added in three holes placed on PCA plates where the fungus spores were scraped. The plates were incubated at 28 °C. The same experiments were also performed on the intracellular and surface-membrane protein fractions obtained from the bacterial cells cultured without co-incubation with the fungus. Protein concentration was determined by the Bradford assay (Bradford, 1976).

### 2.8. In vivo assays

#### 2.8.1. Plant growth promotion effect in tomato

Thirty days old tomato [*Solanum lycopersicum* L.; cv. Naxos F<sub>1</sub> (Nunhems)] seedlings were transplanted in 8 L-plastic pots containing steam-sterilized soil inoculated or not with the bacterial cell suspension. Bacterial inoculum was prepared in 1 L LB broth-containing bottles that were incubated under agitation (150 rpm) for 48 h at room temperature. The obtained culture was then centrifuged (8000 × g for 5 min) and the pellet was re-suspended in water. Cell suspension (OD<sub>600nm</sub> = 0.6) served as inoculum. *Pseudomonas protegens* strain CHA0, kindly provided by Christoph Keel, University of Lausanne, Switzerland, and *Pseudomonas* sp. strain DSMZ 13134, from the commercial product Proradix® (Sourcon Padena, Germany) were included in the experiments as reference strains. Inoculation was carried out one day before transplanting by drenching 60 mL inoculum per liter of soil. A randomized complete block design with four blocks (12 plants/pot) was used. Twenty days after transplanting, fresh weight of the above-ground parts of tomato seedlings was measured

#### 2.8.2. Control of *Pythium* Damping-off in pea

Pea (*Pisum sativum* L. cv. Sprinter) seeds were sowed in 8 L-plastic pots containing steam-sterilized soil inoculated with *Pythium aphanidermatum* IPSP-GB556 strain and bacterial cell suspension. Pots inoculated only with pathogen but not bacteria, or non-inoculated, served as the controls. *P. protegens* CHA0 and *Pseudomonas* sp. DSMZ 13134 were included in the experiment. Inoculum of *P. aphanidermatum* was prepared according to Bates et al. (2008) and used for soil inoculation (5% v/v). Inoculum preparation and inoculation procedures were carried out as described above. A randomized complete block design with

four blocks (20 seeds/pot) was used. Sixteen days after sowing, the percentage of plant emergence and the whole plant fresh weight were measured.

### 2.9. Statistical analysis

A binomial model (GENMOD procedure) was used to analyze plant emergence data, and multiple comparisons of means was based on least-squares means statistics ( $P < .05$ ), using SAS/STAT v. 9.0 (SAS Institute, Cary, NC). All other data were subjected to one-way ANOVA for column analysis ( $P < .05$ ), using Graph Pad Prism v. 6.01.

## 3. Results

### 3.1. Mycelial growth inhibition

In this study, 48 bacterial strains were isolated from agricultural well water and screened based on their ability to antagonize the phytopathogen fungi *B. cinerea* and *A. niger*. Among these, four isolates designated B, C, D and N, revealed to be the most effective strains against the two tested phytopathogens. Specifically, B and N strains showed the highest antifungal activity against *A. niger* mycelia (about 90%), while about 68% growth inhibition was achieved by the isolates C and D (Fig. 1A). In addition, the isolate D exhibited 82.5% antagonistic effect against *B. cinerea*, while the isolates N, C and B resulted in PGI ranging from 80% (N) to 63% (B) against the same fungus (Fig. 1B).

### 3.2. Spores germination inhibition

The germination success of *A. niger* spores was reduced by 20% in the presence of the tested strains, while 100% of the untreated spore suspensions (control) succeeded germination (Fig. 2A). In addition, the four strains completely inhibited *B. cinerea* spore's germination (100% inhibition), whilst only about 10% of spores' germination failure was observed in absence of bacteria (Fig. 2B).

### 3.3. Phenotypic and phylogenetic identification

The four strains appeared rod-shaped at the microscope, showing the appearance of a bacillus; they were Gram negative, motile, and positively reacted to catalase and oxidase tests. Moreover, the identification of the selected bacteria was determined by amplification and sequencing of the 16S rRNA genes. Specifically, the B, D and N sequences obtained the best BLAST hits with strains belonging to the *Pseudomonas* genus, while, the sequence of the isolate C showed the highest matches belonging to *Serratia* genus. Moreover, the phylogenetic analysis revealed that 16S rRNA gene sequences of the isolates B, D and N formed a distinct cluster with *Pseudomonas protegens* CHA0 (99.93% of sequence identity). On the other hand, the isolate C

displayed the highest sequence identity (99.86%) with both *Serratia quinivorans* strain LMG 7887 and *Serratia quinivorans* strain 4364. Anyway, despite the strong homologies identified for the 16S rRNA genes of the four isolates, this analysis only allowed the unambiguous attribution of the genus.

### 3.4. Detection of plant growth promoting traits and antagonistic properties

The four strains produce protease, lipase, chitinase, esterase, and urease enzymes but no amylases, and the strain C was the only one able to degrade tricalcium phosphate. Concerning the siderophores and ammonia synthesis, positive signals were recorded for all the strains under investigation. Moreover, lower HCN amounts were detected in the presence of the two isolates B and D as compared to C and N. Otherwise, IAA amounts, produced in Tryptophan-supplemented LB medium, ranged from  $2.40 \mu\text{g/ml} \pm 0.65$  for the strain C to  $5.09 \mu\text{g/ml} \pm 0.65$  for the strain D (Table 1).

### 3.5. Volatiles substances synthesis

The effect of bacterial volatile compounds on mycelial development on Petri plates was determined by measuring the percentage of growth inhibition as compared to a negative control (in the absence of bacteria). The reduction in *A. niger* growth induced by the volatiles production ranged from 8% to 22% for the isolates B, N, C and D (Fig. 3A). Moreover, the strain C showed the best inhibitory result against *B. cinerea* through volatiles emission (50.8%), whilst the isolates D and N significantly reduced *B. cinerea* propagation by 25.8 and 21.3%, respectively (Fig. 3B).

### 3.6. Localization of the antifungal compounds and induction assays

Petri dish-based assays were carried out to investigate the localization of antifungal compounds produced by the selected bacterial strains (B, C, D and N), using *A. niger* as fungus model. Firstly, the extracellular filtrates obtained from 24 h-old bacterial culture of the four strains were spotted on Petri dishes, scraped with fungal spores, but no inhibition of fungal development was detected (Fig. 4, upper panel). Therefore, in order to verify if the antifungal activity was confined to specific cell compartments, the surface-membrane and the intracellular protein fractions were prepared and tested. Again, no growth inhibition was evidenced, suggesting that these bacteria could exert their antifungal activity only in presence of the fungus (data not shown).

Therefore, we set up induction experiments, exposing the bacterial cultures to the fungus for possible induction of the antifungal activity compounds. The bacterial suspensions were withdrawn from holes made in agar plates containing the fungus and centrifuged to collect the cell-free supernatant and cell pellets. Impressively, the extracellular and surface-membrane preparations showed significant antifungal activities

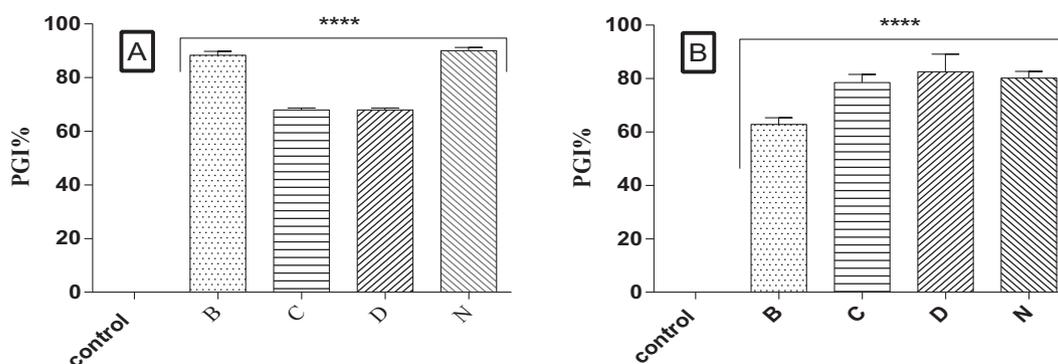


Fig. 1. Mycelial growth inhibition (percentage) of *A. niger* (A) and *B. cinerea* (B) by the antagonistic strains B, C, D, and N in Petri dual culture test. \*\*\*\*: significant difference ( $p < .0001$ ).

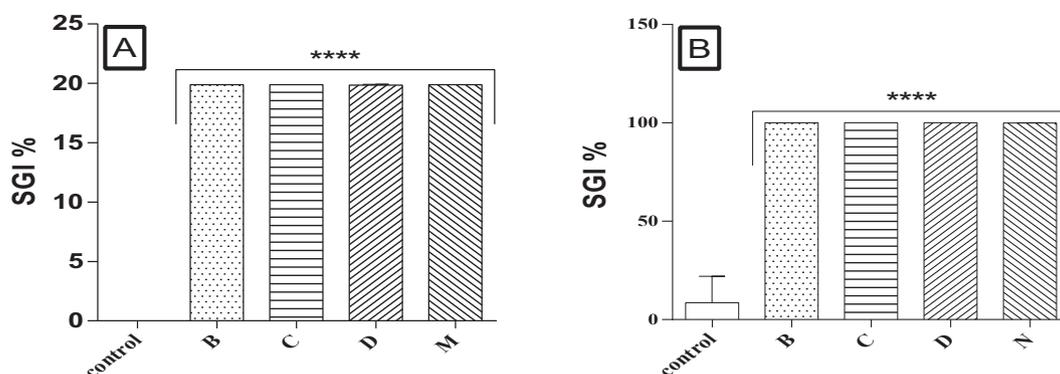


Fig. 2. Spore's germination inhibition (%) of *A. niger* (A) and *B. cinerea* (B) by the antagonistic strains B, C, D, and N in Petri dual culture test. \*\*\*\*: significant difference ( $p < .0001$ ).

Table 1  
Plant growth promoting and antagonistic traits of the analyzed isolates.

	B	C	D	N
Protease	+	+	+	+
Lipase	+	+	+	+
Cellulase	-	+	+	-
Chitinase	++	+++	+++	+
Esterase	+++	+++	+++	+++
Amylase	-	-	-	-
Urease	++	+++	+	+++
Siderophores	+++	+++	+++	+++
Phosphate solubilization	-	+	-	-
IAA ( $\mu\text{g/mL}$ )	$3.32 \pm 0.25$	$3.21 \pm 1.14$	$5.09 \pm 0.65$	$2.40 \pm 0.65$
NH <sub>3</sub>	+++	+++	+++	+++
HCN	+	+++	+	+++

+++ : high activity. ++ : intermediate activity. + : low activity. - : no activity

when tested on the fungus, confirming our suggestion about the inducible character of their antifungal activity (Fig. 4, down panel). In addition, the extracellular fractions obtained from all the strains under investigation, were able to affect consistently the spore production of the fungus, being the N strain the most efficient, as shown in Fig. 4.

### 3.7. Plant growth promotion effects on tomato plants

PGP effects exerted by bacterial strains were evaluated in pot-grown tomato by measuring shoot fresh weight 20 days after soil inoculation. The strain C significantly increased tomato fresh weight (+15%) as compared to non-inoculated controls (Fig. 5). The other bacteria, including the two commercial reference strains (CHA0 and DSMZ 13134), increased tomato growth by 2–10%, as compared to the control.

### 3.8. Control of Pythium Damping-off in pea

The bacterial strains were evaluated for the control of *Pythium* damping-off in pea by determining plant emergence 16 days after sowing in soil inoculated with *Pythium aphanidermatum*. The *Pythium* infection drastically reduced pea emergence from 83.3% in non-inoculated control to only 7.5% in pathogen-inoculated soil (Fig. 6A). All bacterial strains, except D, reduced *Pythium* damping-off compared to control, but such reduction was statistically significant only for the strain N. In soil inoculated with N, plant emergence was 26.3% i.e. a sevenfold increase compared to pathogen-inoculated control. Effectiveness of the strain N was superior to the references strain CHA0 and DSMZ 13134, which increased plant emergence by 4.3- and 2-fold, respectively. The strains B and C determined non-significant increase in plant emergence (2.7- and 3.7-fold, respectively).

In pathogen-inoculated soil, emerged plants also showed a 54% weight reduction (0.23 g/plant) compared to non-inoculated control (0.50 g/plant) (Fig. 6B). Increase in plant weight was observed upon bacteria inoculation, that raised by 43% and 48% in soil inoculated with N and CHA0, respectively, although such an increment was not statistically significant compared to pathogen-inoculated control. In pots inoculated with the other strains, a null or negative variation in weight was observed.

## 4. Discussion

Using chemical fungicides in agriculture causes serious environmental pollution and health concerns. In addition, their efficiency is continually decreasing due to emergence of resistant pathogens (Handelsman and Stabb, 1996; Zhu et al., 2007). Thus, the application of antagonistic microorganisms or their active metabolites as an ecologically sustainable alternative to chemicals constitute a non-negligible approach to follow (Haggag and Mohamed, 2007).

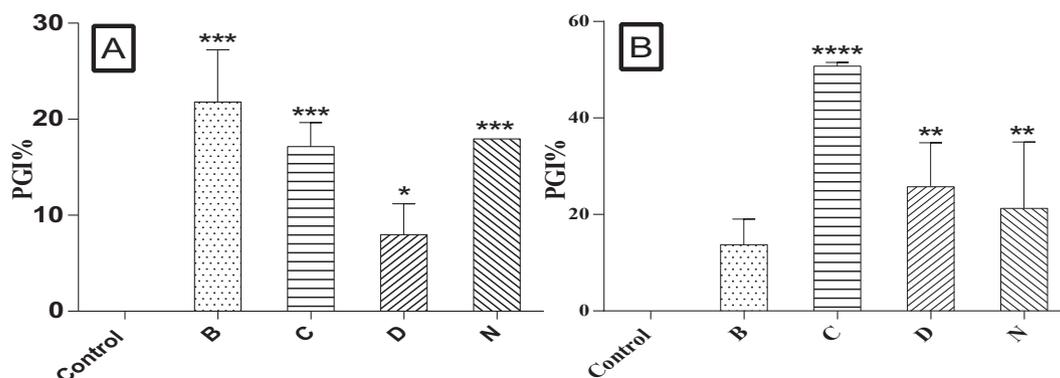


Fig. 3. Effect of volatiles substances produced by the four strains on growth inhibition (PGI%) of *A. niger* (A) and *B. cinerea* (B).

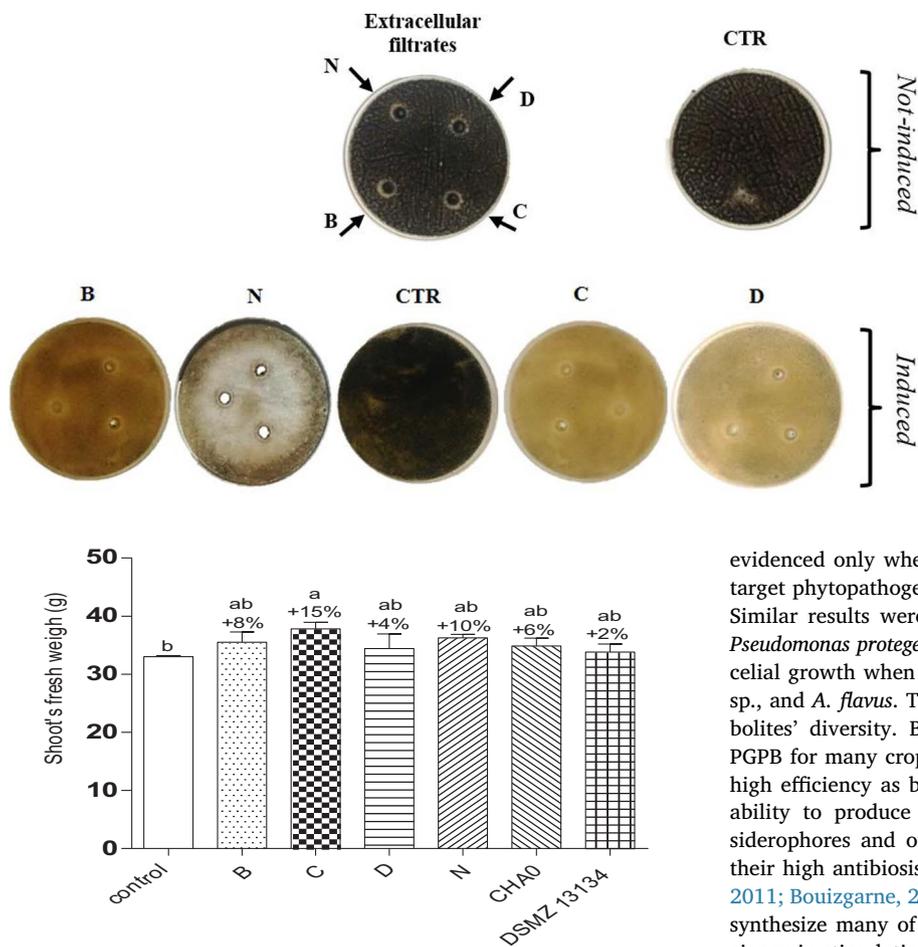


Fig. 5. Growth promoting effect on pot-grown tomato plants. *Pseudomonas protegens* CHA0 and *Pseudomonas* sp. DSMZ 13134 were included as reference strains. Bars with different letters are significantly different according to LSD test ( $p < .05$ ).

In this work, we selected four strains, three of which were identified as belonging to the *Pseudomonas* genus (B, N and D), while the isolate C was molecularly identified as belonging to the genus *Serratia*. Such bacteria were already reported to be effective against plant pathogens (Bensidhoum et al., 2016; Rai et al., 2016; Kamil et al. 2007; Khare et al., 2010) by competing for niches and nutrients, but also by stimulating plant defenses and producing fungal toxic compounds (Timmusk, 2003; De Vleeschauwer and Höfte, 2007).

All the selected strains showed an efficient fungal growth inhibition *in vitro* against *A. niger* and *B. cinerea*. Interestingly, this activity was

Fig. 4. Inducible antifungal activity obtained with culture supernatants of the strains B, N, C and D. The supernatants were obtained from spots of 24 h bacterial cultures in presence of the fungus *A. niger*.

evidenced only when the bacteria were grown in the presence of the target phytopathogens suggesting a clear induction effect of the fungi. Similar results were obtained by Rai et al. (2016), reporting that a *Pseudomonas protegens* (strain RhiNA) exerted potent inhibition of mycelial growth when confronted to the fungi *B. cinerea*, *A. niger*, *Mucor* sp., and *A. flavus*. They attributed this capacity to the produced metabolites' diversity. Bacteria belonging to *Pseudomonas* are known as PGPB for many crops (potato, radish, sugar, beet, lettuces etc.). Their high efficiency as biostimulants and biocontrol agents is due to their ability to produce antibiotics, phytohormones, hydrolytic enzymes, siderophores and other metabolites of agricultural interest, ensuring their high antibiosis, competition, and parasitism (Tri Wahyudi et al., 2011; Bouizgarne, 2013). The strains selected in this study were able to synthesize many of these metabolites, which could explain their efficiency in stimulating tomato and infected pea seedlings.

For many years, extracellular enzymes secretion has been associated with biocontrol abilities of the producing bacteria. Thus, some bacterial enzymes are able to destroy fungal spores, affecting their germinability and inhibiting their mycelial growth (Bouizgarne, 2013). Bacteria such as *Enterobacter*, *Erwinia*, *Bacillus*, *Burkholderia*, *Stenotrophomonas* and *Rhizobium* have been reported to be effective against several phytopathogenic fungi. However, *Pseudomonas*-belonging bacteria are the most widely studied in biological agents' development (John Rusagara Nzungize et al., 2012; Rai et al., 2016). Gohel et al. (2006) mentioned that chitinase- and protease-producing microorganisms might cause fungal cell wall lysis, contributing to pathogen elimination. Otherwise, Suresh et al. (2010) and Raaijmakers et al. (2002) reported that the PGP ability of *Pseudomonas fluorescens* is also due to HCN, siderophores, protease, antimicrobials, and phosphate solubilizing enzymes synthesis.

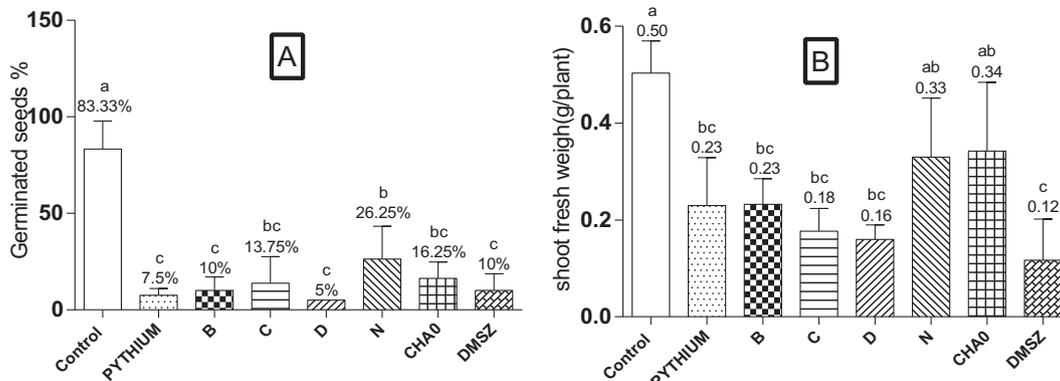


Fig. 6. Control of *Pythium* damping-off in pea: plant emergence (A) and weight (B). *Pseudomonas protegens* CHA0 and *Pseudomonas* sp. DSMZ 13134 were included as reference strains. Bars with different letters are significantly different according to the least-squares means statistics (A;  $p < .05$ ) or LSD test (B;  $p < .05$ ).

Siderophores, HCN, pyrrolnitrine, phenazine and 2, 4-diacetyl phloroglucinol, lytic enzymes (chitinase, cellulase, protease etc.), and other antibiotics production by bacteria belonging to the genus *Pseudomonas*, and their efficiency against fungal pathogens are widely reported (Raaismakers et al., 2002; Al-Hinai et al., 2010; Suresh et al., 2010; Bensidhoum et al., 2016). In addition, Islam et al. (2012) justified the inhibitory effect of some antagonistic pseudomonads to their ability to inhibit the integral functioning of some fungal cell wall components, altering the fungal membranes permeability.

Siderophores are low molecular weight ligands that are produced by organisms as iron-scavenging agents when available forms of iron are limited (Hofte and Bakker, 2007; Saha et al., 2015). They provide competitive advantages to the producer organism for iron absorption (Suresh et al., 2010). According to Bensidhoum et al. (2016), bacterial siderophores production indirectly stimulates plant growth through phytopathogens inhibition and competition for ferric iron resources in soils. Furthermore, Zhu et al. (2007) reported the presence of negative correlation between chlamydo-spores germination and inoculation by *Pseudomonas* sp. or its pyoverdine-type siderophore.

In this study, pea seeds germination in the presence of *Pythium aphanidermatum* was enhanced by +83% after inoculation by *Serratia* sp.-C comparing to the non-treated control. It also stimulated tomato growth by 15%. Such PGP and biocontrol activities of *Serratia* species could be explained by its ability to produce IAA, siderophores and to solubilize tricalcium phosphate. Brurberg et al. (1996) reported that bacteria belonging to the genus *Serratia* are known to be highly efficient for chitin degradation. They produce up to five different chitinolytic enzymes upon induction with chitin. Chitin-degrading enzymes inhibit fungal growth by hydrolyzing their chitin-containing cell walls (Kamil et al., 2007; Velusamy and Kim, 2011). According to Velusamy and Kim (2011), strong correlation was observed between bacterial chitinolytic potential and their *in vitro* fungal mycelium lysis. In addition, volatile compounds such as ammonia and HCN could be implicated in mycelial growth inhibition (Trivedi et al., 2008; Vanitha and Ramjagathesh, 2014). Consistently with Islam et al. (2012), microbial organic volatiles are implicated in initiating some biochemical changes of plants metabolism, hence inhibiting protein synthesis. Moreover, Ramette et al. (2003) reported that HCN production by *Pseudomonas fluorescens* is recognized to be effective in root diseases biocontrol, inhibiting the terminal cytochrome-C oxidase in the fungal respiratory chains and causing severe damages to the fungal metabolism.

IAA is by far the most common as well as the most studied phytohormone. It affects plant roots elongation, nodulation process, cell division and differentiation, and stimulates seeds and tubers germination (Maleki et al., 2010). IAA also controls vegetative growth, photosynthesis, pigment formation and biosynthesis of various metabolites, providing plant growth stimulation and resistance to stressful conditions (Glick, 2012). Ponmurugan and Gopi (2006) reported the role of IAA-producing *Pseudomonas* in enhancing pea roots development and hence, other plant growth parameters. Quantitatively, IAA is the most naturally occurring auxin produced by bacteria. In addition, a positive correlation was reported by Basharat et al. (2009) concerning *in vitro* auxin production by soil bacteria and their ability to promote plant growth under different circumstances. However, Baca and Elmerich (2007) reported that plants response to IAA-producing bacteria depends on several parameters, such as the plant species and the produced amount.

Soil-born oomycete pathogens such as *Pythium* cause damping-off and root rot diseases, damaging young seedlings of several horticultural and vegetable crops under both greenhouse and field production systems (Khabbaz and Abbasi, 2014). In addition, *P. aphanidermatum* is the most widespread and aggressive species of *Pythium* genus, being implicated in severe losses of the most economically important crops (cereals, leguminous, legumes) (Levenfors, 2003; Agrios, 2005; Nwaga et al., 2007; Dimova et al., 2010; Parveen and Sharma, 2015). It infects seeds, seedlings, plant stem, fruits and roots, inducing seeds pre- or

post-emergence damping-off, seedlings general stunting, leaf fall or plant death (Rankin and Paulitz, 1994; Uzuhashi et al., 2010; Múnera and Hausbeck, 2016). In addition, Parveen and Sharma (2015) reviewed that *Pythium* species are not host-specific. Their resistant zoospores, able to infect growing roots, are able to germinate rapidly due to exudates or volatiles exposure from seeds or roots. Thus, chemically treated crops can be exposed to repeated infections waves throughout the cropping season (Nzungize et al., 2011).

According to Vanitha and Ramjagathesh (2014), applying biocontrol agents against *Pythium aphanidermatum* can indirectly promote plant growth for a long time by persisting in soil, thus, giving them several advantages as compared to chemicals. The study of Kraus and Loper (1992) showed that a *Pseudomonas* strain (pf-5) significantly increased cucumber seedlings emergence ( $\pm 60\%$ ) under *Pythium ultimum*-infested soil. They explained that by the strains' ability to compete for nutrients, but also by their antifungal metabolite secretion in soil. The same authors reported that a siderophore deficient *Pseudomonas* lost its ability to inhibit *Pythium* fungus. In addition, several *Serratia* species are known as chitinolytic bacteria. Bacteria with such character are considered as efficient biocontrol agents for various diseases, including those caused by *Pythium* species (Velusamy and Kim, 2011).

Applying soil bacteria that are able to compete oospores in germination for soluble carbon and nitrogen sources may reduce oospores germination and disease level. Such pathogen growth inhibition could be also attributed to antibiosis, parasitism or chitinase production, leading to fungus cell wall degradation through mycelium lysis (El-Mohamedy and El-Mougy, 2009).

In pre-emergence damping-off, seed may be decayed or rot under soil surface directly after infection when moisture penetrates the seed coat or when the radical begins to extend, resulting in poor and uneven seedlings stand (Khabbaz and Abbasi, 2014). The strong antagonistic activity of the isolate *Pseudomonas* sp.-N against *Pythium* could be attributed to siderophores, protease, chitinase and IAA production (Khabbaz and Abbasi, 2014; Nzungize et al., 2012). Similar results were obtained with *Pseudomonas* strains when applied as biocontrol agents for pea protection against *Pythium* damping-off and *Aphanomyces* root rot (Abdel-Kader et al., 2012).

## 5. Conclusion

Irrigation well water could constitute an important source of bacteria with high agricultural interest. The three *Pseudomonas* sp. B, D, and N strains and the *Serratia* sp. C strain exhibited remarkable *in vitro* PGP and antagonistic traits. They also proved high efficiency in inhibiting fungal spores' germination and mycelial development. The *Pseudomonas* sp. -N revealed interesting ability to promote tomato and pea growth under both normal and *Pythium*-infected soils, as compared to the two commercial PGPB *P. protegens* CHA0 and *Pseudomonas* sp. DMSZ 13134. These attempts to understand the bacterial functional diversity in irrigation well water constitute an important contribution to develop new biological agent for plant growth enhancement and phytopathogens' biocontrol.

## Acknowledgments

Authors are grateful to Professor Houali Karim, head of the faculty "Biological and Agronomic Sciences, University of Tizi Ouzou, Algeria", for the internship financed by his faculty.

## References

- Abdel-Kader, M.M., El-Mougy, N.S., DE Aly, M., Lashin., 2012. Different approaches of bio-control agents for controlling root rot incidence of some vegetables under greenhouse conditions. *Int. J. Agric. For.* 1, 115–127.
- Agrios, G.N., 2005. *Plant Pathology*, fifth ed. Elsevier Academic Press, New York.

- Ahmadzadeh, M., Tehrani, A.H., 2009. Evaluation of fluorescent pseudomonads for plant growth promotion, antifungal activity against *Rhizoctonia solani* on common bean, and biocontrol potential. *Biol. Control*. 48, 101–107.
- Al-Hinai, A.H., Al-Sadi, A.M., Al-Bahry, S.N., Mothershaw, A.S., Al-Said, F.A., Al-Harhi, S.A., Deadman, M.L., 2010. Isolation and characterization of *Pseudomonas aeruginosa* with antagonistic activity against *Pythium aphanidermatum*. *J. Plant Pathol.* 3, 653–660.
- Baca, B.E., Elmerich, C. 2007. Microbial Production of Plant Hormones. Bacteria and Cyanobacterial Associations. In: Elmerich, C., Newton, W. E. (Eds.), *Associative and Endophytic Nitrogen-fixing Bacteria and Cyanobacterial Associations*, pp. 113–143.
- Basharat, A., Anjum, N.S., Karin, L., Shahida, H., 2009. Quantification of indole-3-acetic acid from plant associated *Bacillus spp.* and their phyto-stimulatory effect on *Vigna radiata* (L.). *World J. Microbiol. Biotechnol.* 25, 519–526.
- Bates, G.D., Rothrock, C.S., Rupe, J.C., 2008. Resistance of the soybean cultivar Archer to *Pythium* damping-off and root rot caused by several *Pythium spp.* *Plant Dis.* 92, 763–766.
- Beneduzi, A., Ambrosini, A., Passaglia, L.M.P. 2012. Plant growth-promoting rhizobacteria (PGPR): their potential as antagonists and biocontrol agents. *Genet. Mol. Biol.* 35, 4 (suppl), 1044–1051.
- Bensidhoum, L., Nabti, El-H, Tabli, N., Kupferschmied, P., Weiss, A., Rothballer, M., Schmid, M., Keel, C., Hartmann, A., 2016. Heavy metal tolerant *Pseudomonas protegens* isolates from agricultural well water in northeastern Algeria with plant growth promoting, insecticidal and antifungal activities. *Eur. J. Soil Biol.* 75, 38–46.
- Borges, A.A., Jiménez-Arias, D., Expósito-Rodríguez, M., Sandalio, L.M., Pérez, J.A., 2014. Priming crops against biotic and abiotic stresses: MSB as a tool for studying mechanisms. *Front. Plant. Sci./Plant Physiol.* 5, 1–4.
- Bouzigarne, B., 2013. Bacteria for Plant Growth Promotion and Disease Management. In: Maheshwari, D.K. (Eds.), *Bacteria in Agrobiolgy: Disease Management*. pp. 15–47.
- Bradford, M.M., 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem.* 72, 248–254.
- Bric, J.M., Bostock, R.M., Silverston, S.E., 1991. Rapid in situ assay for indole acetic acid production by bacteria immobilization on a nitrocellulose membrane. *Appl. Environ. Microbiol.* 57, 535–538.
- Brurberg, M.B., Ingolf, F. Nes, Vincent, G.H.E., 1996. Comparative studies of chitinases A and B from *Serratia marcescens*. *Microbiology* 142, 1581–1589.
- Cappucino, J.C., Sherman, N., 1992. Negative staining. *Microbiol. Lab. Manual* 3, 125–179.
- Carder, J.H., 1986. Detection and condition of cellulase by Congo Red staining of substrates in a cup plate diffusion assay. *Analyt. Biochem.* 153, 75–79.
- Carrim, A.J.I., Barbosa, E.C., Gonçalves Vieira, J.D., 2006. Enzymatic activity of endophytic bacterial isolates of *Jacaranda decurrens* Cham. (Carobinha-do-campo). *Braz. Arch. Biol. Technol.* 49, 353–359.
- Christensen, W.B. 1946. Urea decomposition as a means of differentiating proteus and paracolon cultures from each other and from Salmonella and Shigella types. *J. Bacteriol.* 52, 461–466.
- Dennis, C., Webster, J., 1971. Antagonistic properties of species groups of *Trichoderma*, II. Production of volatile antibiotics. *Trans. Br. Mycol. Soc.* 57, 363–369.
- De Vleeschouwer, D., Höfte, M., 2007. Using *Serratia plymuthica* to control fungal pathogens of plants. *Perspect. Agric. Vet.Sci.Nutr. Nat.Resour.* 46, 1–12. <http://dx.doi.org/10.1079/PAVSNR20072046>.
- Dimova, M.A., Büttner, C., Gabler, J., Grosch, R., Bar-Yosef, B., Krling, H-P., 2010. Control of root zone pH is not effective in preventing *Pythium aphanidermatum* disease in cucumber. *J. Plant. Dis. Prot.* 62, 44–247.
- E. E. A. 2009. Audubon of Florida 444 Brickell Ave., Suite 850, Miami, FL 33131. <http://www.audubonoffloridanews.org>.
- Edwards, U., Rogall, T., Blocker, H., Emde, M., Bottger, E.C., 1989. Isolation and direct complete nucleotide determination of entire genes: characterization of a gene coding for 16S ribosomal RNA. *Nucl. Acids Res.* 17, 7843–7853.
- El Khoury, W., Makkouk, K. 2010. Integrated plant disease management in developing countries. *J. Plant Pathol.* 92 (4, Supplement), S4.35–S4.42.
- Elad, Y., Malathrakist, N.E., Dik, A.J., 1996. Biological control of *Botrytis*-incited diseases and powdery mildews in greenhouse crops. *Crop Protection* 3, 224–240.
- El-mohamedy, R.S.R., El-mougy, N.S., 2009. Occurrence of *Pythium rot* of chinese cabbage in egypt and its biocontrol measures. *J. Plant Protection Res. Appl. Environ. Microbiol.* 3, 1067–1071.
- Glick, B.R.B.R., 2012. Plant Growth-Promoting Bacteria: Mechanisms and Applications. Hindawi Publishing Corporation Scientifica.
- Gogliettino, M., Balestrieri, M., Pocsfalvi, G., Fiume, I., Natale, L., Rossi, M., Palmieri, G., 2010. A highly selective oligopeptide binding protein from the archaeon *Sulfolobus solfataricus*. *J. Bacteriol.* 192, 3123–3131.
- Gohel, V., Singh, A., Vimal, M., Ashwini, P., Chhatpar, H.S., 2006. Bioprospecting and antifungal potential of chitinolytic microorganisms. *Afr. J. Biotechnol.* 2, 54–72.
- Guiraud, J., P., Galzy, P., 1980. L'analyse microbiologique dans les industries alimentaires. *Edi Usine, Paris*.
- Haggag, W.M., Mohamed, H.A.-L.A., 2007. Biotechnological aspects of microorganisms used in plant biological control. *Am.-Eurasian J. Sustain. Agric.* 1, 7–12.
- Haggag, W.M., Abouzienna, H.F., Abd-El-Kreem, F., El Habbasha, S., 2015. Agriculture biotechnology for management of multiple biotic and abiotic environmental stress in crops. *J. Chem. Pharm. Res.* 10, 882–889.
- Handelsman, J., Stabb, E.V., 1996. Biocontrol of soilborne plant pathogens. *Plant Cell* 8, 1855–1869.
- Höfte, M., Bakker, P.A.H.M. 2007. Competition for Iron and Induced Systemic Resistance by Siderophores of Plant Growth Promoting Rhizobacteria. In: Varma, A., Chincholkar, S.B. (Eds.), *Microbial siderophores*. pp. 121–133.
- Islam, M.R., Jeong, Y.T., Lee, Y.S., Song, C.H., 2012. Isolation and identification of antifungal compounds from *Bacillus subtilis* C9. *Mycobiology* 1, 59–66.
- Itier, B., 2008. Agriculture et recherche: le contexte et les enjeux. *Innovation Agronomique* 2, 1–8.
- Kamil, Z., Rizk, M., Saleh, M., Moustafa, S., 2007. Isolation and identification of rhizosphere soil chitinolytic bacteria and their potential in antifungal biocontrol. *Glob. J. Mol. Sci.* 2, 57–66.
- Khabbaz, S.E., Abbasi, P.A., 2014. Isolation, characterization, and formulation of antagonistic bacteria for the management of seedlings damping-off and root rot disease of cucumber. *Can. J. Microbiol.* 60, 25–33.
- Khare, A., Singh, B.K., Upadhyay, R.S., 2010. Biological Control of *Pythium aphanidermatum* causing damping-off of mustard by mutants of *Trichoderma viride* 1433. *J. Agric. Technol.* 62, 231–243.
- Kopecný, J., Hodrová, B., Stewart, C.S., 1996. The isolation and characterization of a rumen chitinolytic bacterium. *Lett. Appl. Microbiol.* 23, 195–198.
- Kraus, J., Loper, J.E., 1992. Lack of evidence for a role of antifungal metabolite production by pseudomonas fluorescens Pf-5 in biological control of pythium damping-off of cucumber. *Mol. Plant. Path.* 82, 264–271.
- Levenfors, J., 2003. Soil-borne Pathogens in Intensive Legume Cropping - *Aphanomyces spp.* and root rots. Doctoral thesis Swedish University of Agricultural Sciences Uppsala. 54 p.
- Limura, K., Hosono, A., 1998. Antifungal activities of bacteria endemic to buckwheat seeds. *Fagopyrum*. 15, 42–54.
- Loqman, S., Ait Barka, E., Clément, C., Ouhdouch, Y., 2009. Antagonistic actinomycetes from Moroccan soil to control the grapevine gray mold. *World J. Microbiol. Biotechnol.* 25, 81–91.
- Lorck, H., 1948. Production of hydrocyanic acid by bacteria. *Physiol. Plant.* 1, 142–146.
- Maleki, M., Mostafae, S., Mokhtarnejad, L., Farzaneh, M., 2010. Characterization of *Pseudomonas fluorescens* strain CV6 isolated from cucumber rhizosphere in Varamin as a potential biocontrol agent. *Aust. J. Crop. Sci.* 9, 676–683.
- Múnera, J.D.C., Hausbeck, M.K., 2016. Characterization of *Pythium* Species associated with greenhouse floriculture crops in Michigan. *Plant Dis.* 3, 569–576.
- Niranjan Raj, S., Shetty, H.S., Reddy, M.S. 2006. Plant growth-promoting rhizobacteria: potential green alternative for plant productivity. In: Siddiqui, A. (Eds.), *PGPR: Biocontrol and Biofertilization*, pp. 197–216.
- Nwaga, D., Fankem, H., Essono, O.G., Laurette, N.N., Randrianangaly J.S., 2007. Pseudomonads and symbiotic microorganisms as biocontrol agents against fungal disease caused by *Pythium aphanidermatum*. *Afr. J. Biotechnol.* 3, 190–197.
- Nzungize, J.R., Lyumugabe, F., Busogoro, J.-P., Baudoin, J.-P., 2012. *Pythium* root rot of common bean: biology and control methods. A review. *Biotechnol. Agron. Soc. Environ.* 3, 405–413.
- Nzungize, J., Gepts, P., Buruchara, R., Buah, S., Ragama, P., Busogoro, J.P., Baudoin, J.P., 2011. Pathogenic and molecular characterization of *Pythium* species inducing root rot symptoms of common bean in Rwanda. *Afr. J. Microbiol. Res.* 10, 1169–1181.
- Pal, K.K., McSpadden Gardener, B., 2006. Biological control of plant pathogens. *Plant Health Instructor*. <http://dx.doi.org/10.1094/phi-a-2006-1117-02>.
- Parveen, T., Sharma, K., 2015. *Pythium* diseases, control and management strategies: a review. *Int. J. Plant. Anim. Environ. Sci.* 1, 2231–4490.
- Peix, A., Rivas-Boyerob, A.A., Mateos, P.F., Rodriguez-Barruecoa, C., MartoÁñez-Molinab, E., Velazquez, E., 2001. Growth promotion of chickpea and barley by a phosphate solubilizing strain of *Mesorhizobium mediterraneum* under growth chamber conditions. *Soil. Biol. Biochem.* 33, 103–110.
- Ponmuran, P., Gopi, C., 2006. *In vitro* production of growth regulators and phosphatase activity by phosphate solubilizing bacteria. *Afr. J. Biotechnol.* 54, 348–350.
- Przemieniecki, S.W., Kurowski, T.P., Karwowska, A., 2015. Plant growth promoting potential of pseudomonas sp. sp0113 isolated from potable water from a closed water well. *Arch. Biol. Sci. Belgrade.* 2, 663–673.
- Raaijmakers, J.M., Vlami, M., de Souza, J.T., 2002. Antibiotic production by bacterial biocontrol agents. *Antonie van Leeuwenhoek* 81, 537–547.
- Rai, A., Bensidhoum, L., Tabli, N., Bouaoud, Y., Naili, F., Cruz, C., Nabti, E., 2016. A *Pseudomonas Protegens* with high antifungal activity protects apple fruits against *Botrytis Cinerea* Gray Mold. *Int. J. Sci. Res. Sci. Tech.* 2, 227–237.
- Ramadan, E.M., AbdelHafez, A.A., Hassan, E.A., Saber, F.M., 2015. Plant growth promoting rhizobacteria and their potential for biocontrol of phytopathogens. *Afr. J. Microbiol. Res.* 15, 486–504.
- 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. *Mol. Plant. Microb. Inter.* 6, 525–535.
- Rankin, L., Paulitz, T.C., 1994. Evaluation of rhizosphere bacteria for biological control of *Pythium* root rot of greenhouse cucumbers in hydroponic culture. *Plant Dis.* 78, 447–451.
- Reuveni, R., 1995. *Novel Approaches to Integrated Pest Management*, first ed. Lewis Publishers, Boca Raton, FL.
- Sadfi-Zouaoui, N., Hannachi, I., Andurand, D., Essghaier, B., Boudabous, A., Nicot, P., 2008. Biological control of *Botrytis cinerea* on stem wounds with moderately halophilic bacteria. *World J. Microbiol. Biotechnol.* 24, 2871–2877.
- Sagahón, I.P., Reyes, M.A.A., Rojas, H.V.S., Cuenca, A.A., Jurado, A.T., Alvarez, I.O.C., Flores, Y.M., 2011. Isolation of bacteria with antifungal activity against the phytopathogenic fungi *Stenocarpella maydis* and *Stenocarpella macrospora*. *Int. J. Mol. Sci.* 12, 5522–5537.
- Saha, M., Sarkar, S., Sarkar, B., Sharma, B.K., Bhattacharjee, S., Tribedi, P., 2015. Microbial siderophores and their potential applications: a review. *Environ. Sci. Pollut. Res.* <http://dx.doi.org/10.1007/s11356-015-4294-0>.
- Schwyn, B., Neilands, J.B., 1987. Universal chemical assay for the detection and determination of siderophores. *Anal. Biochem.* 160, 47–56.
- Soylu, S., Soylu, E.M., Kurt, S., Ekici, O.K., 2005. Antagonistic potentials of rhizosphere

- associated bacterial isolates against soil-borne diseases of tomato and pepper caused by *Sclerotinia sclerotiorum* and *Rhizoctonia solani*. Pakistan J. Biol. Sci. 8, 43–48.
- Stackebrandt, E., Liesack, W., 1993. Nucleic acids and classification. In: Goodfellow, M., O'Donnell, A.G. (Eds.), Handbook of new bacterial systematics Academic Press. England, London, pp. 152–189.
- Suresh, A., Pallavi, P., Srinivas, P., Praveen Kumar, V., Jeevan Chandra, S., Ram Reddy, S., 2010. Plant growth promoting activities of fluorescent pseudomonads associated with some crop plants. Afr. J. Microbiol. Res. 14, 1491–1494.
- Tabli, N., Nabti, El-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. Econ. Health Environ. 1, 1–7.
- Talibi, I., Boubaker, H., Boudyach, E.H., Aoumar, Ait Ben, A., 2014. Alternative methods for the control of postharvest citrus diseases. J. Appl. Microbiol. <http://dx.doi.org/10.1111/jam.12495>.
- Tamura, K., Stecher, G., Peterson, D., Filipowski, A., Kumar, S., 2013. MEGA6: molecular evolutionary genetics analysis version 6.0. Mol. Biol. Evol. 30, 2725–2729.
- Timmusk, S. 2003. Mechanism of action of the plant growth promoting bacterium *Paenibacillus polymyxa*. Dissertation. Acta Universitatis Upsaliensis. Uppsala. ISSN 1104-232X. ISBN 91-554-5802-5.
- Tri Wahyudi, A., Astuti, R.P., Widyawati, A., Meryandini, A., Nawangsih, A.A., 2011. Characterization of *Bacillus* sp. strains isolated from rhizosphere of soybean plants for their use as potential plant growth for promoting Rhizobacteria. J. Microbiol. Antimicrobial. 3, 34–40.
- Trivedi, P., Pandey, A., Lok Man, S.P., 2008. *In vitro* evaluation of antagonistic properties of *Pseudomonas corrugata*. Microbiol. Res. 163, 329–336.
- Tsegaye, Z., Assefa, f., Beyene, D., 2017. Properties and application of plant growth promoting rhizobacteria. Int. J. Curr. Trend. Pharmacobiol. Med. Sci. 1, 30–43.
- Uzhashi, S., Tojo, M., Kakishima, M., 2010. Phylogeny of the genus *Pythium* and description of new genera. Mycoscience 51, 337–365.
- Vanitha, S., Ramjagathesh, R., 2014. Bio Control Potential of *Pseudomonas fluorescens* against Coleus Root Rot Disease. J. Plant. Pathol. Microb. 5, 216. <http://dx.doi.org/10.4172/2157-7471.1000216>.
- Velusamy, P., Kim, K.Y., 2011. Chitinolytic activity of *Enterobacter* sp. KB3 antagonistic to *Rhizoctonia solani* and its role in the degradation of living fungal hyphae. Int. Res. J. Microbiol. 6, 206–214.
- 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 Res. Sci. Technol. 1, 008–013.
- Zhu, S.S., Liu, X.L., Wang, Y., Wu, X.H., Liu, P.F., Li, J.Q., Yuan, S.K., Si, N.G., 2007. Resistance of *Pseudoperonospora cubensis* to flumorph on cucumber in plastic houses. Plant Path. 56, 967–975.

**Abstract:** The bacterial community in irrigation wells is strongly implicated in soil health and plant development maintaining. Herein, 48 bacterial strains were isolated from agricultural well water in northern Algeria. Among them, four strains were selected based on their ability to inhibit growth of two phytopathogenic fungi, and on their ability to express some Plant Growth Promoting traits such as, Indole Acetic Acid (IAA), hydrolytic enzymes, phosphate solubilization, siderophores etc. sequencing the 16S rRNA gene permit to affiliate B, D and N strains to *Pseudomonas protegens*, and the C strain to *Serratia quinivorans*. Mycelial growth inhibition against *Botrytis cinerea* and *Aspergillus niger* ranged from 60 to 90% for the tested strains. In addition, volatiles compounds released by the four strains resulted in PGI values ranging from 13 to 50%, specifically against *B. cinerea*. The filtered supernatants from bacterial cultures show inhibition activity only if the bacterial strains are previously made in contact with the fungus, so, the antifungal activity is induced. The selected strains were tested for their ability to protect apple fruits against *B. cinerea* and *A. niger*. A greenhouse experiment, carried out to determine the strain's efficacy in promoting tomato and pea plant growth, and protecting pea seedlings under *Pythium aphanidermatum* – infected soil. The results show that the N strain markedly enhanced pea germination (+250%) and fresh weight (+43%) and tomato fresh weight (+10%). The antifungal molecules are membrane proteins with a molecular weight exceeding 30 KDa, These molecules are active against *A. niger*, *B. cinerea*, *Penicillium* sp. and *Alternaria* sp. and when applied on tomato fruits, they reduced the rot caused by *A. niger* with more than 79% of inhibition compared to the control. The results support the use of PGPB as an alternative to protect plant health and development.

**Key words:** *Pseudomonas*; aquatic bacteria; antifungal protein; Biological Control Agent; PGPB.

**Résumé:** La communauté bactérienne dans les puits d'irrigation est fortement impliquée dans le maintien de la santé du sol et le développement des plantes. 48 souches bactériennes sont isolées à partir d'eau de puits agricole situé au nord Algérien. Quatre souches sont sélectionnées en fonction de leur capacité à inhiber la croissance de deux champignons phytopathogènes et de leur capacité à exprimer certaines caractéristiques de croissance végétale telles que l'Acide Indole Acétique, les enzymes hydrolytiques, la solubilisation du phosphate, les sidérophores, etc. Le séquençage du gène d'ARNr 16S a permis d'affilier les souches B, D et N à *Pseudomonas protegens* et la souche C à *Serratia quinivorans*. L'inhibition de la croissance mycélienne contre *Botrytis cinerea* et *Aspergillus niger* varie de 60 à 90% pour les souches testées. De plus, les composés volatils libérés par les quatre souches ont donné des valeurs de PGI allant de 13 à 50%, en particulier contre *B. cinerea*. Les surnageants filtrés des cultures bactériennes montrent une activité d'inhibition seulement si les souches bactériennes sont préalablement mises en contact avec le champignon, ainsi, l'activité antifongique est induite. Les souches sélectionnées sont testées pour leur capacité à protéger les fruits de pomme contre *B. cinerea* et *A. niger*. Une expérience en serre, est réalisée pour déterminer l'efficacité de la souche dans la promotion de la croissance des plants de tomate et de petits pois, et la protection des semis de petit pois dans un sol infecté par *Pythium aphanidermatum*. Les résultats montrent que la souche N a nettement amélioré la germination des petits pois (+ 250%) et le poids frais (+ 43%) ainsi que le poids frais de la tomate (+ 10%). Les molécules antifongiques sont des protéines membranaires d'un poids moléculaire supérieur à 30 KDa. Ces molécules sont actives contre *A. niger*, *B. cinerea*, *Penicillium* sp. et *Alternaria* sp. et lorsqu'elles sont appliquées sur des fruits de tomate, ils réduisent la pourriture causée par *A. niger* avec plus de 79% d'inhibition par rapport au témoin. Les résultats obtenus dans cette étude, encourage l'utilisation des PGPB comme une tentative pour protéger la croissance et la santé des plantes.

**Mots clé :** *Pseudomonas* ; bactéries aquatiques, protéines antifongiques, Agents de biocontrôle, PGPB.

**ملخص:** بكتيريا آبار الري مسؤولة بشكل كبير في المحافظة على صحة التربة و نمو النبات. تم عزل 48 سلالة بكتيرية من ماء بئر متواجد في شمال الجزائر. من بينها، تم اختيار أربع سلالات بناءً على قدرتها على تثبيط نمو الفطريات الممرضة للنبات، وعلى امتلاكها لبعض صفات تحفيز نمو النبات مثل، حامض الإندول (IAA)، الإنزيمات، إنحلال الفوسفات، سايدروفور... الخ. أظهر تحليل الجين 16ARNr لسلاسل B و D و N أنها تنتمي إلى *Pseudomonas protegens*، و سلالة C إلى *Serratia quinivorans*. تراوحت نسبة تثبيط نمو *Botrytis cinerea* و *Aspergillus niger* من 60 إلى 90% للسلاسل المختبرة. بالإضافة إلى ذلك، نتج عن المركبات المتناثرة الصادرة عن السلالات الأربعة قيم PGI تتراوح من 13 إلى 50%، خاصة ضد *B. cinerea*. لا تظهر المواد الطافية من السلالات البكتيرية أي نشاط تثبيط إلا إذا كانت السلالات البكتيرية تتكاثر في وجود الفطر، وبذلك يتم تنشيط النشاط المضاد للفطريات. تم اختبار قدرة السلالات المختارة على حماية ثمار التفاح ضد *B. cinerea*، *A. niger* وأجريت تجربة في الدفيئة لتحديد فعالية السلالة في تعزيز نمو نبات الطماطم و البازلاء، و حماية الشتلات البازلاء تحت تربة تحتوي على *Pythium aphanidermatum*. أظهرت النتائج أن سلالة N قد عززت من انتاش بنور البازلاء (+250%) ومن الوزن (+43%) ووزن نبات الطماطم (+10%). أظهرت النتائج أيضاً أن الجزيئات المضادة للفطريات هي عبارة عن بروتينات غشائية ذات وزن جزيئي يزيد عن 30 كيلو دالتون. هذه الجزيئات نشطة ضد *Aspergillus niger*، *Botrytis cinerea*، *Penicillium* sp. و *Alternaria* sp. وعندما تطبق هذه الجزيئات على ثمار الطماطم، فإنها تقلل من العفن الذي يسببه *A. niger* بأكثر من 79% بالمقارنة مع الشاهد. تشجع النتائج التي توصلنا إليها استخدام PGPB كوسيلة لحماية صحة النباتات ونموها.

**الكلمات المفتاحية:** *Pseudomonas*؛ البكتيريا المائية، البروتينات المضادة للفطريات و عوامل مكافحة البيولوجية، PGPB.

# *Introduction*

# *Partie bibliographique*

# *Matériel et Méthodes*

# *Résultats et Discussion*

# *Conclusion*

*Références  
bibliographiques*

# *Annexes*

*Publications*  
*et*  
*Communications*