

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

Faculté des sciences et de la nature et de la vie

Département de Microbiologie

Filière : sciences biologiques

Option : Biotechnologie Microbienne



Réf :.....

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

**Thème**

**Activité antifongique de *Pseudomonas* sp. et *Bacillus* sp. en présence et en absence de stressés abiotiques.**

Présenté par :

**KAHOUADJI Nabila & KHABER Meriem**

Soutenu le : **11 juin 2015**

Devant le jury composé de :

<b>M<sup>me</sup></b>	<b>CHIBANE N.</b>	<b>MAA</b>	<b>Présidente</b>
<b>M<sup>r</sup></b>	<b>NABTI El-H.</b>	<b>MCA</b>	<b>Encadreur</b>
<b>M<sup>lle</sup></b>	<b>DJINI I.</b>	<b>MCB</b>	<b>Examinatrice</b>
<b>M<sup>lle</sup></b>	<b>BENSIDHOUM L.</b>	<b>Doctorante</b>	<b>Co-Promotrice</b>

**Année universitaire : 2014/2015**



# *Dedicaces*



***A ma très chère mère Naïma.***

Affable, honorable, aimable: Tu représentes pour moi le symbole de la bonté par excellence, la source de tendresse et l'exemple du dévouement qui n'a pas cessé de m'encourager et de prier pour moi. Ta prière et ta bénédiction m'ont été d'un grand secours pour mener à bien mes études. Aucune dédicace ne saurait être assez éloquente pour exprimer ce que tu mérites pour tous les sacrifices que tu n'as cessé de me donner depuis ma naissance, durant mon enfance et même à l'âge adulte. Tu as fait plus qu'une mère puisse faire pour que ses enfants suivent le bon chemin dans leur vie et leurs études. Je te dédie ce travail en témoignage de mon profond amour. Puisse Dieu, le tout puissant, te préserver et t'accorder santé, longue vie et bonheur.

***A mon chère Père Hocine.***

Aucune dédicace ne saurait exprimer l'amour, l'estime, le dévouement et le respect que j'ai toujours eu pour vous. Rien au monde ne vaut les efforts fournis jour et nuit pour mon éducation et mon bien être. Ce travail est le fruit de tes sacrifices que tu as consentis pour mon éducation et ma formation.

***A mes sœurs, Samiha, Hafida, Wassila, Oum Saâd, Amina et ma petite sœur Sounia.***

Les mots ne suffisent guère pour exprimer l'attachement, l'amour et l'affection que je porte pour vous. Je vous dédie ce travail avec tous mes vœux de bonheur, de santé et de réussite.

***A tous les membres de ma famille, Kahouadji et Asmaa petits et grands***

Veuillez trouver dans ce modeste travail l'expression de mon Affection.

***A mes très chères amies, Maïri Assia et Khaber Meriem***

Je vous souhaite un avenir plein de joie, de bonheur, de réussite et de sérénité.

***Nabila***



# *Dedicaces*



A mon père **Rachid** et ma mère **Yasmina**

à qui je dois ce que je suis, qu'ils trouvent dans ce travail, le

Fruit de leurs sacrifices consentis pour mon éducation, l'expression de mon amour et ma gratitude pour la bienveillance avec laquelle ils m'ont toujours entouré, que dieu leur préserve bonne santé et longue vie.

A mes deux sœurs **Saliha** et **Asma**.

A mes deux frères **Farid** et **Hamza**

A mes deux chères familles **KHABER** et **TEBANI**

A mes deux chères amies

**Assia** et **Nabila** qui m'ont tant aidé et soutenue pour effectuer ce travail.

A tous les gens qui me connaissent.

**Meriem**



# REMERCIEMENTS



Nos vifs remerciements vont d'emblée à dieu tout puissant qui nous a doté d'une Grande volonté et d'un savoir adéquat pour mener à bien ce modeste travail.

## **Aux membres de la commission**

*Vous nous avez honorés d'accepter avec grande sympathie de siéger parmi notre jury de mémoire. Veuillez trouver ici l'expression de notre grand respect et nos vifs remerciements.*

## **A notre chère promoteur**

*Nous avons eu le privilège de travailler parmi votre équipe et d'apprécier vos qualités et vos valeurs. Veuillez trouver ici l'expression de notre respectueuse considération et notre profonde admiration pour toutes vos qualités scientifiques et humaines.*

## **A notre chère et dynamique Co promotrice Bensidhoum Leila**

Un remerciement particulier et sincère pour tous vos efforts fournis. Vous avez toujours été présente. Que ce travail soit un témoignage de notre gratitude et notre profond respect.

## **A notre professeur Mr Kecha .M**

*Vous nous avez toujours réservé le meilleur accueil, malgré vos obligations professionnelles. Vos encouragements inlassables, votre amabilité, votre gentillesse méritent toute admiration.*

## **A nos collègues**

Abd elwhab, Zahra, youssra, Kamel, Badria, Soumaia, Nadia, Saloua et toute l'équipe du centre de recherche .Nous vous remercions pour votre estimable participation dans l'élaboration de ce travail.

**Nabila et Meriem**

## *Sommaire*

Liste des tableaux	
Liste des figures	
Liste des abréviations	

<b>Introduction</b> .....	<b>1</b>
---------------------------	----------

### *Synthèse bibliographique*

#### **Chapitre I : Généralités sur les PGPR**

1. La rhizosphère .....	3
2. Rhizobactéries promotrices de la croissance des plantes PGPR .....	3
2.1. Les PGPR phyto-stimulatrices .....	3
2.2. Les PGPR phyto-protectrices .....	4
3. Diversité des PGPR dans la rhizosphère .....	5
4. Mécanismes impliqués dans la stimulation de la croissance des plantes par les PGPR .....	5

#### **Chapitre II : L'effet antagoniste des PGPR**

1. Généralités sur les champignons phytopathogènes .....	6
2. Exemple d'un champignon phytopathogène : <i>Botrytis cinerea</i> .....	6
3. Mécanismes de lutte PGPR .....	7
3.1. Les fongicides de synthèse .....	7
3.2. PGPR antagonistes .....	7
3.2.1. Les PGPR en tant qu'agents de bio contrôle .....	7
3.2.2. Mécanismes d'action des PGPR antagonistes .....	8
3.2.2.1. Interactions directes PGPR- phytopathogènes .....	8
3.2.2.2. Interactions indirectes .....	9
4. PGPR Antagoniste : <i>Bacillus sp.</i> et <i>Pseudomonas sp.</i> .....	11
4.1. <i>Bacillus</i> et ses métabolites antifongiques .....	11
4.2. <i>Pseudomonas</i> et ses métabolites antifongiques .....	11
5. Facteur influençant la production d'antibiotique par les PGPR .....	12

### *Partie pratique*

#### **Chapitre I : Matériel et Méthodes**

<b>1. Matériel</b> .....	<b>13</b>
1.1. Souches bactériennes .....	13
1.2. Champignons .....	13
<b>2. Méthodes</b> .....	<b>14</b>

2.1. Mise en évidence de l'activité antifongique .....	15
2.1.1. Effet des souches bactériennes sur la croissance mycélienne des champignons .....	15
2.1.2. Effet des souches bactériennes sur la germination des spores .....	15
2.1.3. Recherche de substances volatiles .....	15
2.2. Etude de l'influence de stressés abiotiques sur l'activité antifongique .....	16
2.2.1 Effet de milieu de culture .....	16
2.2.2 Effet de pH .....	17
2.2.3 Effet de la température .....	17
2.2.4. Effet de la salinité .....	17
2.3. Recherche de la production de certains métabolites à activité antifongique .....	18
2.3.1. Production de sidérophores .....	18
2.3.2. Production de chitinase .....	19
2.3.3. Production d'ammoniac(NH <sub>3</sub> ).....	20
2.3.4. Production de l'acide cyanhydrique (HCN) .....	20
2.4. Test d'antagonisme sur les feuilles de laitue .....	21
2.5. Analyses statistiques .....	22

### **Chapitre II : Résultats et Discussion**

1. Mise en évidence de l'activité antifongique .....	23
1.1. Effet des souches bactériennes sur la croissance mycélienne des champignons .....	23
1.2. Effet des souches bactériennes sur la germination des spores .....	24
1.3. Effet de la combinaison de souches sur l'activité antifongique .....	26
2. Recherche de la production de substances volatiles .....	27
2.1 Production d'acide cyanhydrique (HCN) .....	29
2.2 Production d'ammoniac NH <sub>3</sub> .....	30
3. Production de chitinase .....	31
4. Production de sidérophores .....	31
5. Etude de l'influence de stressés abiotiques sur l'activité antifongique .....	33
5.1 Effet de milieu de culture .....	35
5.2. Effet de pH .....	35
5.3. Effet de la température .....	37

5.4. Effet de la salinité sur l'activité antifongique des souches .....	39
6. Test d'antagonisme sur les feuilles de laitue .....	41
Conclusion .....	43
Références bibliographiques .....	45
Annexes	

*Liste des tableaux*

<b>N°</b>	<b>Titre</b>	<b>Page</b>
<b>I</b>	Classement des champignons phytopathogènes	<b>06</b>
<b>II</b>	Substances antifongiques produites par quelques espèces des genres <i>Pseudomonas</i> et <i>Bacillus</i>	<b>12</b>
<b>III</b>	Pourcentage d'inhibition de la croissance mycélienne des champignons	<b>23</b>
<b>IV</b>	Pourcentage des spores germées en présence de différentes souches	<b>25</b>
<b>V</b>	Taux de production de sidérophores sur milieu CAS	<b>32</b>
<b>VI</b>	Valeurs des PGI% obtenus sur différents milieux de culture	<b>33</b>
<b>VII</b>	Valeurs des PGI% obtenus à différents pH	<b>35</b>
<b>VIII</b>	Valeurs des PGI% obtenus à différentes température d'incubation	<b>37</b>
<b>IX</b>	Valeurs des PGI% obtenus à différentes concentration d'NaCl	<b>39</b>



*Liste des figures*

<b>N°</b>	<b>Titre</b>	<b>Page</b>
<b>1</b>	Interactions entre les plantes et les bactéries PGPR dans la rhizosphère	<b>04</b>
<b>2</b>	Symptômes de l'agent phytopathogène <i>Botrytis cinerea</i> sur différentes plantes	<b>07</b>
<b>3</b>	Systèmes de résistance des plantes	<b>10</b>
<b>4</b>	Mécanismes d'action des agents de lutte biologique	<b>10</b>
<b>5</b>	Les souches bactériennes utilisées	<b>13</b>
<b>6</b>	Les espèces fongiques.	<b>13</b>
<b>7</b>	Mise en évidence de l'effet des souches bactériennes sur la croissance mycélienne	<b>14</b>
<b>8</b>	Effet des souches bactériennes sur la germination des spores	<b>15</b>
<b>9</b>	Recherche de la production de molécules antifongiques volatiles	<b>16</b>
<b>10</b>	Etude de l'effet de la salinité sur l'activité antifongique	<b>18</b>
<b>11</b>	Production de sidérophores 1 : sur milieu liquide ; 2 : sur milieu solide	<b>19</b>
<b>12</b>	Recherche de la production d'ammoniac	<b>20</b>
<b>13</b>	Production d'acide cyanhydrique (HCN)	<b>21</b>
<b>14</b>	Les différentes étapes de test d'antagonisme sur feuilles de laitue	<b>22</b>
<b>15</b>	Taux d'inhibition de la croissance mycélienne des champignons phytopathogènes	<b>24</b>
<b>16</b>	Taux de germination des spores fongiques en présence des bactéries testées	<b>25</b>
<b>17</b>	Pourcentage d'inhibition de la croissance de <i>B. cinerea</i> par les bactéries testées, seules et combinées	<b>27</b>

<b>18</b>	Taux d'inhibition de la croissance des Champignons phytopathogènes par les composés volatiles	<b>28</b>
<b>19</b>	Quelques images de test d'antagonisme par production de molécules volatiles	<b>28</b>
<b>20</b>	Production de l'HCN par les souches S7LiBe et S5LiBe	<b>29</b>
<b>21</b>	Production d'ammoniaque par les souches S7LiBe et S5LiBe	<b>30</b>
<b>22</b>	Production de siderophore sur milieu solide et liquide	<b>32</b>
<b>23</b>	Effet de milieu de culture sur l'activité antifongique	<b>34</b>
<b>24</b>	Quelques images de l'activité antifongique sur milieu CZA modifié et PDA	<b>34</b>
<b>25</b>	Effet de pH sur l'activité antifongique	<b>35</b>
<b>26</b>	Courbe de croissance des souches S7LiBe et S5LiBe à différentes valeurs du pH	<b>36</b>
<b>27</b>	Quelques images de l'activité antifongique à différents pH	<b>36</b>
<b>28</b>	Effet de la température sur l'activité antifongique	<b>37</b>
<b>29</b>	Courbe de croissance des souches S7LiBe et S5LiBe à différentes températures.	<b>38</b>
<b>30</b>	Effet de la salinité sur l'activité antifongique	<b>39</b>
<b>31</b>	Courbe de croissance des souches S7LiBe et S5LiBe et de <i>B. cinerea</i> à différentes valeurs de NaCl	<b>39</b>
<b>32</b>	Quelques images de l'activité antifongique à différentes concentration de NaCl	<b>40</b>
<b>33</b>	Pourcentage de croissance de <i>B. cinerea</i> , de S5LiBe et S7LiBe sur feuilles de laitue	<b>41</b>
<b>34</b>	Image des zone de lésion par <i>B. cinerea</i> avec ou sans les souches tests obtenus sur feuille de laitue	<b>41</b>

**Liste des abréviations**

**CAS:** Chrom Azurol S

**CZA:** Czapek Agar

**DAPG:** 2, 4 Di Acetyl Phloro Glucinol

**EM:** Extrait De Malt

**HCN:** Hydrogen Cyanide

**HDTMA :** Hexadécyl-Ttriméthyl-Ammonium

**ISR:** Induced Systemic Resistance

**LB :** Luria Bertani

**NH<sub>3</sub>:** Ammoniac

**PDA:** Potato Dextrose Agar

**PGI:** Percentage Growth Inhibition

**PGPR:** Plant Growth Promoting Rhizobacteria

**RSA:** Resistance Systemic Acquisée

**SDB:** Sabouraud Dextrose Agar

### *Introduction*

La population mondiale augmente à un rythme alarmant et devrait augmenter jusqu'à 7,5 milliards en 2025 (Sharma *et al.*, 2001). Environ 70% de la population totale vit dans les zones rurales des pays en développement, où la pauvreté, l'insécurité alimentaire, et la carence nutritionnelle sont les principaux problèmes rencontrés dans la vie. En raison de leurs effets dévastateurs sur la santé des plantes et le rendement des cultures, les phytopathogènes sont une menace majeure pour la production alimentaire ainsi que la stabilité de l'écosystème (Jan *et al.*, 2011).

Pendant les trois dernières décennies, les producteurs sont devenus dépendants des produits chimiques comme méthodes relativement fiables de protection de récolte (Jan *et al.*, 2011). Ces produits ne sont pas seulement efficaces pour fournir le contrôle à long terme, mais aussi ont des effets néfastes sur la santé humaine ; car ils ont la faculté de persister en s'accumulant à diverses étapes de la chaîne alimentaire, en plus d'exposer la communauté microbienne bénéfique du sol à des concentrations excessives en produits agrochimiques (Botelho et Mendonça-Hagler, 2006).

De nos jours, l'utilisation de pesticides chimiques est restée la méthode de choix pour contrôler les phytopathogènes, en raison de leurs performances et leur facilité d'application. La recherche orientée vers la mise en œuvre des moyens naturels pour le contrôle des ravageurs et des maladies phytopathogènes sont nécessaires pour minimiser les impacts environnementaux imprévus, en plus d'améliorer la productivité des cultures pour répondre aux besoins de la population mondiale.

L'atténuation des maladies végétales par les microorganismes antagonistes tels que les rhizobactéries appartenant aux genres *Bacillus* et *Pseudomonas*, semble être la meilleure mesure pour protéger les plantes contre les phytopathogènes sans effet nocif pour la santé humaine ou l'environnement (Jan *et al.*, 2011).

## *Introduction*

---

Il est bien établi que les bactéries rhizosphériques du genre *Bacillus* et *Pseudomonas* sont de bons agents de biocontrôle, de ce fait, il est proposé dans ce travail, d'évaluer l'activité antifongique de trois souches bactériennes appartenant au genre *Bacillus* et *Pseudomonas* (collection du Laboratoire de maîtrise des énergies renouvelables (LMER), équipe : Biomasse & Environnement de l'université de Bejaïa), d'étudier l'influence de certains facteurs abiotiques sur cette activité ainsi que la production de certaines molécules antifongiques. Un test d'activité antifongique sur feuilles de laitue est également effectué.

## **1. La rhizosphère**

Le terme rhizosphère (du grec *Rhiza* : la racine, et sphère : domaine d'influence) a été utilisé pour la première fois par Lorenz Ailtner en 1904 (Morgan et *al.*, 2005) pour définir la zone du sol sous l'influence des racines des légumineuses. La rhizosphère est définie aujourd'hui comme étant le lieu d'interaction entre le sol, la plante et les microorganismes. Ces interactions dépendent des conditions physiques du milieu et des organismes mis en jeu (Norini, 2007). Les composantes physico-chimiques et biologiques de la rhizosphère diffèrent nettement de celles d'un sol non cultivé (Morgan et *al.*, 2005; Cregut, 2009). La rhizosphère est en fait un habitat dont les limites sont mal définies, car elle représente un gradient microbiologique et physico-chimique allant de la racine elle-même jusqu'à une distance plus ou moins grande de 1 à 5 mm au-delà de laquelle l'effet rhizosphérique disparaît. La rhizosphère est aussi définie comme étant la zone du sol influencée par les racines, et les racines elles-mêmes (Antoun et Prévost, 2005 ; Qureshi, 2012).

## **2. Rhizobactéries promotrices de la croissance des plantes**

Entre 2 à 5% des bactéries de la rhizosphère introduites dans les écosystèmes agricoles ont montré un effet bénéfique sur la croissance des cultures, ces bactéries sont donc nommées rhizobactéries promotrices de la croissance des plantes (PGPR) (Antoun et Prévost, 2005). Elles sont également appelées les bactéries stimulatrices de la santé des plantes (PHPR) ou les rhizobactéries stimulatrices de la nodulation des plantes (NPR) (Rifat et *al.*, 2010). Les bactéries PGPR colonisent la rhizosphère en utilisant les exsudats racinaires comme substrats nutritifs, mais à la différence des autres bactéries rhizosphériques elles ont, en retour, un effet bénéfique sur la plante via une multitude de mécanismes (Vacheron et *al.*, 2013).

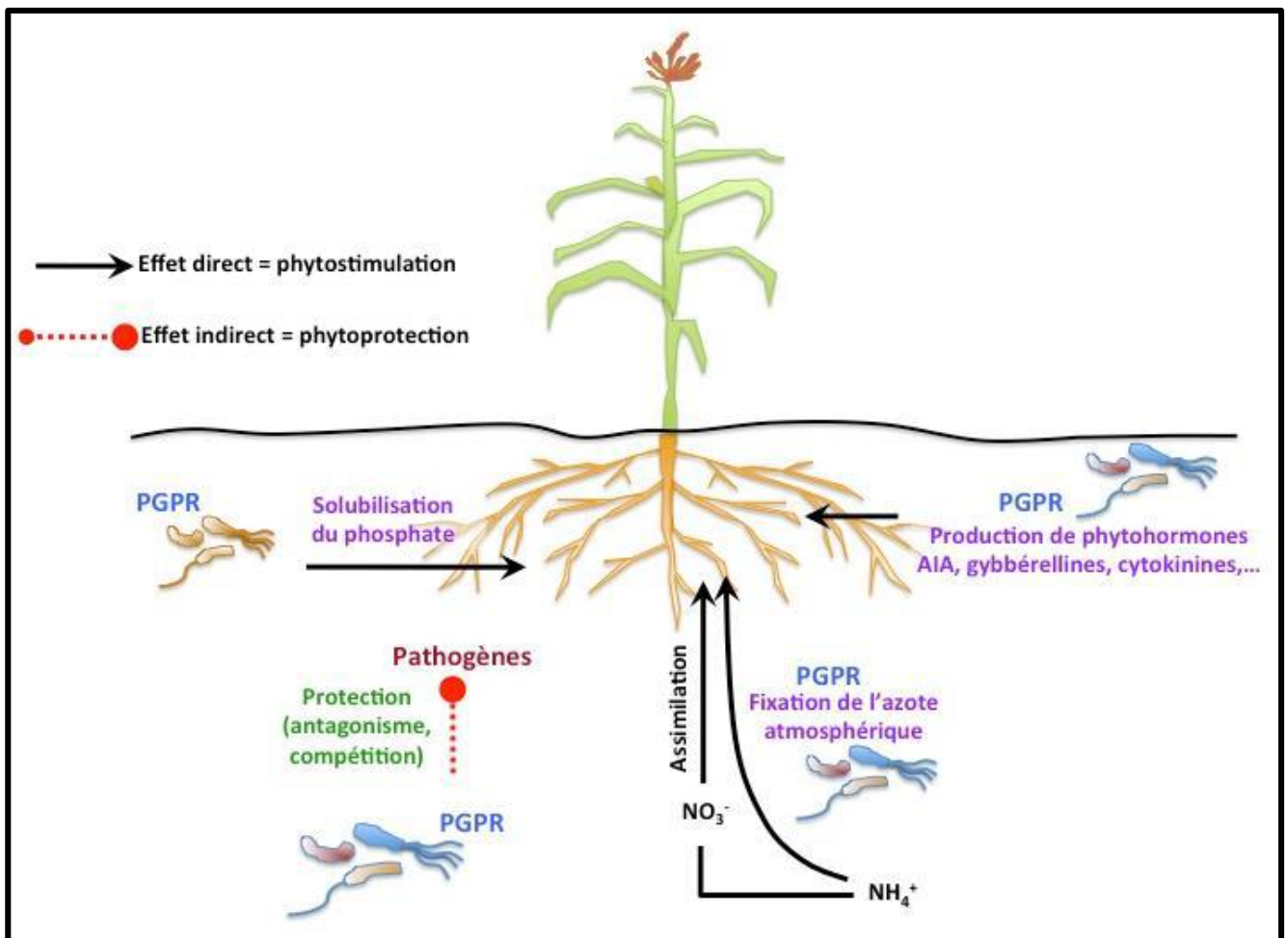
Le nombre d'espèces bactériennes identifiées comme PGPR a augmenté récemment suite à de nombreuses études couvrant une large gamme d'espèces végétales (Antoun et Prévost, 2005 ; Castro-Sowinski et *al.*, 2007).

### **2.1. Les PGPR phytostimulatrices**

Les PGPR phytostimulatrices influencent la croissance des plantes en améliorant la biodisponibilité de certains nutriments (azote, phosphate, etc.) ou en synthétisant des phytohormones (Lutenberg et Kamilava, 2009).

## 2.2. Les PGPR phytoprotectrices

Dans certains sols, on voit apparaître une propriété émergente de résistance du sol à la maladie. Cette résistance est définie comme la capacité du sol à permettre le développement de plantes saines alors que le pathogène est présent et que les conditions climatiques sont favorables au développement de la maladie (Kyselkova *et al.* 2009). Ainsi, les PGPR phytoprotectrices favorisent la croissance des plantes en réduisant le niveau de certaines maladies. Pour cela, elles peuvent agir par antagonisme en produisant des antibiotiques délétères pour les pathogènes, par interférence avec des signaux, en détruisant les molécules signal des pathogènes, en activant la résistance systémique induite des plantes, ou en contrôlant la croissance des pathogènes (Antoun et Prévost, 2005 ; Kaymak, 2010).



**Figure 1** : Interactions entre les plantes et les bactéries PGPR dans la rhizosphère (Prigent-Combaret, 2015).

### **3. Diversité des PGPR dans la rhizosphère**

La diversité des PGPR dans la rhizosphère varie largement selon : le type de la plante et du sol et la disponibilité des nutriments. Parmi les PGPR identifiés, *Pseudomonas* et *Bacillus* sont largement distribués et sont les plus extensivement étudiés. Les souches appartenant aux genres : *Aéromonas*, *Azoarcus*, *Azospirillum*, *Azotobacter*, *Arthrobacter*, *Clostridium*, *Enterobacter*, *Gluconacetobacter*, *Klebsiella*, et *Serratia* sont aussi classées comme PGPR (Fernando et al., 2005 ; Fuentes-Ramirez et Caballero-Mellado, 2005 ; Tripathi et al., 2007).

### **4. Mécanismes impliqués dans la stimulation de la croissance des plantes par les PGPR**

Les PGPR peuvent stimuler la croissance des plantes d'une manière directe ou indirecte (Antoun et Prévost, 2005).

Les mécanismes directs impliquent ; l'apport d'éléments nutritifs non disponibles, la fixation d'azote atmosphérique, la production de phytohormones (auxines, cytokinines et gibbérellines) et de siderophores (O'sullivan et o'gara, 1992 ; lutenberg et kamilava, 2009) et la répression de la synthèse d'éthylène par la production de l'enzyme 1- aminocyclopropane-1-carboxylique désaminase (ACC-désaminase) (Glick, 1995).

Quant aux mécanismes indirects, il s'agit de la suppression d'agents phytopathogènes à travers la compétition pour l'espace et les éléments nutritifs dont la disponibilité dans le sol est faible, la synthèse des enzymes hydrolytiques, l'inhibition des enzymes ou des toxines produites par les pathogènes, et à travers l'induction des mécanismes de résistance de la plante (Glick, 1995 ; Antoun et Prévost, 2005 ; Kaymak, 2010).



## 1. Généralités sur les champignons phytopathogènes

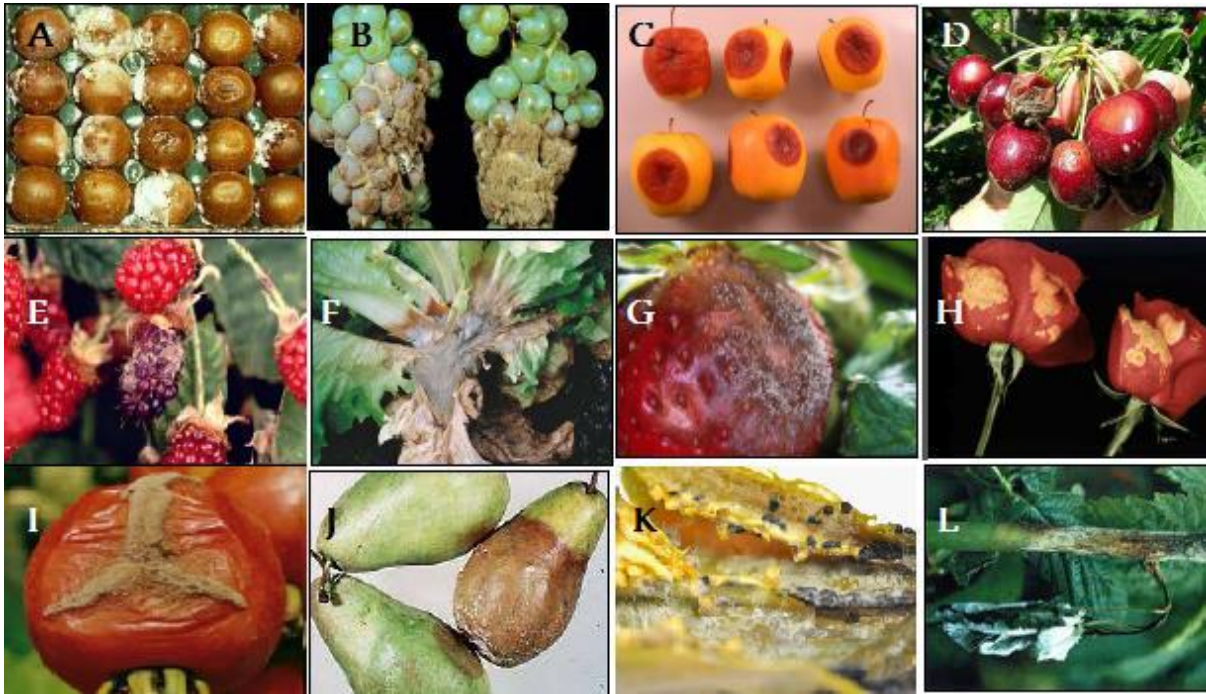
Les champignons phytopathogènes sont la principale cause de maladies chez les plantes et sont responsables d'environ 70 % des maladies des plantes cultivées (Deacon, 2005). Entre dix et quinze mille espèces d'organismes de type champignons ou pseudo-champignons susceptibles d'infecter les plantes sont énumérées (Fernandez-Acero et al., 2007). Par ailleurs, dix espèces de champignons phytopathogènes sont décrites comme étant les plus néfastes, dont six attaquent plus spécifiquement les cultures céréalières (Tableau I).

**Tableau I :** Classement des champignons phytopathogènes (Fernandez-Acero et al., 2007)

	<b>Champignon</b>	<b>Maladie</b>	<b>Type de plante</b>
<b>01</b>	<i>Magnaporthe oryzae</i>	La pyriculariose	Le riz
<b>02</b>	<i>Botrytis cinerea</i>	Pourriture grise	Tomate, fraise
<b>03</b>	<i>Puccinia</i> spp	Rouilles	Les céréales
<b>04</b>	<i>Fusarium graminearum</i>	Fusariose	Maïs, blé
<b>05</b>	<i>Fusarium oxysporum</i>	Fusariose vasculaire	Plantes cultivées
<b>06</b>	<i>Blumeria graminis</i>	L'oïdium	Céréales
<b>07</b>	<i>Mycosphaerella graminicola</i>	Septoriose	Blé
<b>08</b>	<i>Colletotrichum</i> spp.	Anthracoses	Arbres fruitiers, plantes maraîchères et ornementales.
<b>09</b>	<i>Ustilago maydis</i>	Charbon du maïs	Maïs
<b>10</b>	<i>Melampsora lini</i>	Rouille du lin	Les lins

## 2. Exemple d'un champignon phytopathogène : *Botrytis cinerea*

Depuis sa découverte, la pourriture grise causée par le champignon *Botrytis cinerea* provoque l'une des maladies cryptogamiques les plus destructives qui cause d'énormes dégâts en agriculture jusqu'à nos jours. Elle est économiquement redoutable et importante, car ce champignon polyphage est ubiquiste et il est capable d'attaquer plus de 230 espèces de Plantes sur lesquelles il peut engendrer des dégâts sérieux avant et après la récolte, et à n'importe quel stade de leur développement ainsi qu'en période du stockage, (Leroux et al., 1999 ; Ajouz, 2009). Un exemple de cette large gamme d'hôtes est présenté et illustré dans la figure 02.



**Figure 02 :** Symptômes de l'agent phytopathogène *Botrytis cinerea* sur différentes plantes. (A) Kiwi. (B) Grappe du raisin. (C-D) Pommes. (E) Framboises. (F) Laitue. (G) Fraise. (H) Fleurs du rosier. (I) Tomato. (J) Poires. (K) Poivron. (L) Tige de tomate (Agrios, 2005).

### 3. Mécanismes de lutte

#### 3.1. Les fongicides de synthèse

Actuellement, les fongicides de synthèse constituent le moyen de lutte le plus efficace contre les champignons phytopathogènes. Ces produits chimiques sont considérés comme l'arme la plus fiable pour faire face à ces problèmes, mais l'emploi excessif de ces composés chimiques dans les pratiques agricoles nuit à la santé des écosystèmes et à la santé publique. Il affecte de manière négative la croissance des plantes et des microorganismes tels que les PGPR et leurs activités physiologiques (Lavelle et *al.*, 2004).

#### 3.2. PGPR antagonistes

Au regard des inconvénients de l'utilisation des fongicides chimiques, l'utilisation de microorganismes bénéfiques comme agent de biocontrôle semble être une alternative prometteuse pour lutter contre les phytopathogènes tout en diminuant l'emploi des produits chimiques.

##### 3.2.1. Les PGPR en tant qu'agents de biocontrôle

Les PGPR antagonistes ont attiré beaucoup d'attention pour leur pouvoir anti-phytopathogènes. De nombreuses études concernant l'utilisation de ces microorganismes comme une alternative aux pesticides ont prouvé que ces agents de biocontrôle peuvent avoir un rôle important dans l'amélioration

du rendement de l'agriculture et de l'horticulture (Niranjan et *al.*, 2005). Plusieurs bactéries et champignons ont été rapportés comme microorganismes antagonistes en particulier les souches du genre *Bacillus*, *Pseudomonas* et *Burkholderia* (Lodewyckx *al.*, 2002).

### 3.2.2. Mécanismes d'action des PGPR antagonistes

Les microorganismes peuvent exercer une activité antagoniste selon différents mécanismes incluant : la compétition et l'antibiose. Certains microorganismes sont des hyperparasites et interviennent directement sur le phytopathogène en le parasitant. D'autres microorganismes sont capables d'induire une résistance systémique ponctuelle (Résistance systémique induite) ou encore une résistance plus permanente (Résistance systémique acquise) chez les plantes hôtes. Une existence d'un mécanisme permettant d'interférer dans la communication intercellulaire liée à la pathogénicité de certaines bactéries est mise en évidence ces dernières années (Abou-Zeid et *al.*, 2009 ; Montesinos et *al.*, 2009).

#### 3.2.2.1. Interactions directes PGPR- phytopathogènes

La plupart des interactions entre les PGPR antagonistes et les phytopathogènes consistent en l'inhibition de ces derniers par des substances antimicrobiennes (Raaijmakers et *al.*, 2002), la compétition pour les nutriments et/ou l'espace (Antoun et Prévost, 2005), l'inactivation des facteurs de germination du pathogène ou la dégradation de leurs facteurs de pathogénicité comme les toxines, ainsi la capacité de certaines bactéries à parasiter et à dégrader les spores des pathogènes (Whipps, 1997).

##### a. La compétition

La compétition consiste en la consommation ou le contrôle de l'accès aux nutriments, espace ou tout autre facteur dont la disponibilité est limitée (Widen, 1994).

- **Compétition pour les nutriments**

Les PGPR antagonistes peuvent inhiber la croissance de certains agents phytopathogènes via la compétition pour des éléments nutritifs comme l'azote, le carbone, ou des macro- ou micro- éléments présents dans le milieu (Elad et Stewart, 2007).

Un cas particulier de compétition pour les nutriments repose sur la compétition pour le fer. Cet élément est présent dans le sol souvent sous une forme insoluble (le fer ferrique (Fe<sup>3+</sup>)) (Compant et *al.*, 2005 ; Weyens et *al.*, 2010). Pour survivre, les organismes secrètent des ligands fixateurs de fer (sidérophores), ces chélateurs ont une grande affinité pour séquestrer le fer à partir des microenvironnements, privant ainsi les agents phytopathogènes d'un de leurs facteurs de croissance (Pal et Gardener, 2006). Certaines bactéries du genre *Pseudomonas* ont un grand pouvoir de chélater le fer grâce à leurs capacités d'utiliser les sidérophores synthétisés par d'autres bactéries (Johansson, 2003).

- **Compétition pour l'espace**

Une colonisation importante des racines par les bactéries bénéfiques peut réduire la maladie, ceci va donc réduire le nombre de sites habitables pour les microorganismes pathogènes et par conséquent leur croissance (Vessey, 2003).

### **b. Antibiose**

L'antibiose correspond à l'inhibition du pathogène via la production de substances aux propriétés antifongiques et /ou antibiotiques (Johansson, 2003 ; Adam, 2008). Les produits métaboliques sont de différentes natures ; des enzymes lytiques, des peptides ou protéines antimicrobiens, des Polycétides, des composés phénoliques, des bio-surfactants etc. (Fernando et *al.*, 2005). Au cours de la première phase de l'interaction plante hôte-pathogène, la synthèse d'enzymes hydrolytiques est cruciale pour le processus d'infection (Baarlen *et al.*, 2004). Les agents de protection biologique peuvent interférer avec les facteurs de pathogénicité des champignons en inhibant ou en dégradant certaines enzymes hydrolytiques (chitinases, pectinases, etc.) (Ajouz, 2009).

### **3.2.2.2. Interactions indirectes**

#### **a. Interaction PGPR- plantes**

Les interactions des PGPR avec les plantes impliquées dans la lutte contre les agents pathogènes consistent en la stimulation de mécanismes de défense des plantes. Ce phénomène a été nommé « résistance systémique induite » (ISR Induced Systemic Resistance) (Van Loon et *al.*, 1998), il rend l'hôte beaucoup plus résistant aux futures agressions des agents pathogènes. La RSI est donc phénotypiquement similaire à la RSA (Résistance Systémique Acquise) qui est déclenchée par des agents phytopathogènes (Adam, 2008).

Les plantes semblent donc être capables de mémoriser l'impact d'une première infection afin de se protéger face à une seconde infection. Généralement, ce type de résistance est accompagné de l'accumulation d'acide salicylique (SA) et de protéines liées à la pathogénicité (PR : Pathogenesis-Related Proteins). (Adam, 2008), Contrairement à la SAR, la voie de signalisation de l'ISR n'est généralement pas associée avec l'accumulation de SA (Pieterse et al. 2000), mais elle est plutôt liée à la perception du Jasmonate et de l'Éthylène (Kishimoto et al. 2006a).

La résistance systémique peut être induite par des microorganismes variés, les bactéries à Gram positif comme *Bacillus pumilus*, ou à Gram négatif appartenant au genre *Pseudomonas* (*fluorescens*, *putida*, *aeruginosa*) (Jourdan et *al.*, 2008).

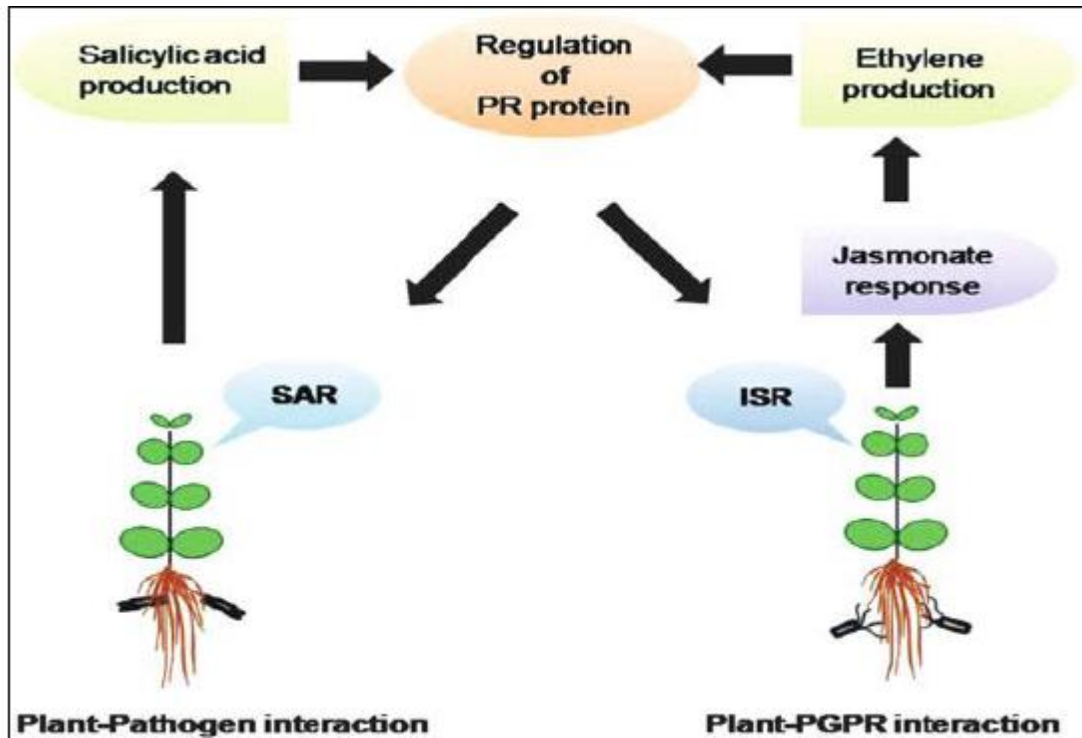
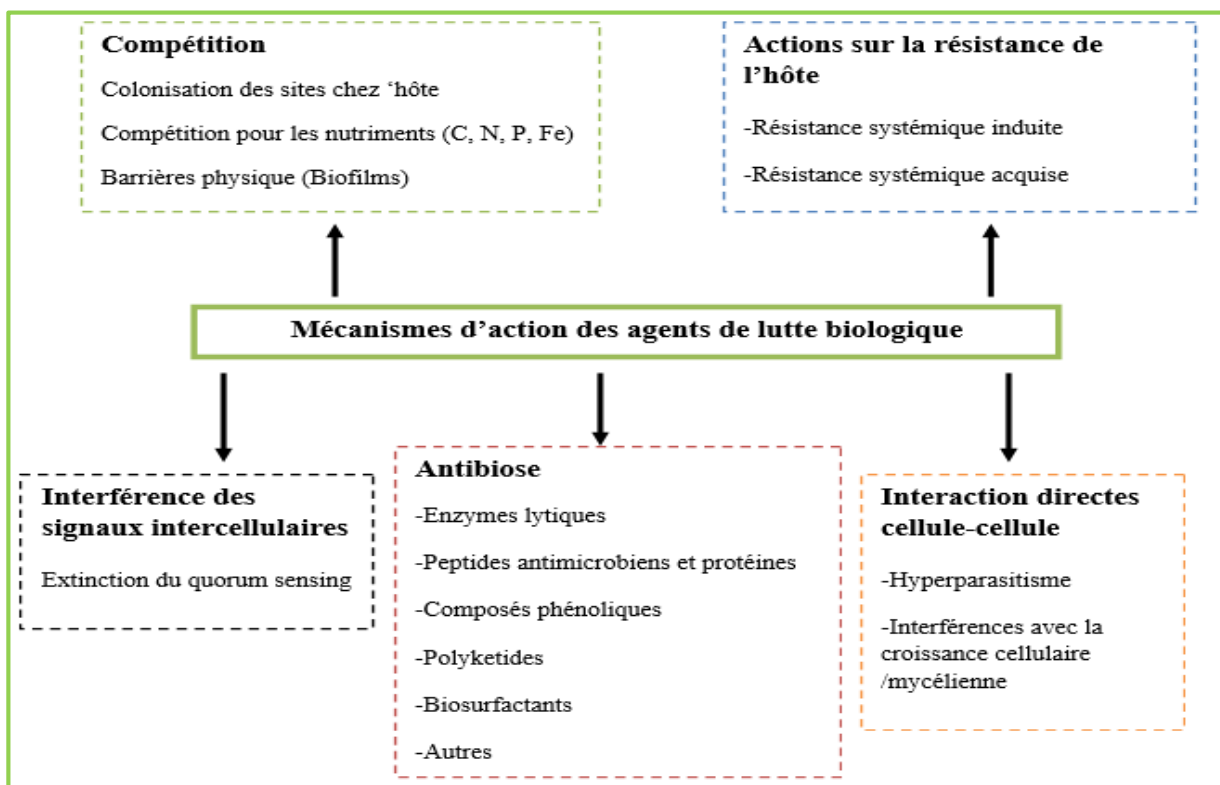


Figure 03 : Systèmes de résistance des plantes (Akhtar et Siddiqui, 2010)

**b. Modification des caractéristiques du milieu**

La modification des caractéristiques du milieu (pH, surface des plantes...) est l'un des mécanismes utilisés par certains agents de biocontrôle et qui leur permet de lutter indirectement contre les pathogènes (Manteau *et al.*, 2003 ; Ajouz, 2009).



**Figure 04 :** Mécanismes d'action des agents de lutte biologique (Montesinos et *al.*, 2009).

#### **4. PGPR Antagoniste : *Bacillus* sp. et *Pseudomonas* sp.**

Les PGPR antagonistes éliminent plusieurs agents phytopathogènes, et protègent les plantes contre les maladies. Cet effet protecteur est principalement dû aux métabolites antifongiques produits par diverses espèces en particulier *Pseudomonas* et *Bacillus*. Ces deux derniers sont des habitants communs de la rhizosphère et sont caractérisés par une activité potentielle dans le contrôle biologique des maladies liées au sol. Ils ont la capacité de produire de nombreux antibiotiques, et ils sont faciles à cultiver *in vitro* et *in vivo*. De plus, les bacilles offrent un avantage par rapport aux autres bactéries en raison de leur capacité à former des endospores résistantes au changement des conditions du milieu. Ils présentent aussi un avantage dans la formulation du produit (Raaijmakers et *al.*, 2002 ; Cavaglieri et *al.*, 2005).

##### **4.1. *Bacillus* et ses métabolites antifongiques**

Les bactéries du genre *Bacillus* sont l'un des principaux groupes des rhizobactéries connues pour leur application dans le biocontrôle de plusieurs phytopathogènes. Elles produisent plusieurs composés biologiques actifs contre les bactéries, les champignons, les protozoaires et les virus (Bottone and Peluso, 2003). Ce genre est capable de produire des antibiotiques, ainsi qu'une variété d'enzymes antifongiques qui dégradent les parois cellulaires, comme les chitinases, les cellulases, les amylases, glucanases, etc. Plusieurs peptides antifongiques synthétisés par des espèces de *Bacillus* sont actifs contre les champignons filamenteux et les levures. De nombreuses souches du genre *Bacillus* produisent des petits peptides circulaires (Comme l'iturine, fengycine, Bacillopeptidase, et surfactine) (Maheshwari, 2010). L'iturine et la fengycine possèdent une forte activité inhibitrice de la croissance d'une large gamme de phytopathogènes (Vanittanakoma et Loeffler, 1986 ; Hsieh et *al.*, 2008).

##### **4.2. *Pseudomonas* et ses métabolites antifongiques**

*Pseudomonas* est également appliquée dans le biocontrôle des maladies des plantes, grâce à la production élevée en métabolites antimicrobiens (bactériocines, antibiotiques, antifongiques, sidérophores et le cyanide d'hydrogène) (Marschner et Timonen, 2006 ; Jamali et *al.*, 2009). Ce genre bactérien inclut aussi des bactéries rhizosphériques facilement cultivables au laboratoire et sur le sol comme inoculants des céréales (Kiely et *al.*, 2006).

#### **5. Facteur influençant la production d'antibiotique par les PGPR**

Plusieurs facteurs abiotiques (oxygène, température, sources spécifiques de carbone et d'azote et micro-éléments), biotiques (plante hôte, pathogène, microflore indigène et densité de cellules de la

souche productrice) et physiologiques tels que le quorum sensing influencent la production d'antibiotiques par les agents bactériens de biocontrôle (Adam, 2008).

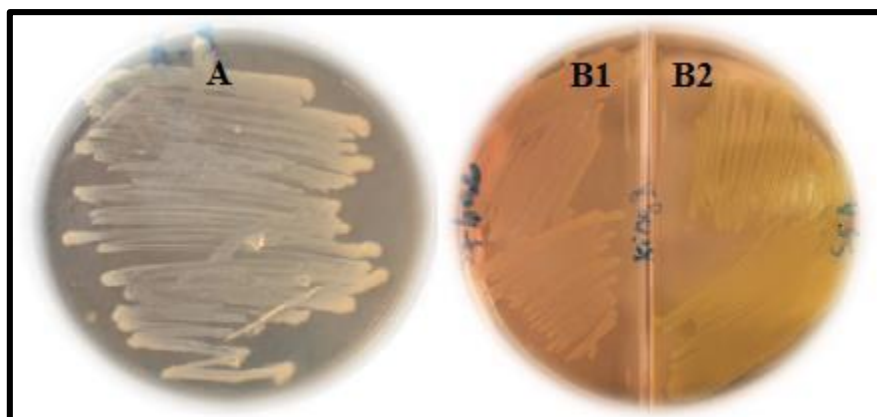
**Tableau II :** Substances antifongiques produites par quelques espèces des genres *Pseudomonas* et *Bacillus* (Quan et al., 2010)

Antifongiques	Source	Pathogène	Référence
Bacillomycine D, F, L, Lc	<i>B. subtilis</i> <i>B. amyloliquefaciens</i>	<i>F. graminearum</i> , <i>R. solani</i> , <i>P. capsici</i>	Eshita et oberto (1995) ; Zhao et al. (2010)
Iturine (A–E)	<i>B. subtilis</i> , <i>B. circulans</i> <i>B. amyloliquefaciens</i>	<i>P. notatum</i> , <i>R. solani</i> , <i>B. cinerea</i>	Hsieh et al. (2008)
Fengycine	<i>B. thuringiensis</i> <i>B. subtilis</i> <i>B. amyloliquefaciens</i>	<i>F. oxysporum</i> , <i>F. solani</i> , <i>R. solani</i> , <i>B. cinerea</i> , <i>P. capsici</i>	Kim et al. (2004) Wang et al. (2007) Vanittanakoma et Loeffler (1986)
Bacisubine	<i>B. subtilis</i>	<i>R. solani</i> , <i>A. oleracea</i> <i>B. cinerea</i>	Liu et al. (2007)
Pyrrrolnitrine	<i>Pseudomonas fluoresces</i>	<i>Fusarium sp.</i> , <i>R. solani</i> <i>Botrytis cinerea</i>	Loper et Gross. (2007) Ligon et al. (2000)
Pyoverdine	<i>P. fluoresces</i> <i>P. putida</i>	<i>f. graminearum</i>	Lamont et Martin (2003)
HCN	<i>P. fluorescens</i>	<i>p. ultimum</i>	Ramette et al. (2003)
Chitinase	<i>P. pseudomonads</i>	<i>f. oxysporum</i>	Ajit et al. (2006)
viscosine		<i>f. culmorum</i>	Braun et al. (2001)
Syringopeptine	<i>P. syringae pv. syringae</i>	Avec une activité antifongique à large spectre	Feil et al. (2005) Scholz-schroeder et al. (2003)
Syringomycine	<i>P. syringae pv. syringae</i>	Avec une activité antifongique à large spectre	Kang et gross (2005) Vaillancourt et al. (2005)

## 1. Matériel

### 1.1. Souches bactériennes

Les souches bactériennes (*Pseudomonas* sp. S5LiBe; *Bacillus* sp. S7LiBe et *Pseudomonas* sp. RS-3) utilisées dans cette étude proviennent de la collection du laboratoire de maîtrise des énergies renouvelables, Equipe Biomasse et Environnement, université de Bejaïa. La revivification a été réalisée par repiquage dans le bouillon nutritif (Annexe I) suivi d'une incubation à 30°C/24h.

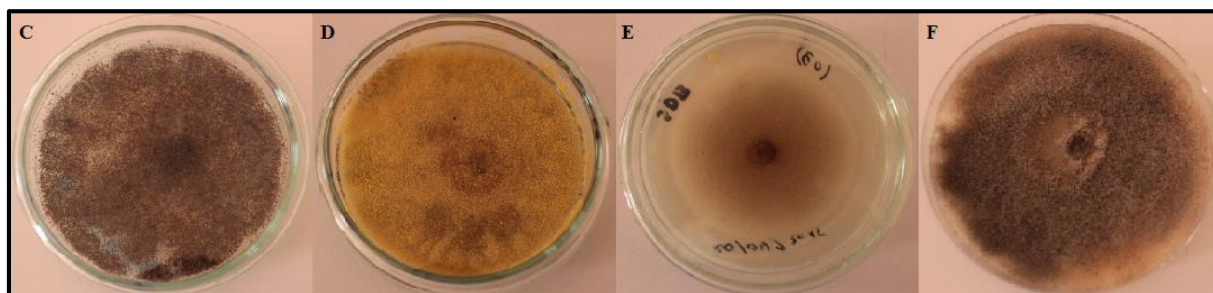


**Figure 05** : Les souches bactériennes utilisées

**A** : *Pseudomonas* sp. R-S3; **B1**: *Bacillus* sp. S7LiBe; **B2**: *Pseudomonas* sp. S5LiBe

### 1.2. Champignons

Quatre espèces de champignons phytopathogènes sont testées durant cette étude, *Botrytis cinerea* (souche de laboratoire de mycologie, université de Bejaia), *Mucor* sp. , *Aspergillus flavus* et *Aspergillus Niger* (Souches provenant de Laboratoire de Microbiologie Appliquée, Université de Bejaia). Les champignons sont repiqués sur milieu gélosé à l'extrait de Malt (Annexe I), dans le but d'obtenir des cultures jeunes.



**Figure 06** : Les espèces fongiques.

**C** : *Aspergillus niger* ; **D** : *Aspergillus flavus* ; **E** : *Mucor* sp. ; **F** : *Botrytis cinerea*



## 2. Méthodes

### 2.1. Mise en évidence de l'activité antifongique

#### 2.1.1. Effet des souches bactériennes sur la croissance mycélienne des champignons (Sagahón et al. 2011)

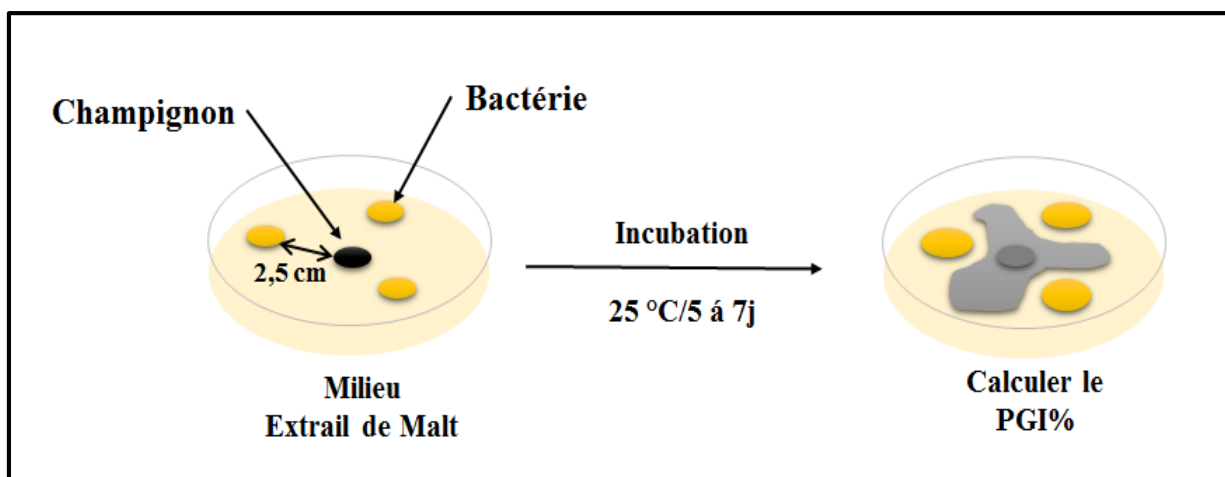
Dans le but d'évaluer l'activité antifongique des bactéries, un disque de champignon (7 mm de diamètre) est inoculé dans le centre de la boîte de Pétri contenant le milieu extrait de malt (EM) (Annexe I). Trois spots de 10 $\mu$ L d'une culture jeune de chaque souche seule ou combinée (S7LiBe+S5LiBe, S7LiBe+R-S3LiBe, S5LiBe+R-S3LiBe, RS3LiBe+S5LiBe+S7LiBe) sont déposés chacun à une distance de 2,5 cm du champignon. Des boîtes de Pétri ne contenant que le champignon cible sont préparées en parallèle pour servir de témoins. Toutes les boîtes sont incubées à 25  $\pm$  2°C/5-7J, selon la vitesse de croissance du champignon (fig. 08).

Le pourcentage d'inhibition de la croissance (PGI%) est mesuré en utilisant la formule décrite par Saddiki, (1999) :

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

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

R1 : Distance en mm entre le point d'inoculation du champignon et la marge de la colonie contenue dans la boîte de pétri traitée.



**Figure 07 :** Mise en évidence de l'effet antagoniste des souches bactériennes sur la croissance mycélienne

#### 2.1.2. Effet antagoniste des souches bactériennes sur la germination des spores (Sadfi-Zouaoui et al., 2008)

Afin de tester l'effet antagoniste des souches bactériennes sur la germination des spores fongiques, 20µl de suspensions de spores fongiques ajustées à 10<sup>6</sup> spores/mL et 20 µL d'une suspension bactérienne âgée de 24h d'une DO= 0,7 sont ensemencés dans un tube Eppendorf contenant 1 ml d'eau distillée stérile additionnée de 5% de glucose. Les tubes sont ensuite incubés à 25 °C pendant 24 h. Des tubes inoculés uniquement par les spores fongiques sont préparés en parallèle comme témoin (fig. 07). L'expérience est réalisée en triplicata.

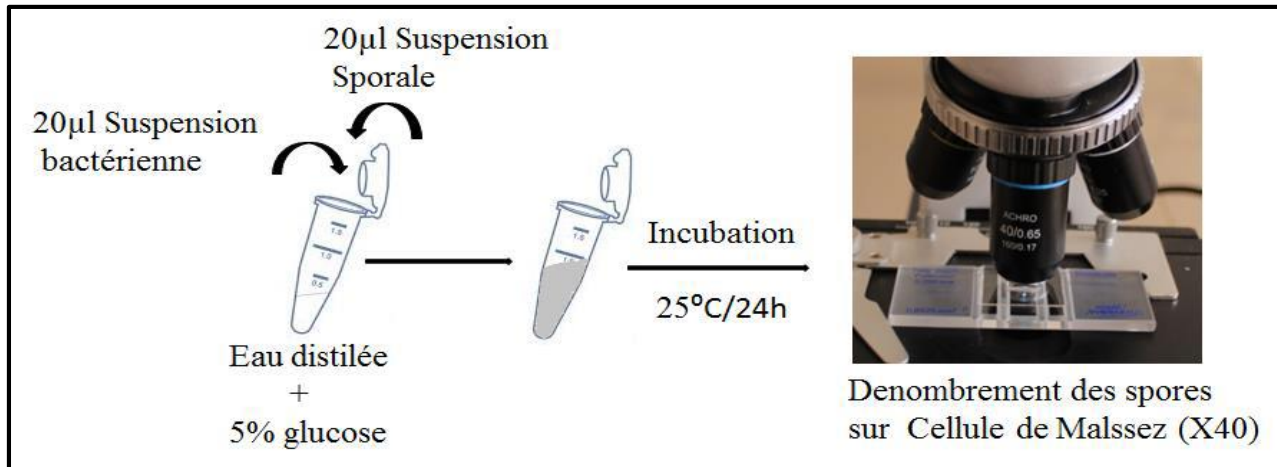
Le comptage des spores est effectué sur une cellule de Malassez où 17 µL de chaque culture sont étalés entre lame et lamelle, puis observé sous microscope à objectif X40. Les spores sont considérées germées lorsque la longueur du tube germinatif est ≥3mm.

Le pourcentage des spores germées (PGS%) est mesuré en utilisant la formule suivante :

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

SGT : Nombre de spores germées dans le témoin.

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



**Figure 08** : Effet antagoniste des souches bactériennes sur la germination des spores

Les deux souches, *Bacillus* sp. S7LiBe, *Pseudomonas* sp. S5LiBe et le champignon *Botrytis cinerea* sont sélectionnés pour les tests qui suivent.

### 2.1.3. Recherche des substances volatiles (Fiddaman, 1993)

L'activité antifongique des composés volatils des deux souches *Bacillus* sp. S7LiBe et *Pseudomonas* sp. S5LiBe à l'égard de *B. cinerea* est recherchée par l'inoculation d'une boîte de

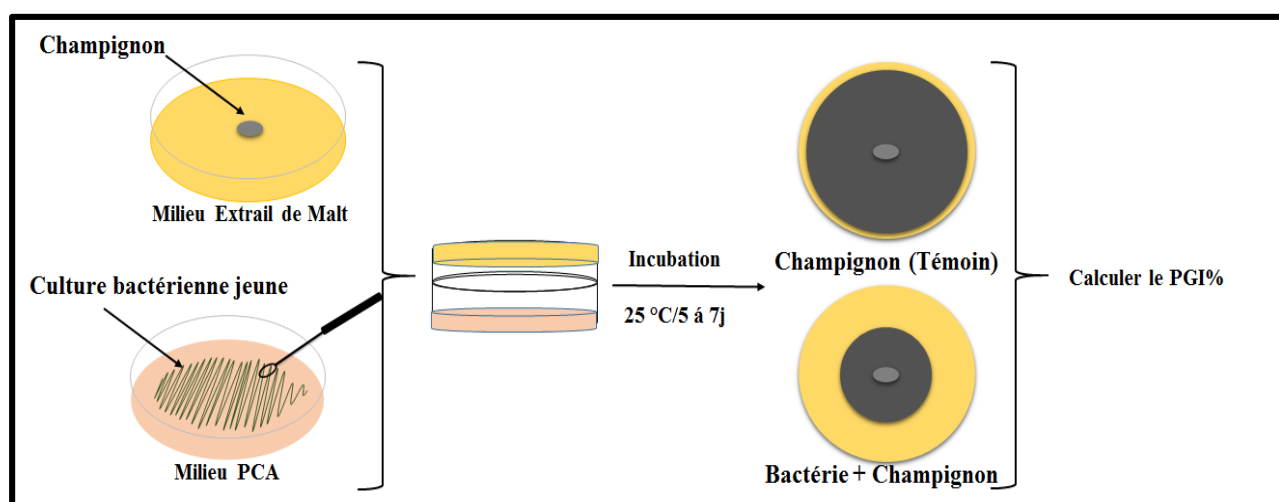
Pétri contenant l'extrait de malt avec un disque de 7 mm de diamètre de *B cinerea*. Cette boîte sera superposée sur une seconde boîte de Pétri contenant le milieu PCA (annexe I)ensemencé par l'une des souches testées (Fig. 09). Les deux boîtes sont scellées avec du parafilm et incubées à  $25 \pm 2^\circ\text{C}/5-7\text{J}$  (fig. 09). Le pourcentage d'inhibition est calculé en utilisant la formule suivante :

$$n = [(a-b)/a] \times 100$$

n : Pourcentage d'inhibition des champignons testés (%).

a : Diamètre moyen de mycélium dans la boîte de témoin (cm).

b : Diamètre moyen de mycélium dans les boîtes inoculées par les bactéries (cm).



**Figure 09 :** Recherche de la production de molécules antifongiques volatiles par les souches *Bacillus sp.* et *Pseudomonas sp.*

## 2.2. Etude de l'influence de stressés abiotiques sur l'activité antifongique

L'étude de l'influence des différents paramètres sur l'activité antifongique est réalisée selon la méthode de confrontation sur gélose (section 2.1.1. ; fig. 07)

### 2.2.1 Effet de milieu de culture

Quatre milieux de culture sont testés afin de déterminer l'effet de leurs compositions sur la production des composés antifongiques par les souches de *Bacillus sp.* S7LiBe et *Pseudomonas sp.* S5LiBe. Les milieux utilisés lors de cette étude sont les suivants (annexe I) :

Potato Dextrose Agar (PDA), Sabouraud Dextrose Agar (SDA), Czapek Dox Agar (CZA,) et Extrait de malt (EM).

### **2.2.2 Effet de pH**

Afin de déterminer le pH optimum pour l'activité antifongique des deux souches testées, le milieu de culture permettant une meilleure activité antifongique est préparé à différentes valeurs de pH (4,5, 6,5, 8,5, 10,5) puis ensemencés selon la méthode de confrontation sur gélose, incubé à 30°C/5-7 J (section 2.1.2.).

### **2.2.3 Effet de la température**

Le milieu de culture sélectionné au pH optimum est utilisé pour déterminer la température optimale pour l'activité antifongique des souches testées. Les températures testées sont les suivantes 4°C, 25°C, 28°C, 30°C, 37°C et 44°C.

### **2.2.4. Effet de la salinité**

Avant de tester l'effet de la salinité sur l'activité antifongique des souches bactériennes, une étude de l'halotolérance des souches bactériennes et fongiques est réalisée au préalable (Bonaterra *et al*, 2007).

#### **2.2.4.1. Détermination de l'halotolérance des souches bactériennes**

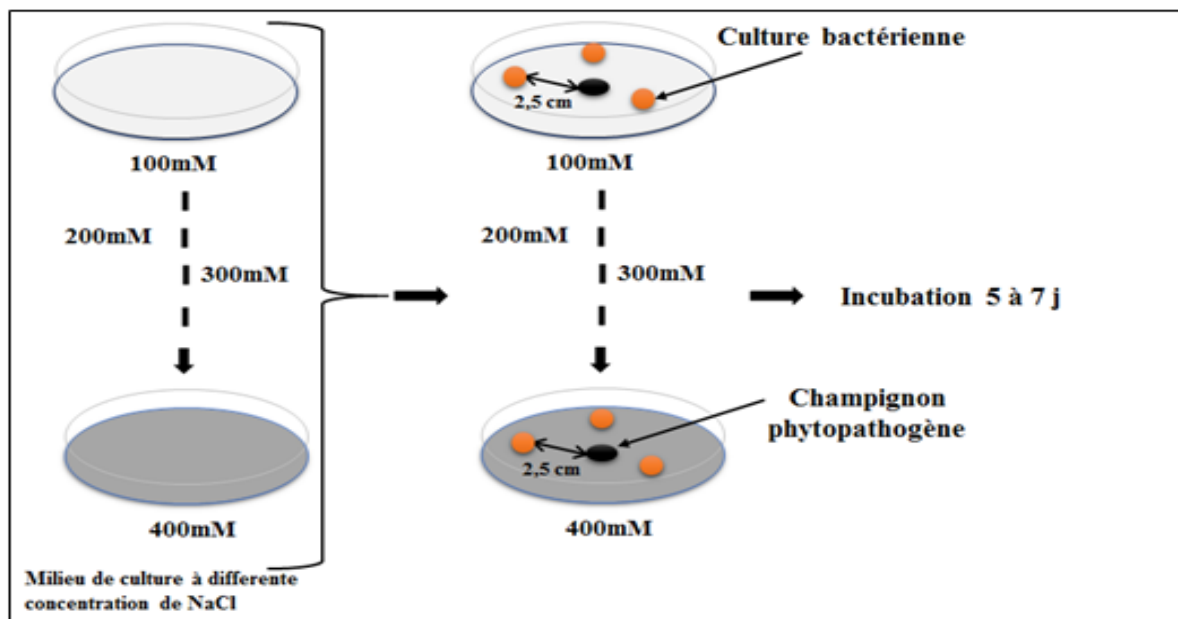
Afin de déterminer la concentration en NaCl tolérée par les souches bactériennes, ces dernières sont cultivées sur bouillon nutritif pendant 18 à 24h. Les cultures sont ensuite centrifugées à 10000 rpm/10min puis lavées deux fois dans 10 ml d'eau physiologique. 20 µl de chaque suspension bactérienne lavée sont inoculé dans 980 µl de milieu GMM (Glucose medium minimum) (annexe I) à différentes concentrations en NaCl (0.05, 0.1, 0.2, 0.3, 0.4, 0.5, 0.6, 0.7, 0.75, 0.8, 0.85, 0.9, 0.95, 1, 1.2, 1.4, 1.6, 1.8, 2M) (Annexe II). Après incubation à 30°C/48h, la croissance bactérienne est déterminée par mesure de l'absorbance à 600nm. Le test est réalisé en triplicata.

#### **2.2.4.2. Détermination de l'halotolérance du champignon**

L'halotolérance de *Botrytis cinerea* est appréciée sur le milieu extrait de malt solide additionné de NaCl (100, 200, 300 et 400mM), le test est réalisé en duplicata.

### 2.2.4.3. Effet de la salinité sur l'activité antifongique des souches

Afin de tester l'effet des différentes concentrations de NaCl sur la production de substances antifongiques par les souches bactériennes, le milieu de culture sélectionné au pH optimum est préparé à différentes concentrations en NaCl (100, 200, 300 et 400mM) (fig. 10). L'effet de la salinité est déterminé par mesure de PGI% après 5-7 jours d'incubation à température optimale.



**Figure 10 :** Etude de l'effet de la salinité sur l'activité antifongique des souches *Bacillus sp.* et *Pseudomonas sp.*

## 2.3. Recherche de la production de certains métabolites à activité antifongique

### 2.3.1. Production de sidérophores (Shwyn et Neilands, 1987).

#### 2.3.1.1. Production de sidérophores sur milieu liquide

La synthèse des sidérophores est induite lors de la croissance en conditions limitantes en fer. A cette fin les bactéries, sont préférentiellement cultivées sur milieu de culture dépourvu de fer. Pour cela le milieu King B (annexe I), étant donné sa composition exempte de fer, est préconisé pour mettre en évidence la production de sidérophores. Le milieu est ensemencé par 100  $\mu$ L des cultures, incubé à 30°C/4J sous agitation (150rpm). Après centrifugation (5000 rpm/20mn), 500  $\mu$ L du surnageant sont additionnés de 500  $\mu$ L de la solution Chrome Azurol S

(CAS) (annexe I) et incubés 30 mn à température ambiante et à l'obscurité. La couleur vire du bleu à l'orange selon le taux de production. La DO est mesuré à 630 nm.

Le pourcentage des sidérophores est calculé selon la formule suivante (Gokarn, 2010) :

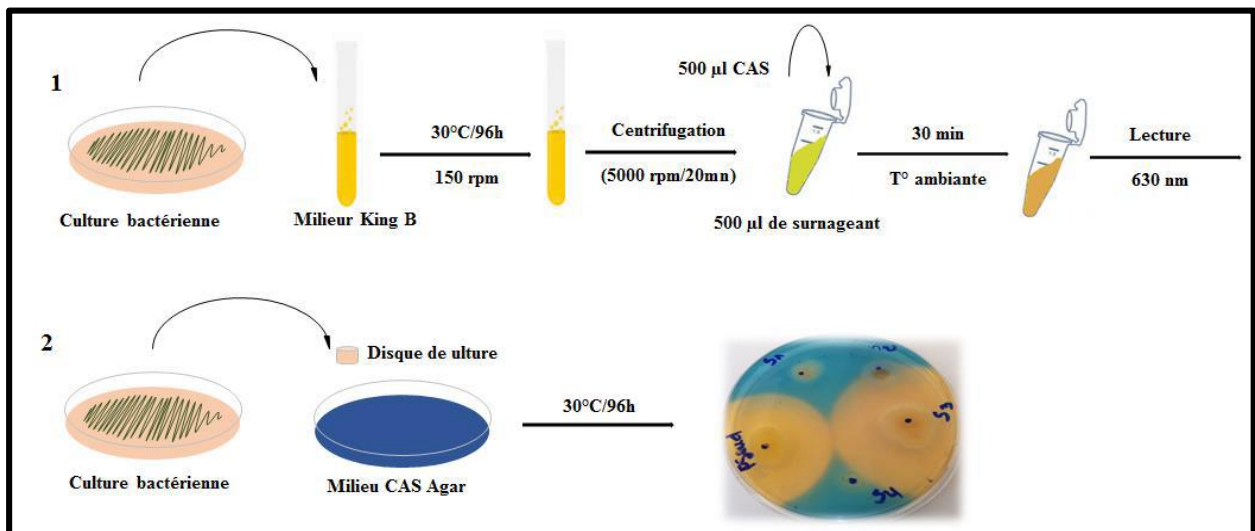
$$S\% = (St - Se) / St \times 100$$

St : DO de la solution CAS de couleur bleue intense (témoin).

Se : DO de la solution de l'échantillon de couleur bleue moins intense à orange indique l'intensité de production des sidérophores.

### 2.3.1.1. Production de sidérophores sur milieu solide

La recherche des protéines fixatrices du fer sur milieu solide est réalisée par la méthode des cylindres d'agar sur le milieu (CAS) (annexe I). La production des sidérophores est révélée par l'apparition d'un halo jaune ou orange autour des colonies.



**Figure 11** : Production de sidérophores 1 : sur milieu liquide ; 2 : sur milieu solide

### 2.3.2. Production de chitinase

Le milieu de culture suivant est utilisé, il est composé en g/L de : la chitine colloïdale : (0,6 - 0,8) ;  $K_2HPO_4$  (2,7) ;  $KH_2PO_4$  (0,3) ;  $MgSO_4 \cdot 7H_2O$  (0,7) ; NaCl (0,5) ; KCl (0,5) ; Extrait de levure (0,13) ; Agar (15). L'incubation dure 7 jours au minimum à 30°C. La présence de chitinase est révélée par l'apparition d'un halo clair autour des colonies bactériennes (Kopečný et al, 1996).

### 2.3.3. Production d'ammoniac (NH<sub>3</sub>)

Ce test qualitatif est réalisé selon la méthode de Capuccino et Sherman (1992). Il consiste à inoculer 100µl de la suspension bactérienne dans 10ml d'eau peptonée (EP). Après incubation à 30°C /96 h, 500µl du réactif de Nessler sont ajoutés dans chaque tube de Eau Peptonée (fig. 12). Le développement d'une couleur jaune ou orange indique la production de NH<sub>3</sub>.

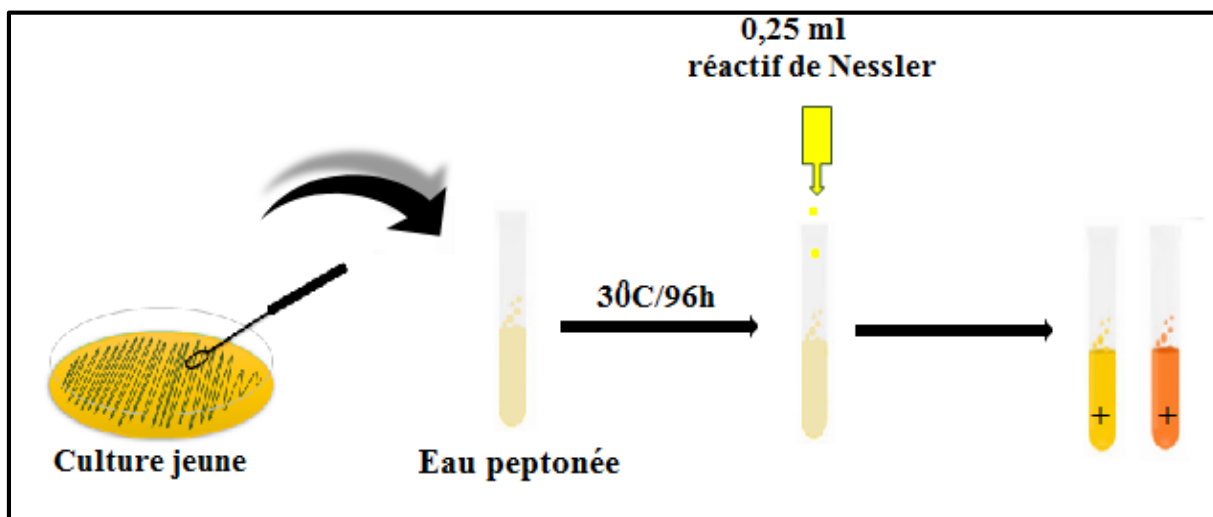
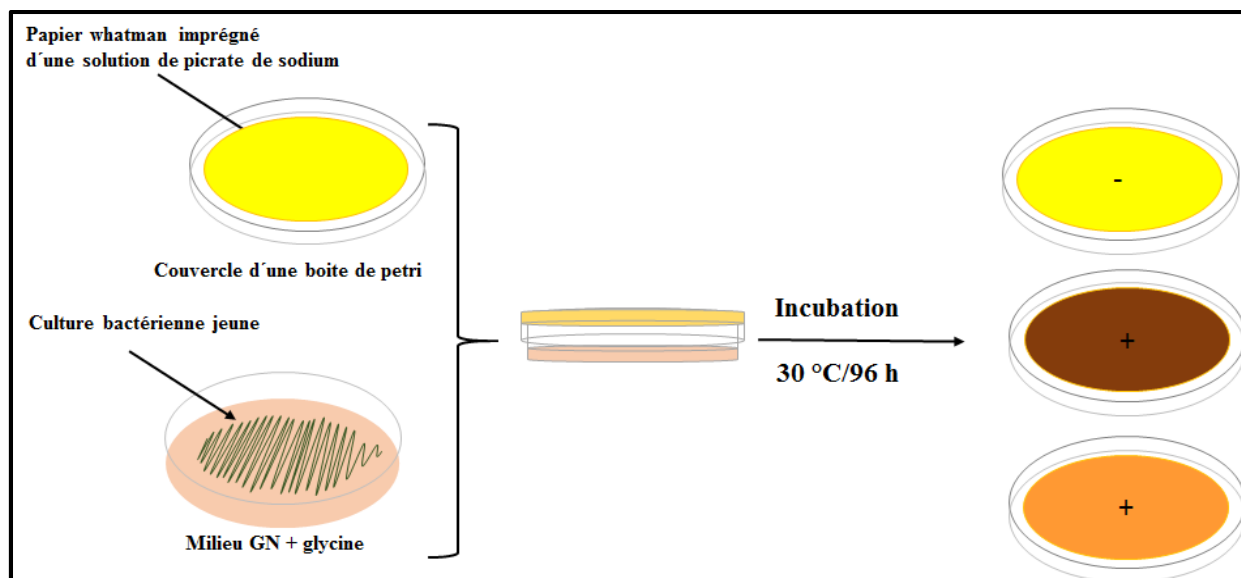


Figure 12 : Recherche de la production d'ammoniac

### 2.3.4. Production de l'acide cyanhydrique (HCN)

Elle est évaluée selon la méthode de Lorck (1948) sur gélose nutritive (GN) additionnée de glycine (4,4g/l). La culture bactérienne est ensemencée par stries sur la gélose en boîtes de Pétri. Un disque papier Whatman N°42 de 9 cm de diamètre imprégné d'une solution de picrate de sodium (5% d'acide picrique et de 2% de carbonate de sodium anhydre) est déposé au fond du couvercle de la boîte. Celle-ci est scellée avec du parafilm et incubée à 30°C/96 h. Le résultat positif se traduit par le virage du papier Whatman du jaune vers une couleur orange à marron indiquant la production de HCN (fig. 13).



+ : Présence d'HCN - : Absence d'HCN

**Figure 13 :** Production d'acide cyanhydrique (HCN)

## 2.4. Test d'antagonisme sur les feuilles de laitue

L'évaluation de l'activité antagoniste des souches S7LiBe et S5LiBe vis-à-vis *Botrytis cinerea* est réalisée sur des feuilles détachées de laitue. Le test est inspiré de la technique de Protocole INRA Avignon France, cité par Adjebli, (2015). Trois feuilles de laitue sont déposées dans des boîtes tapissées au préalable avec du papier absorbant imbibé d'eau distillée stérile, à raison de trois feuilles par boîtes. Un implant mycélien de cinq mm de diamètre, prélevé d'une culture jeune, est déposé au centre de chaque feuille. Une suspension bactérienne d'une DO = 0.7 préparée à partir d'une culture pure et jeune (âgée de 24 heures) est pulvérisée à la surface des feuilles. Un témoin ne contenant que l'implant mycélien sur les feuilles de laitue est préparé en parallèle. Les boîtes sont incubées à 22 °C et à l'obscurité.

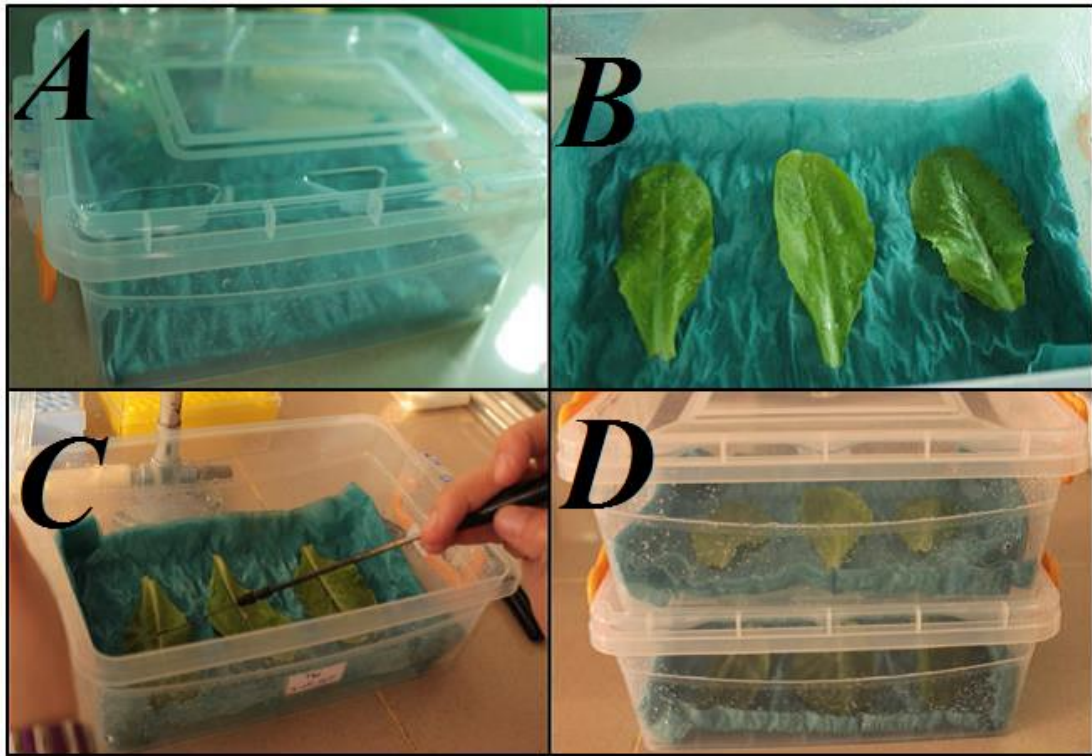
Le pourcentage de réduction de la maladie est calculé en utilisant la formule suivante :

$$\text{Taux de réduction (\%)} = (A - B) / A \times 100,$$

A : est le diamètre de la lésion dans le témoin non traité

B : est le diamètre de la lésion dans la feuille de la laitue infectée traité avec des antagonistes





**Figure 14 :** Les différentes étapes de test d'antagonisme sur feuilles de laitue

### 2.5. Analyses statistiques

Pour certaines expériences, une analyse de la variance (ANOVA) et un test Tukey'S de comparaisons multiples sont réalisés à l'aide du logiciel GraphPad Prism® version 6.01. Lorsqu'il n'y avait que deux traitements, un test t (test de Student) est effectué.

## 1. Mise en évidence de l'activité antifongique

La bio-fertilisation a été adoptée comme solution alternative à l'agriculture intensive, dans le but de diminuer les risques liés à l'usage des pesticides. Il s'agit d'une politique agraire qui exclut l'utilisation des produits phytosanitaires chimiques et utilise des traitements naturels dits « Biopesticides » (COLEACP, 2011).

Dans cette optique, l'utilisation de bactéries telles que *Bacillus* et *Pseudomonas*, qui sont connues comme des rhizobactéries promotrices de la croissance des plantes (PGPR) largement utilisés en agriculture comme agents naturels de biocontrôle (Kumar et al., 2014).

Dans cette étude, un premier test de confrontation est réalisé sur deux milieux solide et liquide. Trois souches bactériennes ont fait l'objet de souches-tests : *Bacillus* sp. S7LiBe, *Pseudomonas* sp. R-S3 et *Pseudomonas* sp. S5LiBe à l'égard de quatre champignons phytopathogènes *Botrytis cinerea*, *Aspergillus niger*, *Aspergillus flavus* et *Mucor* sp..

L'analyse statistique des résultats est effectuée avec le test two-way ANOVA ET tukey's comparaison multiple.

Les deux souches, *Bacillus* sp. S7LiBe, *Pseudomonas* sp. S5LiBe et le champignon *Botrytis cinerea* sont sélectionnés pour les autres tests.

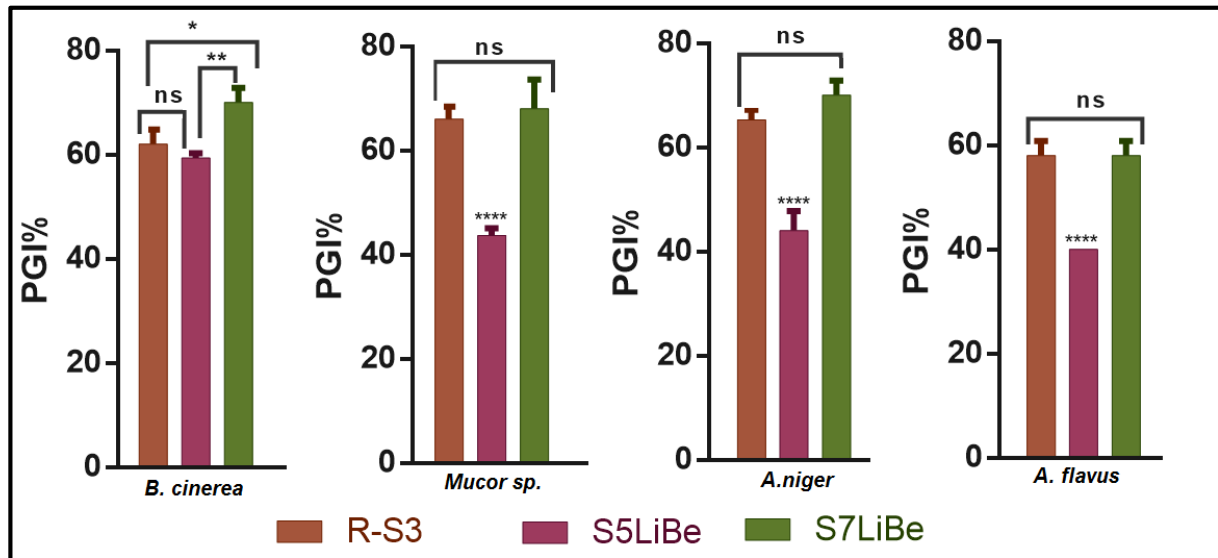
### 1.1. Effet des souches bactériennes sur la croissance mycélienne des champignons

Après 5 à 7 jours d'incubation, Les pourcentages d'inhibition de la croissance mycélienne (PGI %) sont calculés par la formule suivante :  $PGI\% = KR-R1/KR \times 100$ .

Les résultats obtenus sont présentés dans le tableau III et la figure 15.

**Tableau III :** Pourcentage d'inhibition de la croissance mycélienne des champignons

Souches	S7LiBe	R-S3	S5LiBe
<b>Champignons</b>			
<i>B. cinerea</i>	70±1,33	62±1,33	59,33±0,44
<i>A. niger</i>	70±1,33	66±0,88	44±1,77
<i>Mucor</i> sp.	68±2,66	66±1,33	43,66±0,66
<i>A. flavus</i>	58±1,33	58±1,33	40±00



**Figure 15:** Taux d'inhibition de la croissance mycélienne des champignons phytopathogènes

ns : Non significative ( $p \geq 0,05$ ) ; \* : significatif ( $0,05 \geq p \geq 0,01$ ) ; \*\* : Significatif ( $0,01 \geq p \geq 0,005$ ) ; \*\*\*\* : significatif ( $p < 0,0001$ )

La souche *Bacillus sp.* S7LiBe présente un taux de réduction de croissance très important de *B. cinerea* et *A. niger* ( $70\% \pm 1,33$ ), qui est moins important mais remarquable à l'encontre de *Mucor sp.* et *A. flavus* avec des PGI de 68 et 58% respectivement.

Des PGI % allant de 58-66% sont enregistrés pour la souche de *Pseudomonas sp.* (R-S3). En effet une inhibition de la croissance mycélienne dépasse les 58% avec un spectre d'action qui s'étend sur les quatre champignons.

Comparée aux deux autres souches, *Pseudomonas sp.* S5LiBe semble être moins active à l'égard des deux espèces d'*Aspergillus* et de *Mucor sp.* (44 ; 43,66 et 40%) et cette différence d'activité est significative, tandis que son effet sur *B. cinerea* est plus important (59,33%) et proche de celui obtenu avec la souche *Pseudomonas sp.* (R-S3).

La zone d'inhibition observée entre les colonies bactériennes et l'agent pathogène, peut être due à l'effet d'une substance inhibitrice diffusible produite par des bactéries tests et qui ont supprimé la croissance de l'agent pathogène. La production de métabolites antifongiques, en particulier les antibiotiques, joue un rôle important dans la suppression des champignons (Jamalizadeh, 2008).

## 1.2. Effet des souches bactériennes sur la germination des spores de champignons

Après 24h d'incubation, Les pourcentages des spores germées (PSG) sont calculés par la formule suivante :  $PGS\% = \frac{SGT - SGB}{SGT} \times 100$ .

Les résultats obtenus sont illustrés dans la figure 16.

Tableau IV : Pourcentage des spores germées en présence des différentes souches testées

Souches	Témoin	S7LiBe	R-S3	S5LiBe
<i>Mucor sp.</i>	100%	17,46% ±3,58	55,10% ±17,96	38,96% ±25,00
<i>A. flavus</i>	100%	4,63% ±1,5	10,15%±9,44	0,68% ±0,09
<i>A. niger</i>	100%	2,69% ±0,007	14,32%± 8,38	1,58 %±0,1
<i>B. cinerea</i>	100%	25,65% ±6,69	28,92% ±2,72	34,06% ±13,39

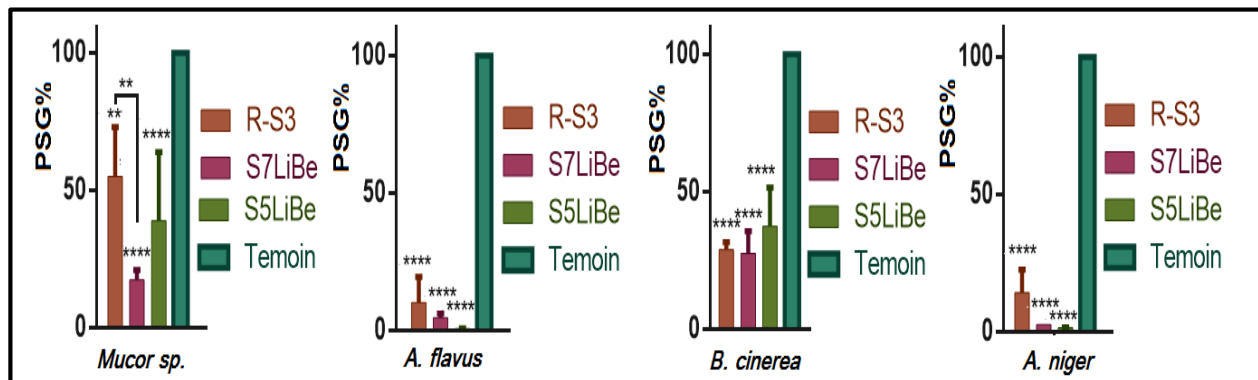


Figure 16 : Taux de germination des spores fongiques en présence des bactéries testées  
 \*\*: Significatif (0,01 ≥ p ≥ 0,005) ; \*\*\*\* : significatif (p < 0,0001)

Les résultats obtenus montrent une inhibition importante des spores fongiques des champignons testés. Les souches bactériennes sont significativement actives sur les quatre champignons. Les deux espèces d'*Aspergillus* semblent être les plus sensibles avec des valeurs de germination ≤15% suivi de *B. cinerea* (25,64% ≥ PSG ≥ 34,05%), quant à *Mucor sp.* les valeurs varient de 55,1% ; 38,96% et 17,46% en présence respective des souches R-S3 ; S5LiBe et S7LiBe.

Plusieurs mécanismes ont été proposés pour expliquer l’inhibition des champignons phytopathogènes par *Bacillus sp.* et *Pseudomonas sp.* en comprenant la production d’antibiotiques, la sécrétion d’enzymes hydrolytiques, la compétition pour les nutriments ou la combinaison de ces mécanismes (Marschner et Timonen, 2006 ; Jamali et al., 2009 ; Calvo et al., 2010).

Alabouvette et al. (2006), supposent que la compétition pour les nutriments, spécialement le carbone soit responsable de l’effet fongistatique qui se caractérise par l’inhibition de la germination des spores dans le sol. Whipps, (2001) suggère que la capacité des bactéries à parasiter et à dégrader les spores ou les hyphes des champignons pathogènes est due à la production de plusieurs enzymes.

D’après Ghahfarokhi et al (2013), les genres *Bacillus* et *Pseudomonas* sont des agents de biocontrôle des champignons aflatoxigéniques par la production d’antibiotiques telles la Fengycine A et B, iturine A, mycosubtiline, bacillomycine D et pyocheline). De plus, Lukkani (2014), a montré

l'activité de plusieurs souches de *Pseudomonas* sur *A. niger* où les valeurs des PGI% varient de 44,6 à 56,8%.

Siddiqui (2005) a également révélé l'effet de *Pseudomonas* PsJN sur la réduction de la maladie de la tomate causée par *Botrytis cinerea*, et selon Elad et Stewart (2007), *Botrytis cinerea* est sensible aux antifongiques produits par certaines espèces de *Bacillus* dans plusieurs hôtes, c'est le cas de la gramicidine S produite par *B. brevis*.

L'inhibition de *Mucor* sp. par *Bacillus* S7LiBe peut être expliquée par la production de molécules antifongiques telle que la fengicine M-4 produite par *Bacillus licheniformis* (Lebbadi et al., 1994).

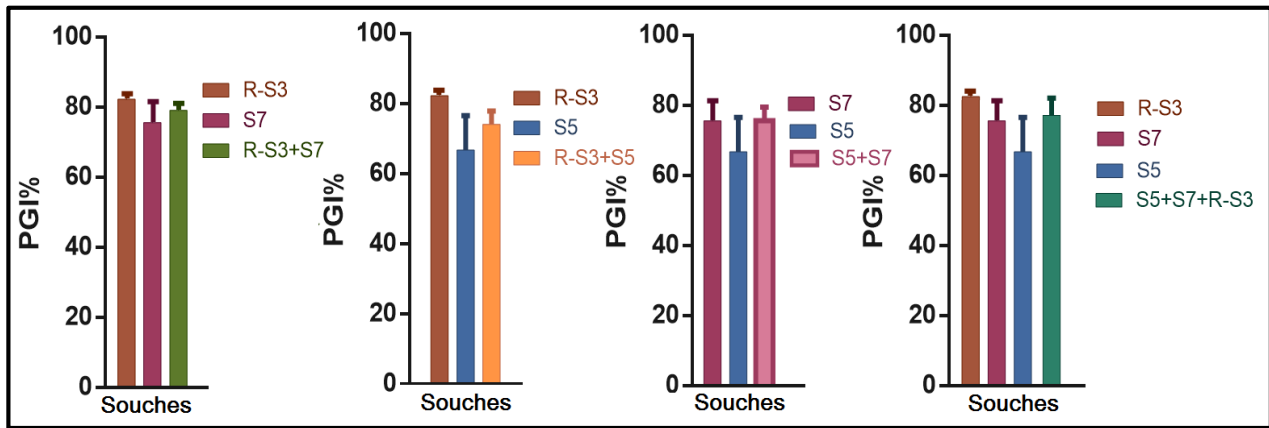
Selon Hagga (2008), *Bacillus brevis* et *Bacillus polymyxa* produisent la gramicidine S et la polymyxine B qui inhibent la germination de *B. cinerea* *in vitro* et *in vivo*. Il a été aussi rapporté que l'iturine produite par *B. subtilis* YM10-20, perméabilise les spores fongiques et empêche la germination des spores de *Penicillium roqueforti* (Chitarra et al., 2003). Selon De-Souza et al. (2003), certains antibiotiques produits par les PGPR inhibent la formation des zoospores de *Pythium* spp.

Ces évidences permettent de supposer que ces composés, sont responsables de la formation des zones d'inhibition entre la bactérie et les isolats fongiques ainsi que l'inhibition de la germination des spores montrées dans cette étude. Ces mécanismes sont bien constatés chez les souches tests qui produisent des chitinases, et elles ont la capacité de synthétiser des sidérophores et d'autres molécules leur permettant de lutter contre les champignons pathogènes.

## 1.2. Effet de la combinaison de souches sur l'activité antifongique

L'application simultanée de plusieurs bactéries peut aussi augmenter le niveau d'élimination des champignons phytopathogènes, mais peu d'études sont rapportées sur l'effet synergique des microorganismes bénéfiques comme *Pseudomonas* sp. et *Bacillus* sp. afin de promouvoir la croissance et la résistance des plantes contre les divers agents pathogènes du sol. (Yusran et al, 2009).

Les résultats des combinaisons possibles entre les souches bactériennes sur *B. cinerea* sont présentés dans la figure 17.



**Figure 17:** Pourcentage d'inhibition de la croissance de *B. cinerea* par les bactéries testées, seules et combinées

Le pourcentage d'inhibition de *B. cinerea* obtenu avec les trois souches bactériennes S5LiBe, S7LiBe et R-S3 est de 66,66% ; 75,58% et 82,17%, respectivement. La combinaison entre les 3 souches ne présente pas une augmentation du pourcentage d'inhibition, cela est observé en combinant (S5LiBe et S7LiBe), (S5LiBe et R-S3), (S7LiBe et R-S3) et (S5LiBe, S7LiBe et R-S3), les valeurs obtenues sont comme suit : 75,58% ; 74,03% ; 79,07% et 77,13%, respectivement.

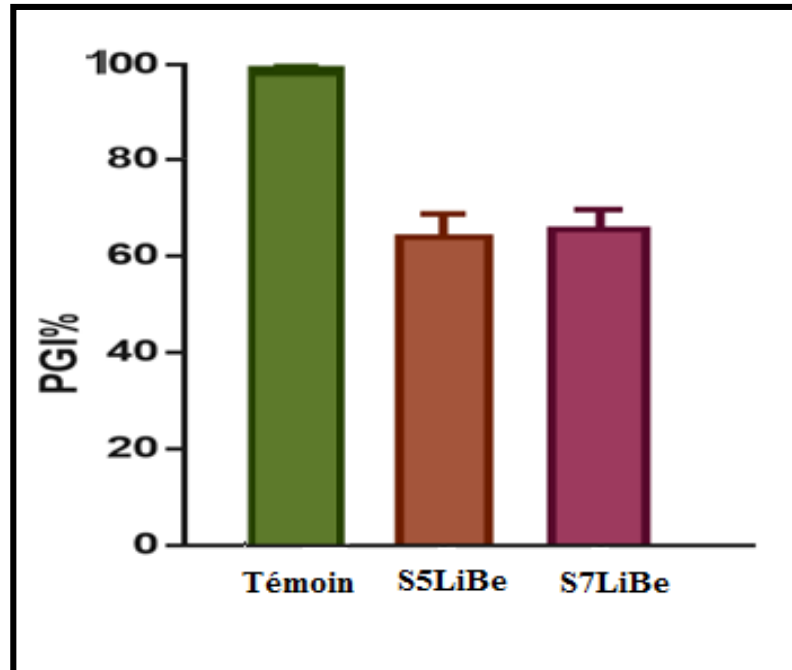
Les résultats de l'analyse statistique avec le test two-way-ANOVA ( $p \leq 0,05$ ) (Fig. 18) révèlent l'absence de différence significative au niveau des activités antagonistes des souches seules ou combinées. La confrontation combinée n'a pas conduit à une augmentation supplémentaire de l'activité antifongique. L'effet de l'inoculation combinée n'a jamais dépassé la somme des effets de l'inoculation avec une seule PGPR, ceci indique des effets additifs de PGPR plutôt que des effets synergiques clairs. Cela a été rapporté par yusran et al. (2009), cependant, Vivas et al. (2003) et Artursson et al. (2006), ont trouvé que l'efficacité pourrait être améliorée en combinant les PGPR. Selon Elad et Stewart, (2007), une association de *Bacillus subtilis* et *B. pumilus* donnera une activité meilleure grâce à l'action synergétique des différents antibiotiques.

Les deux souches, *Bacillus* sp. S7LiBe, *Pseudomonas* sp. S5LiBe et le champignon *Botrytis cinerea* sont sélectionnés pour les tests qui suivent.

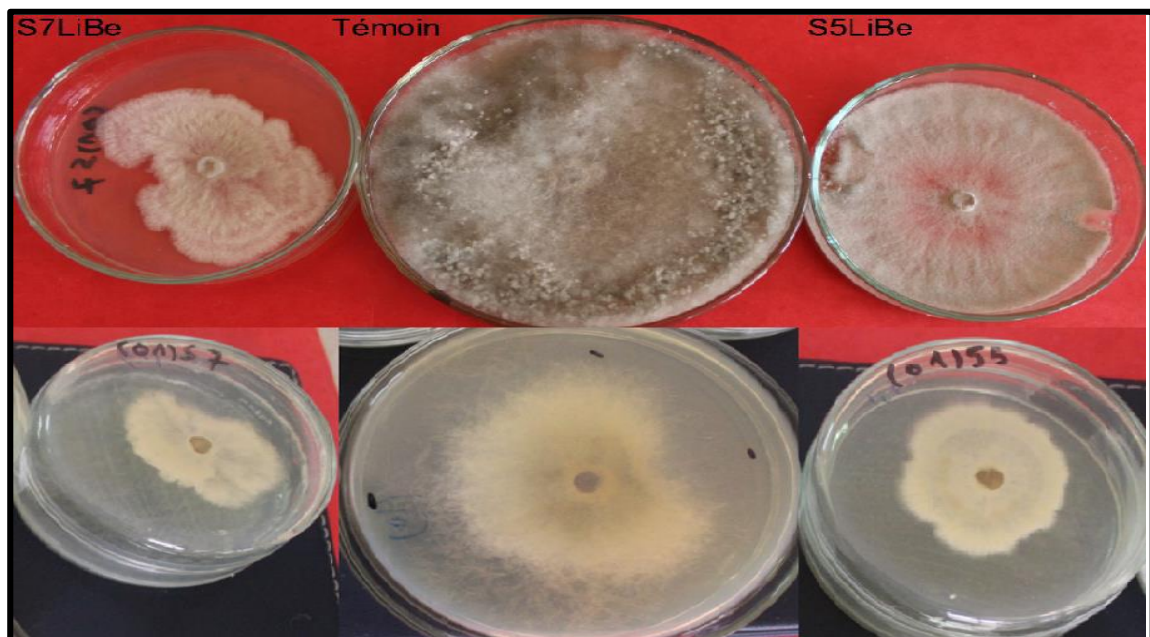
## 2. Recherche des substances volatiles

La culture des bactéries et de *B. cinerea* sur deux boîtes séparées évite le contact entre la gélose supportant la bactérie et la gélose sur laquelle se trouve le champignon, ce qui empêche la diffusion de substances dans le milieu de culture. Seule une substance volatile produite par la bactérie pourra donc

provoquer une inhibition de la croissance du champignon. Les résultats obtenus à la suite de cette expérience sont indiqués dans les figures (18,19)



**Figure 18:** Taux d'inhibition de la croissance de *Botrytis cinerea* par les composées volatiles produits par les souches bactériennes S5LiBe et S7LiBe



**Figure 19:** Quelques images du test d'antagonisme par production de molécules volatiles

Malgré l'absence d'un contact direct entre le champignon *B. cinerea* et les deux souches S7LiBe et S5LiBe, ces dernières ont pu exercer une activité inhibitrice sur le développement des mycéliums de *B. cinerea*. Les valeurs des PGI% obtenus avec la souche S7LiBe ne sont pas significativement différents de ceux obtenus avec la souche S5LiBe (65,81±4,06 et 63,88±4,8, respectivement). Ces

résultats ont permis de mettre en évidence l'existence de molécules volatiles bioactives produites par les deux souches testées.

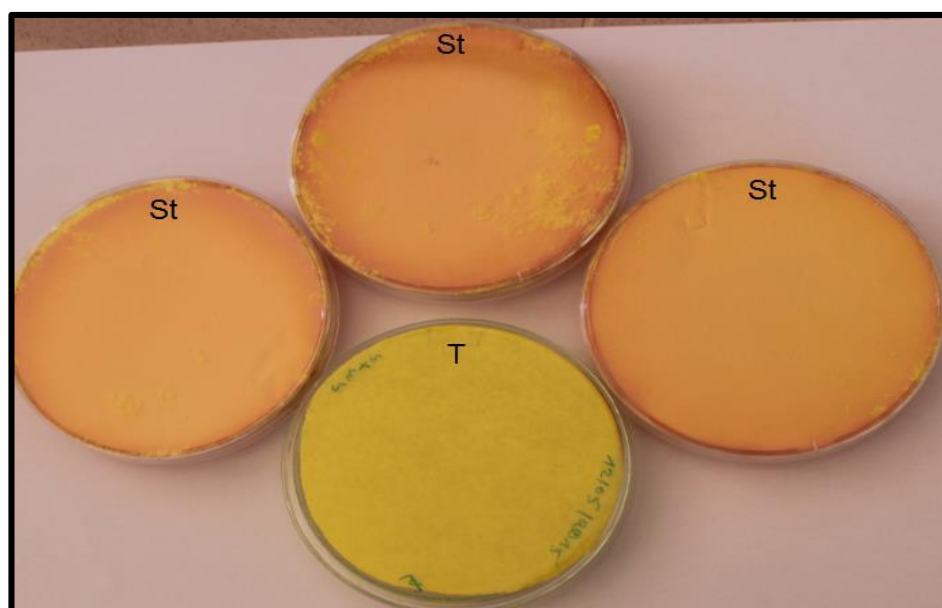
D'après Guetsky et al. (2002), *Bacillus pumilus* inhibe la croissance de *Botrytis cinerea* par synthèse de molécules volatiles à activité fongistatique.

Plusieurs auteurs ont étudiés l'effet des molécules volatiles (HCN, NH<sub>3</sub>, 2,3-butanediol, l'acétoïne, etc.) produites par les bactéries sur l'amélioration de la croissance des plantes et leur rôle dans l'induction de la résistance de ces dernières contre certaines maladies (Charest et al., 2005; Ahmed et al., 2008 ; Wani et al., 2007 ; Ryu et al., 2003)

## 2.1 Production d'acide cyanhydrique (HCN)

L'acide cyanhydrique est l'un des produits impliqués dans l'élimination de divers agents pathogènes, il est synthétisé, excrété et métabolisé par certains organismes dont les bactéries comme un moyen d'éviter la prédation ou la compétition. Les plantes hôtes ne sont généralement pas affectées par le cyanure bactérien (Zeller et al., 2007).

L'HCN est un métabolite secondaire dont la glycine est le précurseur. Après 24h d'incubation à 30°C, la couleur du papier whatman commence à virer du jaune à l'orange indiquant ainsi la production d'acide cyanhydrique et cela pour les deux souches testées. La souche *Pseudomonas* sp. S5LiBe semble être la plus performante en virant la couleur du papier filtre vers une couleur orange foncée (Fig. 20).



**Figure 20** : Production d'HCN par les souches S7LiBe et S5LiBe

T : Témoin ; St : Souche test



La différence entre les deux souches en terme d'efficacité de production de HCN peut être due à la variabilité d'expression des gènes présentés chez les *Pseudomonas* et *Bacillus* producteurs.

La production de HCN est une activité très commune chez *Pseudomonas* (88,89%) et *Bacillus* (50%) dans le sol rhizosphériques (Charest et al., 2005; Ahmed et al., 2008). Prashar et al. (2013) ont montré que 80% des isolats de *Bacillus* sp. produisent de l'HCN. Ramette et al. (2003) ont également révélé l'existence d'une corrélation positive entre la production d'HCN et la protection du concombre et de la tomate contre *Phytophthora ultimum* et *Fusarium oxysporum* respectivement.

Selon Blumer et Haas (2000), la production d'HCN par *Pseudomonas* est impliquée dans la suppression de plusieurs agents pathogènes. Cette substance agit directement sur les cellules en bloquant la cytochrome-oxydase dans la chaîne respiratoire.

## 2.2 Production d'ammoniac (NH<sub>3</sub>)

La production d'ammoniac par les bactéries est l'un des mécanismes impliqués dans la lutte contre les champignons pathogènes (Kavitha et al., 2013).

Après 48h d'incubation et l'ajout du réactif de Nessler, la couleur de l'eau peptonée inoculée, a viré au jaune foncé indiquant la présence de l'ammoniac dans le milieu (Fig 21). La couleur est plus intense dans le milieu inoculé avec la souche *Bacillus* sp.S7LiBe.



**Figure 21** : Production d'ammoniac par les souches S7LiBe et S5LiBe

L'ammoniac est produit comme un intermédiaire du catabolisme des acides aminés des exsudats racinaires assimilés par la bactérie. Sa production est une propriété commune des PGPR, elle est rapportée par de nombreux auteurs (Joseph et al., 2007 ; Ahmed et al., 2008).

Prashar et al. (2013) ont mis en évidence la production d'ammoniac par dix isolats appartenant au genre *Bacillus*. Joseph et al. (2007) ont détecté la production d'ammoniac chez 95% d'isolats du genre *Bacillus* et 94.2% du genre *Pseudomonas*.

Selon Prashar et al. (2013), la production de molécules antifongiques diffusibles et volatiles ainsi que des composés tels que l'ammoniac et le HCN semble être la principale source d'inhibition des pathogènes fongiques testés.

### 3. Production de chitinase

Après incubation, des zones claires sont apparues autour des colonies des deux souches, ces zones indiquent la dégradation de la chitine par les chitinases.

Les micro-organismes produisant des chitinases sont classés dans la catégorie des agents de la lutte biologique contre différents types de maladies fongiques des plantes (Bhushan et Hoondal, 1998 ; Huang et al., 2005). Ces enzymes hydrolysent les polymères linéaires insolubles de  $\beta(1,4)$  de N-acétyl-glucosamine, qui sont des constituants majeurs des cellules pariétales de plusieurs champignons, l'exosquelette des insectes, et les coquilles des crustacées (Bhushan et Hoondal, 1998). Les microorganismes producteurs de chitinases sont qualifiés comme agents de biocontrôle. C'est le cas de *Bacillus cereus* (chitinase +) inhibant la croissance de *Botrytis elliptica* (Huang et al., 2005).

D'après Quecine et al. (2008), la majorité des souches de *Bacillus* sp. sont connues pour leur activité chitinasique élevée. Certaines études ont montré la relation entre les chitinases de *Bacillus* sp. et *Pseudomonas* sp. et leurs aptitudes à inhiber la croissance mycélienne de *Fusarium oxysporum* et *Fusarium solani* (El-Hamshary et al., 2008). Selon Gupta et al. (2012), les bactéries appartenant aux genres *Bacillus* et *Pseudomonas* sont capables de dégrader la chitine. En plus des chitinases, *Pseudomonas* produit d'autres types d'enzymes hydrolytiques en l'occurrence des protéases (Naik et Sakyhivel, 2006).

### 4. Production de sidérophores

La synthèse de sidérophores sur milieu CAS solide (fig. 22) est caractérisée par un halo jaune ou orange autour des colonies. Le pourcentage de production sur milieu CAS liquide (fig.23) est calculé par la différence des DO à 630 nm entre l'échantillon et le témoin. La couleur vire du bleu (témoin) à l'orange plus au moins intense selon le taux de production. Les résultats obtenus sont présentés dans le tableau V et la figure 22.

Tableau V : Taux de production de sidérophores sur milieu CAS

	<i>Pseudomonas sp. S5LiBe</i>	<i>Bacillus sp. S7LiBe</i>
<b>Production de sidérophore sur milieu liquide</b>	22,52%	43%
<b>Production de sidérophore sur milieu solide Ø (cm)</b>	Ø= 4.5cm	Ø= 4cm

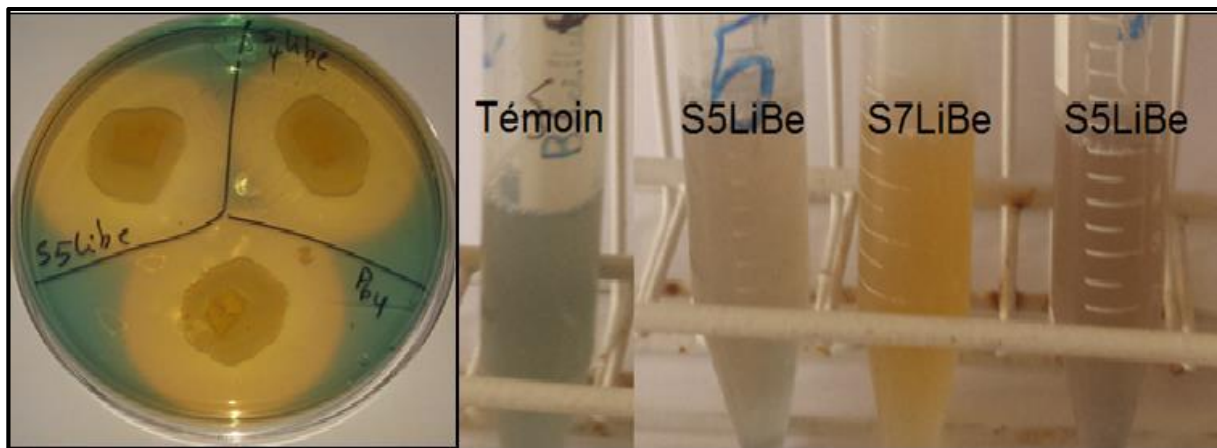


Figure 22 : Production de sidérophore sur milieu solide et liquide

A partir des résultats obtenus, les souches *Pseudomonas sp. S5LiBe* et *Bacillus sp. S7LiBe* se sont avérées de bons producteurs de sidérophores.

Plusieurs études ont confirmé que les sidérophores produits par les PGPR influencent de manière significative l'absorption de divers métaux, y compris Fe, Zn et Cu par les plantes (Egamberdiyeva, 2007 ; Dimkpa et al., 2008., Gururani et al., 2012). La production en quantités importantes de ces molécules chélatrices dans le sol permet aux souches de *Pseudomonas fluorescens* de s'approprier tout le fer nécessaire à leur croissance et de le rendre inaccessible aux autres microorganismes (Viswanathan et samiyappan., 2004).

Les *Pseudomonas fluorescens* produisent deux types de sidérophores, l'un dit de faible affinité (pyochéline) décelé chez *P. aeruginosa* (Cox et al., 1981) et l'autre, possède une affinité élevée (pyoverdine ou pseudobactines). Selon Zahir et al. (2004), *Bacillus* et *Pseudomonas* sont capables de produire ces composés chélateurs de fer. Alabouvette et al. (1998) et Chincholkaret al. (2007) ont démontré que la production de sidérophores par *Pseudomonas fluorescens* appelés pseudobactines ou pyoverdines induit la répression des maladies causées par le genre *Fusarium*. D'après Ji et al. (2014), la production des sidérophores est observée chez plusieurs souches du genre *Bacillus sp.*

Les sidérophores des bactéries rhizosphériques peuvent influencer directement l'alimentation de la plante en fer, comme ils peuvent le rendre ainsi non disponible pour les champignons pathogènes (O'sullivan et O'gara, 1992).

## 5. Etude de l'influence de stressés abiotiques sur l'activité antifongique

Comprendre les facteurs environnementaux qui régulent la biosynthèse des composés antimicrobiens par des souches de *Pseudomonas fluorescens* et *Bacillus* sp. est une étape essentielle dans l'amélioration du niveau et de la fiabilité de leur activité de biocontrôle. (Duffy et De-Fago, 1999).

L'influence des facteurs environnementaux sur la performance des PGPR, le type de sol, les conditions climatiques, a été bien documentée. Cependant les facteurs abiotiques sont les principaux facteurs qui déterminent l'efficacité des PGPR (Egambardieva, 2012).

### 5.1 Effet du milieu de culture

Les résultats obtenus montrent que les deux souches sont actives vis-à-vis de *B. cinerea* sur les différents milieux testés (fig. 23, 24)

**Tableau VI** : Valeurs des PGI% obtenus sur différents milieux de culture

Souches Milieux de culture	S7LiBe	S5LiBe
<b>EM</b>	81,52%±6.41	71,90%±2.01
<b>CZA</b>	83,36%±1.59	87,92%±0.59
<b>PDA</b>	70,27%±0.55	52,63%±2.34
<b>SDB</b>	80,22%±3.67	78,23%±1.13

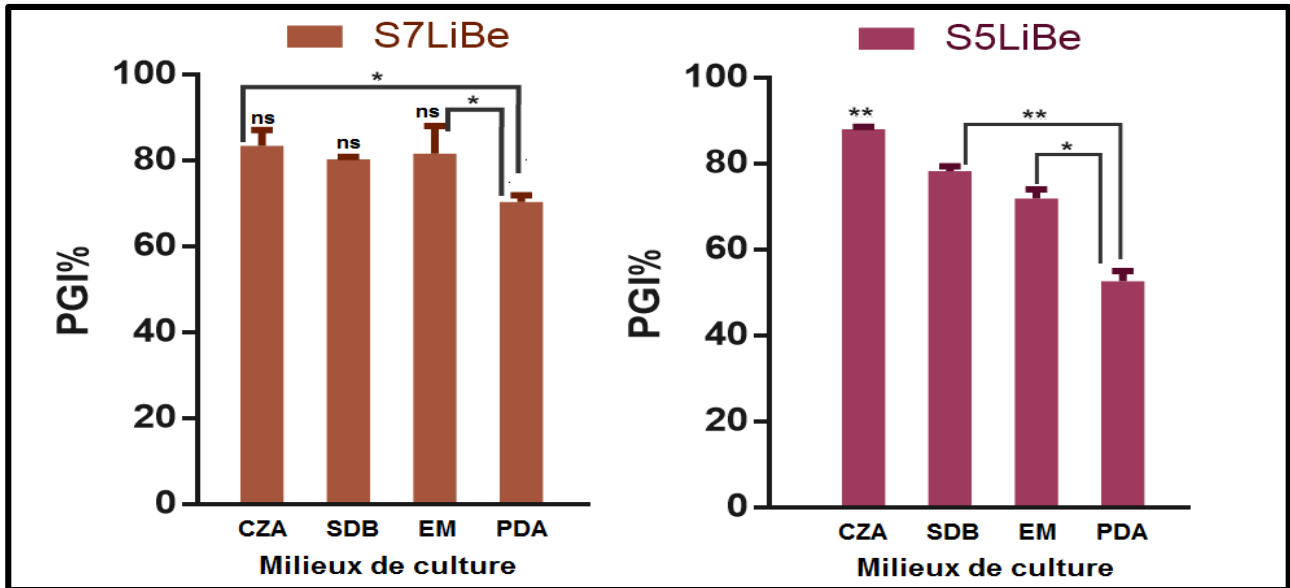


Figure 23 : Effet de milieu de culture sur l’activité antifongique

\* : significatif ( $0,05 \geq p \geq 0,01$ ) ; \*\* : Significatif ( $0,01 \geq p \geq 0,005$ ) ; \*\*\* : significatif ( $0,005 \geq p \geq 0,0001$ )

Le Test T de Student ne montre aucune différence significative entre les activités antifongiques de la souche S7LiBe obtenues sur les milieux CZA modifié, SDB et EM. Comparé aux autres milieux, le milieu PDA semble être le moins convenable pour la souche S7LiBe ( $0,05 \geq p \geq 0,01$ ).

Les résultats obtenus avec la souche S5LiBe révèlent que le milieu CZA favorise plus la production de composés antifongiques, cette activité est significativement différente de celles obtenues sur les trois autres milieux ( $0,01 \geq p \geq 0,005$ ). Compte tenu des résultats obtenus avec la souche S7LiBe, le milieu PDA est le moins convenable. Les résultats des PGI% obtenus diffèrent significativement de ceux obtenus sur les milieux CZA ( $p=0,023$ ), SDB ( $p=0,0051$ ) et EM ( $p=0,0126$ )

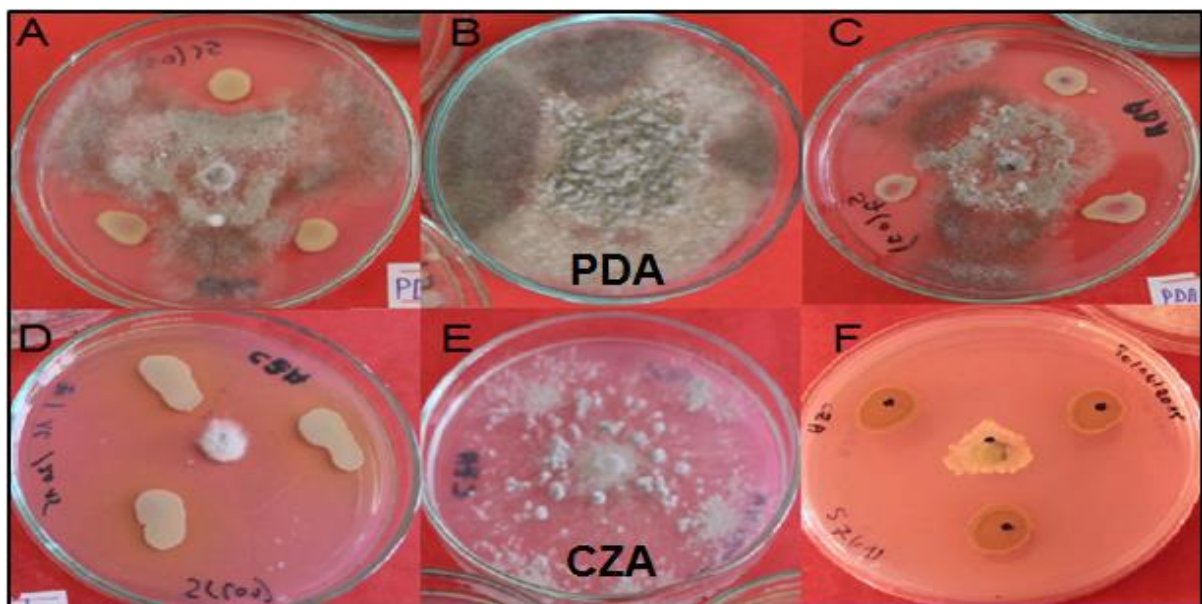


Figure 24 : Quelques images de l’activité antifongique sur milieu CZA modifié et PDA

A, D : S5LiBe ; B, E : Témoins ; C, F : S7LiBe

Selon Naik et Sathivel (2006), les bactéries du genre *Pseudomonas* sont capables d'utiliser plusieurs sources de carbone comme substrat et peuvent s'adapter aux différents milieux.

La production de composés antifongiques est affectée par un grand nombre de facteurs abiotiques, tels que le Fe<sup>+3</sup>, Zn<sup>+2</sup>, Cu<sup>+2</sup>, Mo<sup>+2</sup>, et le glucose. Le Fe<sup>+3</sup> et le saccharose augmentent le niveau de production de DAPG (Diacétyl-phloroglucinol) chez la souche *P. fluorescens* F113, alors que dans le cas de *P. fluorescens* Pf-5 et CHA0 sa production est stimulée par le glucose (Duffy et De-fago, 1999).

### 5.2. Effet de pH

Les résultats obtenus montrent que les deux souches exercent une activité sur *B. cinerea* aux différents pH testés (fig 25, 26).

Tableau VII : Valeurs des PGI% obtenus à différents pH

Souches	S7LiBe	S5LiBe
pH 4.5	68.19%±8.75	50.00%±00
pH 6.5	86.58%±0.58	67.91%±6.48
pH 8.5	81.88%±1.16	58.33%±5.89
pH 10.5	78.91%±0.19	57.50%±3.53

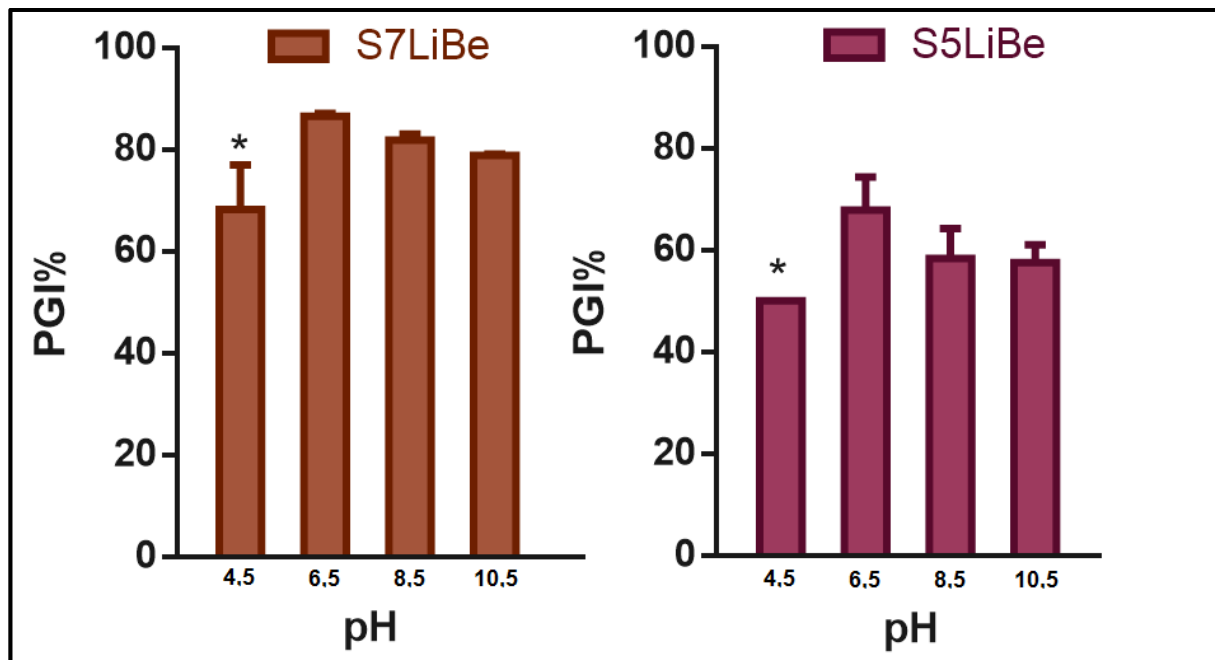
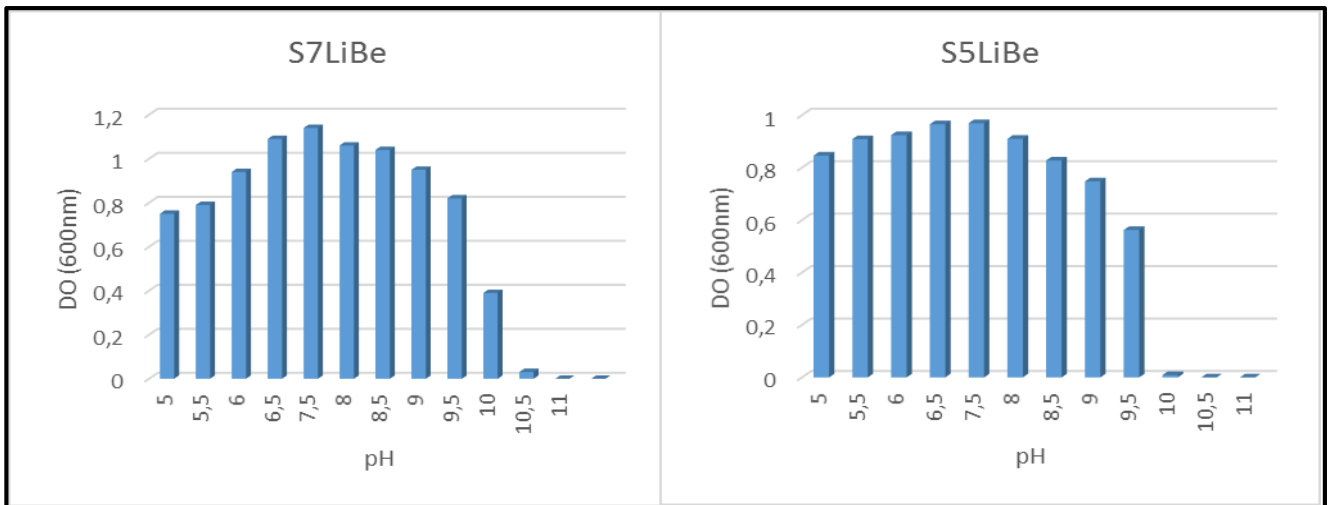
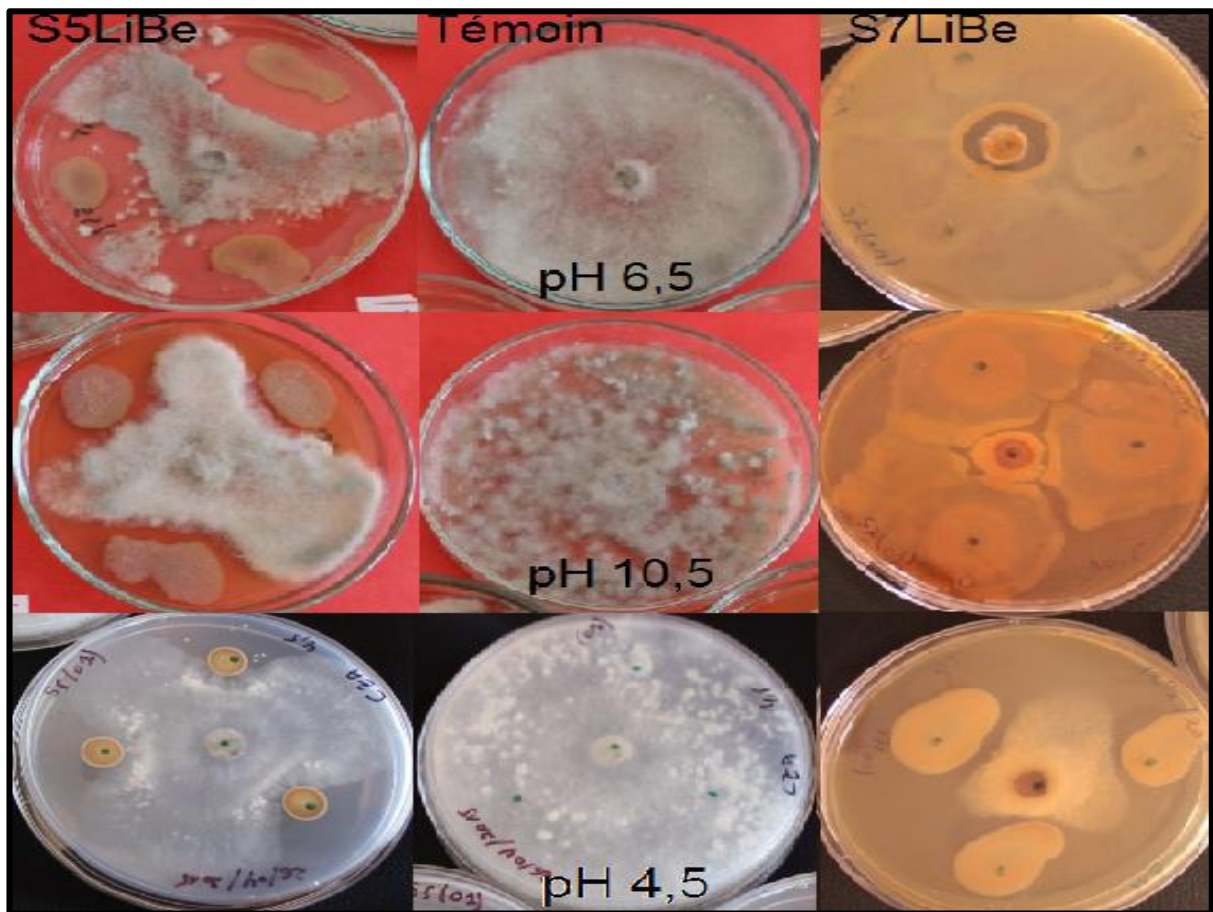


Figure 25 : Effet du pH sur l'activité antifongique des souches bactériennes *Pseudomonas* et *Bacillus*  
 \* : significatif (0,05≥p≥0,01)



**Figure 26:** Histogramme de croissance des souches S7LiBe et S5LiBe à différentes valeurs de pH

Le Test T de Student ne révèle aucune différence significative entre les activités antifongiques obtenues sur les valeurs de pH, 6,5, 8,5 et 10,5. Le pH 4,5 est le moins convenable, les valeurs de PGI% obtenues diffèrent significativement de celles des autres pH et cela pour les deux souches ( $0,05 \geq p \geq 0,01$ ).



**Figure 27 :** Quelques images de l'activité antifongique à différents valeurs de pH

Les résultats obtenus corroborent avec ceux rapportés par Prashar et al. (2013), qui ont clairement montré que des souches du genre *Bacillus* et *Pseudomonas* exercent une forte activité antifongique à pH 6,5, tandis que leur croissance optimale est observée à pH 7,5.

Contrairement aux résultats obtenus par Prashar et al. (2013) et Bojanowski (2011) qui ont montré que les valeurs du pH inférieurs à 7 ont complètement éliminé l'activité antifongique de *Pseudomonas* sp., l'activité antifongique de la souche soumise aux conditions alcalines (pH 9 et 11) est très maximale.

### 5.3. Effet de la température

Les valeurs de PGI% obtenues ainsi que les courbes de croissances des deux souches à différentes températures sont illustrées sur les figures 28 et 29.

Tableau VIII : Valeurs des PGI% obtenues à différentes température d'incubation

Souches	S7LiBe	S5LiBe
Température		
4°C	61,54% ± 0	00%
21°C	78,08% ± 1,29	70% ± 4,71
28°C	77,5% ± 9,43	73,33% ± 1,88
30°C	82,53% ± 2,88	80.00% ± 0
37°C	00%	00%
44°C	00%	00%

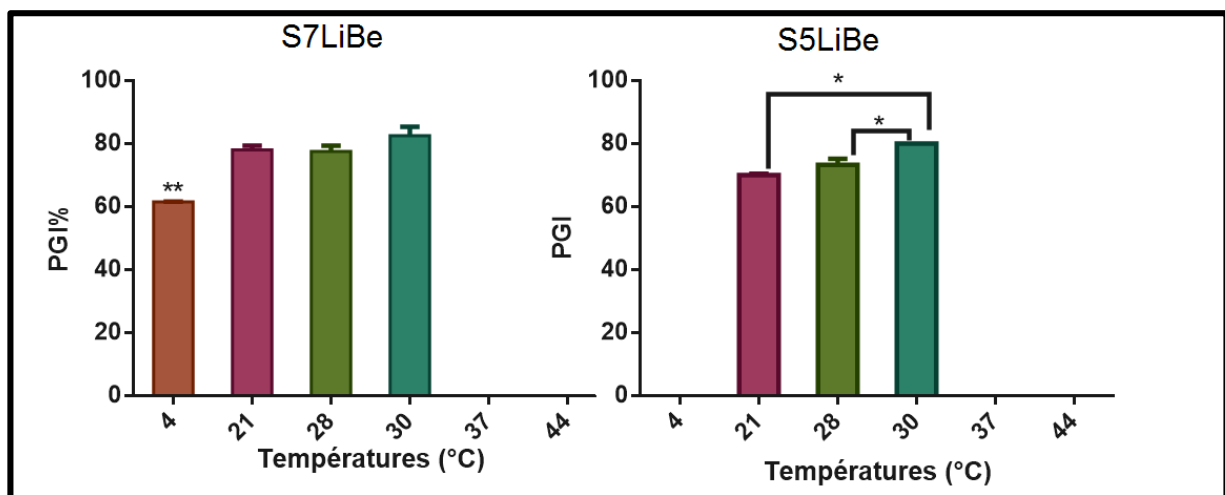
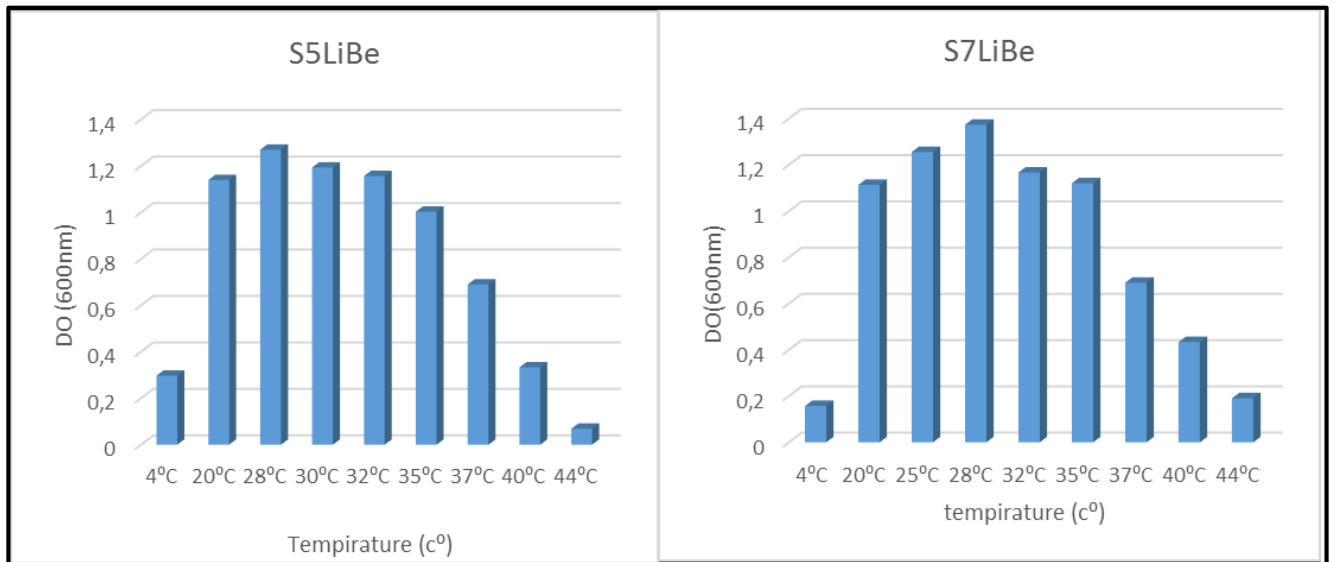


Figure 28 : Effet de la température sur l'activité antifongique  
 \* : significatif (0,05 ≥ p ≥ 0,01)





**Figure 29** : Histogramme de croissance des souches S7LiBe et S5LiBe à différentes températures d'incubation.

L'étude de l'activité antifongique des deux souches à différentes températures d'incubation montre que ces dernières n'exercent aucune activité aux températures 37 et 44°C. Une activité remarquable à 4°C est observée chez la souche S7LiBe et cela malgré sa faible croissance à cette température, quand à la souche S5LiBe, son activité est nulle.

Pour la souche S7LiBe, les valeurs des PGI% aux températures 21, 28 et 30°C ne sont pas significativement différentes ( $p > 0,05$ ). La température 30°C semble être la plus convenable pour la souche S5LiBe, les valeurs de PGI% diffèrent significativement de celles obtenues à 21 et 28°C ( $0,05 \geq p \geq 0,01$ ).

La température influe de manière significative sur la capacité des bactéries à produire des métabolites antifongiques (Landa et al., 2004).

Les résultats obtenus corroborent avec ceux de Landa et al. (2004) qui ont démontré que la température optimale de croissance permet une meilleure production de la pyoverdine par *P. fluorescens* comparée à la température 37°C où la production est inhibée. Selon les mêmes auteurs, la croissance de *F. oxysporum* et *F. ciceris* est fortement réduite en présence de *P. fluorescens* à des températures allant de 22 à 32,5°C.

Prashar et al. (2013) ont rapporté que l'augmentation de la température d'incubation réduit l'activité antagoniste de *Bacillus* sp. la valeur minimale est obtenue à 42°C. ils ont également montré que la souche *B. licheniformis* (EN74-1) est un bon antagoniste de la pourriture grise sur les pommes à 20 et 4°C, elle réduit le diamètre de lésion de *Botrytis mali* (9-11 mm) par rapport au contrôle (32-41 mm) et cela à 4°C.

5.4. Effet de la salinité sur l'activité antifongique des souches

La mesure des zones d'inhibition à des concentrations en sel allant de 100 mM à 300 mM révèle la présence d'une activité antifongique jusqu'à 300 mM (fig. 30, 31).

Tableau IX : Valeurs des PGI% obtenus à différentes concentration d'NaCl

NaCl \ Souches	S5LiBe	S7LiBe
100 mM	69,77%±1.1	77,11%±0.007
200mM	80,62%±1.1	65,62%±4.31
300mM	77,90%±0.55	62,15%±6.98

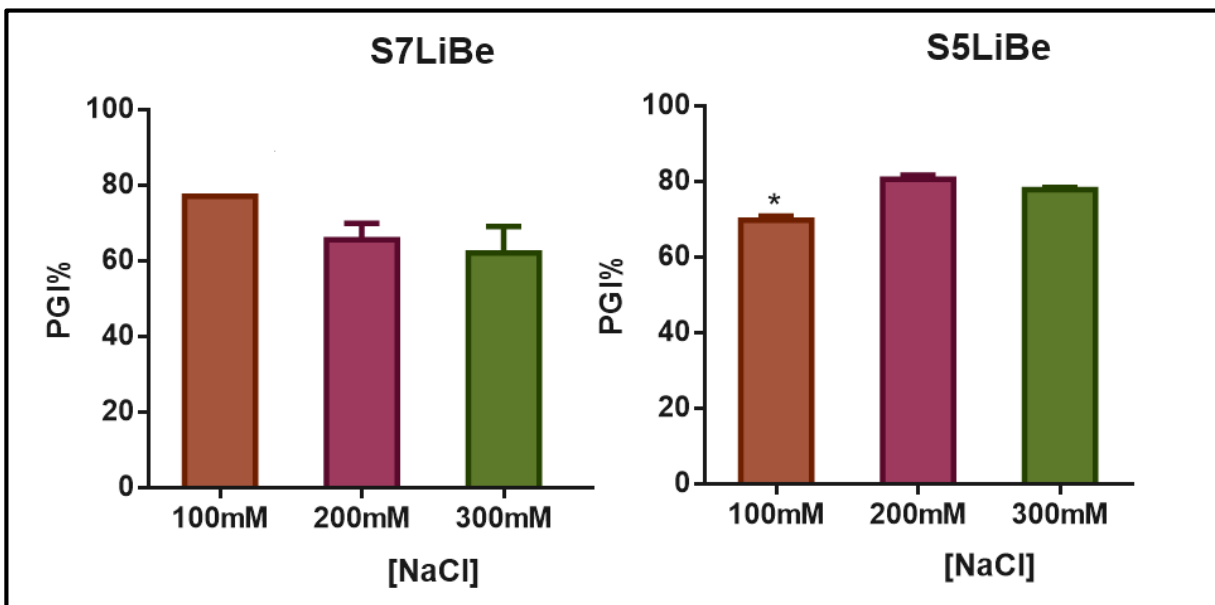


Figure 30: Effet de la salinité sur l'activité antifongique  
\* : significatif (0,05≥p≥0,01)

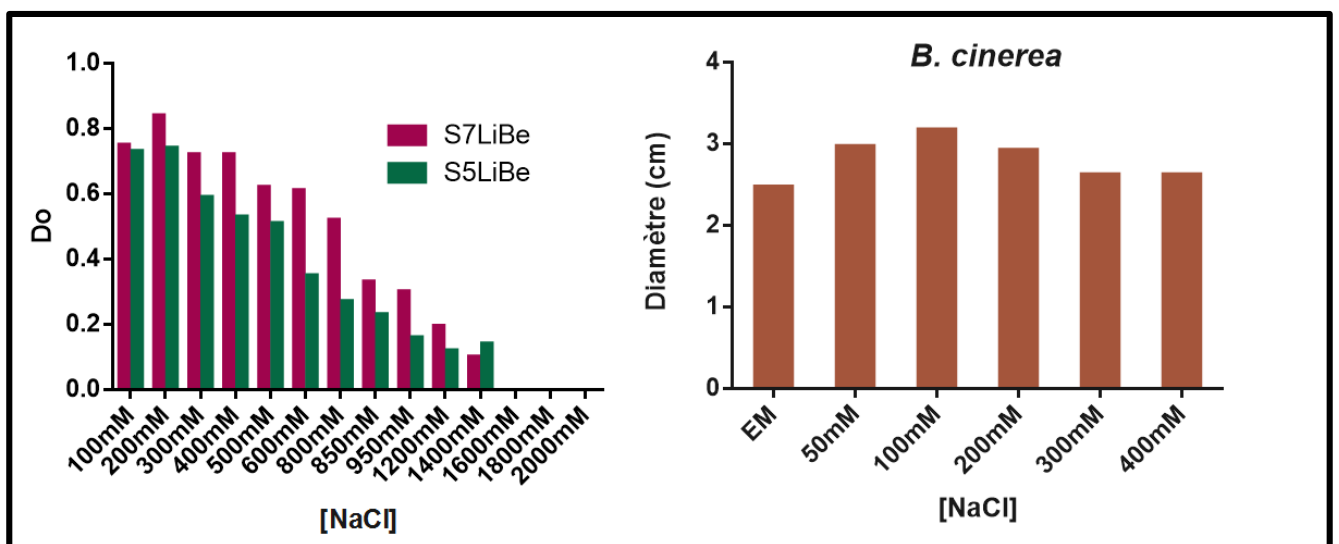
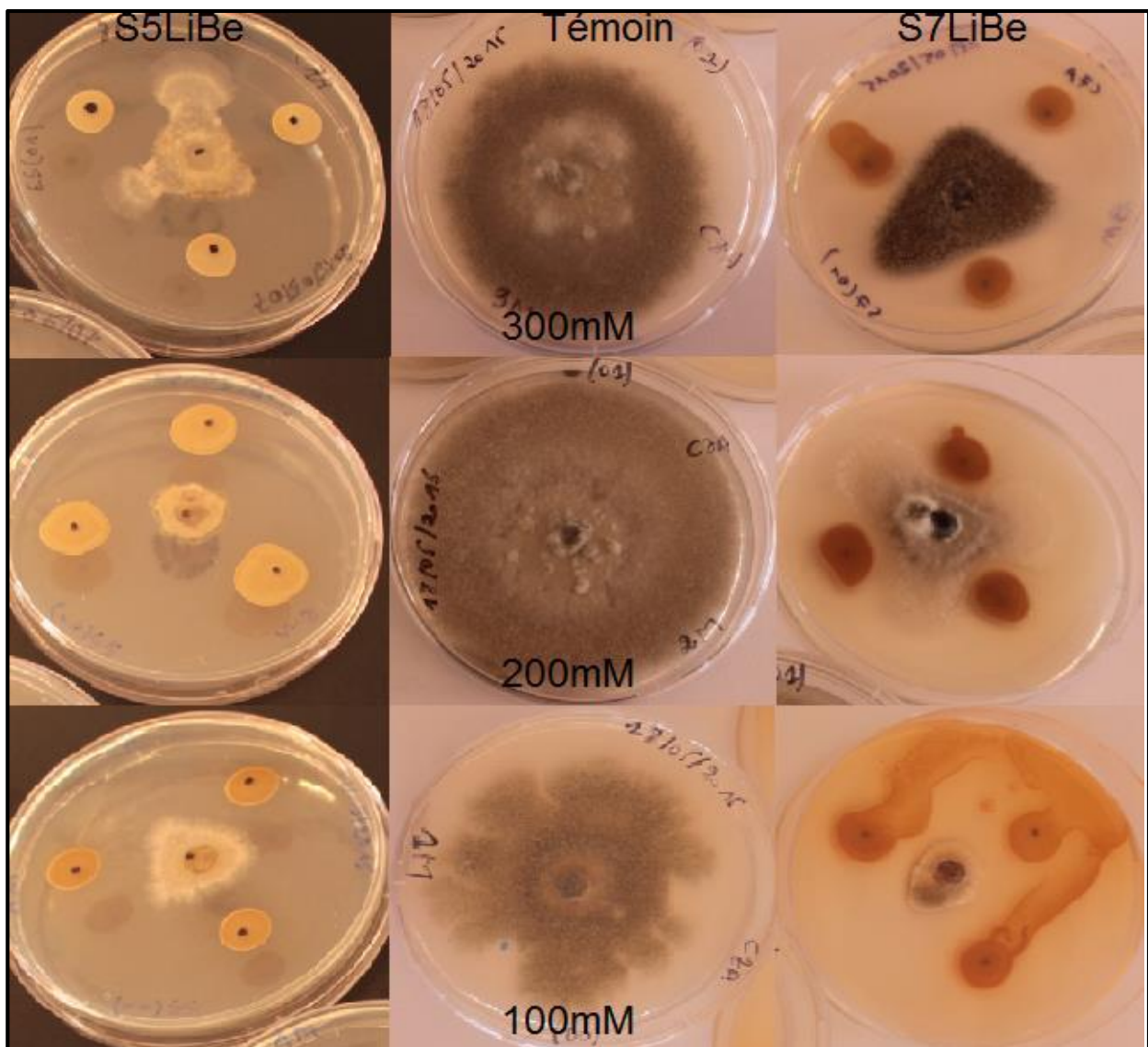


Figure 31 : Histogramme de croissance des souches S7LiBe et S5LiBe et de *B. cinerea* à différentes valeurs de NaCl

Les résultats obtenus montrent que la présence du sel dans le milieu présente un effet sur l'activité antifongique des deux souches. Pour la souche S5LiBe, 200mM semble être la concentration optimale sur cette gamme de concentration, selon l'analyse effectuée par le test t de Student, cette valeur n'est pas significativement différente de celle obtenue à 300mM ( $P=0,0885$ ). La concentration 100mM permet une activité moins importante et les valeurs obtenues sont significativement différentes de celles obtenues à 200 et 300 mM ( $0,05 \geq p \geq 0,01$ ). Contrairement à la souche S5LiBe, la concentration optimale pour la souche S7LiBe est 100mM, mais les valeurs obtenues ne diffèrent pas significativement des autres concentrations ( $p > 0,05$ ).



**Figure 32 :** Quelques images de l'activité antifongique à différentes concentration de NaCl

Patel et al. (2011) ont mis en évidence la production de sidérophores par *Pseudomonas putida* et *Pseudomonas pseudoalcaligenes* dans des conditions du stress salin. Tank et Saraf (2010) ont aussi rapporté la production de sidérophores par les PGPR 6% de NaCl.

6. Test d'antagonisme sur les feuilles de laitue

Les résultats obtenus (fig 33,34) ont montré que les deux souches possèdent un potentiel remarquable contre le champignon *B. cinerea*. la souche S7LiBe montre une activité plus importante que celle de S5LiBe, ces résultats d'étude in vivo confirme les résultats des tests in vitro.

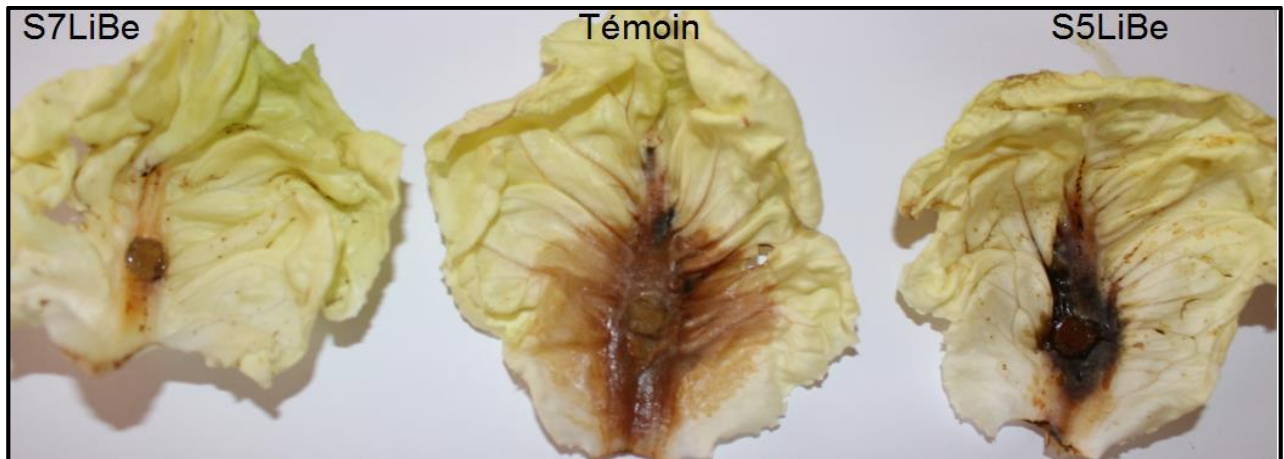


Figure 33 : Image des zone de lésion par *B. cinerea* avec ou sans les souches tests obtenus sur feuille de laitue

Le pourcentage de réduction de *Botrytis cinerea* obtenu avec les deux souches S7LiBe et S5LiBe est de 57.0%, 21.26% respectivement (fig. 34).

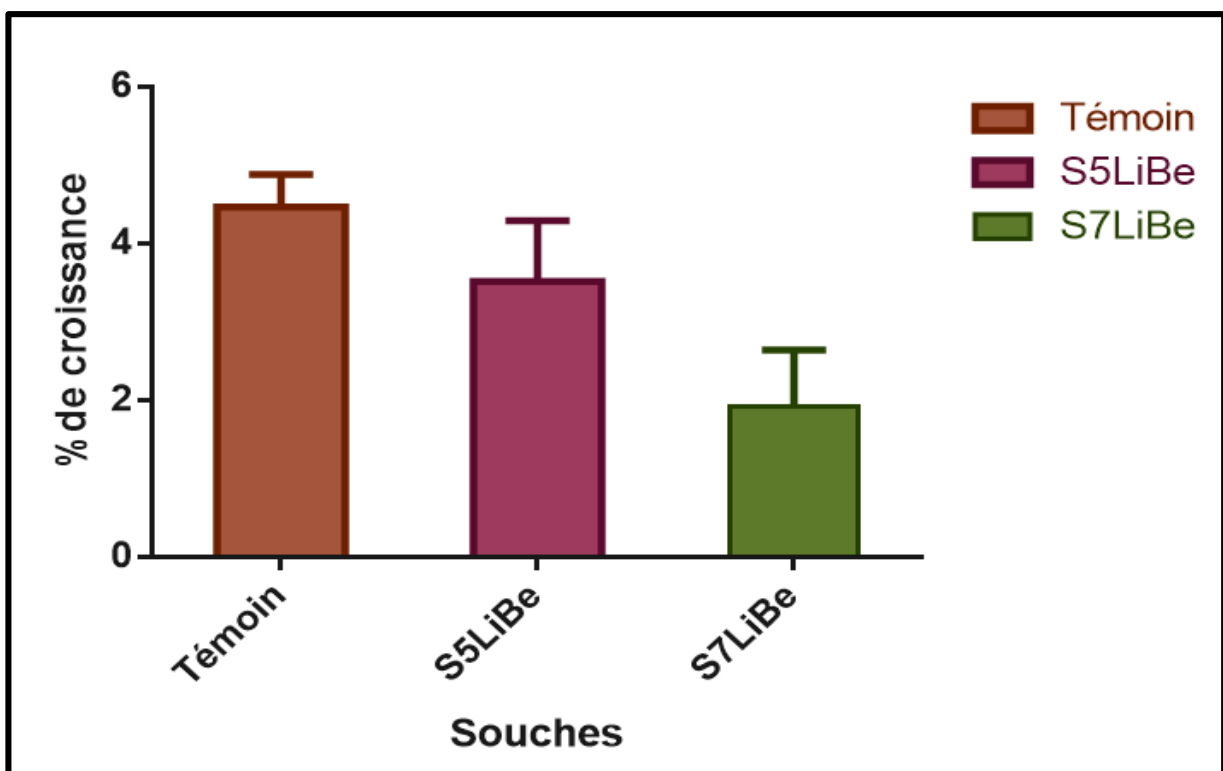


Figure 34 : Pourcentage de croissance de *B. cinerea*, de S5LiBe et S7LiBe sur feuilles de laitue

Les résultats rapportés par WANG et al., (2009) montrent que la souche de *Bacillus subtilis* présente un pourcentage d'inhibition de 52.4% vis-à-vis de *Botrytis cinerea*. Siddiqui (2005), a également révélé l'effet de *Pseudomonas* PsJN sur la réduction de la maladie de la tomate causée par *Botrytis cinerea*, et selon Elad et Stewart (2007), *Botrytis cinerea* est sensible aux antibiotiques produits par certaines espèces de *Bacillus* dans plusieurs hôtes, c'est le cas de la gramicidine S produite par *B. brevis*.

### Conclusion

L'emploi excessif de fongicides chimiques dans les pratiques agronomiques affecte de manière négative la croissance des plantes et des microorganismes tels que les PGPR, et leurs activités physiologiques importante pour la fertilité des sols. Dans ce contexte, l'utilisation des microorganismes bénéfiques comme agent de biocontrôle, constitue une alternative prometteuse pour l'utilisation des fongicides chimiques. Plusieurs bactéries et champignons ont été rapportés comme microorganismes antagonistes en particulier les souches du genre *Bacillus* et *Pseudomonas*.

Trois souches bactériennes (*Pseudomonas* sp. S5LiBe et *Bacillus* sp. S7LiBe et *Bacillus* sp. R-S3) provenant de la collection du laboratoire (LMER) équipe biomasse et environnement sont sélectionnées pour cette étude, sur la base leurs différents effets sur la stimulation de la croissance des plantes.

D'après nos résultats basés sur l'inhibition de la croissance mycélienne et la germination des spores, les trois souches bactériennes testées se sont révélées potentiellement antagonistes vis-à-vis des 4 champignons phytopathogènes cibles (*Botrytis cinerea*, *Mucor* sp., *A. flavus* et *A. niger*). La combinaison des trois souches sur l'activité antifongique à l'égard de *B. cinerea* présente une légère augmentation de pourcentage d'inhibition, ceci indique un effet additif plutôt qu'un effet synergique clair.

L'étude de la production de molécules antifongiques a montré que les souches S7LiBe et S5LiBe produisent des chitinases, des sidèrophores ainsi que des molécules volatiles bioactives (HCN et NH<sub>3</sub>).

Les facteurs abiotiques (milieu de culture, pH, température d'incubation et salinité) influencent la production de substances antifongiques. Le milieu de culture CZA-modifié influence positivement l'activité antifongique de la souche S5LiBe, quant à la souche S7LiBe, les milieux CZA-modifié, SDB ainsi que EM favorisent cette activité.

Les deux souches exercent une forte activité antifongique à des pH alcalins tandis que les valeurs maximales de PGI% sont observées à pH 6,5. La température 30°C semble être la plus appropriée pour l'activité de ces deux souches. Ces dernières n'exercent aucune activité à la température 37 et 44°C.

Une activité remarquable à 4°C est observée chez la souche S7LiBe et cela malgré sa faible croissance à cette température. Contrairement à la souche S5LiBe, qui révèle un optimum d'activité à 200 mM de NaCl, la concentration optimale pour la souche S7LiBe est de 100 mM.

Les résultats de l'activité antifongique sur les feuilles de laitue montrent que les deux souches (S7LiBe et S5LiBe) réduisent remarquablement les zones de lésion (57.0%, 21.26% respectivement).

Ces résultats nous donnent la possibilité de suggérer l'utilisation de ces souches comme agents de biocontrôle.

A l'issue de ce travail, nous émettons quelques réflexions et recommandations sous forme de perspectives pour une meilleure exploitation de ces souches :

- Etude de l'effet d'autres facteurs (source de carbone, métaux lourds, etc.) sur l'activité antifongique et l'efficacité des agents de biocontrôle.
- Réalisation des tests d'antagonisme *in vitro* sur d'autres microorganismes phytopathogènes et *in vivo* pour confirmer ces activités.
- Extraction, identification et détermination de mode d'action des molécules impliquées dans la lutte biologique.

### A

Abou-Zeid AM, Altalhi AD et Abd El-Fattah RE. (2009). Bacterial control of pathogenic fungi isolated from some wild plants in Taif Governorate, Saudi Arabia. *Mycopath.* **7**, 11 -20.

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.

Adjebli A. (2015). Caractérisation phénotypique et génotypique des souches de *Botrytis cinerea*; agent causal de la pourriture grise sur tomate. Thèse de doctorat en microbiologie appliquée. Université A. Mira-Bejaia, Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie, Bejaia, 134p.

Agrios GN. (2005). Plant pathology. (Eds.), Elsevier Academic Press, Oxford, UK, p. 922

Ahmed OH, Aminuddin H et Husni MHA. (2008). Ammonia volatilization and ammonium accumulation from urea mixed with zeolite and triple superphosphate. *Acta Agriculturae Scandinavica.* **58**, 182-186.

Ajouz S. (2009). Estimation du potentiel de résistance de *Botrytis cinerea* à des biofongicides. Thèse de doctorat de Pathologie Végétale. Université d'avignon et des pays de vaucluse. Faculté des Sciences, Avignon, 198p.

Akhtar MS et Siddiqui ZA. (2010). Role of Plant Growth Promoting Rhizobacteria in Biocontrol of Plant Diseases and Sustainable Agriculture, in Plant Growth and Health Promoting Bacteria, Maheshwari DK. (Ed.), Springer, Berlin, Heidelberg, pp. 157-195.

Alabouvette C, Olivain C et Steinberg C. (2006). Biological control of plant diseases. The European situation. *European Journal of Plant Pathology.* **114**, 329–341.



Antoun H et Prévost D. (2005). Ecology of Plant Growth Promoting Rhizobacteria. In Siddiqui ZA. (Ed.), PGPR: Biocontrol and Biofertilization. Springer, Netherlands. P.1-38.

Artursson V , Finlay RD et Jansson JK . (2006). Interactions between arbuscular mycorrhizal fungi and bacteria and their potential for stimulating plant growth. *Environmental Microbiology*. **8**, 1–10.

### ***B***

Baarlén VP, Staats M et Kan VJ. (2004). Induction of programmed cell death in lily by the fungal pathogen *Botrytis elliptica*. *Molecular plant pathology*. **5**, 559-574.

Bhushan B et Hoondal GS. (1998). Isolation, purification and properties of a thermostable chitinase from an alkalophilic *Bacillus* sp. BG-11. *Biotechnology Letters*, **20**, 157–159.

Blumer C et Haas D. (2000). Mechanism, regulation, and ecological role of bacterial cyanide biosynthesis. *Archives Microbiology*. **173**,170–177.

Bojanowski A. (2011). Molécules antifongiques et activité antagoniste de deux souches de *Pseudomonas* envers *Helminthosporium solani*, agent responsable de la tache argentée de la pomme de terre. Mémoire pour l'obtention de grade de maître des sciences. Université Laval, Faculté des études supérieures, Québec, 70p.

Bonaterre A, Cabrefiga J, Camps J et Montesinos E. (2007). Increasing survival and efficacy of a bacterial biocontrol agent of fire blight of rosaceous plants by means of osmoadaptation. *FEMS (Federation of European Microbiological Societies) Microbiol Ecol*. **61**, 185–195.

Botelho GR, Mendonca-Hagler LC. (2006). Fluorescent Pseudomonads associated with the rhizosphere of crops - an overview. *Brazilian Journal of Microbiology*. **37**, 401-416.

Bottone EJ et Peluso RW. (2003). Production by *Bacillus pumilus* (MSH) of an antifungal compound that is active against *Mucoraceae* and *Aspergillus* species: preliminary Report. *Journal of Medical Microbiology*. **52**, 69–74.

### C

Calvo P, Ormeño-Orrillo E, Martínez-Romero E et Zúñiga D. (2010). Characterization of *Bacillus* isolates of potato rhizosphere from andean soils of peru and their potential PGPR characteristics. *Brazilian Journal of Microbiology*. **41**, 899-906.

Cappucino JC et Sherman N. (1992). Negative staining. *Microbiology: A laboratory Manual*. **3**, 125-179.

Castro-Sowinski S, Herschkovitz Y, Okon Y et Jurkevitch E. (2007). Effects of inoculation with plant growth-promoting rhizobacteria on resident rhizosphere microorganisms. *FEMS (Federation of European Microbiological Societies)*. p. 1-11.

Cavaglieri L, Orlando J, Rodriguez MI, Chulze S et Etcheverry M. (2005). Biocontrol of *Bacillus subtilis* against *Fusarium verticillioides in vitro* and at the maize root level. *Research in Microbiology*. **156**, 748-754.

Charest MH, Beauchamp CJ et Antoun H. (2005). Effects of the humic substances of de-inking paper sludge on the antagonism between two compost bacteria and *Pythium ultimum*. *FEMS (Federation of European Microbiological Societies) Microbiology Ecology*. **52**, 219–227.

Chincholkar SB, Chaudhari BL et Rane MR. (2007). Microbial Siderophore: A State of Art .*Soil Biology*. **12**, 233-242.

Chitarra CH, Breeuwer P, Nout MJR, Aelst ACV, Rombouts FM et Abee T.(2003). An antifungal compound produced by *Bacillus subtilis* YM 10–20 inhibits germination of *Penicillium roqueforti* conidiospores. *Journal of Applied Microbiology*. **94**, 159–166.

COLEACP. (2011). Lutte biologique et protection intégrée. Source : [Fpip.coleacp.org/files/documents/COLEACP-Manuel-10- R.pdf](http://Fpip.coleacp.org/files/documents/COLEACP-Manuel-10- R.pdf).

Compant S, Duffy B, Nowak J, Clément C, et Ait Barka E.( 2005). Use of plant growth-promoting bacteria for biocontrol of plant diseases: Principles, Mechanisms of Action, and Future Prospects. *Applied and Environmental Microbiology*. **71**, 4951-4959.

Cox CD, Rinehaet KLJ, Moore ML et Cook JCJ.(1981). Pyochelin: novel structure of an iron-chelating growth promoter for *Pseudomonas aeruginosa*. *Proceedings of the national academy of sciences of the United States of America*. **78**, 4256-4260.

Cregut M. (2009). Caractérisation de la communauté bactérienne impliquée dans la minéralisation du soufre organique dans la rhizosphère de colza et d'orge. Thèse de doctorat. Université de Nancy, INPL. Ecole Doctorale RP2E.INRA. 293p.

## D

Deacon J. (2005). Fungi as plant pathogens. Chapter 14.  
<<http://archive.bio.ed.ac.uk/jdeacon/FungalBiology/chap14.htm#TEXT>> (accessed 15.05.2015)

De Souza JT, De Boer M et De Waar, van Beek TA et Raaijmakers JM1. (2003). Biochemical, Genetic, and Zoosporicidal Properties of Cyclic Lipopeptide Surfactants Produced by *Pseudomonas fluorescens*. *Applied and Environmental Microbiology*.**69**, 7161–7172.

Dimkpa CO, Svatoš A , Dabrowska P , Schmidt A, Boland W et Kothe E.(2008). Involvement of siderophores in the reduction of metal-induced inhibition of auxin synthesis in *Streptomyces* spp. *Chemosphere*. **74**, 19–25.

Duffy BK et De-Fago G. (1999). Environmental factors modulating antibiotic and siderophore biosynthesis by *Pseudomonas fluorescens* biocontrol strains. *Applied and Environmental Microbiology*. **65**, 2429-2438.

### *E*

Egamberdieva D. (2007). The effect of plant growth promoting bacteria on growth and nutrient uptake of maize in two different soils. *Applied soil ecology*. **36**, 184-189.

Egamberdieva D. (2012). The Management of Soil Quality and Plant Productivity in Stressed Environment with Rhizobacteria. In: Maheshwari DK. (Ed.), *Bacteria in Agrobiolgy: Stress Management*. Springer, Heidelberg Dordrecht London New York, pp.27-40.

Elad Y. and Stewart A. (2007). Microbial control of *Botrytis spp*. In: Elad Y. Williamsom B et Tudzynski P. (Eds.), *Botrytis: Biology, Pathology and Control*. Springer, Netherlands, pp. 223-241.

El-Hamshary OIM, Abo-Aba SEM, Awad N. et Gomaa AM. (2008). Genetic Profile of *Bacillus cereus* and *Bacillus subtilis* Indigenous Isolates and Their Performance as Bio-control agent a gainst the Plant Pathogen *Fusarium oxysporum*. *Research Journal of Cell and Molecular Biology*. **2**, 30-38.

### *F*

Férnandez- Acero FJ, Maria Carbu M, Garrido C, Vallejo I et Contoral JM. (2007). Proteomic Advances In Phytopathogenic Fungi .*Current Proteomics*.**4**, 79-88.

Fernando WGD, Nakkeeran S et Zhang Y. (2005). Biosynthesis of antibiotics by PGPR and its relation in biocontrol of plant diseases. In: Siddiqui ZA. (ed.), PGPR: Biocontrol and Biofertilization. Springer, Netherlands, pp. 67–109.

Fiddaman PJ et RossallS. (1993). The production of antifungal volatiles by *Bacillus subtilis*. Journal of Applied Bacteriology. **74**, 119-126.

Fuentes-Ramirez LE et Caballero-Mellado J. (2005). Bacterial Biofertilizers. In: Siddiqui ZA. (Ed.), PGPR: Biocontrol and Biofertilization, P.143-172.

### G

Ghahfarokhi MS, Kalantari S et Razzaghi-Abyaneh M. (2013). Terrestrial Bacteria from Agricultural Soils: Versatile Weapons against Aflatoxigenic Fungi, in Aflatoxins – Recent Advances and Future Prospects pp. 23-39.

Glick BR. (1995). The enhancement of plant growth by free-living bacteria. Canadian Journal of Microbiology. **41**, 109-117.

Gokarn k. (2010). Siderophores and Pathogenicity of Microorganisms. Journal of Bioscience and Technology. **1**, 127-134.

Guetsky R, Elad Y, Shtienberg D et Dinooor A. (2002). Establishment, survival and activity of the biocontrol agents *Pichia guillermondii* and *Bacillus mycoides* applied as a mixture on strawberry plants. Biocontrol Science and Technology. **12**, 705-714.

Gupta K , Chatterjee C et Gupta B.(2012). Isolation and characterization of heavy metal tolerant Gram-positive bacteria with bioremedial properties from municipal waste rich soil of Kestopur canal (Kolkata), West Bengal, India. Biologia. **67**, 827-836.

Gururani MA, Venkatesh J , Upadhyaya CP, Nookaraju A, Pandey SK et Park sw. (2012). Plant disease resistance genes: Current status and future directions. *Physiological and Molecular Plant Pathology*. **78**, 51-65.

### H

Haggag WM. (2008). Isolation of bioactive antibiotic peptides from *Bacillus brevis* and *Bacillus polymyxa* against *Botrytis* grey mould in strawberry. *Archives of Phytopathology and Plant Protection*. **41**, 477 – 491.

Hsieh FC, Lin TC, Kao MMS. (2008). Comparing Methods for Identifying *Bacillus* Strains Capable of Producing the Antifungal Lipopeptide Iturin A. *Current Microbiology*. **56**, 1–5.

Huang CJ, Wang TK, Chung SC et Chen CY. (2005). Identification of an Antifungal Chitinase from a Potential Biocontrol Agent, *Bacillus cereus* 28-9. *Journal of Biochemistry and Molecular Biology*. **38**, 82- 88.

### J

Jamali F, Sharifi-Tehrani A, Lutz MP et Maurhofer M. (2009). Influence of Host Plant Génotype, Presence of a pathogen, and Coinoculation with *Pseudomonas fluorescens* Strains on the rhizosphere expression of hydrogen Cyanide- and 2,4-Diacetylphloroglucinol biosynthesis Genes in *P. fluorescens* biocontrol Strain CHAO. *Microbial Ecology*. **57**, 267-275.

Jamalizadeh M, Etebarien HR, Alizadeh A et Aminian H. (2008). Biological control of gray mould on apple fruits by *Bacillus licheniformis* (EN 74-1). *Phytoparasitica*. **36**, 23-29.

Jan AT, Azam M, Ali A et Rizwanul-Haq QM. (2011). Novel approaches of beneficial *Pseudomonas* in mitigation of plant diseases – an appraisal. **6**, 195-205.

Ji SH, Gururani MA et Chul CS. (2014). Isolation and characterization of plant growth promoting entophytic diazotrophic bacteria from Korean rice cultivars. *Microbiological Research*. **169**, 83– 98.

Johansson PM. (2003). Biocontrol of *Fusarium* in wheat – introducing bacteria to a system of complex interactions. These de Doctorat université des sciences agricoles. Plant Pathology and Biocontrol, Unit Uppsala, suède, P.74.

Joseph B , Patra RR et Lawrence R.(2007). Characterization of plant growth promoting rhizobacteria associated with chickpea (*Cicer arietinum* L). *International Journal of Plant Production*. **2**, 141-152.

Jourdan E, Ongena M et Thonar P. (2008). Caractéristiques moléculaires de l'immunité des plantes induite par les rhizobactéries non pathogènes. *Biotechnologie, Agronomie, Société et Environnement* .**4**, 437-449.

### K

Kavitha T, Nelson R et Josephin JS. (2013). Screening of rhizobacteria for plant growth promoting traits and antifungal activity against charcoal rot pathogen *Macrophomina phaseolina* .*International Journal of Pharma and Bio Sciences*. **4**, 177 – 186.

Kaymak H. (2010). Potential of PGPR in Agricultural Innovations, in *Plant Growth and Health Promoting Bacteria*, Maheshwari DK. (Eds.), Springer, Berlin, Heidelberg, pp. 45-79.

Kiely PD, Haynes JM, Higgins CH, Franks A, Mark GL, Morrissey JP et O'Gara F. (2006). Exploiting New Systems-Based Strategies to Elucidate Plant-Bacterial Interactions in the Rhizosphere. **51**, 257–266.

Kishimoto K, Matsui K, Ozawa R and Takabayashi J (2006a). ETR1-, JAR1- and PAD2- dependent signaling pathways are involved in C6-aldehyde-induced defense responses of Arabidopsis. *Plant Science*. **171**,415-423.

Kopečný J, Hodrová B et Stewart CS. (1996). The isolation and characterization of a rumen chitinolytic bacterium. *Letters in Applied Microbiology*. **23**, 195-198.

Kumar GP, Mir Hassan Ahmed SK, Suseelendra Desai S , Leo Daniel Amalraj E et Rasul A. (2014). *In Vitro* Screening for Abiotic Stress Tolerance in Potent Biocontrol and Plant Growth Promoting Strains of *Pseudomonas* and *Bacillus* spp. *International Journal of Bacteriology*. 1-6.

Kyselkova M, Kopecky J, Frapolli M, De´fago G, Sa´gova M et kova M, Grundmann GL et Loccoz YM. (2009). Comparison of rhizobacterial community composition in soil suppressive or conducive to tobacco black root rot disease. *International Society for Microbial Ecology*. **3**, 1127–1138.

### L

Landaa BB, Navas-Cortésb JA et Jiménez-Díaz RM. (2004). Influence of temperature on plant–rhizobacteria interactions related to biocontrol potential for suppression of fusarium wilt of chickpea. *Plant Pathology*. **53**, 341–352.

Lavelle P, Blouin M, Boyer J, Cadet P, Laffray D, Pham-Thi AT, Reversat G, Settle W et Zuily Y. (2004). Plant parasite control and soil fauna diversity. *Comptes Rendus Biologies - Journal - Elsevier*. **327**, 629–638.

Lebbadi M, Galvez A, Maqueda M, Martinez-Bueno M et Valdivia E. (1994). Fungicin M4: a narrow spectrum peptide antibiotic from *Bacillus licheniformis* M-4. *J Applied Bacteriology*. **77**, 49–53.

Leroux P, Chapeland F, Desbrosses D, Gredt M. (1999). Patterns of Cross-Resistance to Fungicides in *Botryotinia fuckeliana* (*Botrytis cinerea*) Isolates From French Vineyards. **18**, 687-697.



Lodewyckx C, Vangronsveld J, Porteous F, Moore ERB, Taghavi S, Mezgeay M et van der Lelie D. (2002). Endophytic bacteria and their potential applications. *Critical Reviews in Plant Sciences*. **21**, 583–606.

Lorck H. (1948). Production of hydrocyanic acid by bacteria. *Physiol. Plant*. **1**, 142-146.

Lugtenberg B et Kamilova F. (2009). Plant-Growth-Promoting Rhizobacteria. *Annual. Review. Microbiology*. **63**, 541-556.

Lukkani N et Reddy EC. (2014). Evaluation of Plant Growth Promoting Attributes and Biocontrol Potential of Native Fluorescent *Pseudomonas* spp. Against *Aspergillus niger* Causing Collar Rot of Ground Nut. **4** , 256 -262.

## M

Maheshwari DK. (2010). *Plant Growth and Health Promoting Bacteria*. Edition: springer, Heidelberg Dordrecht London New York. 445p.

Manteau S, Abouna S, Lambert B, et Legendre L. (2003). Differential regulation by ambient pH of putative virulence factor secretion by the phytopathogenic fungus *Botrytis cinerea*. *FEMS (Federation of European Microbiological Societies). Microbiology Ecology*. **43**, 359-366.

Marschner P et Timonen S. (2006). Bacterial community composition and activity in rhizosphere of roots colonized by arbuscular mycorrhizal fungi. In Mukerji KG, Manoharachary C, Singh J. (Eds.), *Microbiam activity in the rhizosphere*, *Soil Biology*. **7**, 139-154.

Montesinos E., Bonaterra A. et Moselio S. (2009). Pesticides, Microbial. *In: Moselio S. (Ed.), Encyclopedia of Microbiology Academic Press, Oxford, UK*. Pp. 110-120.

Morgan JAW, Bending GD et White PJ. (2005). Biological costs and benefits to plant–microbe interactions in the rhizosphere. *Journal of Experimental Botany*. **56**, 1729-1739.

*N*

Naik PR et Sakthivel N. (2006). Functional characterization of a novel hydrocarbonoclastic *Pseudomonas* sp.strain PUP6 with plant-growth-promoting traits and antifungal potential. *Research in Microbiology* . **157**, 538–546.

Niranjana RS, Shetty HS et Reddy MS. (2005). Plant Growth Promoting Rhizobacteria: Potential green alternative for plant productivity. In: Siddiqui ZA (Ed.), *PGPR: Biocontrol and Biofertilization*, India, pp.197–216

Norini MP. (2007). Ecodynamique des hydrocarbures aromatiques polycycliques (HAP) et des communautés microbiennes dans des sols à pollution mixte (HAP, métaux) avant et après traitement par biopile et par désorption thermique : influence de la rhizosphère et de la mycorhization. Thèse de Doctorat de Géosciences. Université de Nancy I, Faculté des sciences et techniques, Nancy, 243p.

*O*

O'sullivan DJ. et O'gara F. (1992). Traits of Fluorescent *Pseudomonas* spp. Involved in Suppression of Plant Root Pathogens. *Microbiological Reviews*. **56**, 662-676.

*P*

Pal KK et Gardener BMS. (2006). Biological control of plant pathogens. *The Plant Health Instructor*.**2**, 1-25.

Patel D, Jha CK, Tank N, Saraf M. (2011). Growth enhancement of chickpea in saline soils using plant growth-promoting rhizobacteria. *J Plant Growth Regul.* doi: 10.1007/s00344-011-9219-7.

Pieterse CMJ, van Pelt JA, Ton J, Parchmann S, Mueller MJ, Buchala AJ, Métraux JP and van Loon LC. (2000). Rhizobacteria-mediated induced systemic resistance (ISR) in *Arabidopsis* requires sensitivity to jasmonate and ethylene but is not accompanied by an increase in their production. *Physiological and Molecular Plant Pathology.* **57**,123-134.

Prashar P, Kapoor N, et Sachdeva S. (2013). Isolation and Characterization of *Bacillus* sp with In-vitro Antagonistic Activity against *Fusarium oxysporum* from Rhizosphere of Tomato. **15**, 1501-1512.

Prigent-Combaret C. (2015). Rhizosphère. <<http://ecomicro.univ-lyon1.fr/spip.php?rubrique45>> (accessed 23.05.15).

## Q

Quan CS, Wang X et Fan SD. (2010). Antifungal Compounds of Plant Growth Promoting Rhizobacteria and Its Action Mode, in *Plant Growth and Health Promoting Bacteria*, Maheshwari DK, (Ed.), Springer, Berlin, Heidelberg, pp. 117-156.

Quecine MC, Araujo WL, Marcon J, Gai CS, Azevedo JL et Pizzirani-Kleiner AA. (2008). Chitinolytic activity of endophytic *Streptomyces* and potential for biocontrol. *Original Article.* **47**, 486–491.

Qureshi MA, Ahmad ZA, Akhtar N, Iqbal A, Mujeeb F et Shakir MA. (2012). Role of Phosphate Solubilizing Bacteria (psb) in Enhancing P Availability and Promoting Cotton Growth. *The Journal of Animal & Plant Sciences.* **22**, 204-210.

Raaijmakers J, Vlami M et Jorge T. (2002). Antibiotic production by bacterial biocontrol agents. *Antonie van Leeuwenhoek*. **81**, 537–547.

Ramette A, Frapolli M, Défago G et 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. **16**, 525-535.

Rifat H, Safdar A ,Ummay A, Rabia K et Iftikhar A. (2010). Soil beneficial bacteria and their role in plant growth promotion: a review. *Annals of Microbiology* .**60**, 579–598.

Ryu, CM, Farag MA, Hu CH, Reddy MS, Wei HX, Paré PW et Kloepper JW. (2003). Bacterial volatiles promote growth in *Arabidopsis*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*.**100**, 4927-4932.

### S

Sadfi-ZN, Hannachi I, Andurand D, Essghaier B, Boudabous A. Nicot P, (2008). Biological control of *Botrytis cinerea* on stem wounds with moderately halophilic bacteria. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*. **24**, 2871–2877.

Sagahón IP, Anducho-Reyes MA, Silva-Rojas HV, Arana-Cuenca A, Alejandro Tellez-Jurado A, Cárdenas-Álvarez IO et Mercado-Flores Y. (2011). Isolation of Bacteria with Antifungal Activity against the Phytopathogenic Fungi *Stenocarpella maydis* and *Stenocarpella macrospora*. *International Journal of Molecular Sciences*. **12**, 5522-5537.

Schwyn B et Neilands JB. (1987). Universal Chemical Assay for the Detection and Determination of Siderophores. **160**, 47-56.

Sharma HC., Sharma KK., Seetharama NN., Ortiz R. (2001). Genetic transformations of crop plants: risk and opportunities for the rural poor. *Résultats de recherche Current Science*. **80**, 1495-1508.

Siddiqui ZA. (2005). PGPR: Prospective biocontrol agents of plant pathogens. In Siddiqui ZA (Ed.), PGPR: Biocontrôle and biofertilization. Springer, Pays-Bas, P.111-142.

### *T*

Tank N et Saraf M. ( 2010). Salinity-resistant plant growth promoting rhizobacteria ameliorates sodium chloride stress on tomato plants. *Journal of Plant Interactions*. **5**, 51-58.

Tripathi M, Munot HP et Van Loon LC. (2007). Plant responses to plant-growth promoting rhizobacteria. *European Journal Plant Pathology*. **119**, 243-254.

### *V*

Vacheron J, Desbrosses G, Bouffaud ML, Touraine B, Moëgne-Loccoz Y, Muller D, Legendre L, Wisniewski-Dyé F et Prigent-Combaret C.(2013). Plant growth-promoting rhizobacteria and root system functioning. *Frontiers in plant science*. **4**, 1-19.

Van Loon LC, Bakker PAHM et Pieterse CMJ. (1998). Systemic resistance induced by rhizosphere bacteria. *Annual Review of Phytopathology*. **36**, 453–483.

Vanittanakoma N et Loeffler W. (1986). Fengycin – a novel antifungal lipopeptide antibiotic produced by *Bacillus subtilis* F-29-3. *The Journal of Antibiotics*.**39**, 888–901.

Vessey JK. (2003). Plant growth promoting rhizobacteria as biofertilizers. *Plant and Soil*. **255**, 571–586.

Viswanathan R et Samiyappan R .(2004). Secondary metabolites production by *Pseudomonas* spp. strains antagonistic to *Colletotrichum falcatum* causing red rot disease in sugarcane. *Acta Phytopathologica Entomologica et Hungarica*. **39**, 28-37.

Vivas A, Voros I, Biro B, Campos E, Barea JM et Azcon R. (2003) Symbiotic Efficiency of Autochthonous Arbuscular Mycorrhizal Fungus (*G. mosseae*) and *Brevibacillus* sp. Isolated From Cadmium Polluted Soil Under Increasing Cadmium Levels . **126**, 179–189.

### W

Wang S, Hu T, Jiao Y, Wie J, Cao K. (2009). Isolation and characterization of *Bacillus subtilis* EB-28, an endophytic bacterium strain displaying biocontrol activity against *Botrytis cinerea* Pers. *Frontiers of Agriculture in China*. **3**, 247-252.

Wani PA, MS Khan et A Zaidi. (2007). Synergistic effects of the inoculation with nitrogen fixing and phosphate-solubilizing rhizobacteria on the performance of field grown chickpea. *Journal of Plant Nutrition and Soil Science* .**170**, 283-287.

Weyens N, Monchy S, Vangronsveld J, Taghari et Lelie DV. (2010). Plant- Microbe Partnerships. In: Timmis KN. (Ed.), *Hand booh of Hydrocarbon and Lipid Microbiology*, p. 2547-257.

Whipps J M. (1997). *Plant Pathology and Microbiology Department, Horticulture Research International, Welles Bourne, Warwick CV35 9EF*.**26**, 1-134.

Whipps JM. (2001). Microbial interaction and biocontrol in the rhizosphere. *Journal of Experimental Botany*. **52**, 487-511.

Widen B, Cronberg N et Widen M. (1994). Genotypic diversity, molecular markers and spatial distribution of genets in clonal plants, A literature survey. *Folia Geobot. Phytotax*. **29**, 245-263.

### Y

Yusran Y, Volker R, et Torsten M. Effects of *Pseudomonas* sp. "Proradix" and *Bacillus amyloliquefaciens* FZB42 on the Establishment of AMF Infection, Nutrient Acquisition and Growth of Tomato Affected by *Fusarium oxysporum* Schlecht f.sp. *radices lycopersici* Jarvis and Shoemaker in International Plant Nutrition Colloquium. (2009); Université de California Davis, 1106 p.

**Z**

Zahir ZA, Arshad M et Frankenberger WTJ. (2004). Plant growth promoting rhizobacteria: application and perspectives in agriculture. *Advances in Agronomy*. **81**, 97-198.

Zeller SL, Brandl H, Schmid B(2007) Host-Plant Selectivity of Rhizobacteria in a Crop/Weed Model System .*Plant-Selective Rhizobacteria*. **9**, 1-9. 30 .

.

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

➤ **Bouillon Nutritif :**

<b>Composition</b>	<b>Quantité (g)</b>
<b>Peptone</b>	<b>10</b>
<b>Extrait de viande</b>	<b>5</b>
<b>Chlorure de sodium</b>	<b>5</b>
<b>pH</b>	<b>7.2±0.2</b>

➤ **Eau peptonée :**

<b>Composition</b>	<b>Quantité (g)</b>
<b>Peptone de caséine</b>	<b>1</b>
<b>Extrait de levure</b>	<b>5</b>
<b>NaCl</b>	<b>5</b>
<b>Tween</b>	<b>1ml</b>

➤ **Luria Bertani (LB):**

<b>Composition</b>	<b>Quantité (g)</b>
<b>NaCl</b>	<b>4</b>
<b>Tryptone</b>	<b>10</b>
<b>Extrait de levure</b>	<b>5</b>
<b>Agar</b>	<b>8</b>
<b>pH</b>	<b>7.3±0.2</b>

➤ **Sabouraud Dextrose Agar (SDA) (Bojanowski, 2011)**

<b>Compositions</b>	<b>Quantité (g)</b>
<b>Glucose</b>	<b>5</b>
<b>Peptone de caséine</b>	<b>10</b>
<b>NaCl</b>	<b>5</b>
<b>pH</b>	<b>7.2±0.2</b>



➤ **King B**

<b>Compositions</b>	<b>Quantité (g )</b>
<b>Peptone de caséine</b>	<b>10</b>
<b>Peptone de viande</b>	<b>10</b>
<b>MgSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O</b>	<b>1.5</b>
<b>K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub></b>	<b>1.5</b>
<b>Agar</b>	<b>12</b>

➤ **Potato Dextrose Agar (PDA) :**

<b>Compositions</b>	<b>Quantité (g)</b>
<b>Pomme de terre</b>	<b>200</b>
<b>Glucose</b>	<b>20</b>
<b>Agar</b>	<b>15</b>
<b>pH</b>	<b>5.4±0.2</b>

➤ **Agar à l'extrait de malt (EM) :**

<b>Compositions</b>	<b>Quantité (g)</b>
<b>Extrait de malt</b>	<b>30</b>
<b>Peptone mycologique</b>	<b>5</b>
<b>Agar</b>	<b>15</b>
<b>pH</b>	<b>5.4± 0.2</b>

➤ **Czapek Agar (CZA) (Bojanowski, 2011)**

<b>Compositions</b>	<b>Quantité (g )</b>
<b>Sucrose</b>	<b>30</b>
<b>Nitrate de sodium</b>	<b>3</b>
<b>Phosphate dipotassique</b>	<b>1</b>
<b>Sulfat de magnésium</b>	<b>0.5</b>

<b>Chlorure de potassium</b>	<b>0.5</b>
<b>Sulfate ferreux</b>	<b>0.01</b>
<b>Agar</b>	<b>17</b>
<b>pH</b>	<b>7.3±0.2</b>

➤ **Czapek Agar (CZA) modifié**

<b>Compositions</b>	<b>Quantité (g)</b>
<b>Saccharose</b>	<b>30</b>
<b>Nitrate de sodium</b>	<b>3</b>
<b>Phosphate dipotassique</b>	<b>1</b>
<b>Sulfat de magnésium</b>	<b>0.5</b>
<b>Chlorure de potassium</b>	<b>0.5</b>
<b>Sulfate ferreux</b>	<b>0.01</b>
<b>Agar</b>	<b>17</b>
<b>pH</b>	<b>7.3±0.2</b>

➤ **Le milieu minéral minimum de glucose (GMM) (Bonaterra *et al.*, 2007)**

<b>Composition</b>	<b>Quantité (g)</b>
<b>Glucose</b>	<b>5</b>
<b>NH<sub>4</sub>Cl</b>	<b>1</b>
<b>KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub></b>	<b>3</b>
<b>Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub></b>	<b>2,4</b>
<b>NaCl</b>	<b>0,5</b>
<b>MgSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O</b>	<b>0,2</b>
<b>pH</b>	<b>7.0±0.2</b>

➤ **Préparation de milieu Chrom Azurol S Agar (CAS) (Alexander et Zubeer, 1991).**

**La solution 1 :** Fe-CAS indicateur : 10 ml de 1mM FeCl<sub>3</sub>.6H<sub>2</sub>O préparés dans 10 mM HCl sont mélangés avec 50 ml d'une solution aqueuse de CAS (1,21 mg/ml). Le mélange est ajouté lentement sous agitation constante à 40 ml d'une solution aqueuse d'HDTMA (1,82 mg/ml).

**La solution 2 :** Solution tampon : 30,24 g de PIPES sont dissout dans 750 ml d'une solution saline contenant 0,3g KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 0,5g de NaCl et 1 g de NH<sub>4</sub>Cl. Le pH est ajusté a 6,8 avec KOH à 50% et 15g de gélose sont ajoutés.

**La solution 3 :** Dans 70 ml d'eau distillée sont dissouts : 2g de glucose, 2g de mannitol, 493 mg de MgSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O, 11 mg CaCl<sub>2</sub>, 1,17 mg de MnSO<sub>4</sub>.H<sub>2</sub>O, 1,4 mg H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub>, 0,04 mg CuSO<sub>4</sub>.5H<sub>2</sub>O, 1,2 de ZnSO<sub>4</sub>.7 H<sub>2</sub>O et 1 mg de Na<sub>2</sub>MnO<sub>4</sub>.2H<sub>2</sub>O.

Les trois solutions sont autoclavées puis refroidies à 50°C.

**La solution 4 :** 30 ml de casamino-acide à 10% sont stérilisés par filtration.

Les solutions 2, 3 et 4 sont mélangées après. La solution d'indicateur est ajoutée en dernier lieu sous agitation pour mélanger les ingrédients.

**Annexe II :** Quantités en NaCl correspondantes à la concentration (mM)

Concentration en NaCl (mM)	Quantité de NaCl (g)
1.72	0.1
100	5,85
150	8,77
200	11,7
250	14,62
300	17,55
350	20,47
400	23,4
450	26,32
500	29,25
550	32,17
600	35,1
650	38,02
700	40,95
750	43,87
800	46,8
850	49,72
900	52,65
950	55,57
1000	58,5

**Résumé :** Les champignons phytopathogènes causent des problèmes énormes en agriculture, dont la gravité peut être atténuée par les agents de bio-contrôle. Trois souches bactériennes de la collection du laboratoire (L.M.E.R.), Equipe biomasse et environnement (*Pseudomonas* sp.S5, *Bacillus* sp.S7LiBe, *Pseudomonas* sp. R-S3.) ont fait l'objet d'étude de l'activité antifongique contre quatre champignons (*Botrytis cinerea*, *Mucor* sp, *A. niger* et *A. flavus*). Les souches S5LiBe et S7LiBe sont sélectionnées pour étudier l'influence de quelques facteurs abiotiques sur leur performance contre *B. cinerea* ainsi que la production de quelques métabolites antifongiques (siderophores, ammoniac, acide cyanhydrique et chitinase). L'activité antagoniste contre *B. cinerea* sur des feuilles détachées de laitue est aussi effectuée. Les résultats obtenus montrent que les trois souches exercent une bonne activité inhibitrice de la croissance mycélienne, PGI% qui varient entre : S5LiBe (40 à 59.33%) ; S7LiBe (58 à 70%) et R-S3 (58 à 66%). et de la germination des spores avec des PGS  $\leq 15\%$  contre *A. niger* et *A. flavus*, suivi de *B. cinerea* (25,64%  $\geq$  PSG  $\geq$  34,05%) et *Mucor* sp. (55.1%  $\geq$  PSG  $\geq$  17.46%). Les souches S5LiBe et S7LiBe produisent les siderophores, l'ammoniaque, l'acide cyanhydrique et la chitinase. L'activité antagoniste des deux souches s'est révélé optimales sur milieu CZA modifié à pH 6.5 et à une température d'incubation de 30°C, par contre la gamme de salinité étudiée (100, 200 et 300mM) ne présente aucune influence significative. Les résultats de l'activité antifongique sur les feuilles de laitue montrent que les deux souches réduisent les zones de lésion de 57.0% et 21.26% respectivement.

**Mots clés :** *Pseudomonas* sp., *Bacillus* sp., PGPR, biocontrôle, champignons phytopathogène

**Abstract:** The phytopathogenic fungi cause huge problems in agriculture whose severity can be mitigated by biocontrol agents. Three bacterial strains from the collection of the laboratory (L.M.E.R.), Group of Biomass and Environment (*Pseudomonas* sp.S5, *Bacillus* sp.S7LiBe, *Pseudomonas* sp. R-S3.) have been subjected to the study of their antifungal activity against four fungus (*Botrytis cinerea*, *Mucor* sp., *Aspergillus niger* and *Aspergillus flavus*). The strains S5LiBe and S7LiBe were selected for studying the effect of some abiotic factors on their performance against *B. cinerea* and for the production of some antifungal metabolites (siderophores, ammonia, hydrogen cyanide and chitinase). Antagonistic activities against *B. cinerea* on the detached lettuce leaves was also carried out. The results showed that the three strains inhibit the the mycelial growth in high level [PGI %: (40 to 59.33 %) for S5LiBe, (58 to 70%) for S7LiBe and (58-66 %) for R-S3] and the fungal spores germination (PGS  $\leq 15\%$ ) against *A. flavus* and *A. Niger*, (25.64 %  $\geq$  PSG  $\geq$  34.05 %) against *B. cinerea* and (55.1 %  $\geq$  PSG  $\geq$  17.46 %) against *Mucor* sp. The strains S5LiBe and S7LiBe produced siderophores, ammonia, hydrogen cyanide and chitinase. Their antagonistic activity was found to be optimal on CZA modified medium at a pH of 6.5 and a temperature of 30 ° C. However, salinity (100, 200 and 300 mM of NaCl) had no significant effect. The antagonist activity on the detached lettuce leaves showed that the strains (S7LiBe and S5LiBe) inhibit the lesion extension 57.0% and 21.26% respectively.

**Keywords:** *Pseudomonas* sp., *Bacillus* sp., PGPR, biocontrol, phytopathogenic fungi.

# *Introduction*

*Partie*  
*Bibliographique*

*Matériel*  
*et*  
*Méthodes*

*Résultats*  
*et*  
*Discussion*



*Chapitre I*  
*Généralités sur les*  
*PGPR*

# *Conclusion*

*Références  
Bibliographiques*

# *Annexes*

*Chapitre II*  
*L'effet antagoniste des*  
*PGPR*

*Partie*  
*Pratique*