



الجمهورية الجزائرية الديمقراطية الشعبية  
RÉPUBLIQUE ALGÉRIENNE DÉMOCRATIQUE ET POPULAIRE

وزارة التعليم العالي و البحث العلمي  
MINISTÈRE DE L'ENSEIGNEMENT SUPÉRIEUR ET DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE

Université des Frères Mentouri Constantine 1  
Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie

جامعة الاخوة منتوري قسنطينة 1  
كلية علوم الطبيعة و الحياة

**Département :** Microbiologie

**قسم :** الميكروبيولوجيا

**Mémoire présenté en vue de l'obtention du Diplôme de Master**

**Domaine :** Sciences de la Nature et de la Vie

**Filière :** Biotechnologies

**Spécialité :** Mycologie et Biotechnologie Fongique

Intitulé :

---

L'antagonisme de *Pseudomonas sp.*, de *Bacillus sp.* et de *Trichoderma sp.*  
vis-à-vis l'agent causal de la fusariose racinaire de la tomate

---

**Présenté et soutenu par :**

**BENTAYEB Roumeissa Badraa**

**BOUFEKHED Maya**

**Le : 20/09/2021**

**Jury d'évaluation :**

**Présidente du jury :** Melle. ABDELAZIZ O.

M. C. B. - UFM Constantine 1.

**Promotrice :** Melle. BELMESSIKH A.

M. A. A. - UFM Constantine 1.

**Examinatrice :** Mme. LEGHLIMI H.

M. C. A. - UFM Constantine 1.

*Année universitaire*  
**2020 - 2021**



## ***Remerciements***

Nous tenons à remercier Dieu qui nous a donné le courage et le savoir afin d'achever ce modeste travail.

Nous souhaitons adresser nos remerciements les plus sincères à notre encadreur Melle. BELMESSIKH Aïcha M. A. A. - UFM Constantine 1 ; pour son aide, ses conseils et remarques toujours pertinentes, sa compréhension et son soutien moral, et surtout pour sa patience. Merci aussi pour la confiance que vous nous avez accordée durant cette période en permettant d'être très autonomes et libres dans la manière de diriger ce travail. Merci également pour votre disponibilité lorsqu'on avait des doutes, des questions ou qu'on était en période de rédaction, pour vos encouragements ; sans tout ça, ce mémoire n'était pas noir sur blanc. On vous remercie aussi pour toutes les discussions qu'on a pu avoir aussi bien autour de la microbiologie que du reste, qui ont été indispensables au bon déroulement de ce mémoire. Tout cela nous a fait heureux et nous a permis d'aller au labo chaque matin avec plaisir. On vous souhaite une bonne continuation professionnelle.

On tient à exprimer notre gratitude aux membres de jury pour avoir accepté de lire et d'évaluer notre manuscrit et pour avoir contribué à l'enrichir par votre réflexion. Nos chères profs, vos séances de cours ont été un vrai plaisir par la clarté et l'enthousiasme qui y régnaient. Vous nous faites un grand honneur en acceptant de siéger parmi le jury de ce modeste travail, et d'être venues pour en échanger.

À Mme le chef de département ABDELAZIZ Ouided, M. C. B.- UFM Constantine 1 ; vous nous avez fait le grand honneur de présider le jury de ce travail et de nous accorder de votre temps. Veuillez trouver ici l'expression de notre reconnaissance et de notre profond respect.

À Mme LEGHLIMI Hind, M. C. A. - UFM Constantine 1 ; vous nous avez fait l'honneur de porter un jugement averti sur ce travail. Veuillez accepter notre reconnaissance et nos remerciements les plus sincères.

Merci à Mr. BOULAHROUF Khaled M. C. - UFM Constantine 1 qui a été le premier à nous expliquer le monde compliqué de la biologie et précisément la microbiologie. Merci d'avoir toujours pris au sérieux notre travail, merci pour vos conseils éclairés, et merci pour tout ce que vous nous avez apporté scientifiquement.

Merci à l'ensemble du personnel du laboratoire de Microbiologie RDC pour votre accueil chaleureux et votre soutien quotidien, merci à Mes dames Samira, Hanane et Soumeya, vos connaissances nous ont enrichis. Merci pour votre sympathie durant ces quelques mois auprès de vous. Et merci pour vos précieux conseils, Votre disponibilité, votre franchise, votre caractère et pour nous avoir fait découvrir le monde du laboratoire.

Nos remerciements vont également à Mr. Ibrahim le Responsable des Produits de la Faculté ; qui nous a beaucoup aidé, Merci pour votre bonne humeur et votre gentillesse. Qui a toujours tout fait pour nous aider et qui nous a sortie de bien des situations difficiles.

Merci également à Mr. Ammar *le Magasinier* pour son aide, merci d'avoir été aussi patient avec nous, sa disponibilité, son souriant.

On tient également à remercier tous ceux qui nous auront si gentiment aidées, comme l'équipe du labo 16 qui étaient toujours souriantes et bienveillantes ainsi que l'équipe du labo 09.

On souhaite remercier Mr. KANDOULI Chouaib et Mme. GHORRI Sana ; M. C. - UFM Constantine 1 pour toute l'aide qu'ils nous ont apporté. Pour leur soutien moral et leurs encouragements.

Merci également à monsieur Nabil Ingénieur du laboratoire de Biochimie RDC, Vous nous avez toujours marqué par votre gentillesse, votre aide et votre sympathie.

On adresse également notre gratitude à toutes les personnes qu'on a croisées au cours de nos études et qui nous ont donné goût à la biologie.

Sans oublier les amis(es) qui nous ont soutenu, ne serait ce que moralement. Les noms sont bien inscrits en nous, mais la liste en est trop longue, qu'ils excusent la brièveté de ce propos.

## *Dédicace*

Je dédie ce modeste travail :

À mes très chers parents que j'aime profondément, pour leur soutien et leur aide qu'ils m'ont apporté durant mes années d'études. Qui m'ont toujours soutenue et encouragée à suivre les chemins que je désirais. Rien au monde ne vaut les efforts fournis par eux jour et nuit pour mon éducation et mon bien-être. Jamais je ne les remercierai assez de m'avoir donné le meilleur d'eux-mêmes.

A mes très chers frères : Ahmed et Mohamed qui ont toujours été là à m'encourager et à croire en moi.

A ma très chère et unique sœur Salsabil qui a supporté toutes mes crises durant ces deux années difficiles.

A ma chère tante Faouzia qui grâce à elle j'ai trouvé le chemin de mes rêves, tu es l'exemple de la femme forte, courageuse, ambitieuse.

A mes très chères cousines : Chahinez, Zayneb, Meryem, qui ont été là pour moi dans ces derniers moments difficiles et qui m'ont encouragé à suivre mes objectifs et mes rêves, qui n'ont pas cessé de m'aider psychologiquement et physiquement. A Fatima, Houda qui m'ont soutenue et encouragée.

A ma chère copine Lamis qui malgré tout les difficultés elle était là à me soutenir et m'encourager.

A toutes mes chères amies Amira et Kamar qui sont toujours à mes côtés dans les bons et les mauvais moments.

A ceux que la distance nous sépare, mais ils étaient toujours là pour moi à m'écouter à m'aider à m'encourager à me comprendre dans mes pires moments.

Et finalement à ma chère binôme Maya qui a été toujours là pour moi à m'écouter et supporter mes crises durant notre expérience c'est grâce à sa patience qu'on est arrivé là.

*Roumeissa*

## *Dédicace*

Je dédie ce mémoire :

À ma très chère mère, tu as toujours été pour moi un exemple de la mère respectueuse, honnête, de la personne méticuleuse, je tiens à honorer la femme que tu es. Ce modeste travail est le fruit de tous les sacrifices que tu as déployé pour mon éducation et ma formation.

À mon cher père, Aucun langage ne saurait exprimer mon respect et ma considération pour ton soutien et encouragements. Je te dédie ce travail en reconnaissance de l'amour que tu m'offre quotidiennement. Que Dieu le tout Puissant te garde et te procure santé et bonheur.

À ma chère sœur Racha et son mari Djamel et à ma chère sœur Serine, pour leurs soutiens moral et leurs conseils précieux tout au long de mes études. Qui m'ont entouré d'amour, d'affection et qui font tout pour ma réussite, que dieu les garde.

Une dédicace spéciale à la personne qui m'a accompagné pendant mes moments de crise et de joie, ma meilleure amie Bernou Romeissa pour ton écoute, ta présence et tes nombreux encouragements.

À ceux qui m'ont beaucoup aidé et supporter dans les moments difficiles, qui m'ont soutenu et épaulé pour que je puisse atteindre mes objectifs.

J'ai également une tendre pensée pour toute ma famille, mes grands-parents, mes chères tantes et mes cousines en particulier Nourhane que j'ai trouvé dans les moments difficiles.

À ma partenaire de mémoire, ma chère binôme Roumeissa, mon amie, pour son soutien moral, sa patience et sa compréhension. Cette année fut riche en émotions et je tiens à te remercier pour ton soutien et ce lien tout particulier qui s'est créé entre nous.

*Maya*

## Résumé

La présente étude a été effectuée dans le but de lutter contre le champignon phytopathogène "*Fusarium oxysporum*". Qui a été isolé à partir des racines d'une tomate infectée. L'identification du genre a été effectuée selon les caractères culturaux macroscopiques et morphologiques microscopiques. La lutte biologique contre ce phytopathogène, est mise en évidence en utilisant les PGPR dans notre cas les *Pseudomonas*, *Bacillus* (isolées à partir du sol agricole de la wilaya de Biskra) et les TR (*Trichoderma*). Des tests d'antagonisme par méthode de confrontation avec le champignon phytopathogène ont été utilisés et ont donné de bons résultats. Ces essais de confrontations entre *F. oxysporum* et les souches antagonistes (*Pseudomonas sp. fluorescente*, *Bacillus sp.* et *Trichoderma sp.*) d'une façon directe et indirecte sur un milieu de culture solide a révélé une inhibition de la croissance mycélienne de l'isolat phytopathogène. Ce travail a suggéré que l'antagoniste bactérien et fongique pourrait être un moyen de lutte potentiel de la pourriture racinaire de la tomate. L'application de micro-organismes comme agents de lutte biologique est importante, car ils peuvent augmenter l'activité microbienne bénéfique qui s'étend pendant une longue période de temps.

**Mots clés :** Champignon phytopathogène, lutte biologique, PGPR, TR, test d'antagonisme.

## الملخص

أجريت الدراسة الحالية بهدف السيطرة على الفطر الممرض للنبات "*Fusarium oxysporum*". حيث تم عزل الفطر *Fusarium* من جذور طماطم مصابة. وتم تحديد الجنس وفقاً للصفات الزراعية بالعين المجردة المورفولوجية المجهرية. المكافحة البيولوجية ضد هذا العامل الممرض للنبات تتم باستخدام سلالات البكتيريا الجذرية المحسنة للنمو النباتي من جنس *Pseudomonas* و *Bacillus* (المعزولة من التربة الزراعية لولاية بسكرة) وTR(*Trichoderma*). تم استخدام طرق المواجهة مع الفطر الممرض للنبات باختبار الخصوم وأعطت نتائج جيدة، أظهر الاختبار للمواجهات بين *F.oxysporum* والسلالات المعادية (*Pseudomonas sp. fluorescent* ، *Bacillus sp.* و(*Trichoderma sp.*) بطريقة مباشرة وغير مباشرة على الوسط الزراعي الصلب تثبيط النمو الفطري للمعزولات المختبرة. اقترح هذا العمل أن المضاد البكتيري والفطري قد يكون وسيلة محتملة للسيطرة على تعفن الجذور في الطماطم. يعد استخدام الكائنات الحية الدقيقة كعوامل للمكافحة البيولوجية أمراً مهماً لأنها يمكن أن تزيد من النشاط الميكروبي المفيد الذي ينتشر على مدى فترة طويلة من الزمن.

**الكلمات المفتاحية :** الفطريات الممرضة للنبات. المكافحة البيولوجية ، البكتيريا الجذرية المحسنة للنمو النباتي ، TR, اختبار تضاد.



## ABSTRACT

The present study was carried out in order to control the phytopathogenic fungus "*Fusarium oxysporum*". Which was isolated from the roots of an infected tomato. The identification of the genus was carried out according to the macroscopic cultural and microscopic morphological characteristics. The biological control of this phytopathogen is evidenced using PGPR in our case *Pseudomonas*, *Bacillus* (isolated from the agricultural soil of the wilaya of *Biskra*) and TR (*Trichoderma*). Antagonism tests by confrontation method with the phytopathogenic fungus were used and gave good results, this confrontation test between *F. oxysporum* and the antagonistic strains (*Pseudomonas sp. fluorescent*, *Bacillus sp.* and *Trichoderma sp.*) in a direct and indirect way on solid culture medium revealed an inhibition of the mycelial growth of the tested isolates. This work suggested that bacterial and fungal antagonist can be a potential control of tomato root rot. The application of microorganisms as biological control agents is important because they can increase beneficial microbial activity that extends over a long period of time.

**Keywords:** Plant pathogenic fungus, biological control, PGPR, TR, antagonism test.



# Table des matières

Liste des abréviations

Liste des figures

Liste des tableaux

Liste des annexes

Introduction..... 1

## Partie bibliographique

### Chapitre 1 : La fusariose racinaire de la tomate

1	La tomate .....	3
1.1	Généralités.....	3
1.2	Origine .....	3
1.3	Description botanique .....	3
1.4	Croissance et développement.....	4
1.5	Caractéristiques morphologiques de la tomate .....	4
1.6	Pathologie fongique de la tomate .....	5
2	<i>Fusarium oxysporum</i> .....	7
2.1	Taxonomie .....	7
2.2	Description macroscopique et microscopique de <i>Fusarium oxysporum</i> ..	7
2.3	Cycle biologique de <i>Fusarium oxysporum f.sp.radicis-Lycopersici</i> .....	8
2.4	Pathologie fusarienne : la fusariose des racines et du collet provoquée par l'agent pathogène <i>Fusarium oxysporum f.sp.radicis-lycopersici</i> .....	9

2.5	Infection et symptomatologie de <i>Fusarium oxysporum f.sp. radicum-Lycopersici</i> .....	9
-----	---	---

## Chapitre 2 : Les PGPR et les PGPF

1	Les PGPR ( <i>Plant Growth Promoting Rhizobacteria</i> ).....	10
2	Mode d'action des PGPR.....	10
2.1	Mode d'action directe.....	11
2.1.1	Fixation d'azote .....	11
2.1.2	Phytohormone.....	11
2.1.3	La solubilisation des phosphates .....	12
2.2	Mode d'action indirect .....	13
2.2.1	Production d'antibiotiques.....	13
2.2.2	Les Sidérophores .....	13
2.2.3	Production de l'acide cyanhydrique .....	13
3	Les PGPR performante.....	14
3.1	<i>Bacillus</i> .....	14
3.1.1	Caractères bactériologiques .....	14
3.1.2	Classification.....	14
3.2	<i>Pseudomonas</i> .....	15
3.2.1	Caractéristiques bactériologiques .....	15
3.2.2	Classification du genre <i>Pseudomonas</i> .....	15
4	Les PGPF ( <i>Plant Growth-Promoting Fungi</i> ) .....	16
4.1	Généralité sur les TR .....	16
4.1.1	Taxonomie .....	17
4.1.2	Caractères macroscopiques et microscopiques .....	17

4.2	Importance des <i>Trichoderma</i> .....	18
4.2.1	Métabolites secondaires de <i>Trichoderma</i> .....	18
4.2.2	Mycoparasitisme .....	18
4.2.3	Stimulation de la résistance des plantes .....	18

### **Chapitre 3 : La lutte biologique**

1	La lutte biologique.....	19
1.1	Généralités.....	19
1.2	Utilisation des microorganismes contre d'autres microorganismes ....	19
1.2.1	Utilisation des bactéries contre des champignons .....	20
1.2.2	Utilisation des champignons contre des champignons.....	20
2	Autres moyens de lutte.....	21
2.1	La lutte chimique.....	21
2.2	Lutte physique .....	21

### **Partie expérimentale**

#### **I. Matériel et méthodes**

1	Matériel.....	22
1.1	Matériel biologique .....	22
1.2	Les souches fongiques.....	22
1.3	Les souches bactériennes .....	22
1.4	Les milieux de culture (Annexe 01) .....	23
1.5	Les réactifs et solutions (Annexe 02).....	23
1.6	Appareillage (Annexe 03).....	23
2	Méthodes.....	23
2.1	Echantillonnage.....	23

2.2	Suspension et dilution.....	23
2.3	Isolement des bactéries .....	24
2.3.1	Isolement de <i>Pseudomonas sp. fluorescent</i> .....	24
2.3.2	Isolement de <i>Bacillus sp.</i> .....	24
2.4	Purification et conservation des souches bactériennes .....	24
2.5	Identification des souches antagonistes .....	24
2.5.1	Test de fluorescence .....	25
2.5.2	Caractères morphologiques.....	25
2.5.3	Coloration de vert de malachite .....	25
2.5.4	Etude des caractères biochimiques.....	25
—	Recherche de catalase.....	25
—	Citrate de Simmons.....	26
—	Test de Mannitol Mobilité.....	26
—	Croissance à 4°C et à 41°C.....	26
2.6	Préparation de la suspension bactérienne .....	26
2.7	Caractérisation du potentiel de promotion de la croissance des souches antagonistes isolés <i>in vitro</i> .....	27
2.7.1	Solubilisation des phosphates .....	27
2.7.2	Production d'ammoniaque.....	27
2.7.3	Production d'HCN.....	27
2.7.4	Production d'AIA .....	27
2.7.5	Production d'Amylase .....	28
2.7.6	Production de Protéase.....	28
2.7.7	Production de Pectinase.....	28

2.8	Isolement du pathogène .....	28
2.9	Identification des isolats pathogènes.....	29
2.10	Test de virulence.....	29
2.11	Production par Fermentation et extraction des métabolites bioactifs...	30
2.11.1	Production par fermentation.....	30
2.11.2	Extraction des métabolites bioactifs .....	31
2.11.3	Test de l'activité des molécules bioactives .....	32
2.12	Test d'antagonisme <i>in vitro</i> .....	33
2.12.1	Test de confrontation directe.....	33
2.12.2	Test de confrontation indirecte .....	34
2.13	Chromatographie sur couche mince .....	35
2.14	Analyse statistique .....	36

## II. Résultats et discussion

3	Isolement des souches antagonistes .....	37
4	Identification des souches antagonistes .....	37
4.1	Identification de <i>Pseudomonas sp. fluorescent</i> .....	37
4.1.1	Macroscopique et microscopique .....	37
4.1.2	Biochimique .....	37
4.2	Identification de <i>Bacillus sp.</i> .....	40
4.2.1	Macroscopique et microscopique .....	40
4.2.2	Biochimique .....	40
5	Caractérisation du potentiel de promotion de la croissance des souches antagonistes isolées <i>in vitro</i> .....	42
5.1	La solubilisation de phosphate.....	42

5.2	Production d'ammoniaque.....	43
5.3	Production d'HCN.....	43
5.4	Production de l'acide acétique indole .....	44
5.5	Production d'amylase.....	45
5.6	Production de protéase .....	46
5.7	Production de pectinase.....	46
6	Identification des isolats phytopathogène .....	47
7	Test de virulence.....	49
7.1	Production par fermentation et extraction des métabolites bioactifs....	50
7.2	Quantités d'extraits produites par les souches antagonistes.....	51
7.2.1	Par <i>Pseudomonas sp. fluorescent</i> .....	52
7.2.2	Par <i>Bacillus sp.</i> .....	52
7.2.3	Par <i>Trichoderma sp.</i> .....	52
7.3	Activité des extraits contre <i>Fusarium</i> .....	52
8	Test d'antagonisme <i>in vitro</i> .....	54
8.1	Confrontation directe .....	54
8.1.1	<i>Bacillus-Fusarium</i> .....	54
8.1.2	<i>Trichoderma-Fusarium</i> .....	56
8.1.3	<i>Pseudomonas -Fusarium</i> .....	58
8.2	Analyse statistique de la confrontation directe sur les différents milieux.....	60
8.3	Confrontation indirecte .....	61
8.4	Analyse statistique du test de la confrontation indirecte .....	64

<b>9</b>	<b>Comparaison des résultats entre la confrontation directe et indirecte .....</b>	<b>64</b>
<b>10</b>	<b>Chromatographie sur couche mince (CCM).....</b>	<b>65</b>
	<b>Conclusion .....</b>	<b>67</b>
	<b>Références bibliographiques.....</b>	<b>69</b>
	<b>Annexes</b>	



## Liste des abréviations

6PP : 6-n-Pentyl-6H-Pyran-2-one

AMF: *Arbuscular Mycorrhizal Fungi*

BNF : Fixation Biologique de l'Azote

CCM : Chromatographie sur Couche Mince

CO<sub>2</sub> : Dioxyde de carbone

DAPG: 2, 4 diacéthylephoroglucinol

*F.oxysporium* : *Fusarium oxysporium*

HCN : Acide cyanhydrique

HR : Réponse Hypersensible

IAA : Acide Indoleacétique

ISR : Résistance Systémique Induite

KA : King A

KB : King B

LB : Luria Bertani

MH : Muller Hinton

N<sub>2</sub> : Azote gazeux

*P.aeruginosa* : *Pseudomonas aeruginosa*

PDA : *Potato Dextrose Agar*

PDB : *Potato Dextrose Bouillon*

pH : Potentiel hydrogène

PGPB : *Plant Growth Promoting Bacteria*

PGPF :: *Plant Growth Promoting Fungi*

PGPR : *Plant Growth Promoting Rhizobacteria*

PGPY : *Plant Growth Promoting Yeasts*

PLT : Pyolutéorine

PPO : Polyphénol Oxydase

PRN : Pyrrolnitrine

PVK : Pikovskaya

Rf : Rapport frontal

Rmp : Revolution par minute

SAR : Résistance Systémique Acquise

SM : Solution Mère

TKB : Tryptophane King B

TLB : Tryptophane Luria Bertani

TSA : Gélose Tryptone Soja

TR : *Trichoderma Spp.*

UFC : Unité Faisant Colonie

UV : Ultraviolet

## Liste des figures

<b>Figure 01</b> : Les maladies fongiques, A : Mildiou ; B : L'alternariose ; C : Rhizoctone noir ; D : Oïdium (Blancard, 2009).....	6
<b>Figure 02</b> : Observation microscopique du genre <i>Fusarium</i> A : chlamydospores ; B : macroconidies ; C : microconidies (Lecomte, 2016).....	8
<b>Figure 03</b> : Symptômes externes de la pourriture racinaire sur les feuilles et le système racinaire ; A : feuilles de tomate malade ; B : tige infectée par le pathogène FORL ; C : brunissement du cylindre central et du collet malade (Blancard, 1997 ; Agrios, 2005). ....	9
<b>Figure 04</b> : Les mécanismes directs et indirects des PGPR (Timmusk, 2013). ....	10
<b>Figure 05</b> : Aspect microscopique de <i>Trichoderma sp.</i> (Samuels et al., 1994). ....	17
<b>Figure 06</b> : A : Site d'échantillonnage de la Wilaya de Biskra ; B : situation de la zone d'échantillonnage sur la carte graphique (Rekibi, 2015).....	23
<b>Figure 08</b> : Test de virulence sur les graines de tomate, A : témoin en absence de l'agent pathogène ; B : test sur les graines. ....	30
<b>Figure 09</b> : Fermentation des souches antagonistes. ....	31
<b>Figure 10</b> : Extraction liquide-liquide, A : ampoule à décanter ; B : rotavapor (Evaporateur rotatif). ....	32
<b>Figure 11</b> : Confrontation directe entre l'agent pathogène et l'agent antagoniste, A : confrontation directe entre <i>Trichoderma sp.</i> et le pathogène ; B : confrontation directe entre les bactéries antagonistes ( <i>Pseudomonas sp. fluorescent</i> et <i>Bacillus sp.</i> ) et le pathogène.....	34
<b>Figure 12</b> : Confrontation indirecte entre le pathogène et l'agent antagoniste, A : confrontation à distance entre les bactéries antagonistes ( <i>Pseudomonas sp. fluorescent</i> et <i>Bacillus sp.</i> ) et l'agent pathogène ; B : confrontation à distance entre <i>Trichoderma sp.</i> et l'agent pathogène.....	35
<b>Figure 14</b> : Certaines caractéristiques morphologiques de <i>Pseudomonas sp. fluorescent</i> , A : aspect macroscopique ; B : aspect microscopique.....	38
<b>Figure 15</b> : Test de fluorescence de <i>Pseudomonas sp. fluorescent</i> ; C: fluorescence sur milieu KB ; D : fluorescence sur milieu KA (King A) sous UV ; E : fluorescence sur milieu KB (à gauche) et KA (à droite) à l'œil nu. ....	38
<b>Figure 16</b> : Certaines caractéristiques biochimiques de <i>Pseudomonas sp. fluorescent</i> , F : test citrate de Simmons (F <sub>1</sub> ) et Mannitol mobilité (F <sub>2</sub> ) ; G : test catalase. ....	39
<b>Figure 17</b> : Certaines caractéristiques morphologiques de <i>Bacillus sp.</i> , A : aspect macroscopique ; B : aspect microscopique (coloration de Gram) ; C : coloration des endospores.....	40
<b>Figure 18</b> : Certaines caractéristiques biochimiques de <i>Bacillus sp.</i> , D : test de Mannitol mobilité ; E : test de catalase. ....	41

<b>Figure 19 :</b> Test de solubilisation de phosphate, A : absence d'halo autour de la colonie de <i>Pseudomonas sp. fluorescent</i> ; B : absence d'halo autour de la colonie de <i>Bacillus sp.</i> ; C : absence d'halo autour de la colonie de <i>Trichoderma sp.</i> .....	42
<b>Figure 20 :</b> Production d'ammoniaque par les souches antagonistes.....	43
<b>Figure 21 :</b> Production d'acide cyanhydrique, A : témoin ; B : production d'HCN par <i>Pseudomonas sp. fluorescent</i> ; C : production par <i>Trichoderma sp.</i> ; D : production d'HCN par <i>Bacillus sp.</i> .....	44
<b>Figure 22 :</b> Production d'acide acétique indole par les souches antagonistes, A : production d'AIA par <i>Bacillus sp.</i> ; B : production d'AIA par <i>Pseudomonas sp. fluorescent</i> ; C : production d'AIA par <i>Trichoderma sp.</i> .....	45
<b>Figure 23 :</b> Production d'amylase par les souches antagonistes, A : production d'amylase par <i>Pseudomonas sp. fluorescent</i> ; B : production d'amylase par <i>Bacillus sp.</i> ; C : production d'amylase par <i>Trichoderma sp.</i> .....	45
<b>Figure 24 :</b> Production de protéase, A : absence de la production chez <i>Bacillus sp.</i> ; B : absence de la production chez <i>Trichoderma sp.</i> ; C : production de protéase chez <i>Pseudomonas sp. fluorescent</i> .....	46
<b>Figure 25 :</b> Activité pectinase des souches antagonistes, A : production de pectinase par <i>Pseudomonas sp. fluorescent</i> ; B : absence de production de pectinase par <i>Bacillus sp.</i> ; C : absence de production par <i>Trichoderma sp.</i> .....	47
<b>Figure 27 :</b> Aspect microscopique de <i>Fusarium oxysporum</i> ; A : microconidies (unicellulaire et bicellulaire) ; B : conidiophores portant de courtes phialides. ....	48
<b>Figure 28 :</b> Aspect macroscopique du pathogène sélectionné <i>Fusarium oxysporum</i> , A <sub>1</sub> : aspect de la colonie recto ; A <sub>2</sub> : aspect de la colonie verso. ....	49
<b>Figure 29 :</b> La virulence de <i>F.oxysporum</i> sur les graines de la tomate, A : témoin ; B : après 7 jours d'incubation, C : après 10 jours d'incubation.....	50
<b>Figure 30 :</b> Les extraits des molécules bioactives après Rotavaporisation.....	51
<b>Figure 31 :</b> Activité des molécules bioactives des extraits chloroformiques et d'acétate d'éthyle, A <sub>1</sub> et A <sub>2</sub> : <i>Bacillus sp.</i> ; B <sub>1</sub> et B <sub>2</sub> : <i>Trichoderma sp.</i> ; C <sub>1</sub> et C <sub>2</sub> : <i>Pseudomonas sp. fluorescent</i> . ....	53
<b>Figure 32 :</b> Le taux d'inhibition du pathogène par l'agent antagoniste <i>Bacillus sp.</i> .....	55
<b>Figure 33 :</b> Confrontation directe entre <i>Bacillus sp.</i> et le pathogène, A : méthode de disque sur milieu Muller-Hinton ; B : méthode de disque sur milieu Luria Bertani ; C : méthode de trait sur milieu LB ; D : méthode de stries sur milieu LB/PDA ; E : témoin.....	56
<b>Figure 34 :</b> Le taux d'inhibition de <i>F.oxysporum</i> par l'agent antagoniste <i>Trichoderma sp.</i> .....	57
<b>Figure 35 :</b> Test de confrontation directe, A : confrontation entre <i>Trichoderma sp.</i> et <i>Fusarium oxysporum</i> ; B : témoin. ....	57
<b>Figure 36 :</b> Le taux d'inhibition par confrontation directe de <i>Pseudomonas sp. fluorescent</i> vis-à-vis <i>F.oxysporum</i> . ....	58

<b>Figure 37 :</b> Confrontation directe entre <i>Pseudomonas sp. fluorescent</i> et l'agent pathogène, A : méthode des disques sur milieu KB ; B : méthode des disques sur milieu MH ; C : méthode de strie sur milieu KB ; D : méthode de trait sur milieu KB/PDA ; E : témoin. ....	59
<b>Figure 38 :</b> Le taux d'inhibition du pathogène par les souches antagonistes. ....	62
<b>Figure 39 :</b> Confrontation indirecte le pathogène et les souches antagonistes ; A : confrontation indirecte entre <i>Trichoderma sp.</i> et le pathogène ; B : confrontation indirecte entre <i>Bacillus sp.</i> et le pathogène; C : confrontation indirecte entre <i>Pseudomonas sp. fluorescent</i> et le pathogène. ....	63
<b>Figure 40 :</b> CCM présentant des spots de molécules bioactives sous lampe UV (254nm) des souches antagonistes ( <i>Pseudomonas sp. fluorescent</i> (A, B) ; <i>Bacillus sp.</i> (C, D) et <i>Trichoderma sp.</i> (E, F)). ...	66

## Liste des tableaux

<b>Tableau 01</b> : Les principaux agents de lutte biologique vis-à-vis <i>F.oxysporum</i> (Lydie, 2010 ; Srivastava et <i>al.</i> , 2010 ; Birinchi Kumar Sarma et <i>al.</i> , 2015).....	21
<b>Tableau 02</b> : Caractères morphologiques et biochimiques de <i>Pseudomonas sp. fluorescents</i> . ....	39
<b>Tableau 03</b> : Caractères morphologiques et biochimiques de <i>Bacillus</i> .....	41
<b>Tableau 04</b> : Résultats du potentiel de promotion de la croissance des souches antagonistes. ....	47
<b>Tableau 05</b> : Les résultats de test de virulence. ....	49
<b>Tableau 06</b> : La quantité de l'extrait obtenu après extraction par chaque solvant.....	51
<b>Tableau 07</b> : Taux d'inhibition par confrontation directe ( <i>Bacillus sp. vis-à-vis F.oxysporum</i> ).....	54
<b>Tableau 08</b> : Taux d'inhibition par confrontation directe ( <i>Trichoderma sp. vis-à-vis F. oxysporum</i> ) .	56
<b>Tableau 09</b> : Taux d'inhibition par confrontation directe ( <i>Pseudomonas sp. fluorescent vis-à-vis le</i> <i>pathogène F.oxysporum</i> ). ....	58
<b>Tableau 10</b> : L'analyse statistique ANOVA pour le résultat de l'activité antagoniste des souches antagonistes par confrontation directe sur différents milieux.....	60
<b>Tableau 11</b> : Taux d'inhibition par confrontation indirecte par les souches antagonistes. ....	62
<b>Tableau 12</b> : L'analyse statistique ANOVA des activités des souches antagonistes. ....	64

## Liste des annexes

<b>Annexe 01</b> : Les milieux de culture .....	69
<b>Annexe 02</b> : Les Solutions et réactifs.....	73
<b>Annexe 03</b> : Appareillages.....	74
<b>Annexe 04</b> : Principe des colorations .....	75



**Introduction**



Dans le monde entier, la tomate occupe la deuxième place après la pomme de terre, que ce soit dans la production ou la consommation (Mohi et *al.*, 2011). Les producteurs sont confrontés à diverses maladies qui s'attaquent aux cultures. On estime que près de 50% de la production agricole mondiale est perdue avant et après la récolte. En 1999 la F.A.O a signalé que les maladies phytopathogènes réduisent de 12 à 14% de la production agricole mondiale, 70% des dommages étant d'origine fongique (Aouar, 2012).

Parmi ces maladies fongiques, on signale la fusariose racinaire de la tomate dont l'agent causal est un champignon tellurique « *Fusarium oxysporum* » qui se développe rapidement et engendre chaque année la destruction des dizaines d'hectare de culture de tomate. Cette maladie colonise plus ou moins entièrement les racines, où elle occasionne de nombreuses lésions brunes ainsi que leur pourriture.

Le contrôle biologique des maladies telluriques par l'introduction de microorganismes bénéfiques dans la rhizosphère (les PGPR : *Plant Growth Promoting Rhizobacteria*, et les TR : *Trichoderma*), est proposé comme une alternative pour remplacer ou compléter l'utilisation des produits chimiques de synthèse. Ces microorganismes bénéfiques se manifestent par une grande variété, dissémination facile, spécificité d'action ainsi qu'une persistance dans l'environnement (Kouassi, 2001). Parmi ces agents de lutte biologique *Pseudomonas*, *Bacillus* et *Trichoderma*, sont les plus prédominants grâce à leur capacité de suppression des pathogènes et la réduction de l'incidence des maladies par plusieurs mécanismes : la compétition, l'antibiose ou le parasitisme. Ainsi que leur capacité à sécréter des substances antimicrobiennes ayant soit une activité antibactérienne soit une activité antifongique (sidérophores, le cyanure d'hydrogène (HCN) et les composés volatiles). En plus d'améliorer la santé des plantes, ils jouent divers rôles dans le sol et impactent la structure des communautés microbiennes ainsi que le développement des plantes et arbres et sont notamment connues pour leur effet antagoniste avec les phytopathogènes (Bloemberg et Lugtenberg, 2001).

Ce document est structuré en deux parties; Partie bibliographique (divisée en trois chapitres) et une partie expérimentale.

L'objectif principal de cette recherche se focalise sur :

- L'isolement des souches antagonistes (à partir de la rhizosphère de la tomate de la région de *Biskra*) et le pathogène (à partir de l'hôte infectée).
- Caractérisation du potentiel de promotion de la croissance de souches antagonistes isolées *in vitro*.
- L'étude *in vitro* des interactions dans la rhizosphère entre les souches antagonistes (*Pseudomonas sp. fluorescent* ; *Bacillus sp.* et *Trichoderma sp.*) et le phytopathogène (*Fusarium oxysporum*).



**Partie bibliographique**

## 1 La tomate

### 1.1 Généralités

La tomate connue dans les anciens livres sous des dénominations *Solanum lycopersicum L.* et *Lycopersicon Lycopersicum*, et récemment sous le nom de *Lycopersicon esculentum Mill.* D'après Philip Miller en 1754, le nom du genre *Lycopersicon* désigne 'pêche de loup' et le nom d'espèce *esculentum* signifie 'comestible' à part les jeunes fruits et le feuillage qui ne sont pas comestibles en cause de leur constitution en alcaloïdes toxiques (tomatine, solanine) qui disparaissent pendant le développement des fruits. Ce fruit charnu, une baie largement consommée dans de nombreux pays, frais ou transformé (Blancard, 2009 ; Chanforan, 2010).

Compte tenu de son importance économique, elle est l'objet de nombreuses recherches scientifiques et est considérée comme une plante modèle pour les études scientifiques sur les fruits charnus. La morphologie de ce dernier telle que sa taille, sa forme et sa couleur leur permet d'être manipulé et contrôlé par des facteurs mono ou oligogéniques (Aurore, 2010).

### 1.2 Origine

La tomate est originaire du nord-ouest de l'Amérique du Sud, les mexicains étaient les premiers à la consommé. Au début du XVI<sup>e</sup> siècle, les espagnols l'ont introduit en Europe puis traversa les frontières européennes. Elle était plutôt considérée comme une plante ornementale jusqu'au XVIII<sup>e</sup> siècle dans les pays du nord de l'Europe. Sa diffusion s'accéléra à la fin du XVIII<sup>e</sup> siècle et ce fruit entra petit à petit dans la composition de nombreux plats. Au XX<sup>e</sup> siècle, les cultivateurs d'Espagne qui ont importé la tomate en Algérie, pour que sa consommation fût en premier dans la région d'Oran en 1905 puis elle s'est développée dans le centre notamment à Alger (Latigui, 1984).

### 1.3 Description botanique

Selon Atherton et Rudich, 1986, la tomate appartient à la classification suivante :

Règne.....Plantae.  
Sous règne.....Trachenobionta.  
Division.....Magnoliophyta.  
Classe.....Magnoliopsida.  
Sous classe.....Asteridae.  
Ordre.....Solonales.

Famille.....Solanaceae.

Genre.....*Solanum* ou *Lycopersicon*

Espèce.....*Lycopersicon esculentum* Mill.

(Bouzaata, 2016).

#### 1.4 Croissance et développement

En fonction du développement des tiges de tomates, les différentes variétés sont classées en deux types de croissance : déterminée et indéterminée (Atherton et Rudich, 1986).

- La croissance déterminée due à une mutation génétique (le *self pruning factor*), la tige se termine par une inflorescence après avoir donné un faible nombre de bouquet ; autrement dit les pousses latérales se terminent par une inflorescence.
- Au contraire pour la croissance indéterminée qui ne s'arrête pas de croître et qui présente un nombre indéfini d'inflorescences sur la tige principale tout comme sur les tiges latérales. Elle est interrompue par des facteurs extérieurs tels que le gel, ou régulée en taillant les plantes (Chanforan, 2010).

Les fruits présentent une courbe de croissance d'allure sigmoïdale et comprend trois périodes :

- **La première phase** : la croissance est lente de 15 jours après anthèse, dans laquelle la plupart des divisions cellulaires ont lieu. durant cette période le potentiel de croissance du fruit peut être déterminé par le nombre de cellules formées.
- **La deuxième phase** : la croissance est plus rapide jusqu'au stade vert mature, durant cette phase le potentiel généré pendant l'étape précédente est plus ou moins réalisé selon les conditions climatique.
- **La troisième phase ou phase de maturation** : la croissance est lente et caractérisée par un changement brutal de la couleur et la texture ainsi que la composition chimique du fruit. Cette période dépend des composés de stockage ainsi que l'environnement du fruit. (Grasselly et *al.*, 2000).

#### 1.5 Caractéristiques morphologiques de la tomate

La tomate est une plante buisant à tige le plus souvent retombante (Clement, 1981). Elle est obtenue à partir de graines de petite taille, poilus à germination épigée. C'est une plante

herbacée, vivace à l'état naturel, et annuelle en culture. Les principaux composants de cette plante sont :

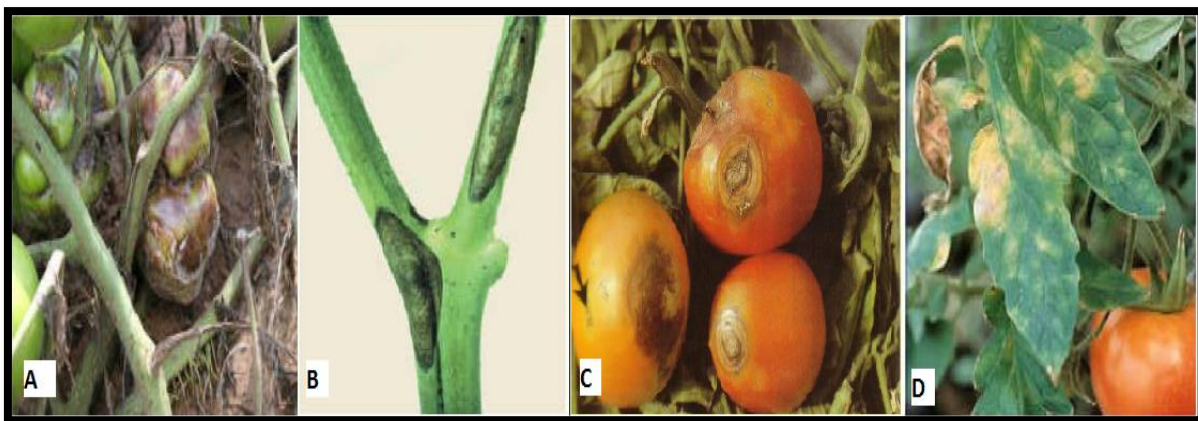
- **Racine (le système racinaire) :** il est très puissant et ramifié, très actif sur les trente premiers centimètres (30 à 40). Pour les sols profonds, les systèmes racinaires peuvent être prolongés jusqu'à un mètre. Ainsi que la racine principale produit une haute densité de racines latérales et adventices (Chaux et Foury, 1994).
- **Tige :** pleine et pubescente, épaisse aux entre-nœuds, poilue et glandulaire. Au début de la croissance elle a une consistance herbacée, puis devient un peu ligneuse en vieillissant. Les rameaux issus des bourgeons axillaires produisent des feuilles à chaque nœud et se terminent aussi par une inflorescence (Chaux et Foury, 1994).
- **Feuilles :** Alternes, disposé en spirale avec une longueur de 10 à 25 cm, avec 10 à 30 cm de largeur, imparipennées, et comprennent de 5 à 7 folioles ovales à oblongue aux lobes très découpés, le bord du limbe est denté (Chaux et Foury, 1994).
- **Fleurs :** bisexuées et régulières mesure entre 1.5 et 2 cm de diamètre. Le pistil est entouré d'un cône constitué d'étamines qui ont une couleur jaune vif. La fleur comporte 5 sépales persistants, 5 pétales qui peuvent atteindre une longueur de 1 cm qui sont jaunes et courbées lorsqu'elles sont mûres, 5 à 7 étamines qui entourent le style qui a une extrémité stérile allongée et 2 carpelles soudées formant un ovaire (Shankara et al., 2005).
- **Fruit :** C'est une baie charnue de forme globulaire ou aplatie avec 2 ou 3 loges, à graines très nombreuses, de taille et de couleur très variées, lorsque le fruit n'est pas encore mûr il est vert et poilu, lorsqu'il est mûr sa couleur varie du jaune au rouge. La présence d'une zone d'abscission qui est présentée par le pédoncule du fruit, de sorte que le fruit mûr se détache en conservant une partie du pédoncule ainsi que le calice. En général le fruit est rond et régulier ou bien côtelé (Chanforan, 2010).
- **Graines :** un nombre important de graines qui varie de 80 à 500 graines pour chaque fruit. Elles sont poilues, beiges, grisâtres et velues, en forme de rein ou de poire, avec 3 à 5 mm de longueur et de 2 à 4 mm de largeur. Elles sont enveloppées d'un mucilage qui renferme à sa maturité l'embryon, ce dernier est enroulé dans l'albumen (Shankara et al., 2005).

## 1.6 Pathologie fongique de la tomate

- **Le Mildiou:** *Phytophthora infestans*, a été anciennement classé parmi les mycètes. les plantes de tomate peuvent être infectées par le mildiou lorsqu'elles côtoient des cultures de pomme de terre pénétrées par cette maladie. Elle peut détruire les cultures de tomates

durant les périodes fraîches et pluvieuses. Elle se présente par des taches nécrotiques, irrégulières, d'extension rapide, entourées d'une marge livide (Figure 01 A) (Messiaen et *al.*, 1991).

- **Maladie des taches brunes de la tomate (L'alternariose) :** *Alternaria solani* Sorauer peut provoquer une grave défoliation des plantes de tomates. Peut affecter toutes les parties aériennes des plantes, tout au long de la saison de croissance. Dans de rares cas, un chancre du collet peut encercler la base de la tige au moment de l'émergence, des taches brunes, allongées, légèrement déprimées, qui peuvent présenter des bandes concentriques au plus haut de la tige (Figure 01 B) (Messiaen et *al.*, 1991).
- **Pourriture brune du collet (Rhizoctone noir) :** l'agent causal est *Rhizoctonia solani* Kühn. La phase pourriture du collet de la fonte des semis demeure un problème chez les plantes produites culture hydroponique. Il se caractérise par des taches brunes ou rougeâtres sur n'importe quelle partie de la plantule avant la levée et après la levée, il provoque une lésion brune, brun-rouge ou presque noire sur la tige au niveau du sol (Figure 01C) (Blancard, 2009).
- **Oïdium :** *Oïdium neolycopersici* qui provoque des taches sur les feuilles qui sont poudreuses et blanches et couvrent plutôt la face supérieure des folioles de tomate. Une fois les tissus sont touchés ils brunissent localement et deviennent chlorotiques, finissent par se nécroser (Figure 01 D) (Blancard, 2009).



**Figure 01 :** Les maladies fongiques, A : Mildiou ; B : L'alternariose ; C : Rhizoctone noir ; D : Oïdium (Blancard, 2009).

## 2 *Fusarium oxysporum*

Le nom *Fusarium* est dérivé du latin *fuscus* car ses spores sont fusiformes et se multiplient dans le sol, se caractérise par une variété de capacités d'adaptation aux conditions environnementales, grâce à sa capacité à changer de forme et de fonction (Booth, 1971 ; El Banna et *al.*, 1984). Le *F. oxysporum* est un complexe d'espèces important au sein du genre *Fusarium* et l'agent causal de la fusariose racinaire dans diverses cultures agronomiques et horticoles importantes comme la tomate (Bosland et Williams, 1987 ; Vakalounakis, 1996 ; Szczechura et *al.*, 2013). La majorité des espèces de *Fusarium* sont inoffensives, saprophytes et sont des membres relativement abondants de la communauté microbienne du sol. La capacité de ce champignon particulier à provoquer des maladies chez les plantes et les humains a encouragé d'importantes recherches sur ce genre (Sayuj, 2015).

### 2.1 Taxonomie

La taxonomie de *Fusarium* était confuse et sujette de plusieurs débats (Nelson et *al.*, 1994). Toutes les controverses sur la taxonomie du genre *Fusarium* ont concerné l'espèce *Fusarium oxysporum*. Le genre *Fusarium* est maintenant considéré comme un genre anamorphe qui se rapporte aux Hypocréales (Ascomycètes) (Mihai, 1998).

Eukariotese

Champignons supérieurs

Deuteromycètes

Ascomycètes Euascomycètes

Pyrenomycètes

Hypocerealis

Nectriaceae

*Fusarium*

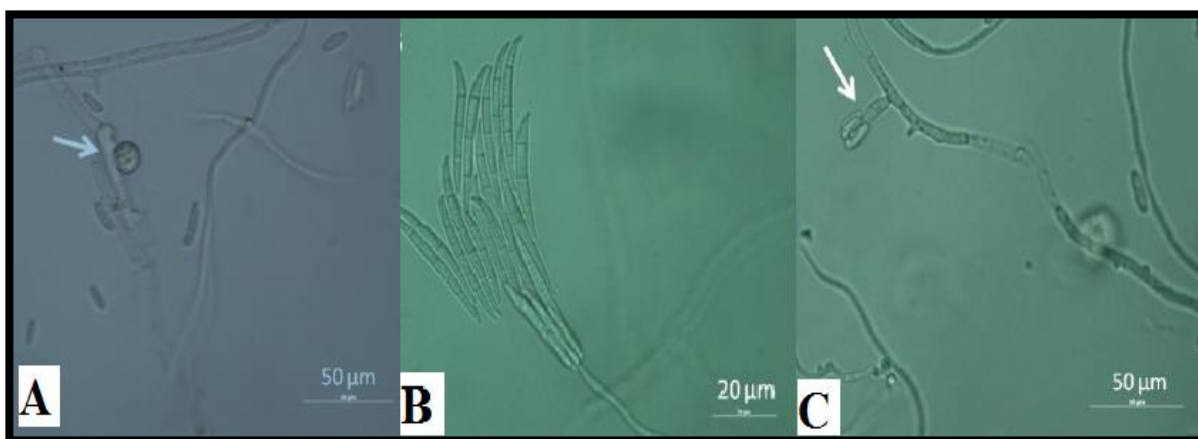
*Fusarium oxysporum* f. sp. *radicis-lycopersici*

### 2.2 Description macroscopique et microscopique de *Fusarium oxysporum*

Cet agent pathogène n'a pas d'état parfait connu, sous forme vasculaire avec un mycélium septé aérien, généralement blanchâtre ou rosâtre selon le milieu dans lequel est cultivé. Il peut prendre d'autres pigmentations (violette, mauve, orange ou beige) qui sont dues à la formation d'une multitude de spores en surface par des organes fructifères (Yezli,



1989). Du fait qu'il est un champignon imparfait, la phase sexuée n'existe pas ou du moins, n'a jamais été observée. *F. oxysporum* produit trois types de spores asexuées : macroconidies, microconidies et chlamydospores. Dans le cas du *F. oxysporum*, les macroconidies sont en forme de faucille ou droites avec trois ou quatre septums. Elles peuvent être produites à partir de monophialides sur un conidiophore ramifié ou sur des hyphes. Cellule basale dentelée et une cellule apicale pointue. Les microconidies sont produites en fausses têtes sur de courtes monophialides sur les hyphes. Les chlamydospores sont généralement produites en simple ou en paires sur les régions intercalaires ou terminales des hyphes. Elles sont formées par la modification des cellules hyphales et conidiennes par la condensation de leur contenu (Figure 02) (Fuchs, 1993).



**Figure 02** : Observation microscopique du genre *Fusarium* A : chlamydospores ; B : macroconidies ; C : microconidies (Lecomte, 2016).

### 2.3 Cycle biologique de *Fusarium oxysporum f.sp.radicis-Lycopersici*

Le champignon *Fusarium* fait d'origine tellurique, ce qui fait qu'il est présent en grand pourcentage dans le sol, la plupart sont des espèces de *F. oxysporum* en absence de la plante hôte, il survie sous forme de saprophyte, en présence de la plante hôte il croît en débris des plantes ou bien survie grâce aux macro/microconidies et les chlamydospores aux parois épaisses et résistantes.

Après la germination des chlamydospores, la pénétration par le pathogène peut être par l'intermédiaire de blessures naturelles ou accidentelles, de l'extrémité des racines. Selon des récentes études, le mycélium du pathogène a la capacité d'être en contact avec le chevelu

racinaire, s'entremêler avec lui et s'accrocher aux radicelles. Le champignon va progressivement envahir les tissus et finit par coloniser le système racinaire (Hamini, 2011 ; Benaouali, 2015).

#### 2.4 Pathologie fusarienne : la fusariose des racines et du collet provoquée par l'agent pathogène *Fusarium oxysporum f.sp.radicis-lycopersici*

La fusariose des racines de la tomate (*Fusarium crown and root rot*) est découverte pour la première fois au Japon en 1969 (Menziés et Javis, 1994), la maladie est présente aujourd'hui dans plusieurs pays du globe terrestre c'est l'une des maladies les plus fréquentes, responsable des pertes économiquement importantes (Blancard, 1997).

#### 2.5 Infection et symptomatologie de *Fusarium oxysporum f.sp. radidis-Lycopersici*

*F.oxysporum f.sp.radicis-lycopersici* entraîne plusieurs symptômes et la maladie évolue très rapidement. Ce champignon ravageur est avant tout inféodé au système racinaire de la plante de la tomate, où il provoque tout d'abord de nombreuses lésions rougeâtres humides, évoluant en pourriture suivit d'un développement d'un chancre brun sur un seul coté de la tige et du collet en forme de flamme. En plus de ces altérations, des symptômes de flétrissements et de jaunissement à la périphérie du limbe des vieilles feuilles. Concernant les symptômes internes, des brunissements apparaissent au niveau du cylindre central des grosses racines jusqu'à la tige au-dessus du collet (Figure 03) (Benaouali, 2015 ; Si Mohammed, 2017).



**Figure 03** : Symptômes externes de la pourriture racinaire sur les feuilles et le système racinaire ; A : feuilles de tomate malade ; B : tige infectée par le pathogène FORL ; C : brunissement du cylindre central et du collet malade (Blancard, 1997 ; Agrios, 2005).

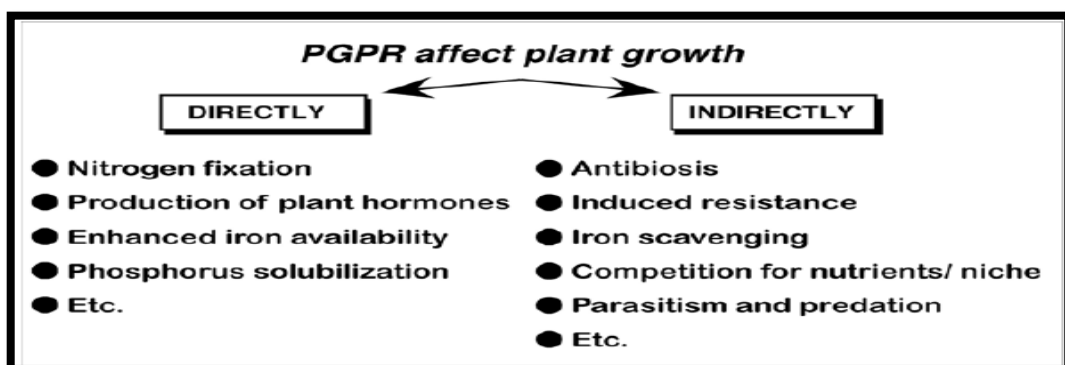
## 1 Les PGPR (*Plant Growth Promoting Rhizobacteria*)

Le concept de rhizosphère a été introduit pour la première fois par Hiltner pour décrire la zone étroite du sol entourant les racines dont les propriétés physiques, chimiques et biologiques ont été modifiées par l'activité de la racine. La rhizosphère contenant plus d'un million de micro-organismes par gramme de sol, ce qui entraîne une activité microbienne particulièrement excessive dans la zone à influence racinaire, elle est le siège de plusieurs interactions entre les micro-organismes et les racines. Ces interactions sont bénéfiques, nocives ou neutres pour les plantes. En effet, les microorganismes retrouvent des substrats énergétiques libérés par les racines dans ce milieu. Ces substrats sont nécessaires à leur métabolisme: sucres, acides aminés, acides organiques, hormones (Bashan et *al.*, 2013 ; Figueiredo et *al.*, 2016).

Les rhizobactéries qui favorisent la croissance des plantes (PGPR), colonisent les racines des plantes de manière compétitive et stimulent la croissance des plantes et/ou réduisent l'incidence des maladies végétales. *Pseudomonas* et *Bacillus* sont les genres les plus communément décrits comme étant des PGPR antagonistes des pathogènes racinaires reconnus (Adeemoye et *al.*, 2009).

## 2 Mode d'action des PGPR

Ces bactéries exercent des effets bénéfiques sur la croissance et le développement des plantes. L'un de ces effets bénéfiques est l'amélioration de la disponibilité et de l'efficacité d'utilisation des nutriments, cela par différents mécanismes directs et indirects (Figure 04) (Beauchamp et *al.*, 2021).



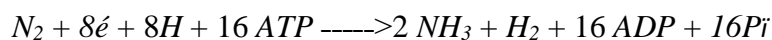
**Figure 04** : Les mécanismes directs et indirects des PGPR (Timmusk, 2013).

## 2.1 Mode d'action directe

Les PGPR affectent directement le métabolisme des plantes en fournissant des nutriments qui sont généralement rares dans la rhizosphère (Ahmad et *al.*, 2008).

### 2.1.1 Fixation d'azote

Les PGPR peuvent convertir l'azote piégé sous forme moléculaire ou atmosphérique (N<sub>2</sub>) en formes biologiquement utiles dans un processus connu sous le nom de fixation biologique de l'azote (BNF) qui se transforme en ammoniac. Cette transformation est essentielle pour toutes les formes de vie car l'azote est l'élément de base des plantes. Seules les bactéries diazotrophes exécutent la BNF, car l'enzyme nitrogénase n'est présente que dans ces organismes (Bhattacharjee et *al.*, 2008). Le complexe de la nitrogénase est une enzyme complexe réalisant le processus de fixation de l'azote.



### 2.1.2 Phytohormone

Les phytohormones sont des messagers chimiques qui jouent un rôle crucial dans la croissance naturelle et sont présentes en faible concentration. Elles façonnent la plante, affectant également la croissance des graines, le moment de la floraison, le sexe des fleurs, la sénescence des feuilles et des fruits. Elles affectent également les niveaux d'expression et de transcription des gènes, la division et la croissance cellulaires. Dans les cellules ciblées, les phytohormones régulent également les processus cellulaires, la formation des motifs, le développement végétatif et reproductif et les réponses au stress. Plus de colonisateurs naturels des racines, les plantes recrutent également des microorganismes nécessaires dans la rhizosphère lorsqu'elles rencontrent des agents pathogènes. Les PGPR peuvent également favoriser la croissance des racines. Cela peut être dû à la capacité de la plupart des bactéries de la rhizosphère à produire des hormones végétales, qui favorisent la division et l'expansion cellulaires. Extension du tissu végétal et /ou autres changements morphologiques des racines (Salisbury, 1994) telles que :

- **L'acide indole-3-acétique (IAA)** : Est l'une des auxines les plus communes ainsi que les plus étudiées, et une grande partie de la littérature scientifique considère que les termes auxine et IAA sont interchangeable. Sa principale fonction est la division, l'élongation, la différenciation et l'extension des cellules (Jose Miguel et *al.*, 2005).

- **L'éthylène** : C'est la molécule la plus simple avec une large gamme d'activités biologiques. Elle est produite par la plante de manière endogène et induit différents changements physiologiques dans les plantes au niveau moléculaire. La production d'éthylène varie selon les espèces végétales et les types de tissus. Cette hormone gazeuse est formée par la dégradation de la méthionine qui est présente dans toutes les cellules. Il est produit d'avantage dans les cellules en division, surtout dans l'obscurité. Il affecte la croissance des plantes par l'initiation des racines, la maturation des fruits, la germination des graines et l'inhibition de l'élongation des racines. Il est appelé hormone de vieillissement des plantes (Jose Miguel et *al.*, 2005).
- **Les gibbérellines** : Sont des substances chimiques produites naturellement par les plantes et agissent comme un messenger chimique et aident à rompre la dormance. Elles stimulent l'enzyme (alpha-amylase) et aident à l'hydrolyse de l'amidon présent dans de nombreuses graines en glucose qui sera utilisé dans la respiration cellulaire. Les gibbérellines sont des hormones végétales qui influencent et contrôlent les processus de développement des plantes comme l'élongation de la tige, la germination, la dormance, la floraison, l'expression du sexe et la sénescence des feuilles et des fruits (Rishi et *al.*, 2015).
- **Les Cytokinines** : Sont des phytohormones qui favorisent la division cellulaire dans les racines et les pousses des plantes dont leur principale fonction est la croissance et la différenciation des cellules. Les cytokinines associées à l'éthylène, favorisent l'abscission des feuilles, des parties florales et des fruits. Elles aident la plante en retardant la sénescence ou le vieillissement des tissus, ce qui a un effet sur la croissance des feuilles (Rishi et *al.*, 2015).

### 2.1.3 La solubilisation des phosphates

Les bactéries solubilisatrices de phosphate sont des bactéries bénéfiques capables d'hydrolyser le phosphore inorganique insoluble en phosphore organique soluble, qui est absorbé comme nutriment par les plantes. Les bactéries solubilisatrices de phosphate les plus efficaces appartiennent aux genres *Bacillus*, *Rhizobium* et *Pseudomonas*. Le phosphore est requis pour la croissance et le développement des plantes. Il permet la fixation d'azote et implique, dans la photosynthèse, la biosynthèse de macromolécules, la transduction de signaux, le transfert d'énergie et la respiration (Ahmad et *al.*, 2008 ; Singh et Singh, 2013).

## 2.2 Mode d'action indirect

Ce mécanisme concerne la production des métabolites secondaires qui sont toxiques aux pathogènes du sol, dont les antibiotiques, le cyanide, les sidérophores, et diverses substances qui ont une gamme d'activités inhibitrices de la croissance des pathogènes (Timmusk, 2013).

### 2.2.1 Production d'antibiotiques

Les antibiotiques produits par les différents PGPR possèdent un large spectre d'activité. Ils jouent un rôle majeur dans la suppression des agents pathogènes bactériens. Le groupe de bactéries rhizosphériques le plus étudié en ce qui concerne la production d'antibiotiques est celui des *Pseudomonas fluorescents*. Ce dernier est responsable de la production du premier antibiotique impliqué dans le biocontrôle ; la phenazine dérivative. En plus d'autres antibiotiques sont produits par les rhizobactéries du genre *pseudomonas* : 2,4 diacéthylephoroglucinol (DAPG), Pyolutéorine (PLT), les Pyrrolnitrine (PRN) etc. (Allaire, 2005).

### 2.2.2 Les Sidérophores

Les sidérophores sont des molécules extracellulaires de faible poids moléculaire considérées comme des métabolites essentiels pour la régulation du fer (Fallahzadeh-Mamaghani et al., 2009). Ces molécules sont des transporteurs des ions ferriques à l'intérieur des cellules microbiennes. Les Pyoverdines sont des sidérophores complexes, produites par les *Pseudomonas fluorescents* (Ravel et Cornelis, 2003 ; Cornelis, 2010) ; elles sont composées par un chromophore dihydroxyquinoline fluorescent associé à un peptide de longueur et de composition variables. D'autres sidérophores Ferrichrome, Ferroxamine B, Pseudobactine, Pyochéline. Leurs mode d'action est lié à la compétition pour le fer, en carence de fer les antagonistes produisent les sidérophores qui ces dernières réduisent la germination des chlamydospores du pathogène *Fusarium* dans le sol. La capacité de produire des sidérophores est une propriété PGPR et est aussi considérée comme une propriété de biocontrôle, car la chélation du fer permet de restreindre la quantité disponible aux pathogènes (Trapet, 2015 ; Subramaniam, et Sundaram, 2020).

### 2.2.3 Production de l'acide cyanhydrique

Les cyanides sont des métabolites secondaires secrétés par plusieurs micro-organismes, produits directement à partir de la glycine ou à partir des glycosides cyanogènes. Ce sont des

substances volatiles inhibitrices, l'action bénéfique de ces composés est liée à la lutte biologique, soit par induction des mécanismes de défense des plantes ou par antagonisme direct avec l'agent pathogène (Bakker et Schippers, 1987). La stimulation de la production d'acide cyanhydrique a amélioré l'efficacité des bactéries à réduire la gravité de la maladie (Abbas-Zadeh et *al.*, 2009).

### 3 Les PGPR performante

#### 3.1 *Bacillus*

Le genre *Bacillus* et certaines de ses espèces portent une place importante dans l'histoire de la bactériologie (Bouhairi, 2017). Grâce à leur pouvoir antagoniste et leur capacité à produire un grand nombre d'antibiotiques et de métabolites antifongiques elles font partie des rhizobactéries les plus utilisées dans la lutte biologique (Handelsman et *al.*, 2009). Ce genre fait partie des principaux groupes de bactéries à intérêt médical. Ce sont des bâtonnets de diverses tailles formant des colonies de formes variées. Leur capacité à sporuler leur permet de tolérer des conditions nutritionnelles pauvres. Elles sont hétérotrophes et tirent leur énergie d'une large gamme de composés organiques par fermentation ou respiration. Les espèces du genre *Bacillus* sont capables de former des spores, qui leurs permettent de survivre long temps dans des conditions extrêmes telles que la dessiccation, la chaleur ou les radiations (Fatiha, 2014).

##### 3.1.1 Caractères bactériologiques

Le genre *Bacillus* regroupe des bactéries à Gram positif, caractérisées par leurs formes bacilles rectilignes à extrémités carrées ou arrondies, sporulés, selon les caractères biochimiques elles sont oxydase positive ou négative catalase positive pour la plupart, aérobies ou anaérobies facultatives, généralement mobiles grâce à une ciliature péritriche (Demeule, 2020).

##### 3.1.2 Classification

Selon Bergey et *al.* (1939), elle est classée comme suit :

Embranchement : Firmicutes

Classe : Bacilli

Ordre : Bacillales

Famille : Bacillaceae

Genre : *Bacillus*

### 3.2 *Pseudomonas*

Le genre *Pseudomonas* est un grand groupe bactérien particulièrement important qui appartient à la sous-classe des protéobactéries et comprend plus d'une centaine d'espèces ubiquitaires (Bossis et al., 2000). Les *Pseudomonas* font parties des bactéries les plus rencontrées dans la rhizosphère. Depuis la découverte du genre *Pseudomonas* par Migula (1894), beaucoup de noms d'espèces lui ont été assignés. Le nombre d'espèces a subi de nombreuses variations principalement dues à la description de nouvelles espèces et à divers changements de la définition du genre (Boukerma, 2017).

#### 3.2.1 Caractéristiques bactériologiques

Les bactéries du genre *Pseudomonas* sont des bacilles à Gram négatif, mobiles par des cils polaires (une ou plusieurs flagelles), droites et fines, sans spores, non exigeantes, aérobies strictes. Certaines espèces sont capables de produire des pigments fluorescents ou non fluorescents. Certaines produisent un pigment fluorescent appelé pyoverdine (jaune-vert), qui agit comme un sidérophore. Ces espèces sont classées dans le groupe des *Pseudomonas fluorescents* : *aeruginosa*, *chlororaphis* subsp. *chlororaphis*, *fluorescens*, *putida*, etc. Ces pigments ont une influence sur la virulence des bactéries. Les *Pseudomonas* du groupe non fluorescent sont notamment les espèces *alcaligenes*, *fragi*, *mendocina*, *stutzeri*, *pseudoalcaligenes*. Certaines espèces comme *aeruginosa*, *chlororaphis* subsp. *Aureofaciens* produisent des phénazines, des pigments non fluorescents, Le plus courant est la pyocyanine. Il est spécifique de *Pseudomonas aeruginosa* qui fonctionne comme un transporteur d'électrons. Les espèces de *chlororaphis* peuvent produire des pigments verts ou orange selon le biovar (Benchabane, 2005).

#### 3.2.2 Classification du genre *Pseudomonas*

La classification est la suivante (Palleroni, 1993) :

Règne : Bactéria

Division: Proteobacteria



Classe : Gammaproteobacteria

Ordre : Pseudomonadales

Famille: Pseudomonadaceae

Genre: *Pseudomonas*

## 4 Les PGPF (*Plant Growth-Promoting Fungi*)

Certains champignons stimulent la croissance et la défense de la plante, accompagnée avec une activité antagoniste envers différents phytopathogènes appelés récemment PGPF “*Plant Growth-Promoting Fungi*”. Les PGPF, peuvent être des champignons filamenteux voire même des levures également appelées PGPY pour “*Plant Growth-Promoting Yeasts*”, présents naturellement chez des plantes herbacées que chez les plantes ligneuses et sont à l’origine de symbioses remarquables telles que les mycorhizes (Harman et *al.*, 2004). Parmi lesquelles on cite les TR (*Trichoderma spp.*) qui constituent les PGPF les plus performantes.

### 4.1 Généralité sur les TR

Des découvertes récentes montrent que les *Trichoderma spp.* sont des symbiotes opportunistes et avirulents des plantes (Harman, 2006). Les TR sont des champignons filamenteux ubiquitaires connus pour leur capacité à coloniser une grande variété de niches, ainsi qu’antagoniser et contrôler de nombreux champignons phytopathogènes. Elles sont parmi les champignons saprophytes les plus courants dans la rhizosphère. Ils ont également des effets bénéfiques directs sur les plantes, notamment en améliorant de la croissance, de l’assimilation des nutriments et de la résistance systémique (Woo et *al.*, 2006). Il a été largement reconnu que les *Trichoderma spp.* utilisent de multiples mécanismes et différents modes d’action lorsqu’ils interagissent avec les plantes et d’autres microbes (Francesco et *al.*, 2008).

Les TR sont les champignons mycoparasites les plus étudiés et les plus appliqués dans la pratique, et environ 60 % des biopesticides contiennent des espèces de TR uniques ou combinées. *Trichoderma asperellum*, *Trichoderma atroviride*, *Trichoderma harzianum*, *Trichoderma virens* et *Trichoderma viride* sont couramment utilisés à cette fin (Szczałba et *al.*, 2019).

#### 4.1.1 Taxonomie

La classification taxonomique de *Trichoderma* selon Bissett (2004), est la suivante :

Domaine : Eukaryota

Royaume : Fungi

Division : Ascomycota

Classe : Euascomycètes

Ordre : Hypocreales

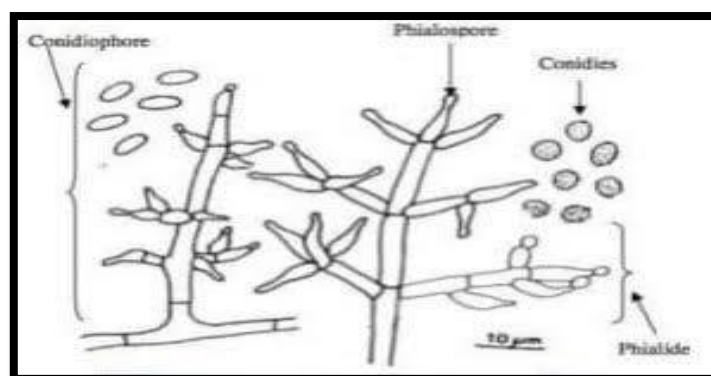
Famille : Hypocreaceae

Genre : *Trichoderma*

#### 4.1.2 Caractères macroscopiques et microscopiques

Macroscopiquement *Trichoderma sp.* est appréciée à partir de cultures sur différents milieux de culture (PDA, Sabauroud, Czapeck dox). Les colonies fongiques présentent un aspect légèrement floconneuses ou bien compactées en touffes. Elles sont colorées en fonction de la pigmentation des phialides. Après sa germination environ cinq jours, la conidie donne naissance à un mycélium blanc et stérile en forme de cercle. À partir du septième jour, une couleur verte est visible sur les parties aériennes du mycélium qui correspondent à la conidiogenèse.

Microscopiquement, on observe un mycélium composé d'hyphes jaunes, cloisonnée, ramifiés avec une paroi lisse. Les conidiophores ont une forme conique ou pyramidale, très ramifiés, ils portent des phialides en forme de flasques ou de quilles, que ces derniers portent les spores (Figure 05) (Ghorri, 2015).



**Figure 05** : Aspect microscopique de *Trichoderma sp.* (Samuels et al., 1994).

## 4.2 Importance des *Trichoderma*

### 4.2.1 Métabolites secondaires de *Trichoderma*

Elles constituent un groupe hétérogène de composés naturels qui sont considérés comme aidant l'organisme producteur à survivre et à remplir ses fonctions de base, telles que la compétition, la symbiose, le transport des métaux, la différenciation, etc.

La production de métabolites secondaires chez *Trichoderma sp.* dépend de la souche et comprend des substances antifongiques volatiles et non volatiles, comme la 6-n-pentyl-6H-pyran-2-one (6PP), la gliotoxine, la viridine, l'harzianopyridone, l'harziandione et les peptaibols. Ces métabolites secondaires produits par les *Trichoderma* jouent un rôle majeur dans l'interaction tripartite complexe entre la plante, les pathogènes et les antagonistes (Vinale et al., 2008).

### 4.2.2 Mycoparasitisme

Il s'agit d'un processus très complexe qui implique des événements séquentiels, notamment la reconnaissance, l'attaque, puis la pénétration et la mort de l'hôte. En contact de l'hôte, *Trichoderma* s'enroule autour des hyphes de l'hôte et forme des structures en forme de crochets qui l'aident à pénétrer la paroi cellulaire de l'hôte. Il s'agit d'un processus d'attaque directe d'un champignon sur un autre.

*Trichoderma sp.* peut exercer un bio-contrôle direct en parasitant une série de champignons, en détectant d'autres champignons et en se développant vers eux. La télédétection est partiellement due à l'expression séquentielle de protéines liées à la pathogénèse, principalement des chitinases, des glucanases et des protéases (Saba, 2012).

### 4.2.3 Stimulation de la résistance des plantes

L'effet global de biocontrôle de *Trichoderma sp.* a été considérablement amélioré par la stimulation des réponses de défense des plantes à l'attaque des pathogènes racinaires. Les souches de *Trichoderma* ajoutées à la rhizosphère protègent les plantes contre de nombreuses classes d'agents pathogènes ; ce qui indique l'induction des mécanismes de résistance similaires à la réponse hypersensible (HR), à la résistance systémique acquise (SAR) et à la résistance systémique induite (ISR) chez les plantes (Ben Amira, 2018).

## 1 La lutte biologique

### 1.1 Généralités

Au XX<sup>e</sup> siècle la lutte biologique est devenue un sujet d'études par les chercheurs et agriculteurs. Dans le domaine agronomique, on entend par lutte biologique toute forme d'utilisation d'organismes vivants ayant pour but de limiter la pullulation et/ou la nocivité des divers ennemis des cultures. Rongeurs, Insectes et Acariens, Nématodes, agents des maladies des plantes et mauvaises herbes sont justiciables d'une telle lutte, qui est basée sur des relations naturelles entre individus ou entre espèces, mises à profit par l'Homme de diverses manières (Lydie, 2010).

La lutte biologique contre les agents pathogènes des plantes est déterminée comme l'utilisation de processus biologique afin de baisser la densité d'inoculum des agents pathogènes dans le but de réduire leur capacité à induire la maladie (Baker et Cook, 1974). La réussite de la lutte biologique nécessite l'application d'un agent de biocontrôle efficace. L'efficacité est notamment liée à l'utilisation de plusieurs modes d'action et à la capacité de l'agent de lutte biologique à coloniser et à s'installer dans le milieu rhizosphérique des plantes (Singh et *al.*, 2003).

L'organisme vivant utilisé comme agent de lutte est un « auxiliaire » de l'Homme, dont l'agent pathogène auxiliaire peut être un Champignon, une Bactérie, un Virus, un Protozoaire. Il infecte l'hôte en général par ingestion et possède une forme de résistance lui permettant de passer et de demeurer dans le milieu (sol, feuillage, litière). L'agent pathogène se multiplie dans l'hôte et cause sa mort par destruction de tissus, par septicémie, parfois par l'émission d'une substance toxique (cas de Bactéries) (Lydie, 2010).

### 1.2 Utilisation des microorganismes contre d'autres microorganismes

Si l'organisme antagoniste est un microorganisme, on parle de lutte microbiologique. Un agent de lutte microbiologique doit présenter certaines critères ; la stabilité génétique de la souche, une efficacité à faible concentration et sur un grand nombre de pathogènes, faible exigence nutritionnelle, sa capacité d'adaptation et de survie aux conditions environnementales, une possibilité de production de masse à faible coût, absence de toxicité sur d'autres organismes, résistance aux pesticides et sa comptabilité avec d'autres traitements (Lepoivre, 2003).

### 1.2.1 Utilisation des bactéries contre des champignons

L'utilisation des bactéries autant qu'agent de lutte pour contrôler l'agent pathogène *Fusarium oxysporum f.sp.radicis-lycopersici*, fait appel aux PGPR (*Plant-Growth-Promotion-Rhizobacteria*) ou les PGPB (*Plant Growth Promotion Bactéria*) (Lugtenberg et Kamilova, 2009 ; Orozco-Mosqueda et al., 2020). Parmi ces derniers, de nombreux genres sont recensés tels *Achromobacter*, *Arthrobacter*, *Azotobacter*, *Azospirillum*, *Bacillus*, *Burkholderia*, *Enterobacter*, *Pseudomonas*, *Rhizobium*, *Serratia* et *Thiobacillus* (Bashan, 2013). Les *Pseudomonas fluorescents* et les *Bacillus* sont les principaux groupes de bactérie antagonistes du genre *Fusarium* par leur différent mécanisme de défense (Tableau 01).

### 1.2.2 Utilisation des champignons contre des champignons

L'utilisation des champignons non pathogènes comme agent de lutte biologique vis-à-vis l'agent pathogène *Fusarium oxysporum* fait appel à l'utilisation des AMF (*Arbuscular Mycorrhizal Fungi*) ou les PGPF (*Plant Growth Promotion Fungi*). Les principaux agents de lutte vis-à-vis *F.oxysporum* sont les TR (*Trichoderma spp.*) qui ont présenté des capacités antagonistes vis-à-vis un grand nombre d'agents pathogènes telluriques ou aériens (Harman, 2006), et ceci sur des cultures très diverses : coton, raisin, maïs doux, laitue, vigne, oignon, pois, prune, pomme, carottes, tomate, etc. (Tableau 01).

**Tableau 01** : Les principaux agents de lutte biologique vis-à-vis *F.oxysporum* (Lydie, 2010 ; Srivastava et *al.*, 2010 ; Birinchi Kumar Sarma et *al.*, 2015).

Classe	Espèces antagonistes	Agent pathogène cible
Bactéries	<i>Pseudomonas fluorescens</i>	<i>F.oxysporum</i>
	<i>Pseudomonas putida</i>	<i>F.oxysporum</i>
	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	<i>F.oxysporum</i>
	<i>Bacillus subtilis</i>	<i>F.oxysporum</i>
	<i>B.amyloliquefaciens</i>	<i>F.oxysporum</i>
Champignons	<i>Trichoderma harzianum</i>	<i>F.oxysporum</i>
	<i>Trichoderma viridae</i>	<i>F.oxysporum</i>
	<i>Trichoderma atroviride</i>	<i>F.oxysporum</i>

## 2 Autres moyens de lutte

### 2.1 La lutte chimique

À cause de son efficacité elle est considérée comme le moyen de lutte le plus utilisé, son seul désavantage qu'elle provoque plusieurs effets néfastes sur l'environnement et la santé des consommateurs ce qui a mené à la remplacer par l'utilisation de bio-fongicides comme lutte biologique. La désinfection du sol se fait par un fongicide chimique dont les plus utilisés le triazole et ces dérivés qui possèdent une activité pharmacologique antibactérienne, antifongique et hypoglycémique (Si Mohammed, 2017).

### 2.2 Lutte physique

C'est une méthode qui consiste à stériliser le sol par la chaleur, la solarisation avant transplantation ; ou bien de traiter les racines par l'eau chaude entre 48 et 49°C pendant 30 secondes (Anchisi et *al.*, 1985). Leurs désavantages ne sont pas des solutions efficaces à long terme (Smahi, 2008).



**Partie expérimentale :**  
**I. Matériel et méthodes**

Le présent travail a été réalisé au niveau du laboratoire de microbiologie, Université des frères Mentouri 1 ; Constantine. Il a porté sur la lutte biologique contre *Fusarium oxysporum* agent causal de la fusariose racinaire de la tomate. L'objectif consiste à :

- Isoler l'agent pathogène à partir de la racine de la tomate et les souches antagonistes PGPR (*Pseudomonas sp.* et *Bacillus sp.*) à partir du sol.
- Caractériser le potentiel de promotion de la croissance de souches antagonistes isolées *in vitro*.
- Etudier *in vitro* des interactions dans la rhizosphère entre les souches antagonistes (*Pseudomonas sp. fluorescent* ; *Bacillus sp.* et *Trichoderma sp.*) et le phytopathogène (*Fusarium oxysporum*).

## 1 Matériel

### 1.1 Matériel biologique

### 1.2 Les souches fongiques

Les souches utilisées dans cette étude appartiennent à deux genres de moisissures :

- ✓ Souche pathogène *Fusarium oxysporum* a été isolée à partir d'organe infecté.
- ✓ Souche antagoniste *Trichoderma sp.* isolée de source thermale (Hammam Debeh *Guelma*) a été offerte par notre promotrice Mme Belmessikh Aicha (Laboratoire de biologie et environnement, *Constantine*).

### 1.3 Les souches bactériennes

Les autres souches utilisées dans ce travail appartiennent à deux genres de bactéries ; ces deux souches antagonistes ont été isolées à partir du sol de *Biskra*.



### 1.4 Les milieux de culture (Annexe 01)

### 1.5 Les réactifs et solutions (Annexe 02)

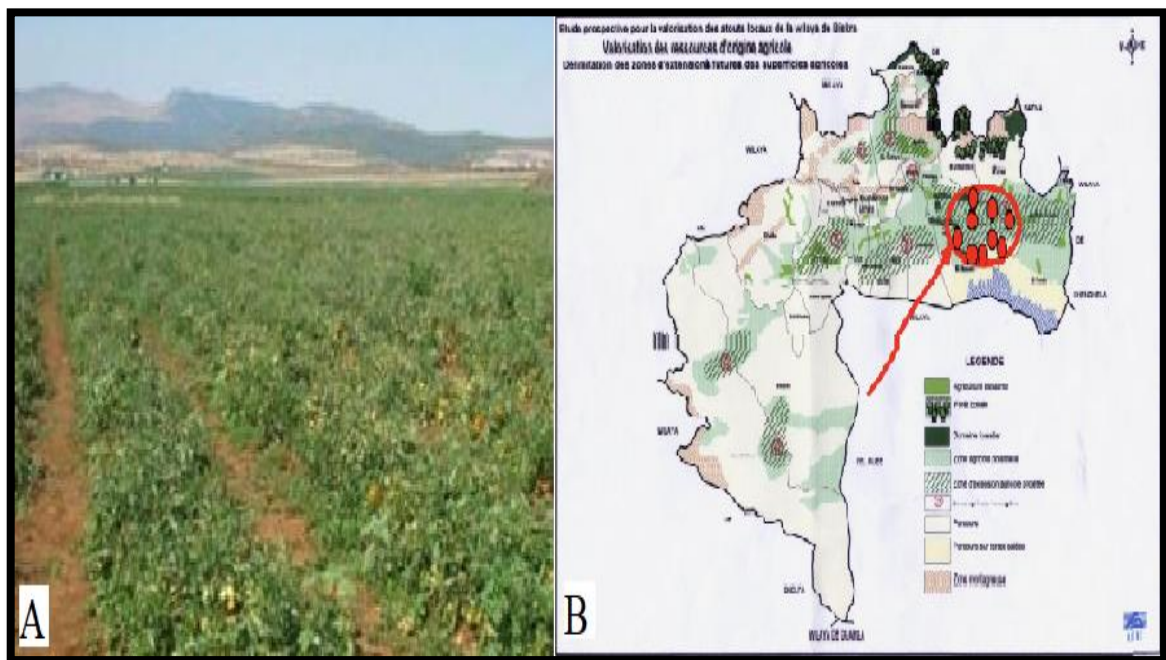
### 1.6 Appareillage (Annexe 03)

## 2 Méthodes

### 2.1 Echantillonnage

Les échantillons de sol que nous avons utilisés ont été prélevés à partir du site situé sur les champs cultivés de la tomate, dans la région de *Biskra* (Figure 06).

Le prélèvement a été effectué à partir de la rhizosphère de la tomate. L'échantillon a été prélevé à une profondeur de 10 cm de la surface, et a été mis dans un récipient stérile.



**Figure 06** : A : Site d'échantillonnage de la Wilaya de *Biskra* ; B : situation de la zone d'échantillonnage sur la carte graphique (Rekibi, 2015).

### 2.2 Suspension et dilution

Le principe de cette technique consiste à mettre une quantité de 10g de sol et la diluer dans 90 ml d'eau physiologique stérile. Cette suspension est homogénéisée avec un agitateur magnétique pendant 15 minutes, pour obtenir une dilution de  $10^{-1}$  correspondant à la solution

mère. Après agitation, des prélèvements successifs de 1ml de cette suspension sont introduits dans des dilutions décimales dans 9 ml d'eau physiologique jusqu'à l'obtention de la dilution  $10^{-5}$ .

### 2.3 Isolement des bactéries

#### 2.3.1 Isolement de *Pseudomonas sp. fluorescent*

Après la série de dilution, 0.1 ml de chacune des dilutions décimales est étalé par la méthode de râteau sur la surface des boîtes de Pétri contenant le milieu King B (KB) (Annexe 01). Après 48h d'incubation à 28°C, on a repéré les souches fluorescentes ; ces bactéries apparaissent fluorescentes sur ce milieu soit à l'œil nu, soit sous UV à 254 nm avec une fluorescence qui varie du bleu vers le jaune verdâtre selon l'espèce bactérienne. Les souches sélectionnées sont purifiées par culture en stries serrées sur milieu KB.

#### 2.3.2 Isolement de *Bacillus sp.*

Après la série de dilution et l'isolement de *Pseudomonas*, les dilutions décimales sont chauffées à 80°C pendant 10 minutes dans un bain marie pour sélectionner les espèces de *Bacillus*. Ensuite, chaque 0.1 ml de chacune des dilutions décimales est étalé par la méthode de râteau sur la surface des boîtes de Pétri contenant le milieu Luria Bertani (LB) (Annexe 01), ces dernières sont incubées à une température de 30°C pendant un intervalle de temps 24 à 48 heures.

### 2.4 Purification et conservation des souches bactériennes

Selon les caractéristiques macroscopiques que présentent les souches sélectionnées, purifiées, repiquées par ensemencement en stries sur milieu KB pour *Pseudomonas fluorescent*s et sur milieu LB pour *Bacillus* de façon à obtenir des souches pures. Elles sont ensuite soumises à la coloration de Gram et ainsi à la recherche de catalase. Ces deux tests préliminaires nous permettent de vérifier et d'orienter la recherche des deux souches. Les souches sont ensuite conservées dans le glycérol 20%.

### 2.5 Identification des souches antagonistes

Une identification approfondie a été réalisée, en suivant une approche taxonomique qui consiste à tester la production des pigments fluorescents sur milieu KB et à étudier quelques caractères morphologiques et biochimiques.

### 2.5.1 Test de fluorescence

Il est considéré selon Olmar et *al.* (2001), comme premier test pour une sélection préliminaire des isolats. La mise en évidence de la production du pigment fluorescent est réalisée sur milieu KB et sur milieu KA (King A), elle est révélée par UV (254nm) dans une chambre noire à UV, après une incubation de 3 à 5 jours à 28° C (Guiraud, 1998).

### 2.5.2 Caractères morphologiques

L'observation macroscopique des colonies constitue la première étape, qui nous sert comme une première caractérisation, avec une orientation des résultats au cours de l'identification. Deuxièmement, des observations microscopiques après coloration de Gram (Annexe 04), ont été établies afin de différencier le type de Gram (Gram positif ou Gram négatif), les bacilles et les coques (Oulebsir- Mohandkaci, 2012).

### 2.5.3 Coloration de vert de malachite

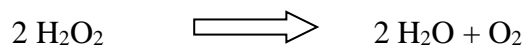
Certaines bactéries telles que les bactéries du genre *Bacillus* possèdent une structure résistante appelée endospore, ces dernières ne sont pas colorées par la plupart des colorants, mais une fois colorée elles résistent à la décoloration, leur morphologie et localisation varient d'une espèce à autre (Protocol Annexe 4) (Oulebsir- Mohandkaci, 2012).

### 2.5.4 Etude des caractères biochimiques

Les tests biochimiques permettent en général de distinguer les espèces, même étroitement apparentées entre elles. Il est possible de connaître certaines caractéristiques du métabolisme bactérien, grâce à cette étude.

#### — Recherche de catalase

Ce test est basé sur l'identification des bactéries aérobies telles que *Bacillus* et *Pseudomonas*, la présence d'enzyme catalase qui leur permet de vivre en présence d'oxygène. Chez les bactéries aérobies, il existe en plus de la chaîne respiratoire des cytochromes une autre chaîne accessoire courte, fixant l'hydrogène sur l'oxygène en aboutissant de l'eau oxygénée (peroxyde d'hydrogène) selon la réaction suivante :



L'ajout de quelques gouttes de l'eau oxygénée à la colonie permet la mise en évidence de cette enzyme, un dégagement gazeux traduit la présence d'une catalase (Oulebsir-Mohandkaci, 2012).

#### — Citrate de Simmons

Ce test permet de déterminer si la bactérie peut utiliser le citrate comme seule source de carbone ; le cas des *Pseudomonas*. La technique consiste à prélever une colonie âgée de 48h à partir de milieu KB et l'ensemencer sur milieu citrate de Simmons après sa solubilisation dans de l'eau physiologique et incubé la culture à une température de 28°C pendant 24h. Dans le cas des bactéries citrate positif, un virage de l'indicateur du pH du vert au bleu (khelil-Radji, 2015).

#### — Test de Mannitol Mobilité

Le test consiste à l'utilisation du milieu Mannitol mobilité pour chercher simultanément la fermentation du mannitol et la mobilité des bactéries. Dans le cas des résultats positifs, un virage de la couleur orange et la présence d'un trait de mobilité seront observés (Bekada, 2019).

#### — Croissance à 4°C et à 41°C

Ce test permet de différencier les *Pseudomonas fluorescents* et aussi d'identifier les souches bactériennes qui poussent à ces deux températures, car seule *Pseudomonas aeruginosa* peut supporter une température allant jusqu'à 42°C.

## 2.6 Préparation de la suspension bactérienne

À l'aide d'une anse de platine stérile, la crème bactérienne âgée de 48 h est raclée délicatement et mise en suspension dans 9ml de l'eau physiologique stérile, une bonne homogénéisation est pratiquée. Pour déterminer la concentration de cette suspension, l'absorbance a été mesurée à une longueur d'onde de  $\gamma = 620\text{nm}$ . Cette suspension a été ajustée par l'eau physiologique stérile à des concentrations de 0,08 CFU/ml.

## 2.7 Caractérisation du potentiel de promotion de la croissance des souches antagonistes isolés *in vitro*

### 2.7.1 Solubilisation des phosphates

Ce test permet d'évaluer la capacité de nos isolats à solubiliser les phosphates sur milieu de Pikovskaya (PVK) (Pikovskaya, 1948), ce milieu contient du  $K_2HPO_4$  comme seule source de phosphate et  $CaCO_3$  comme source de calcium (Annexe 01). Les isolats sont déposés sous forme de spots sur le milieu PVK solide. Après incubation à 28°C/10 jours, le diamètre total (diamètre de l'halo + diamètre de la colonie) est mesuré. Le diamètre de l'halo de solubilisation pour chacune des souches est déterminé en soustrayant le diamètre de la colonie du diamètre total (Bouras, 2018).

### 2.7.2 Production d'ammoniaque

Selon la méthode d'Ariana Alves et *al.* (2016), La production de  $NH_3$  est testée sur eau peptonée. La méthode consiste à inoculer 100  $\mu$ l de la culture bactérienne dans les tubes contenant l'eau peptonée, puis incubée à 30°C pendant 48h. L'addition de 0.5 ml du réactif de Nessler (Annexe 02) donne une couleur jaune à marron qui indique la production de  $NH_3$ .

### 2.7.3 Production d'HCN

Selon la méthode de Bakker et Schipperes (1987), la production l'acide cyanhydrique (HCN) est testée sur le milieu TSA additionné de glycine (4,4g/l). Les isolats sont ensemencés par stries sur la gélose en boîtes de Pétri. Un disque de papier Whatman N1 stérile 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 de Pétri. Celle-ci est scellée avec du papier parafilm et incubée à 30°C pendant 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 volatile (Benchabane, 2005).

### 2.7.4 Production d'AIA

La production l'AIA (Acide Indole-3-Acétique) ou des substances apparentées a été vérifiée, dont chaque isolat a été inoculé à l'aide d'une anse sous forme de stries, sur une boîte de Pétri contenant le milieu tryptophane modifié selon les isolats à inoculer. Un papier Wattman N1 stérile de 9 cm de diamètre, est déposé directement sur le milieu TLB

(Tryptophane Luria Bertani) (Annexe 01) et TKB (Tryptophane King B) (Annexe 01). Les boîtes de Pétri inoculées, ont été incubées en position inversée à 30°C pendant 72h. Après 3 jours d'incubation, le papier Whatman dont les colonies montrent une bonne croissance, a été imprégné de 2,5 ml du réactif de Salkowski (Annexe 02) puis ré-incubé pendant 20 minutes à l'obscurité. Le résultat positif de la synthèse de l'AIA se traduit par le changement de couleur (rose-rouge) observée (Sebihi et *al.*, 2020).

### 2.7.5 Production d'Amylase

La recherche d'Amylase est effectuée par la mise en culture des isolats sur une gélose à amidon (Annexe 01). Après incubation à 30°C pendant 5 jours, les boîtes de Pétri sont inondées par une solution d'iode lugol. Une réaction positive est marquée par l'apparition d'un halo clair autour des colonies (Holt et *al.*, 1994).

### 2.7.6 Production de Protéase

La production de la protéase a été déterminée par un halo clair formé autour des colonies poussant sur une gélose au lait écrémé, obtenue en mélangeant 1g d'agar suspendue dans 90ml d'eau distillée avec 10ml du lait écrémé (Sebihi et *al.*, 2020).

### 2.7.7 Production de Pectinase

La pectinase a été recherchée sur milieu KB additionné de 0.5 % de pectine. Les boîtes ensemencées sont incubées pendant 48h, puis inonder avec une solution d'iode lugol pendant 30 min. L'apparition d'un halo clair autour des colonies indique une réaction positive (Sebihi et *al.*, 2020).

## 2.8 Isolement du pathogène

Les prélèvements effectués à partir de l'hôte (racine infectée) (Figure 07) sont désinfectés par de l'eau de Javel 10% durant 30 minutes. Après désinfection, les échantillons sont lavés à l'eau distillée stérile puis séchés, puis sont coupés à l'aide d'un sécateur stérile, enfin placés sur une boîte de Pétri contenant du PDA (Annexe 01) et incubés à 28°C.

Après incubation, des filaments mycéliens apparaissent autour des petits fragments, et afin de purifier les souches résultantes, des repiquages successifs sur d'autres boîtes de Pétri contenant du PDA sont effectués. Les boîtes ont été mises en incubation pendant 7 jours à une température de 28°C.



Figure 07 : Racine infectée d'une plante de tomate.

## 2.9 Identification des isolats pathogènes

Selon Lesslie et Summerell (2006), l'identification des espèces de *Fusarium sp.* est basée sur les critères suivants :

- La taille et la forme des macroconidies,
- La présence ou l'absence des microconidies,
- L'aspect et la coloration du mycélium sur milieu PDA,
- La présence ou l'absence de chlamydozoospores.

## 2.10 Test de virulence

La virulence de l'isolat du champignon phytopathogène identifié comme *Fusarium oxysporum* est testée sur les graines de plante de la tomate, et la virulence se manifeste par l'inhibition de la germination des graines et de la croissance racinaire des plantules issus des graines germées.

Pour cela, un disque du champignon phytopathogène prélevé sur une culture âgée de 3 jours est placé au centre de boîtes de Pétri de 9 cm de diamètre contenant du milieu de culture PDA. Neufs graines de tomate désinfectées superficiellement avec de l'eau de Javel Cl 13° (10%) pendant 30 minutes, sont repiquées à la périphérie de chaque boîte. Les implantations

des graines et du champignon sur le milieu de culture se font en même temps (Figure 08 B). Les graines ont ainsi, le temps de germer avant d'être atteintes par les filaments mycéliens du champignon. La même expérience est refaite en absence de la rondelle du champignon en guise de témoin et les cultures sont incubées à 30°C pendant 7 jours (Figure 08 A). Le nombre de graines ayant germé est noté et le pourcentage de germination est ainsi calculé. Une graine germée est celle qui parvient à émettre une radicule. La virulence du champignon phytopathogène est estimée par le pourcentage d'inhibition de la germination selon l'équation(1) :

$$\text{PIG} = [(\text{PGTe} - \text{PGTr}) / (\text{PGTe})] \times 100 \quad (1)$$

PGTe : Pourcentage de Germination des Graines Témoins

PGTr : Pourcentage de Germination des Graines Traitées

PIG : Pourcentage d'Inhibition de la Germination (Nirina rakotoarimanga et *al.*, 2014).

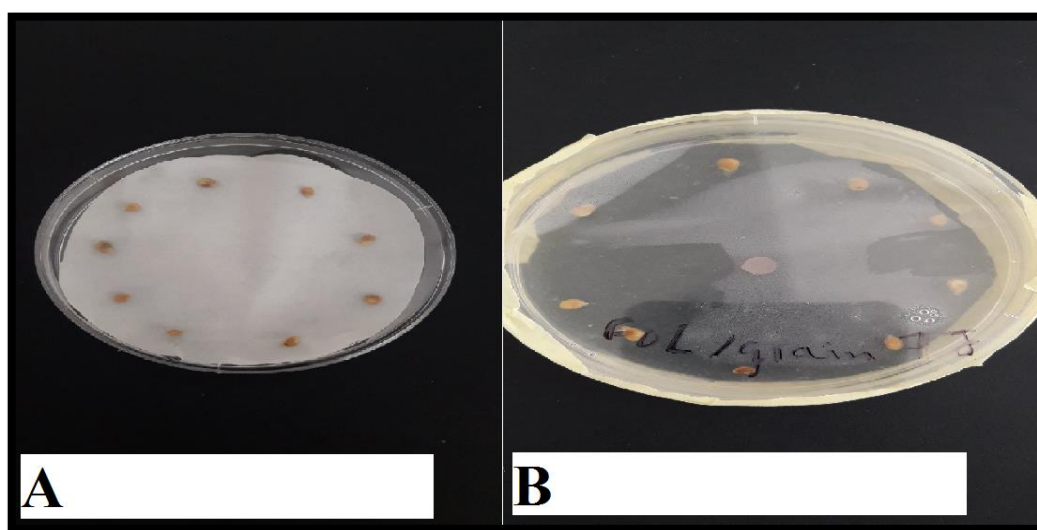


Figure 08 : Test de virulence sur les graines de tomate, A : témoin en absence de l'agent pathogène ;  
B : test sur les graines.

## 2.11 Production par Fermentation et extraction des métabolites bioactifs

### 2.11.1 Production par fermentation

- Selon le protocole de Najat et Kahkashan (2012), la mise en évidence de l'activité antifongique des métabolites secondaires produits par les souches antagonistes a été



effectuée. Le milieu de fermentation utilisé pour cet objectif est celui de PDB (Annexe 01). Pour cela, huit erlens meyers de 250ml contenant 50ml du milieu PDB, ont été inoculés par quatre disques de culture âgée de 7 jours pour la souche *Trichoderma sp.* et incubés à 28°C pendant 7 jours sous agitation de 150rpm. Après fermentation, les erlens meyers de la souche *Trichoderma sp.* ont été utilisés pour effectuer l'extraction des métabolites secondaires.

- Pour la fermentation des bactéries antagonistes, les deux milieux KB broth (Annexe 01) et LB broth (Annexe 01) sont utilisés, quatre erlens meyers de 250 ml, contenant 100 ml de chaque milieu ont été inoculés par une boîte raclée d'une culture âgée de 24h pour chaque souche des bactéries antagonistes et incubés sous agitation de 180 rpm pendant 72h à une température de 25°C. Après fermentation, les erlens meyers des souches de bactéries antagonistes ont été utilisés pour effectuer l'extraction des métabolites secondaires (Figure 09).

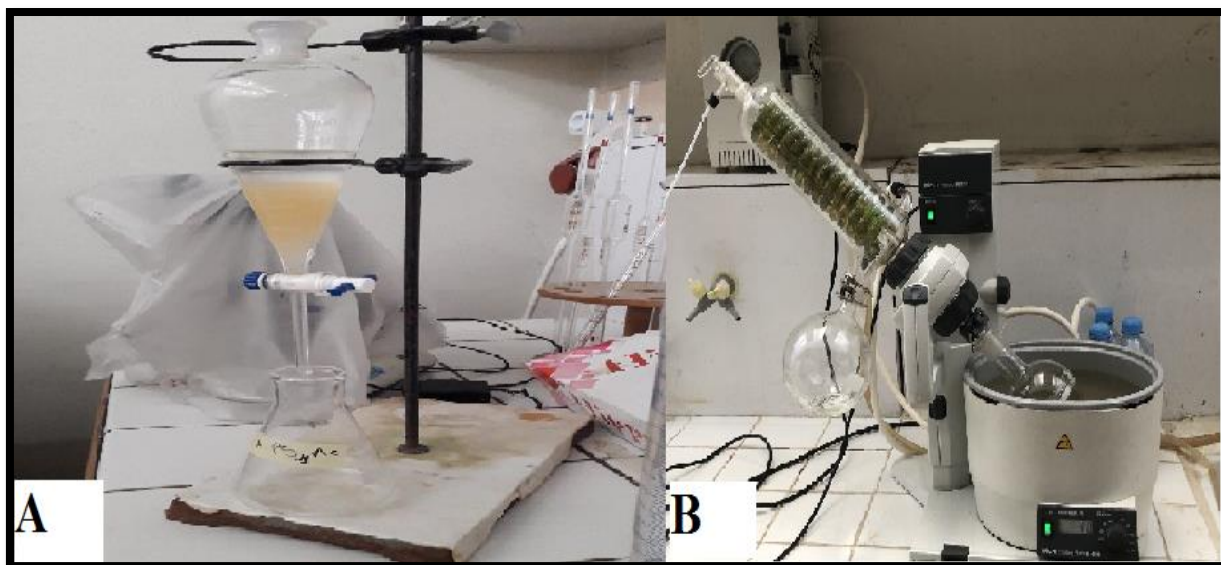


**Figure 09 :** Fermentation des souches antagonistes.

### 2.11.2 Extraction des métabolites bioactifs

Deux solvants ont été utilisés; chloroforme ( $\text{CHCl}_3$ ), acétate d'éthyle ( $\text{C}_4\text{H}_8\text{O}_2$ ), un volume équivalent de chacun des solvants a été utilisé pour les quatre erlens meyers. Une extraction

liquide-liquide discontinue à l'aide d'ampoule à décanter a été effectuée pour séparer les deux phases aqueuse et organique (Figure 10 A). Le solvant a été évaporé en utilisant l'appareil rotatif évaporation à une température de 40°C (Figure 08 B). Enfin, le résidu est recueilli de nouveau à l'aide de méthanol (Saber et *al.*, 2009).



**Figure 10** : Extraction liquide-liquide, A : ampoule à décanter ; B : rotavapor (Evaporateur rotatif).

### 2.11.3 Test de l'activité des molécules bioactives

Ce test est effectué avec les extraits organiques des souches antagonistes (*Pseudomonas sp. fluorescent* ; *Bacillus sp.* ; *Trichoderma sp.*) vis-à-vis le pathogène *Fusarium oxysporum*. De chaque extrait, à l'aide d'une pipette pasteur les disques de papier whatman N°1 de 6mm de diamètre sont imprégnés par les extraits organiques à raison de 40  $\mu$ l/disque. Le dépôt se fait par fraction progressive (à chaque fois on dépose 5  $\mu$ l de l'extrait jusqu'à l'obtention de 40  $\mu$ l par disque). Ensuite, ils sont déposés aseptiquement sur les boîtes de pétri pré ensemencées par le pathogène. Les boîtes de pétri sont placées à 4°C pendant 2 heures afin de permettre la diffusion des antibiotiques et l'inhibition momentanée de la croissance mycélienne. Après incubation à 30°C pendant 24h à 48h. Le résultat se présente par l'apparition d'un halo autour des disques et la lecture est effectuée par la mesure du diamètre des zones d'inhibition en mm (diamètre du disque compris) (Ghorri, 2015).

## 2.12 Test d'antagonisme *in vitro*

### 2.12.1 Test de confrontation directe

Le test de confrontation directe des souches antagonistes (*Pseudomonas sp.*, *Bacillus sp.*, *Trichoderma sp.*) a été effectué sur différents milieux :

- Milieu KB favorable au développement des *Pseudomonas sp. fluorescent.*
- Un mixte équilibré des deux milieux PDA et KB.
- Milieu LB favorable au développement des *Bacillus sp.*
- Un mixte équilibré des deux milieux LB et PDA.
- Milieu PDA favorable au développement des *Trichoderma sp.*

L'essai de l'antagonisme *in vitro* a été effectué comme suit :

- Première méthode consiste à mettre un disque du pathogène (5mm de diamètre) au centre de la boîte de pétri d'une culture de 7 jours sur milieu KB pour *Pseudomonas sp. fluorescent* et LB pour *Bacillus sp.* et trois disques de papier filtre imbibés de crème bactérienne d'une culture de 48h sur milieu KB dans la périphérie à une distance de 2.5 cm du centre de la boîte de pétri. La même technique est réalisée sur milieu Muller Hinton. Toutes les boîtes sont incubées à 28°C pendant 7 jours. La mesure du diamètre s'effectue chaque jour (Figure 11 A).
- Deuxième méthode consiste à mettre un disque du pathogène (5mm de diamètre) au centre de la boîte de pétri d'une culture de 7 jours sur milieu KB et un mixte équilibré des deux milieux KB/PDA pour *Pseudomonas sp. fluorescent.* et milieu LB et un mixte équilibré des deux milieux LB/PDA pour *Bacillus sp.* Ces deux bactéries sont ensemencées avec des stries ou avec un trait à une distance de 3 cm entre le pathogène et l'agent antagoniste (*Pseudomonas sp.* et *Bacillus sp.*) (Figure 11 B).
- Le milieu PDA est utilisé pour tester l'activité antagoniste de *Trichoderma sp.* Le test consiste à mettre un disque du pathogène (5mm de diamètre) d'une culture de 7 jours et un disque d'antagoniste tout en suivant un axe diamétral à 3 cm et équidistance du centre de la boîte. Les repiquages sont effectués en même temps. L'incubation est réalisée à 28 °C pendant 7 jours (Hibar et *al.*, 2005) (Figure 11 A).

L'activité inhibitrice des souches antagonistes vis-à-vis le champignon pathogène a été évalué par le pourcentage d'inhibition de la croissance mycélienne selon l'équation suivante :

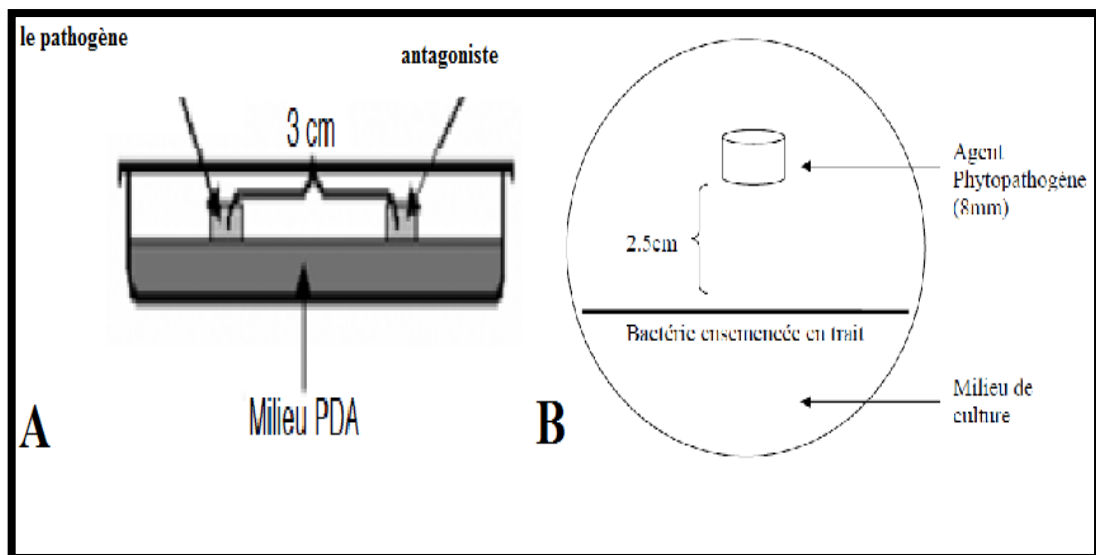
Taux d'inhibition :

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

**I (%) :** Taux d'inhibition de la croissance mycélienne.

**r:** Le diamètre moyen des colonies en présence de l'antagoniste (*Trichoderma sp.* et *Bacillus sp.* et *Pseudomonas sp. fluorescent*) (mm/j).

**R:** Le diamètre moyen des colonies témoins (mm/j) (Idris et al., 2007).

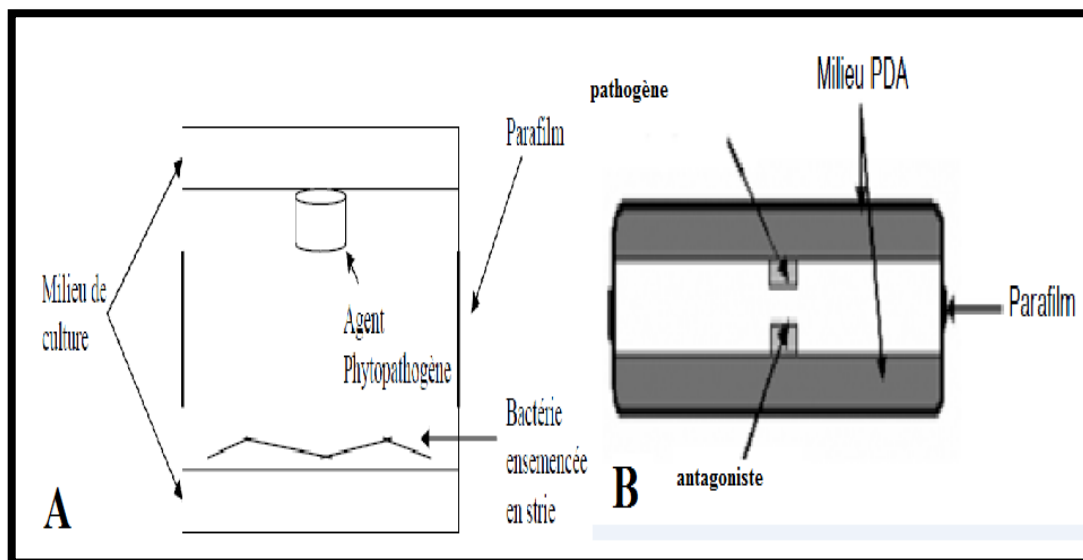


**Figure 11 :** Confrontation directe entre l'agent pathogène et l'agent antagoniste, A : confrontation directe entre *Trichoderma sp.* et le pathogène ; B : confrontation directe entre les bactéries antagonistes (*Pseudomonas sp. fluorescent* et *Bacillus sp.*) et le pathogène (Hibar et al., 2005).

### 2.12.2 Test de confrontation indirecte

La confrontation indirecte ou test à distance des substances volatiles consiste à repiquer l'agent antagoniste et l'agent pathogène dans deux boîtes séparées ; par la suite, un assemblage est réalisé par superposition des deux boîtes, l'agent pathogène en haut et l'agent antagoniste en bas. La jonction entre les deux boîtes est assurée par des couches de Parafilm

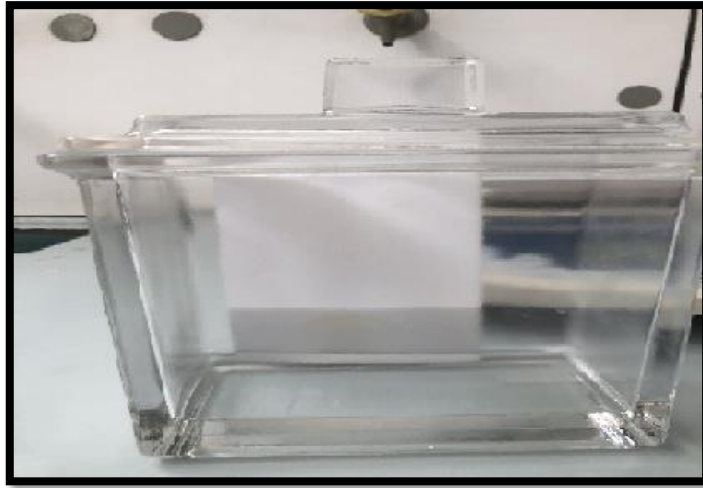
afin d'éviter toute déperdition des substances volatiles (Daami-Remadi, El Mahjoub, 2001). Incubation à 28°C pendant sept jours (Figure 12).



**Figure 12 :** Confrontation indirecte entre le pathogène et l'agent antagoniste, A : confrontation à distance entre les bactéries antagonistes (*Pseudomonas sp. fluorescent* et *Bacillus sp.*) et l'agent pathogène ; B : confrontation à distance entre *Trichoderma sp.* et l'agent pathogène.

### 2.13 Chromatographie sur couche mince

Nous avons utilisé des plaques de CCM (6cm X 12cm), le dépôt de l'extrait a été réalisé sous forme de spots (trois spots) placés chacune à 1cm du bord inférieur de la plaque avec une distance de 1.5 cm entre chaque spot, l'extrait a été déposé progressivement à l'aide d'une micropipette. La plaque est ensuite séchée dans l'étuve. Dans des cuves de verre contenant 50ml de système solvant, préalablement saturé par la vapeur du système éluant (Chloroforme/Acétate d'éthyle (v/v)) pendant 2 heures. La plaque CCM a été ensuite déposée (Figure 13). Après 15 minutes de distance parcourue par le solvant à partir des points de départ, la chromatographie est arrêtée et le solvant est éliminé. L'observation a été effectuée à l'aide d'une lampe UV (254nm).



**Figure 13 :** Chromatographie sur couche mince.

#### 2.14 Analyse statistique

Afin d'étudier l'activité des souches antagonistes vis-à-vis l'agent pathogène, par les deux méthodes de confrontation (confrontation directe et indirecte) sur différents milieux de cultures nous avons réalisé une analyse statistique des données en utilisant logiciel *STATISTICA* version 10, le test de variance (ANOVA) à un facteur  $p < 0.05$ .



## **II. Résultats et discussion**

### 3 Isolement des souches antagonistes

L'isolement des souches antagonistes (*Pseudomonas sp. fluorescent* et *Bacillus sp.*) a été effectué à partir de la rhizosphère de la tomate, de la région de *Biskra*. Ce sol est favorable pour la croissance des souches antagonistes de la tomate. Les cultures réalisées ont abouti à l'obtention de colonies bactériennes à divers aspects, textures et couleurs. Sur la base des caractéristiques des genres *Pseudomonas* et *Bacillus* que nous recherchons, des isolats de *Pseudomonas sp. fluorescent* et de *Bacillus sp.* ont été sélectionnés et purifiés.

### 4 Identification des souches antagonistes

#### 4.1 Identification de *Pseudomonas sp. fluorescent*

##### 4.1.1 Macroscopique et microscopique

Les isolats présumés genre *Pseudomonas* ont montré les caractéristiques suivantes :

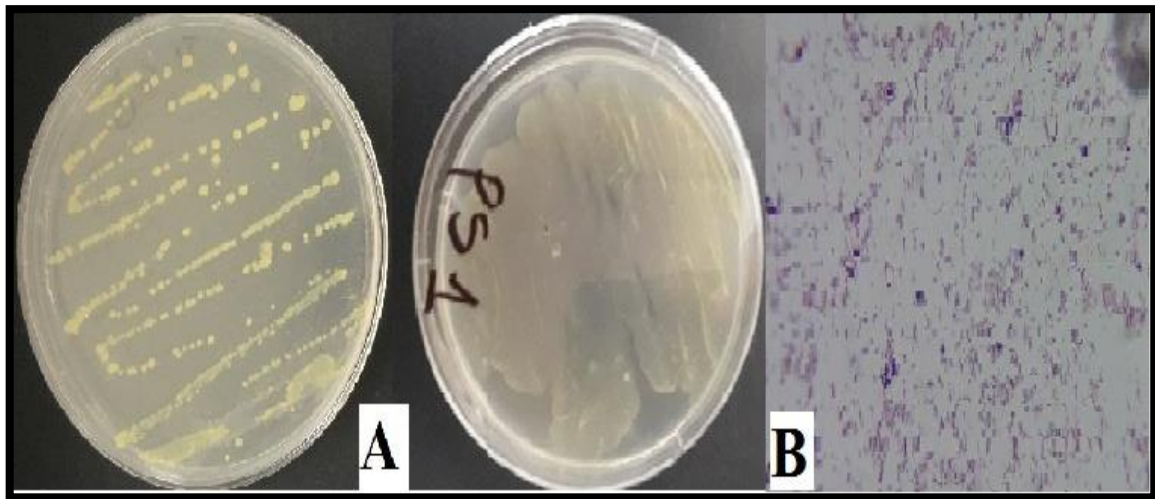
- La forme des colonies : ronde.
- La couleur des colonies : pigmentation jaune-verte.
- La taille des colonies par mesure du diamètre : comprise entre 1 et 3 mm (Figure 14 A).

Pour l'observation microscopique, la coloration de Gram nous permet de faire une étude morphologique des cellules bactériennes. (*Pseudomonas* : Gram négatif) (Figure 14 B).

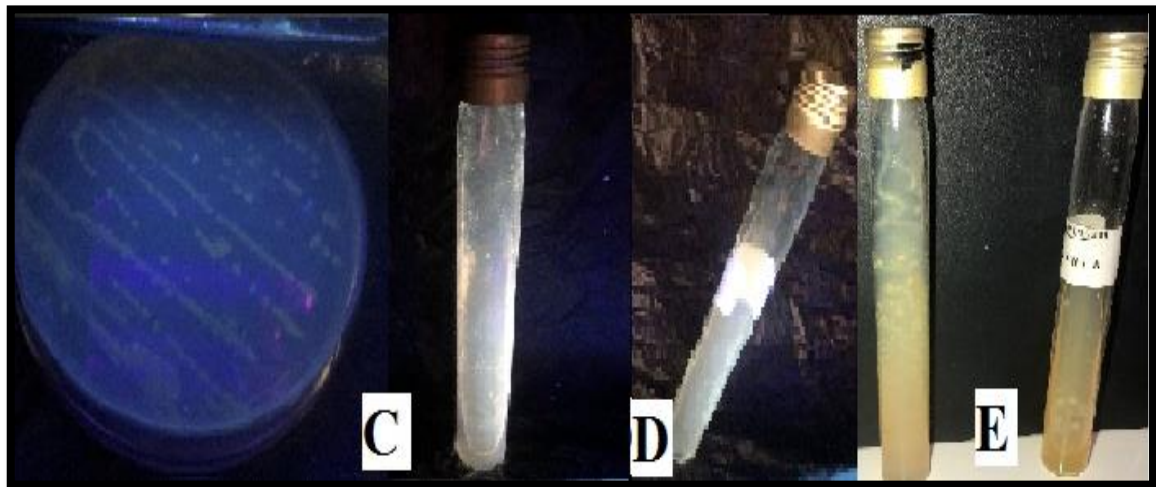
##### 4.1.2 Biochimique

Le test oxydase (Figure 16 G) et le test de fluorescence (Figure 15 ; C ; D ; E) sont considérés comme caractère taxonomique qui permettent de distinguer les *Pseudomonas sp. fluorescent*s. La fermentation mannitol et la mobilité (Figure 16 F1) de la souche ainsi que la fermentation de citrate de Simmons (Figure 16 F1) plus la croissance à 4°C et l'absence de la croissance à 41°C, ont confirmé que la souche sélectionnée appartient au genre *Pseudomonas sp. fluorescent* (Tableau 02).

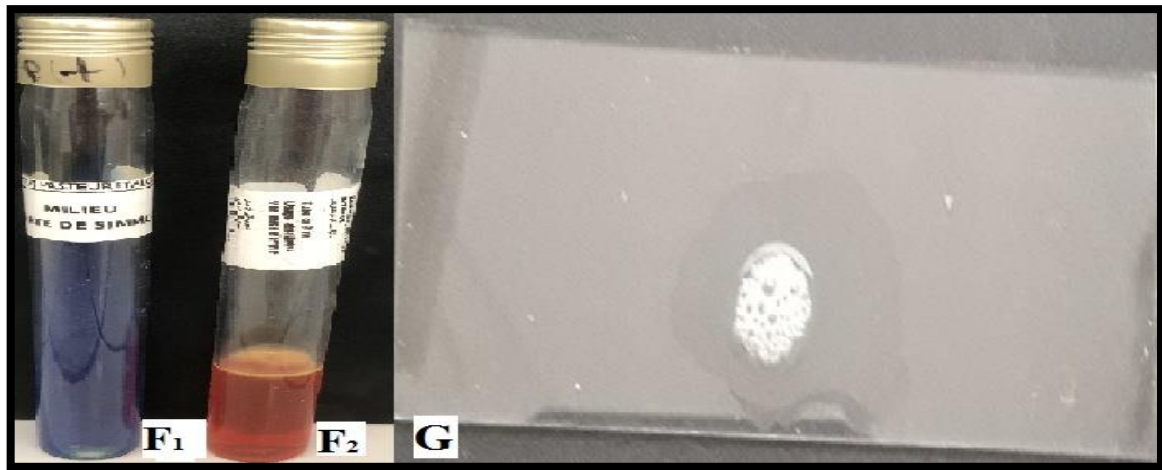




**Figure 14** : Certaines caractéristiques morphologiques de *Pseudomonas sp. fluorescent*, A : aspect macroscopique ; B : aspect microscopique.



**Figure 15** : Test de fluorescence de *Pseudomonas sp. fluorescent* ; C: fluorescence sur milieu KB ; D : fluorescence sur milieu KA (King A) sous UV ; E : fluorescence sur milieu KB (à gauche) et KA (à droite) à l'œil nu.



**Figure 16 :** Certaines caractéristiques biochimiques de *Pseudomonas sp. fluorescent*, F : test citrate de Simmons (F<sub>1</sub>) et Mannitol mobilité (F<sub>2</sub>) ; G : test catalase.

**Tableau 02 :** Caractères morphologiques et biochimiques de *Pseudomonas sp. fluorescent*s.

Test d'identification de <i>Pseudomonas sp. fluorescent</i>	Résultats
Coloration de Gram	Gram négatif (rose)
	Bacille
Test de fluorescence	Jaune verdâtre
Citrate de Simmons	Positive (virage au bleu)
Mannitol mobilité	Positive (virage de la couleur orange)
	Bactérie mobile (trouble)
Catalase	Positive
Croissance à 4°C et à 41°C	Croissance à 4°C
	Absence de croissance à 41°C
Fluorescence sur milieu King A	Absence de la fluorescence bleu-vert

Ces résultats rapprochent ceux d'Abdallah et Kaci (2015).

## 4.2 Identification de *Bacillus sp.*

### 4.2.1 Macroscopique et microscopique

Les caractères morphologiques de notre deuxième isolat sont :

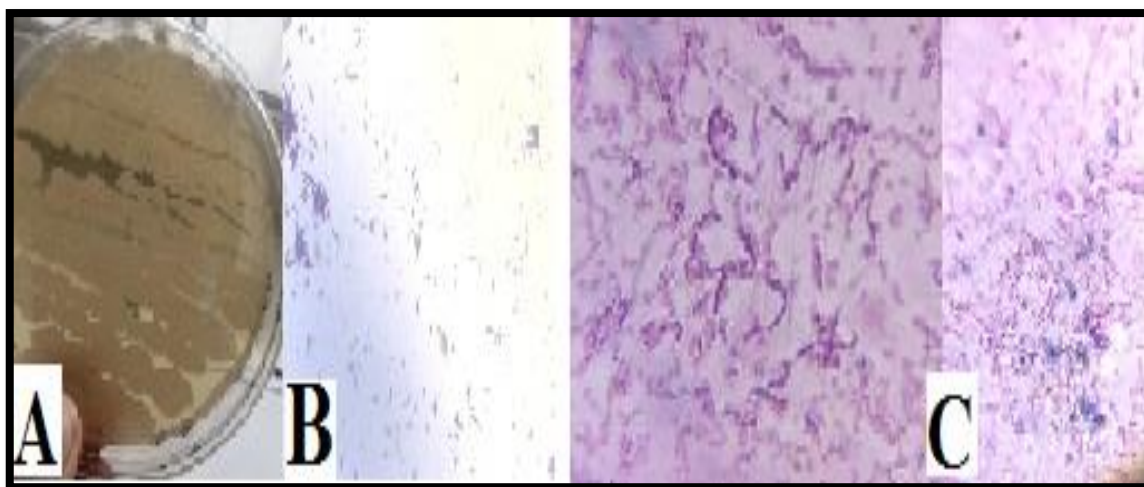
- La forme des colonies : ronde, irrégulière.
- La couleur des colonies : blanchâtre à crème.
- La taille des colonies par mesure de diamètre : comprise entre 1 et 3 mm (Figure 17 A).

En ce qui concerne l'observation microscopique, la coloration de Gram nous permet de faire une étude morphologique des cellules bactériennes (*Bacillus* : Gram positif) (Figure 17B).

Cette bactérie est caractérisée par la présence des endospores après coloration au vert de Malachite (Figure 17 C).

### 4.2.2 Biochimique

Le test catalase a été observé positif, il est considéré comme un test préliminaire de l'identification des *Bacillus* (Figure 18 E). Cet isolat présente un virage de l'indicateur du pH et un trouble au tour de la pique centrale dans le milieu mannitol mobilité, ce qui fait-elle mannitol mobilité positive. Vu qu'elle est aérobique, on observe un virage de la couleur seulement dans la partie supérieur (Figure 18 D).



**Figure 17** : Certaines caractéristiques morphologiques de *Bacillus sp.* , A : aspect macroscopique ; B : aspect microscopique (coloration de Gram) ; C : coloration des endospores.



**Figure 18** : Certaines caractéristiques biochimiques de *Bacillus sp.*, D : test de Mannitol mobilité ; E : test de catalase.

Ces résultats d'identification sont rassemblés dans le tableau ci-dessous, ce qui confirme que la deuxième souche bactérienne sélectionnée appartient au genre *Bacillus*.

**Tableau 03** : Caractères morphologiques et biochimiques de *Bacillus*.

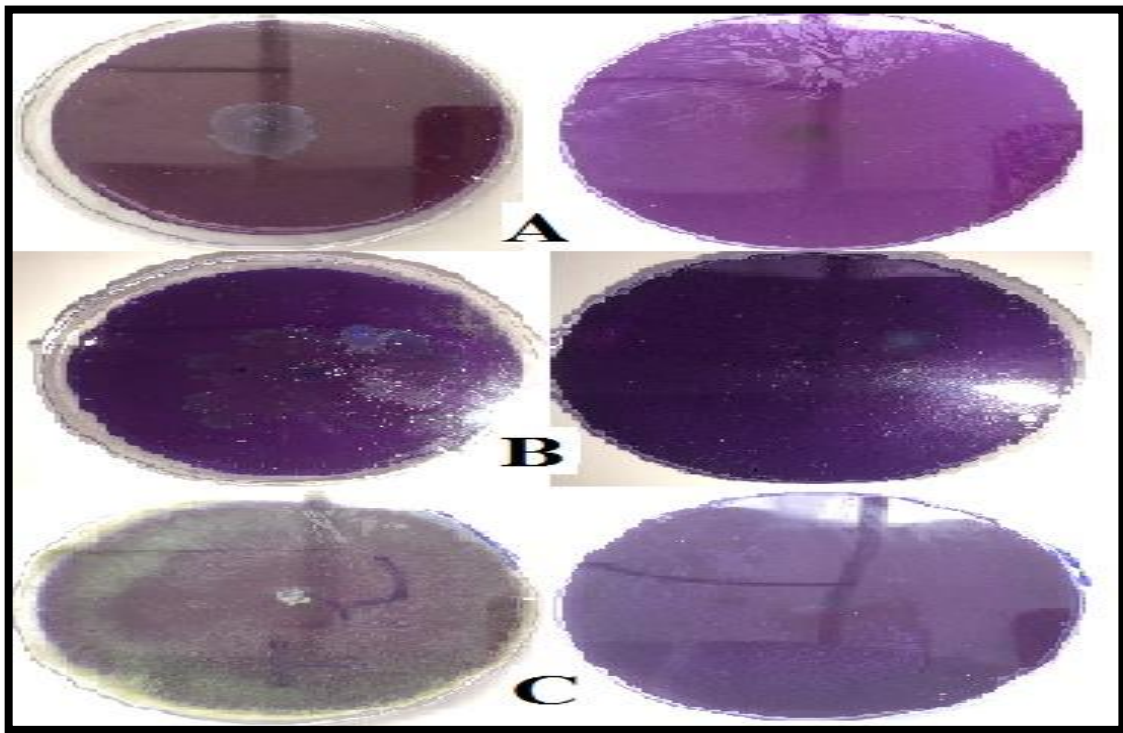
Identification de <i>Bacillus sp.</i>	Résultats
Coloration de Gram	Gram positif (violet)
	Bacille
Coloration de vert de malachite	Endospore : central ovoïde non déformante
Mannitol mobilité	Virage de la couleur du milieu
	Bactérie mobile
Catalase	Positive

Ces résultats sont en accord avec ceux de d'Ait Belkacem et Belgrade (2017).

## 5 Caractérisation du potentiel de promotion de la croissance des souches antagonistes isolées *in vitro*

### 5.1 La solubilisation de phosphate

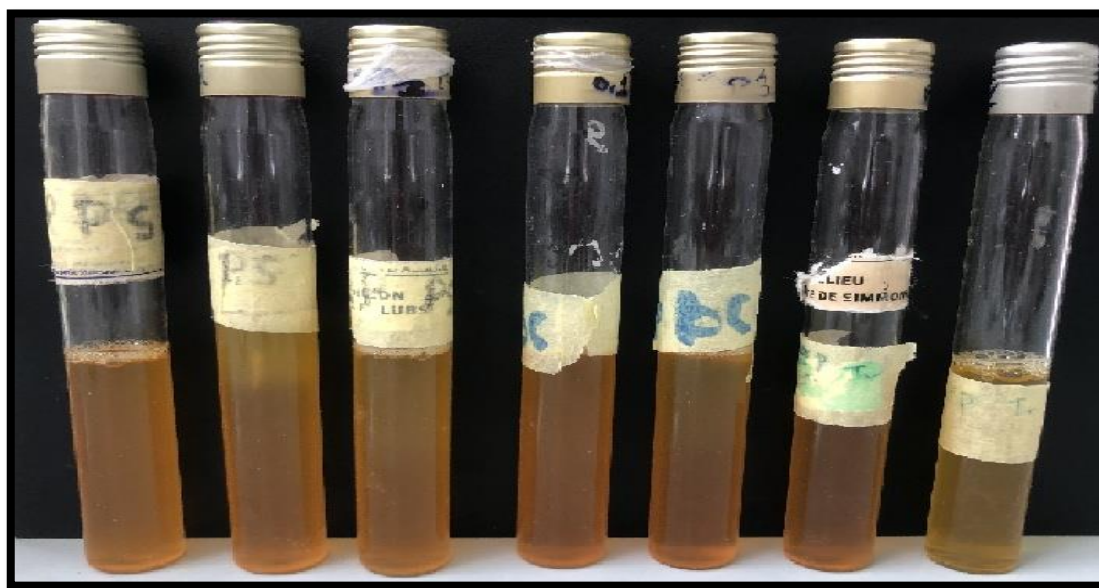
Les souches antagonistes (*Pseudomonas sp. fluorescent* et *Bacillus sp. Trichoderma sp.*) ont été testées pour leur efficacité à solubiliser le phosphate sur milieu Pikovskaya solide contenant le  $K_2HPO_4$  comme seule source de phosphore. Après 10 jours d'incubation à 28°C des trois souches antagonistes, les souches ont utilisé le phosphate organique pour leur croissance étant un composant important pour leur développement, mais ce dernier pour être solubilisé doit être en forme inorganique insoluble ( $Ca(PO_4)_2$ ). Autrement dit l'absence d'halo autour des colonies est due aux exigences métaboliques de chaque souche (Figure 19).



**Figure 19 :** Test de solubilisation de phosphate, A : absence d'halo autour de la colonie de *Pseudomonas sp. fluorescent* ; B : absence d'halo autour de la colonie de *Bacillus sp.* ; C : absence d'halo autour de la colonie de *Trichoderma sp.*

## 5.2 Production d'ammoniaque

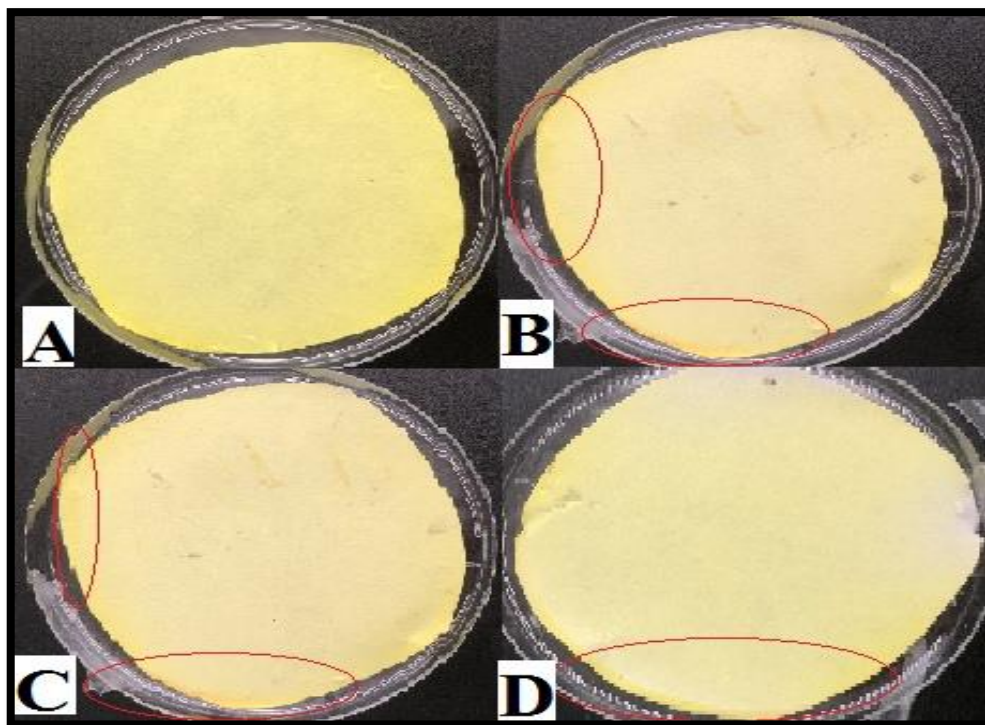
La capacité de produire l'ammoniaque a été testée sur l'eau peptonée, après une incubation de 48h à 30°C. L'ajout du réactif Nessler entraîne l'apparition d'un virage de couleur au jaune-marron qui traduit la production d'ammoniaque (Figure 20). Ces résultats se coïncident avec ceux de Laradj (2017).



**Figure 20 :** Production d'ammoniaque par les souches antagonistes.

## 5.3 Production d'HCN

La capacité des souches antagonistes à produire l'acide cyanhydrique a été révélée par la transformation de la couleur du papier Whatman du jaune au rouge/orange. Après 4 jours d'incubation à 30°C, les résultats obtenus ont montré une très faible production d'HCN sur les bords du papier (Figure 21). L'enzyme synthétase HCN est une flavoprotéine de la membrane qui catalyse la formation d'HCN et CO<sub>2</sub> de la glycine. Alors la production en très faible quantité peut être due à une faible concentration de la glycine dans le milieu TSA. Les résultats ne sont pas totalement en accord avec ceux de Sebihi (2016).

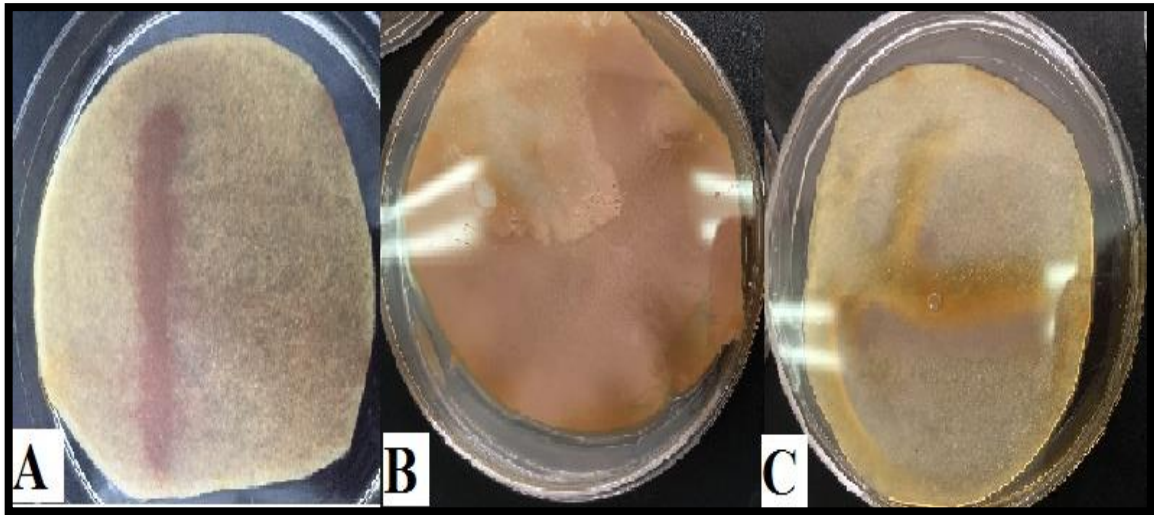


**Figure 21** : Production d'acide cyanhydrique, A : témoin ; B : production d'HCN par *Pseudomonas sp. fluorescent* ; C : production par *Trichoderma sp.* ; D : production d'HCN par *Bacillus sp.*

#### 5.4 Production de l'acide acétique indole

La capacité des souches antagonistes à produire l'AIA a été testée sur les différents milieux TLB et TKB. Pour cela, la synthèse de l'AIA a été révélée par le développement d'une couleur rose-rouge après l'ajout du réactif Salkowski sur les disques du papier whatman où les colonies se sont développées (Figure 22).

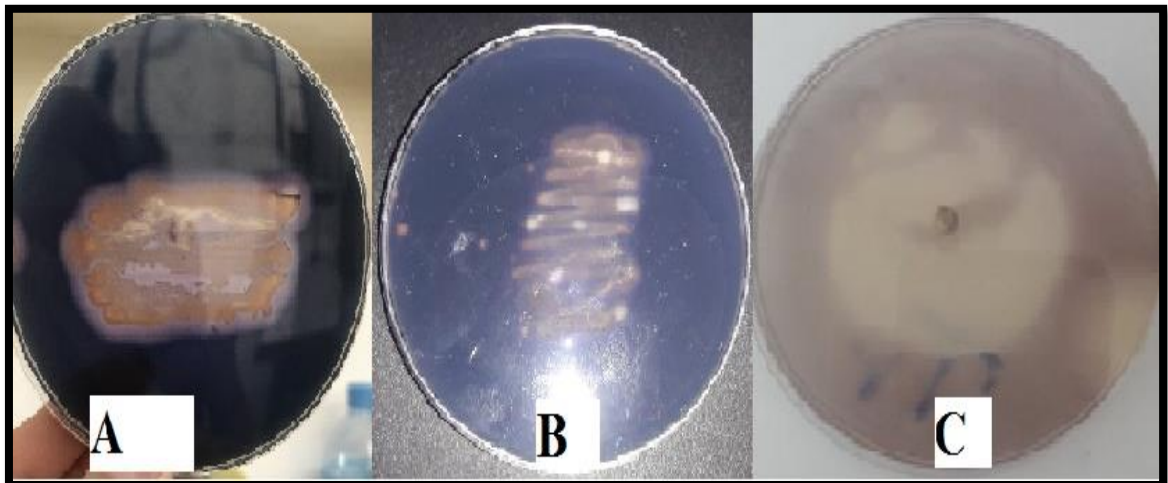
Ces résultats rapprochent ceux d'Ait Belkacem et Belgrade (2017). En outre, Khan et *al.* (2009) rapportent que les PGPR libèrent des auxines (AIA) dans la rhizosphère comme des métabolites secondaires.



**Figure 22 :** Production d'acide acétique indole par les souches antagonistes, A : production d'AIA par *Bacillus sp.* ; B : production d'AIA par *Pseudomonas sp. fluorescent* ; C : production d'AIA par *Trichoderma sp.*

### 5.5 Production d'amylase

La capacité des souches à produire l'amylase a été testée sur milieu gélose amidon, la production a été révélée par l'apparition d'un halo autour des colonies après l'ajout de l'indol-lugol (Figure 23). Ces résultats sont similaires à ceux trouvés par Yousfi (2013).

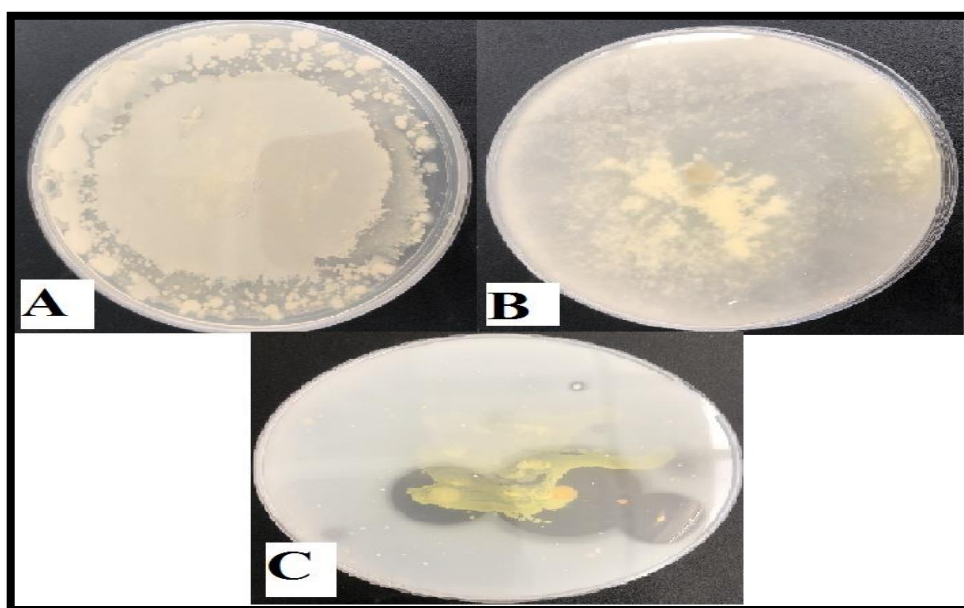


**Figure 23 :** Production d'amylase par les souches antagonistes, A : production d'amylase par *Pseudomonas sp. fluorescent* ; B : production d'amylase par *Bacillus sp.* ; C : production d'amylase par *Trichoderma sp.*



### 5.6 Production de protéase

L'activité protéolytique des souches antagonistes a été testée sur milieu gélose au lait, et révélé par l'apparition des zones claires autour des souches productrices. Cette dernière a été observée chez *Pseudomonas sp. Fluorescent* (Figure 24 C). Contrairement aux autres souches de *Bacillus sp.* (Figure 24 A) et de *Trichoderma sp.* (Figure 24 B), on observe une absence d'halo en raison de leur dispersion totale dans le milieu ce qui ne nous a pas permis de révéler leur activité alors qu'elles sont productrices de l'enzyme protéase.

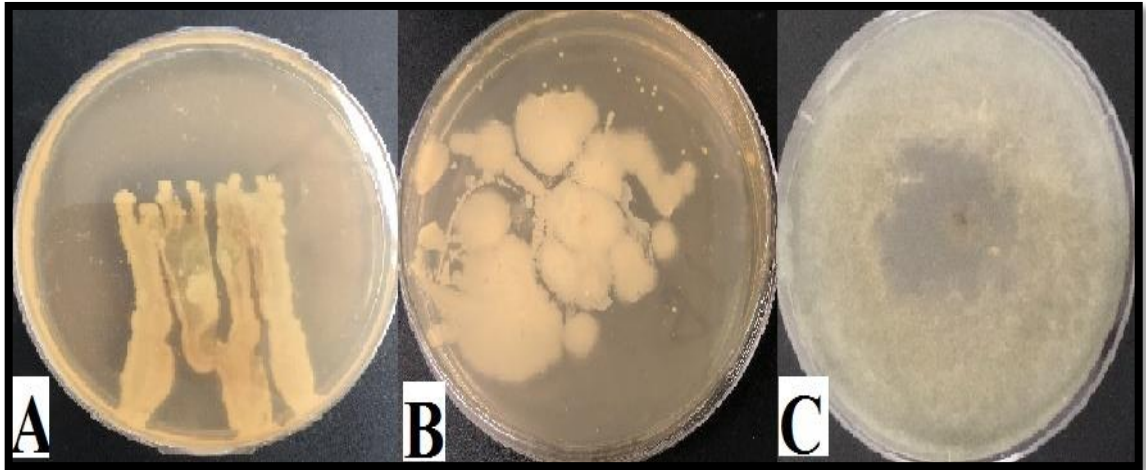


**Figure 24 :** Production de protéase, A : absence de la production chez *Bacillus sp.* ; B : absence de la production chez *Trichoderma sp.* ; C : production de protéase chez *Pseudomonas sp. fluorescent*.

### 5.7 Production de pectinase

La capacité des souches antagonistes à produire la pectinase a été testée sur milieu KB et LB additionné de la pectine, la production de pectinase a apparu chez *Pseudomonas sp. fluorescent* par la présence d'un halo autour de la colonie après l'ajout de l'iode lugol (Figure 25 A).

Ces résultats sont en accord avec Sebihi (2016), tandis qu'on ne l'observe pas autour de la colonie de *Bacillus sp.* et de *Trichoderma sp.* (Figure 25 B C) en raison de leur dispersion dans le milieu.



**Figure 25 :** Activité pectinase des souches antagonistes, A : production de pectinase par *Pseudomonas sp. fluorescent* ; B : absence de production de pectinase par *Bacillus sp.* ; C : absence de production par *Trichoderma sp.*

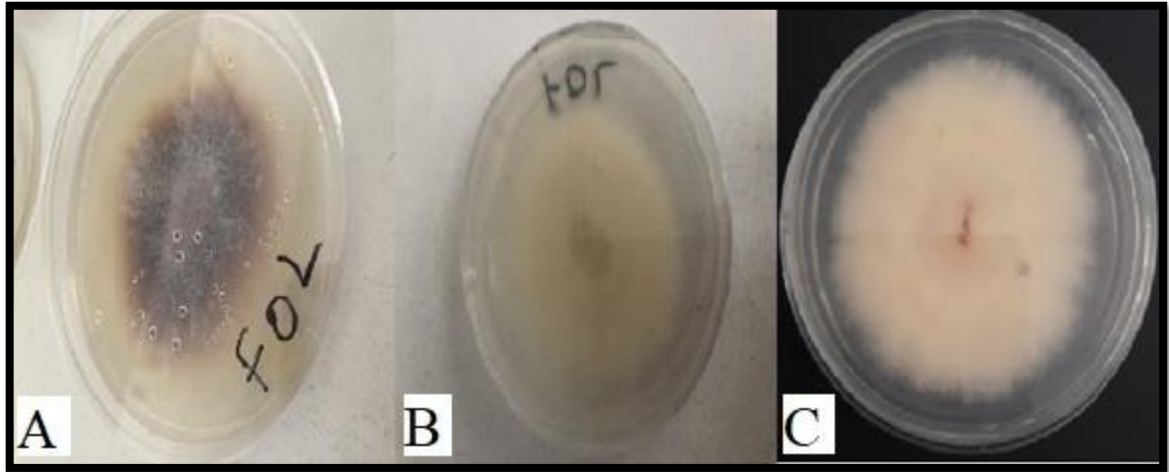
**Tableau 04 :** Résultats du potentiel de promotion de la croissance des souches antagonistes.

Tests	Résultats
Solubilisation de phosphate	-
Synthèse d'azote d'ammoniaque	+
Production de HCN	+
Production d'AIA	+
Amylase	+
Protéase	+/-
Pectinase	+/-

## 6 Identification des isolats phytopathogène

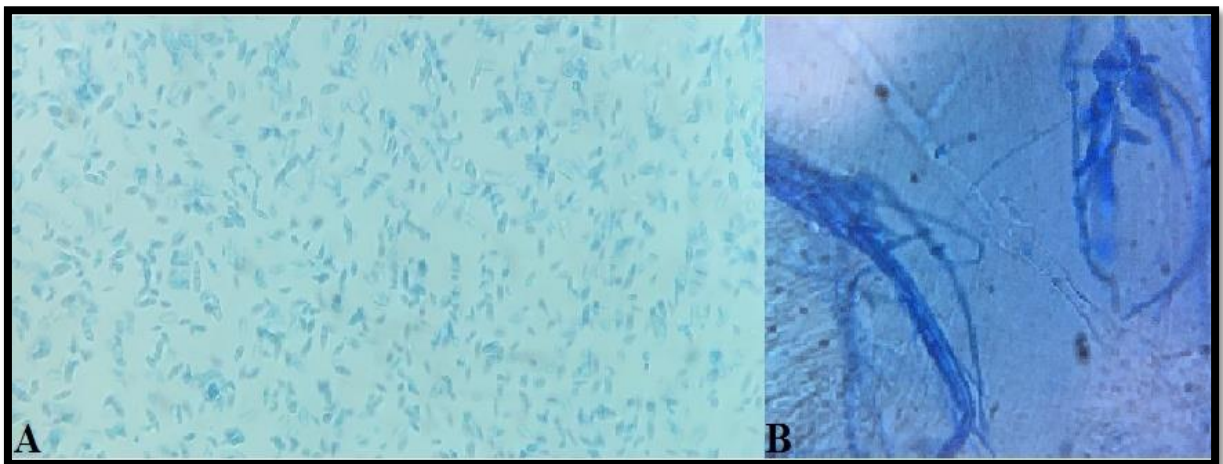
La détermination des *formae speciales* de *F. oxysporum*, malheureusement, se repose sur une longue procédure de contrôle de la pathogénicité chez les différentes espèces végétales.

Après incubation, 7 jours sur milieu PDA à 28°C des différents isolats présumés genre *Fusarium*, on a obtenu des colonies à mycélium très abondant et dense avec de différentes couleurs (rose, blanche, violette) envahissant toute la boîte, présentant un aspect cotonneux, ces critères ont conduit à une identification préliminaire du genre *Fusarium* (Figure 26 : A, B, C).



**Figure 26 :** *Fusarium oxysporum* obtenue à partir de l'isolement de l'hôte.

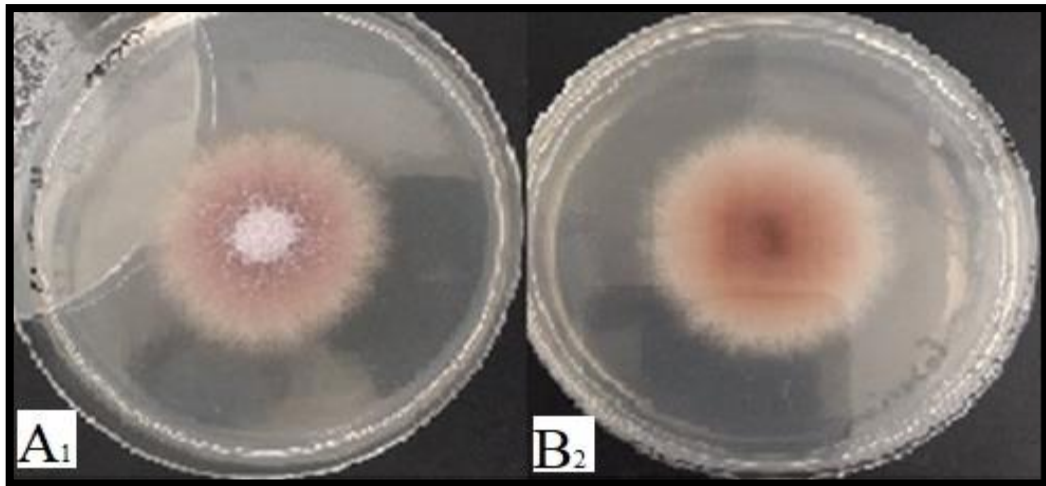
L'étude microscopique a révélé la présence d'un mycélium ramifié, cloisonné et des conidiophores portant de courtes phialides, ainsi la présence des microconidies (unicellulaires et bicellulaires) et des macroconidies variables qui sont abondantes (Figure 27 B et C).



**Figure 27 :** Aspect microscopique de *Fusarium oxysporum* ; A : microconidies (unicellulaire et bicellulaire) ; B : conidiophores portant de courtes phialides.

## 7 Test de virulence

Ce test a été réalisé en utilisant une seule souche pathogène (Figure 28). Les résultats de ce test sont représentés dans le Tableau 05.



**Figure 28** : Aspect macroscopique du pathogène sélectionné *Fusarium oxysporum*, A<sub>1</sub> : aspect de la colonie recto ; A<sub>2</sub> : aspect de la colonie verso.

**Tableau 05** : Les résultats de test de virulence.

Les graines testées	Nombre de graines germées		Nombre de graines non germées	
	7 jours	10 jours	7 jours	10 jours
Graines témoins	6 graines	8 graines	3 graines	1 graine
Graines traitées	2 graines	0 graine	7 graines	9 graines

$$PTG = (PGTe - PGTr)/(PGTe) * 100$$

$$PGTe = 77.77\%$$

$$PGTr = 22.22\%$$

$$PI = 71.42\%$$

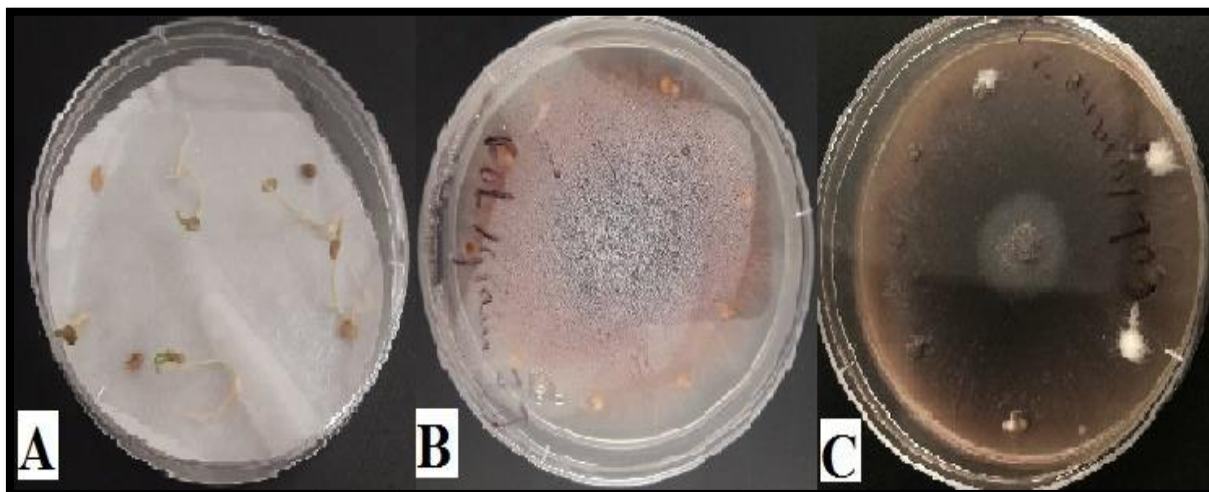
Après 7 jours d'incubation, (Figure 29 A et B) :

- Les graines traitées ont présenté un pourcentage de germination de 22.22%.
- Les graines témoins ont présenté un pourcentage de germination de 66.66%.
- Le pourcentage de la virulence est de 71.42%.

Après 10 jours d'incubation, (Figure 29 C) :

- Les graines traitées sont toutes infectées par le pathogène, alors que les graines témoins ont totalement germé.
- Le pourcentage de virulence est de 100%.

D'après les résultats obtenus, l'agent pathogène s'est montré virulent vis-à-vis de la germination des graines de la tomate.

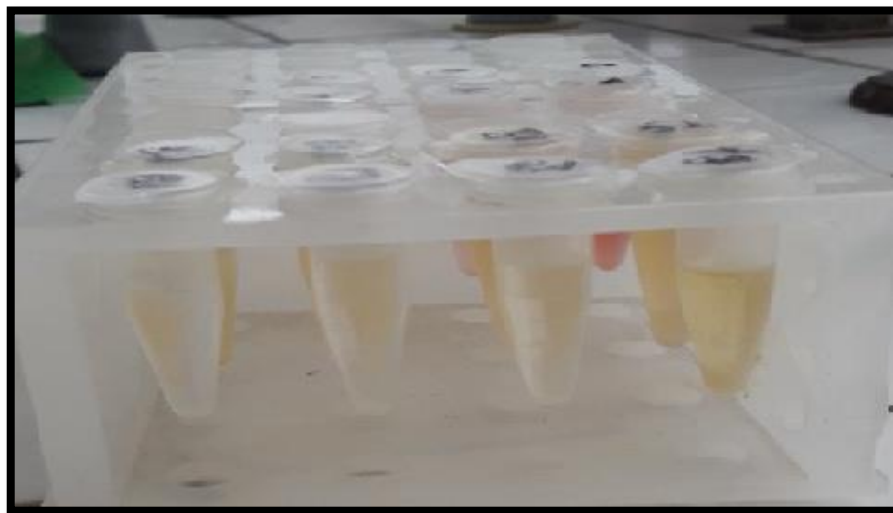


**Figure 29** : La virulence de *F.oxysporum* sur les graines de la tomate, A : témoin ; B : après 7 jours d'incubation, C : après 10 jours d'incubation.

### 7.1 Production par fermentation et extraction des métabolites bioactifs

Après une fermentation liquide (de 3 jours pour *Pseudomonas sp. fluorescent* et *Bacillus sp.* et 7 jours pour *Trichoderma sp.*) sous agitation, on a obtenu une biomasse visible (un trouble transparent pour les bactéries antagonistes et un anneau vert (conidies) pour le champignon antagoniste), les filtrats contenant les molécules bioactives ont été centrifugés afin d'éliminer toutes les cellules microbiennes, ensuite extraits à l'aide de deux solvants (Chloroforme et Acétate d'éthyle) par la méthode d'extraction liquide-liquide discontinue à

l'ampoule à décanter (où deux phases sont obtenues ; une phase organique et une phase aqueuse) et enfin on a éliminé le solvant par évaporation à l'aide d'un rotavapor à 40°C. L'extrait obtenu a été remis en suspension dans du méthanol et placé dans des tubes d'ependroff (Figure 30).



**Figure 30** : Les extrais des molécules bioactives après Rotavaporisation.

## 7.2 Quantités d'extraits produites par les souches antagonistes

Les résultats de chaque extrait obtenus sont décrits dans le tableau ci-dessous :

**Tableau 06** : La quantité de l'extrait obtenu après extraction par chaque solvant

Souches antagonistes / Solvants	Chloroforme	Acétate d'éthyle
<i>Pseudomonas</i>	0.01g	0.04g
<i>Bacillus</i>	0.01g	0.16g
<i>Trichoderma</i>	0.60g	0.09g

### 7.2.1 Par *Pseudomonas sp. fluorescent*

- Après l'extraction par le chloroforme on a obtenu une quantité de 0.01g qui a été dilué dans 5ml de méthanol afin d'obtenir une concentration de 2mg/ml (Solution mère SM).
- Après l'extraction par l'acétate d'éthyle on a obtenu une quantité de 0.04g qui a été dilué dans 5ml de méthanol afin d'obtenir une concentration de 8mg/ml (SM).

### 7.2.2 Par *Bacillus sp.*

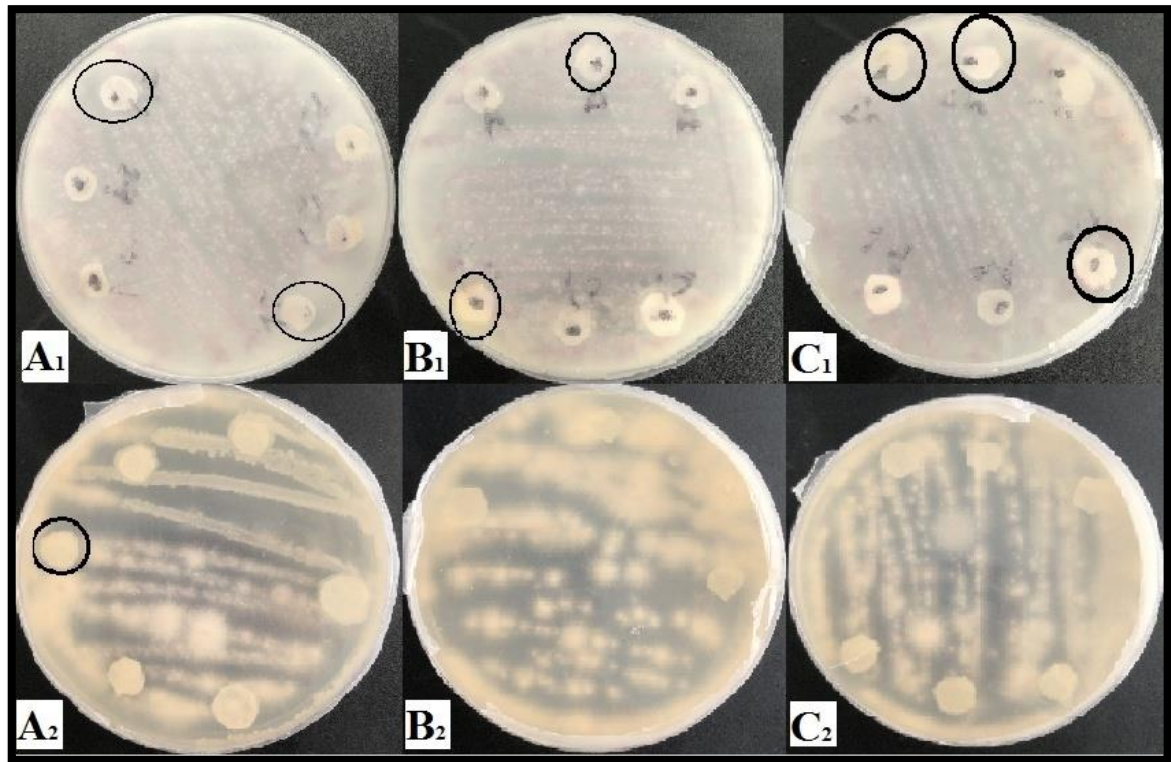
- Après l'extraction par le chloroforme on a obtenu une quantité de 01g qui a été dilué dans 5ml de méthanol afin d'obtenir une concentration de 2mg/ml (SM).
- Après l'extraction par l'acétate d'éthyle on a obtenu une quantité de 16g qui a été dilué dans 5ml de méthanol afin d'obtenir une concentration de 32mg/ml (SM).

### 7.2.3 Par *Trichoderma sp.*

- Après l'extraction par le chloroforme on a obtenu une quantité de 0.6g qui a été dilué dans 5ml de méthanol afin d'obtenir une concentration de 120mg/ml (SM).
- Après l'extraction par l'acétate d'éthyle on a obtenu une quantité de 0.09g qui a été dilué dans 5ml de méthanol afin d'obtenir une concentration de 18mg/ml (SM).

## 7.3 Activité des extraits contre *Fusarium*

Suite à une incubation de 48h, on a observé des halos autour de certains disques imbibés de l'extrait pour le test des extraits contre *Fusarium*. Lorsqu'on a dilué la SM des extraits on a observé que les souches n'ont pas montré le même effet sur la souche *Fusarium* (Figure 31 A ; B ; C).



**Figure 31 :** Activité des molécules bioactives des extraits chloroformiques et d'acétate d'éthyle, A<sub>1</sub> et A<sub>2</sub> : *Bacillus sp.* ; B<sub>1</sub> et B<sub>2</sub> : *Trichoderma sp.* ; C<sub>1</sub> et C<sub>2</sub>: *Pseudomonas sp. fluorescent.*

- En commençant par la souche *Pseudomonas sp. fluorescent*, l'extrait de chloroforme présente une zone d'inhibition plus visible que celle de l'extrait de l'acétate d'éthyle (Figure 31 C<sub>1</sub>). Ces résultats sont en accord avec ceux de Benchabane (2005) ; Benzina tihar et *al.* (2020).
- Au contraire, pour la souche *Bacillus sp.* l'extrait d'acétate d'éthyle présente une zone d'inhibition plus visible que celle de l'extrait de chloroforme (Figure 31 A<sub>1</sub> et A<sub>2</sub>).
- Par ailleurs, Pour la souche de *Trichoderma sp.* une zone d'inhibition visible pour les deux extraits de chloroforme et de l'acétate d'éthyle (Figure 31 B<sub>1</sub>).

Selon les résultats obtenus, le pathogène *Fusarium oxysporum* a montré :

- Une sensibilité moyenne avec les extraits d'acétate d'éthyle des trois souches antagonistes.
- Une sensibilité moyenne avec les extraits chloroformiques de *Pseudomonas sp. fluorescent* et de *Trichoderma sp.*
- Une très faible sensibilité avec l'extrait chloroformique de *Bacillus sp.*



## 8 Test d'antagonisme *in vitro*

Les tests d'antagonisme des souches antagonistes (*Pseudomonas sp. fluorescent* ; *Bacillus sp.* et *Trichoderma sp.*) vis-à-vis *Fusarium oxysporum in vitro* ont permis de déterminer le potentiel d'inhibition du pathogène.

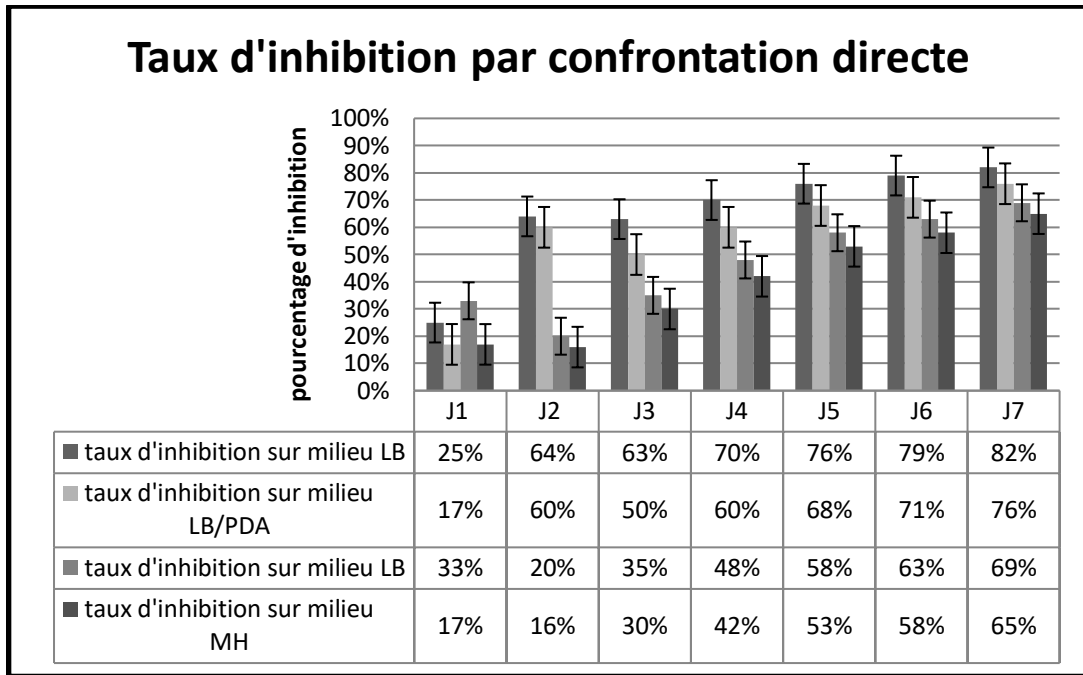
### 8.1 Confrontation directe

#### 8.1.1 *Bacillus-Fusarium*

Les résultats après 7 jours d'incubation, sont présentés dans le tableau ci-dessous :

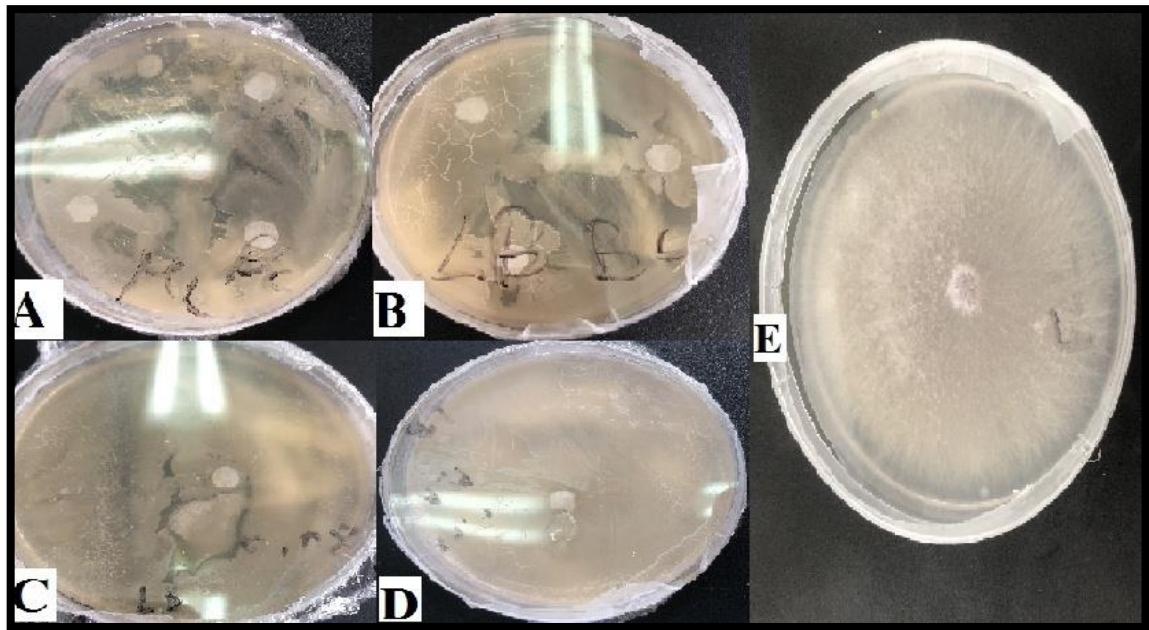
**Tableau 07** : Taux d'inhibition par confrontation directe (*Bacillus sp.* vis-à-vis *F.oxysporum*).

Jours	Taux d'inhibition sur milieu LB	Taux d'inhibition sur milieu LB/PDA	Taux d'inhibition sur milieu LB	Taux d'inhibition sur milieu MH	Taux de croissance du Témoin
<b>J1</b>	25%	17%	33%	17%	14%
<b>J2</b>	64%	60%	20%	16%	29%
<b>J3</b>	63%	50%	35%	30%	47%
<b>J4</b>	70%	60%	48%	42%	59%
<b>J5</b>	76%	68%	58%	53%	73%
<b>J6</b>	79%	71%	63%	58%	82%
<b>J7</b>	82%	76%	69%	65%	100%



**Figure 32 :** Le taux d'inhibition du pathogène par l'agent antagoniste *Bacillus sp.*

D'après les résultats obtenus sur les deux milieux (milieu LB et un mixte de milieu LB/PDA), on observe une inhibition très importante de l'agent pathogène par l'antagoniste *Bacillus sp.* dont la croissance mycélienne s'est arrêtée à partir du 3<sup>ème</sup> jour (Tableau 07, Figure 32 et 33).



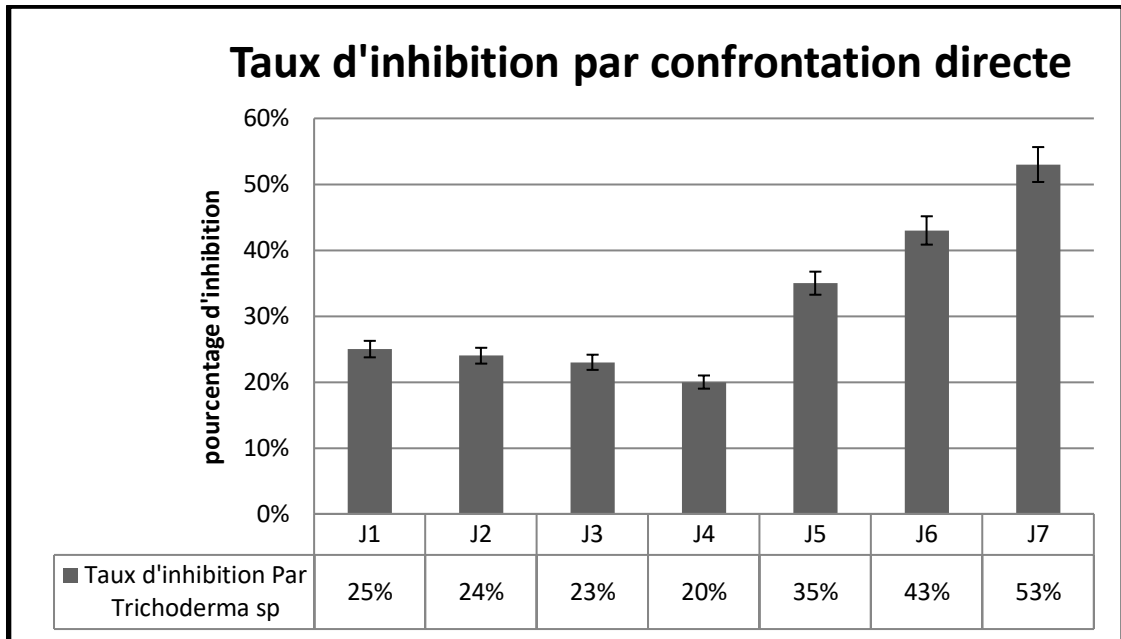
**Figure 33** : Confrontation directe entre *Bacillus sp.* et le pathogène, A : méthode de disque sur milieu Muller-Hinton ; B : méthode de disque sur milieu Luria Bertani ; C : méthode de trait sur milieu LB ; D : méthode de stries sur milieu LB/PDA ; E : témoin.

### 8.1.2 *Trichoderma-Fusarium*

Les résultats après 7 jours d'incubation, sont présentés dans le tableau ci-dessous :

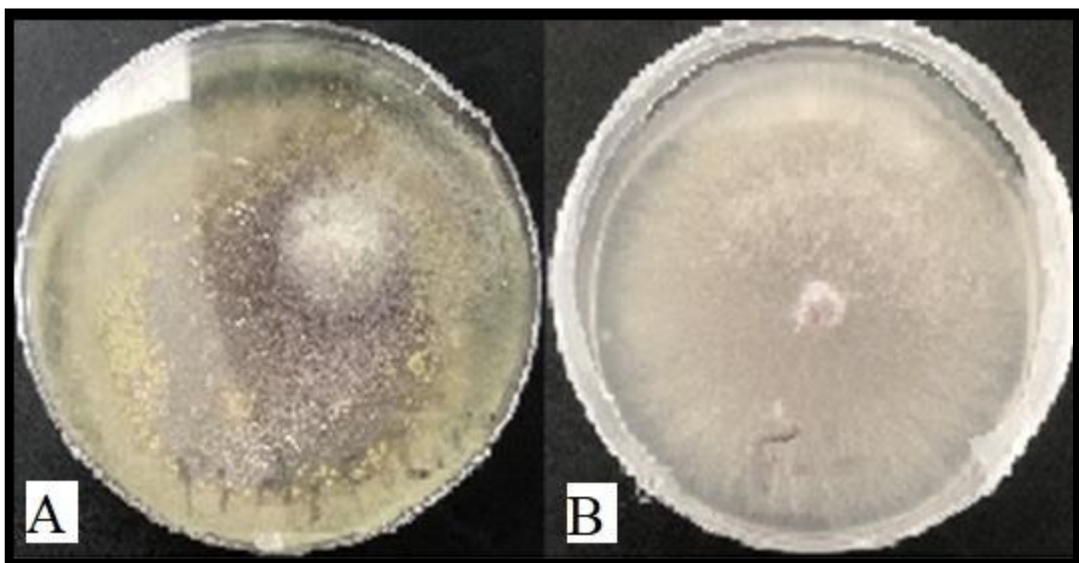
**Tableau 08** : Taux d'inhibition par confrontation directe (*Trichoderma sp.* vis-à-vis *F. oxysporum*)

Jours	Taux d'inhibition Par <i>Trichoderma sp.</i>	Taux de croissance du Témoin
J1	25%	14%
J2	24%	29%
J3	23%	47%
J4	20%	59%
J5	35%	73%
J6	43%	82%
J7	53%	100%



**Figure 34 :** Le taux d'inhibition de *F.oxysporum* par l'agent antagoniste *Trichoderma sp.*

D'après les résultats obtenus, on remarque qu'à partir du 4<sup>ème</sup> jour la croissance du pathogène s'est arrêté par rapport au témoin (Tableau 08, Figure 34, Figure 35). De ce fait on peut exprimer cette inhibition grâce à sa capacité de produire des enzymes et des métabolites qui agissent comme des antifongiques. Ces résultats se rapprochent de ceux de Mohamed Cherif et Benhamou (1990) ; Mesfek et Belabassi (2016) ; Ghorri (2015).



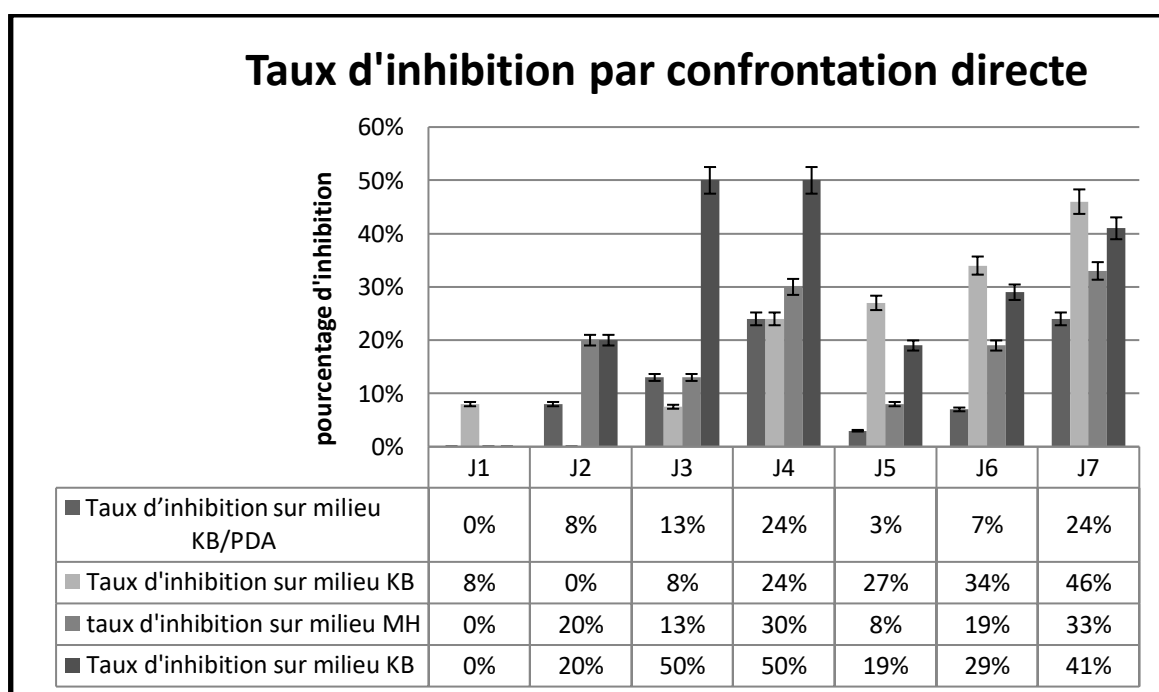
**Figure 35 :** Test de confrontation directe, A : confrontation entre *Trichoderma sp.* et *Fusarium oxysporum* ; B : témoin.

8.1.3 *Pseudomonas -Fusarium*

Les résultats après 7 jours d'incubation, sont présentés dans le tableau ci-dessous :

**Tableau 09** : Taux d'inhibition par confrontation directe (*Pseudomonas sp. fluorescent* vis-à-vis le pathogène *F.oxysporum*).

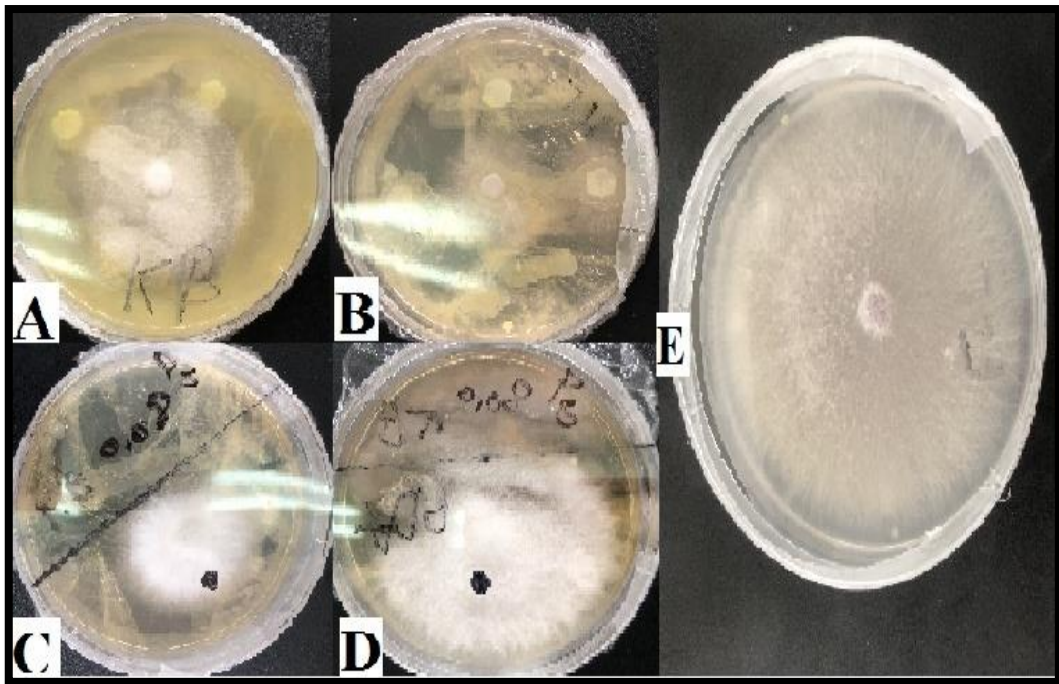
Jours	Taux d'inhibition sur milieu KB/PDA	Taux d'inhibition sur milieu KB	Taux d'inhibition sur milieu MH	Taux d'inhibition sur milieu KB	Taux de croissance du Témoin
J1	0%	8%	0%	0%	14%
J2	8%	0%	20%	20%	29%
J3	13%	8%	13%	50%	47%
J4	24%	24%	30%	50%	59%
J5	3%	27%	8%	19%	73%
J6	7%	34%	19%	29%	82%
J7	24%	46%	33%	41%	100%



**Figure 36** : Le taux d'inhibition par confrontation directe de *Pseudomonas sp. fluorescent* vis-à-vis *F.oxysporum*.

Les résultats obtenus sur les deux milieux (KB et mixte de milieu KB/PDA), se rapprochent avec des pourcentages identiques pendant les deux premiers jours et le quatrième jour, dans les derniers jours l'inhibition sur milieu KB été plus importante, tandis que sur les deux milieux (milieu KB et MH) on observe que le taux d'inhibition par méthode de disque sur milieu KB est plus important que celui sur milieu MH. Cette activité inhibitrice sur milieu KB est due à la production des sidérophores en carence de fer sur ce milieu, et à la production d'antibiotique et d'autres mécanismes toxiques sur milieu mixte PDA/KB et MH (Tableau 09 ; Figure 36, Figure 37).

Les résultats précédents ont démontré que la croissance mycélienne du témoin est plus importante en comparaison avec la confrontation directe des souches antagonistes contre le pathogène. Ces résultats se rapprochent de ceux de Bounoua (2012) et ceux de Herati et Seghir (2019).



**Figure 37 :** Confrontation directe entre *Pseudomonas sp. fluorescent* et l'agent pathogène, A : méthode des disques sur milieu KB ; B : méthode des disques sur milieu MH ; C : méthode de strie sur milieu KB ; D : méthode de trait sur milieu KB/PDA ; E : témoin.

## 8.2 Analyse statistique de la confrontation directe sur les différents milieux

L'étude statistique a été réalisée à l'aide de logiciel informatique *STATISTICA*, nous permet d'analyser la variance de la méthode de confrontation directe sur les différents milieux utilisés pour les deux souches (*Pseudomonas sp. fluorescent* et *Bacillus sp.*).

**Tableau 10** : L'analyse statistique ANOVA pour le résultat de l'activité antagoniste des souches antagonistes par confrontation directe sur différents milieux.

Univariate Tests of Significance for Taux d'inhibition (Spreadsheet4_(Recovered)) Sigma-restricted parameterization Effective hypothesis decomposition						
Effect	SS	Degr. of Freedom	MS	F	p	
Intercept	7,159534	1	7,159534	202,7928	0,000000	
milieu	1,775684	5	0,355137	10,0592	0,000001	
Error	2,012366	57	0,035305			

( $p < 0.05$ ).

Selon le test statistique ANOVA, on constate que l'effet antagoniste par confrontation directe entre les souches antagonistes et l'agent pathogène sur les différents milieux est très significatif ( $p=0.000001$ ) pour les souches antagonistes (*Pseudomonas sp. fluorescent*, *Bacillus sp.* et *Trichoderma sp.*).

L'étude statistique révèle une différence significative entre la croissance mycélienne des témoins et celles traitées par les souches antagonistes (*Trichoderma sp.* et *Bacillus sp.*, *Pseudomonas sp. fluorescent*). On note cependant une très légère différence de l'effet de l'antagonisme des PGPR (*Bacillus sp.* et *Pseudomonas sp. fluorescent*) et des TR (*Trichoderma sp.*) vis-à-vis l'agent pathogène, on constate que l'action de *Bacillus sp.* est plus importante par rapport à celle des autres souches antagonistes (Tableau 07), et le taux d'inhibition de *Trichoderma sp.* (Tableau 08) est plus important que celui de *Pseudomonas sp. fluorescent* qui cette dernière a présenté un taux d'inhibition moins important que les deux autres souches antagonistes (Tableau 09).

La croissance de *Bacillus sp.* est beaucoup plus rapide que celle de *F.oxysporum* et dès que les deux souches sont mis en confrontation, on peut remarquer directement un développement rapide de la bactérie avec une inhibition directe en diffusant dans toutes les boîtes.

La croissance de *Trichoderma sp.* est beaucoup plus rapide que celle de *F.oxysporum* et dès que les deux champignons sont mis en confrontation, on peut remarquer directement un début de développement mycélien de *Trichoderma sp.* à proximité (0.3cm) de la zone de rencontre des deux colonies, la croissance du mycélium de *Trichoderma sp.* est momentanément inhibée. En plus du mode d'action d'antibiose de *Trichoderma sp.*, la souche a colonisé le milieu et a ravisé les éléments nutritifs, c'est ce qu'on appelle la compétition.

La croissance de *Pseudomonas sp. fluorescent* est plus ou moins rapide que celle de *F.oxysporum* et dès que les deux souches sont mises en confrontation, on peut remarquer directement un développement de la bactérie *Pseudomonas sp. fluorescent*. On peut remarquer qu'une fois que l'agent pathogène est proche de la souche, sa croissance mycélienne s'arrête.

La croissance mycélienne du pathogène confrontée par les souches antagonistes n'a pas été trop influencée durant les deux premiers jours par rapport au témoin. À partir du 2<sup>ème</sup> jour, cette influence est observée avec la formation d'une zone d'inhibition, la croissance mycélienne de l'agent pathogène étant fortement inhibée par la croissance et le développement de *Bacillus sp.* à partir du 3<sup>ème</sup> jour, *Trichoderma sp.* au 4<sup>ème</sup> jour et au 5<sup>ème</sup> jour pour *Pseudomonas sp. fluorescent*.

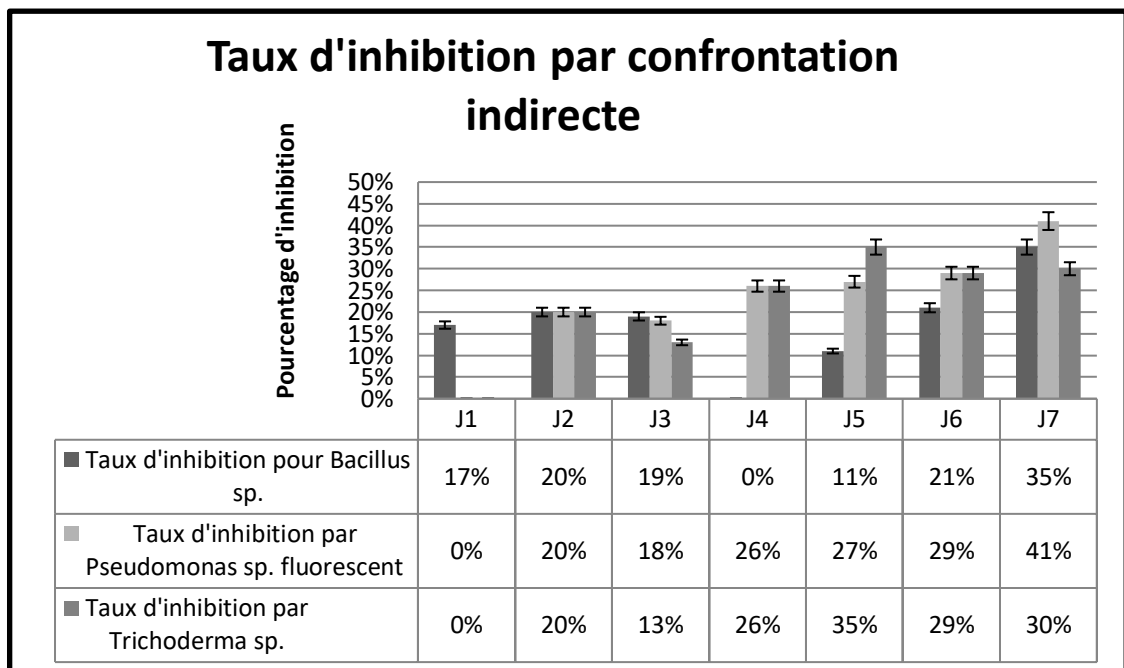
### 8.3 Confrontation indirecte

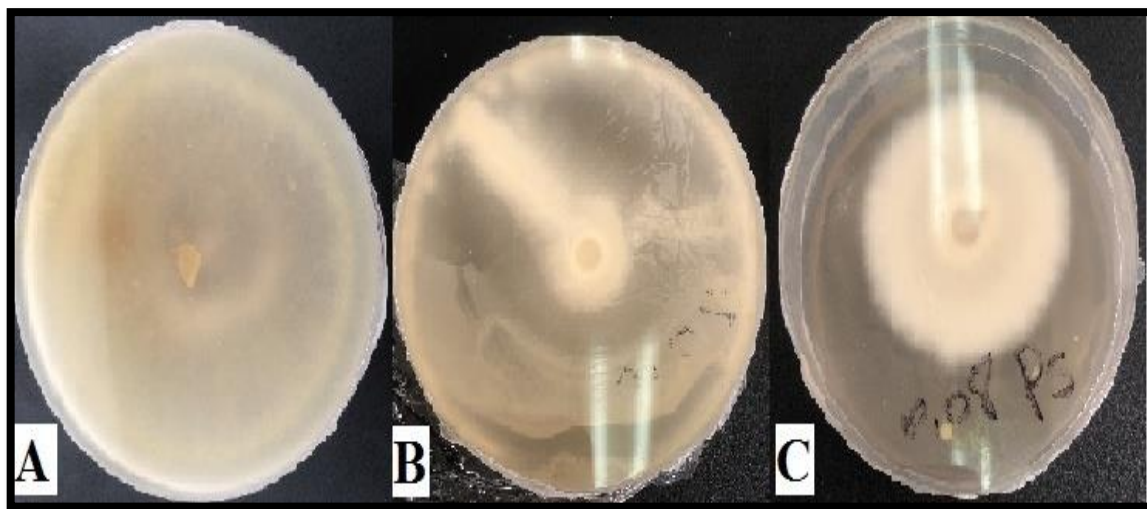
Les résultats sont obtenus par la mesure des diamètres après 7 jours d'incubation afin de déterminer les taux d'inhibition (Tableau 11):



**Tableau 11** : Taux d'inhibition par confrontation indirecte par les souches antagonistes.

Jours	Taux d'inhibition pour <i>Bacillus sp.</i>	Taux d'inhibition par <i>Pseudomonas sp. fluorescent</i>	Taux d'inhibition par <i>Trichoderma sp.</i>	Taux de croissance du Témoin
J1	17%	0%	0%	14%
J2	20%	20%	20%	29%
J3	19%	18%	13%	47%
J4	0%	26%	26%	59%
J5	11%	27%	35%	73%
J6	21%	29%	29%	82%
J7	35%	41%	30%	100%

**Figure 38** : Le taux d'inhibition du pathogène par les souches antagonistes.



**Figure 39 :** Confrontation indirecte le pathogène et les souches antagonistes ; A : confrontation indirecte entre *Trichoderma sp.* et le pathogène ; B : confrontation indirecte entre *Bacillus sp.* et le pathogène; C : confrontation indirecte entre *Pseudomonas sp. fluorescent* et le pathogène.

Les résultats de la confrontation indirecte ont montré une inhibition importante de l'agent pathogène en présence des souches antagonistes par rapport à la croissance du témoin (Tableau 11 ci-dessous, Figure 37 et 38) ;

On note que le taux d'inhibition à distance par *Pseudomonas sp. fluorescent* est égale à celui de *Bacillus sp.* pendant les 2 premiers jours et semblable à celui de *Trichoderma sp.* pendant le 2<sup>ème</sup> jour. Ensuite, on remarque que depuis le 4<sup>ème</sup> jour jusqu'au 7<sup>ème</sup> jour le taux augmente avec des pourcentages variables selon la souche antagoniste. D'après ces résultats, on observe que la souche *Pseudomonas sp. fluorescent* présente un taux d'inhibition (41%) plus important que celui des autres souches antagonistes *Trichoderma sp.* (30%) et *Bacillus sp.* (35%).

Les résultats de la confrontation indirecte ont démontré que la croissance mycélienne du témoin été plus importante que celles en présence de l'agent antagoniste, et qui ont montré un ralentissement de la croissance mycélienne du pathogène *Fusarium oxysporum* et donc malgré l'absence du contact directe, il y a un impact de l'antagoniste sur l'agent pathogène.

Les *Trichoderma* et PGPR sont connus de longue date pour leurs activités antagonistes à l'égard de champignons *Fusarium*.

#### 8.4 Analyse statistique du test de la confrontation indirecte

Le logiciel *STATISTICA*, nous a permis d'analyser la variance de la confrontation directe entre les différentes souches antagonistes testées. Les résultats de l'étude statistique sont représentés dans le Tableau 12.

**Tableau 12** : L'analyse statistique ANOVA des activités des souches antagonistes.

Univariate Tests of Significance for taux d'inhibition (Spreadsheet4)						
Sigma-restricted parameterization						
Effective hypothesis decomposition						
Effect	SS	Degr. of Freedom	MS	F	p	
Intercept	0,494676	1	0,494676	54,78327	0,000001	
souche antagoniste	0,015219	3	0,005073	0,56181	0,647477	
Error	0,153505	17	0,009030			

( $p < 0.05$ )

Selon le l'analyse statistique ANOVA (Tableau 12), on constate que l'effet antagoniste par confrontation indirecte entre les souches antagonistes et l'agent pathogène n'est pas significatif ( $p=0.6$ ).

### 9 Comparaison des résultats entre la confrontation directe et indirecte

En comparant les résultats de confrontation directe avec ceux de la confrontation indirecte :

- Les pourcentages d'inhibition de la souche *Pseudomonas sp. fluorescent* varient entre 20% à 41% dès le deuxième jour (Tableau 12) lors de la confrontation indirecte. Ceci confirme que le mode d'action indirect par les composés volatiles de cette bactérie sur la croissance du pathogène est presque identique que celui de la confrontation directe. Ces résultats sont en désaccord avec ceux obtenus par Tripathi et Johri (2002) qui ont constaté que les composés volatiles antifongiques produits par des *Pseudomonas fluorescens* ayant un pouvoir antifongique moins important que leurs produits diffusibles.
- Les pourcentages d'inhibition de la souche *Bacillus sp.* varient entre 17 à 35% (Tableau 11) lors de la confrontation indirecte. Ceci confirme que le mode d'action indirect par les composés volatiles de cette bactérie sur la croissance du pathogène est

moins important que lors de la confrontation directe avec ce dernier. Certaines bactéries sont plus actives via la libération des substances volatiles que diffusible, ce qui n'était pas le cas de *Bacillus sp.* dans notre étude.

- Les pourcentages d'inhibition de la souche *Trichoderma sp.* varient entre 20 % à 30% dès le deuxième jour, ceci confirme que le mode d'action indirect par les composés volatiles sur la croissance du pathogène utilisés est moins important que lors de la confrontation directe avec ce dernier.

Le pourcentage d'inhibition du pathogène dépend des souches antagonistes ainsi que leur capacité à produire des molécules bioactives tels que les antifongiques.

## 10 Chromatographie sur couche mince (CCM)

Les résultats obtenus après l'analyse quantitative CCM des molécules bioactives produites par les souches antagonistes (*Bacillus sp.* et *Pseudomonas sp. fluorescent*, *Trichoderma sp.*) (Figure 40), ont permis de détecter des spots de couleur rose violette qui indique que les souches sont productrices d'AIA (Acide Acétique Indole) et cela avec différents Rf ;

- *Pseudomonas sp. fluorescent* extrait acétate d'éthyle : Rf = 0.91.
- *Pseudomonas sp. fluorescent* extrait chloroformique : Rf = 0.88.

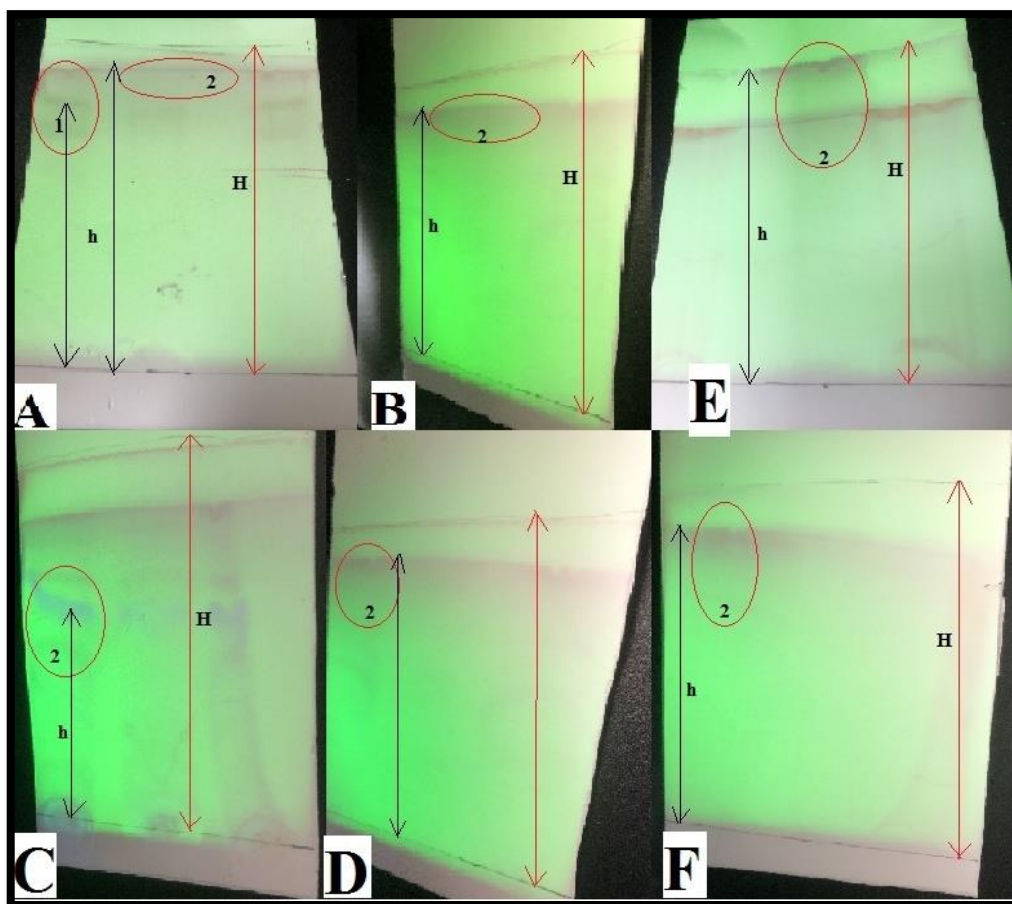
L'acide acétique indole est avec un Rf de 0.91 et 0.88 ce qui fait qu'il est très soluble dans les deux solvants (phase mobile) et sa séparation est parfaite dans les deux solvants. Les résultats de la détection d'AIA sont en accord avec ceux de Meliani (2012).

- *Bacillus sp.* extrait chloroformique : Rf = 0.69.
- *Bacillus sp.* extrait acétate d'éthyle : Rf = 0.89.

L'acide acétique indole avec un Rf de 0.69 et 0.89 ce qui fait qu'il est soluble dans l'acétate d'éthyle que dans le chloroforme et sa séparation est parfaite dans les deux solvants.

- *Trichoderma sp.* extrait chloroformique : Rf= 0.97.
- *Trichoderma sp.* extrait acétate d'éthyle : Rf= 0.86.

L'acide acétique indole est révélé avec un Rf de 0.97 et 0.86, ce qui fait qu'il est très soluble dans les deux solvants (phase mobile) et sa séparation est parfait dans ces derniers.



**Figure 40 :** CCM présentant des spots de molécules bioactives sous lampe UV (254nm) des souches antagonistes (*Pseudomonas sp. fluorescent* (A, B) ; *Bacillus sp.* (C, D) et *Trichoderma sp.* (E, F)).

<sup>1</sup>Pyoverdine.

<sup>2</sup>Acide indole acétique.

L'analyse quantitative par CCM, a permis de révéler aussi des spots de couleur verte qui indique la sécrétion de la pyoverdine par *Pseudomonas sp. fluorescent* avec un Rf de 0.84, (Figure 40 A '1')\_ qui est insoluble dans le chloroforme mais soluble dans l'extrait d'acétate d'éthyle avec un Rf proche de 1.

Selon les résultats de la CCM, on remarque que les molécules ne se sont pas séparées ; ce qui fait qu'on n'a pas pu révéler la présence d'autres molécules bioactives. Cela peut être dû au gel de silice (phase stationnaire), ou bien les molécules sont toutes très solubles dans la phase mobile (Rf comprise entre 0.88 et 1).



**Conclusion**

Parmi les maladies fongiques de la tomate, la fusariose racinaire de la tomate, une maladie très dommageable, qui reste un grand problème dans le secteur d'agricole et scientifique. Pour résoudre ce problème, des solutions alternatives sont donc recherchées. De nouvelles stratégies biotechnologiques ont pour but d'introduire des microorganismes bénéfiques tels que les PGPR (dans notre cas les *Pseudomonas sp. fluorescents* et *Bacillus sp.*) et les TR (*Trichoderma sp.*) dans le sol pour combattre la moisissure responsable de cette maladie.

Les PGPR et les TR jouent un rôle dans la suppression des maladies, et la stimulation des capacités défensives naturelles des plantes par la synthèse des antibiotiques. En plus de leur aptitude à réduire l'incidence des maladies telluriques dans certains champs, ainsi qu'à inhiber la croissance d'un grand nombre d'agents phytopathogènes *in vitro*. Ce qui a été prouvé dans notre étude.

Les isollements réalisés à partir d'une rhizosphère de la tomate de la région de *Biskra*, ainsi que l'étude morphologique et biochimique ont permis de sélectionner deux souches antagonistes appartiennent au genre : *Pseudomonas sp. fluorescent* et *Bacillus sp.*

Les tests de caractérisation du potentiel de promotion de la croissance des souches antagonistes isolés *in vitro* nous a permis de révéler que les souches antagonistes sont productrices des phytohormones (Acide Acétique Indole) et d'HCN , synthétisantes d'ammoniaque, et non solubilisatrices de phosphate.

L'essai d'interaction *in vitro* et de confrontation directe entre *F. oxysporum* et des souches antagonistes (*Trichoderma sp.* , *Pseudomonas sp. fluorescent* et *Bacillus sp.*) a révélé une inhibition de la croissance mycélienne du pathogène, lors du contact direct entre le pathogène et l'antagoniste.

Le test d'antagonisme par confrontation indirecte, a montré une réduction de diamètre du pathogène par rapport au témoin négatif. Cela prouve que les souches bactériennes utilisées secrètent des substances volatiles qui sont capables de stopper à distance le développement des souches fongiques.

Afin de mieux comprendre les mécanismes d'antagonisme existants chez les souches antagonistes, nous avons procédé à l'extraction de quelques métabolites secondaires. Qui participent à l'amélioration de la fertilité du sol, ce qui leurs permet d'être des agents de biocontrôle et de biofertilisation.

En fin, cette recherche a prouvé la fiabilité des résultats précédemment décrits.

Pour maîtriser la complexité de ces interactions, il est souhaitable d'approfondir les investigations relatives à la mise en œuvre des activités antagonistes et stimulatrices des capacités défensives naturelles des plantes, en développant des études permettant d'une part de mesurer dans le même système plante/microorganismes, et d'autre part d'analyser le comportement de la souche antagoniste dans différents rhizosphères.





**Références  
bibliographiques**

**Abbas-Zadeh, P., Saleh-Rastin, N., Asadi-Rahmani, H., Khavazi, A., Soltani, A., Shoary-Nejati, A.R. et Miransari, M. (2009).** Plant growth-promoting activities of *fluorescent pseudomonas*, isolated from the Iranian soils. *Acta Physiol Plant*. Vol-32: 281–288Pp.

**A. Bokhari, N. et Perveen, K. (2012).** Antagonistic action of *Trichoderma harzianum* and *Trichoderma viride* against *Fusarium solani* causing root rot of tomato. *African Journal of Microbiology Research*. Vol-6(44): 7193-7197Pp.

**Abdallah, K. et Kaci, N. (2015).** Activités antagonistes *in vitro* de deux souches de *Pseudomonas spp fluorescens* vis -à-vis des fusarioses vasculaires. Mémoire. Université Mouloud Mammeri De Tizi-Ouzou. 105Pp.

**Abdou Azali, H. (2010).** Taxonomie et diagnostic des espèces de *Xanthomonas* associées à la gale bactérienne de la tomate et des *capsicum spp.* : Situation dans les îles du sud ouest de l’océan indien. Thèse de doctorat. Université de la Réunion. 35-36Pp.

**Ahmad, F., Ahmad, I., Khan, M.S. (2008).** Screening of free living rhizospheric bacteria for their multiple plant growth promoting activities. *Microbiological Research*. Vol-163:173-181Pp.

**Ait Belkacem, C., Belgrade, A. N. (2017).** Extraction et caractérisation de quelques molécules bioactives à partir des souches de *Pseudomonas fluorescens* et *Bacillus sp.*. Mémoire. Université M’hamed Bougara De Boumerdes. 85p.

**Almi, H. (2016).** Etude des myco-pathogènes de *Lens Culinaris* et évaluation de l’effet de deux souches de *Trichoderma harzianum* : cas de la fusariose et de la cylindrosporiose. Thèse De Doctorat. Université Des Frères Mentouri Constantine. 27p.

**Adesemoye, A. O., Torbert, H. A., Kloepper, J. W. (2009).** Plant Growth-Promoting Rhizobacteria Allow Reduced Application Rates Of Chemical Fertilizers. 9p.

**Atherton, J.C., Rudich, J. (1986).** The tomato crop: a scientific basis for Improvement. 56p.

**Aouar, L. (2012).** Isolement et identification des actinomycètes antagonistes des microorganismes phytopathogènes. Thèse de doctorat. Université Mentouri-Constantine. 240p.

- Aurore, L. (2010).** Résistance De la tomate, l'aubergine et le piment a *Ralstonia Solanacearum* : interactions entre les géniteurs de résistance et la diversité bactérienne, caractérisation et cartographie des facteurs génétiques impliqués chez l'aubergine. Thèse De Doctorat. Université De La Réunion. 13p.
- Bakker, A.W., Schippers, B. (1987).** Microbial cyanide production in the rhizosphere in relation to potato yield reduction and *Pseudomonas spp.* mediated plant growth-stimulation. *Soil Biol Biochem.* Vol-19: 451–457Pp.
- Bashan, Y., De-Bashan, L.E., Prabhu, S. R. et Hernandez, J.P. (2013).**Advances in Plant Growth-Promoting Bacterial inoculant technology: formulations and practical perspectives (1998–2013). 33p.
- Beauchamp, C.J. (2021).** Mode d'action des rhizobactéries favorisant la croissance des plantes et potentiel de leur utilisation comme agent de lutte biologique. Vol-74 (1): 10p. Uri: <https://Id.Erudit.Org/Iderudit/706033ar>.
- Bekada, D.E. (2019).** Interet des tests microbiologique dans le cas de la gastrite B maladie de crohn rectocolite hémorragique. Thèse de doctorat. Université d'Oran 1. 176p.
- Bénard, C. (2009).** Etude de l'impact de la nutrition azotée et des conditions de culture sur le contenu en polyphénols chez la tomate. Thèse de doctorat. Université de Nancy. 265p.
- Ben Amira, M. (2018).** Etude de la relation mycoparasitaire *Trichoderma harzianum* avec *Fusarium solani* chez l'olivier : caractérisations moléculaires et fonctionnelles des aquaporines chez *Trichoderma harzianum*. Thèse de doctorat. Université Clermont Auvergne. 242p.
- Benchabane M., Bakour R., Toua D. et Boutekrabt A., (2000).** Mise En Evidence De L'effet Antagoniste De *Pseudomonas fluorescens* vis-à-vis de la fusariose vasculaire de la tomate. *Bulletin Oepl/Eppo.Bulletin.* Vol-30: 243-246Pp.
- Benchabane M. (2005).** Caractérisation des effets d'antagoniste microbien et la promotion de la croissance végétale de souches de *Pseudomonas spp. fluorescens* .Thèse Doctorat, Fsb-Uthb, Alger.235p.
- Ben Yahia (2015).** Activités antimicrobiennes et insecticides de *Thymus capitatus*, *Daucus crinitus* et *Tetraclinis articulata* sur la mineuse *Tuta absoluta* (Meyrick) et la microflore

pathogène de la tomate *Lycopersicum esculentum*. Thèse de doctorat. Université Abou-Bakr Belkaid Tlemcen. 226p.

**Benzina Tihar, F., Oulebsir-Mohand Kaci, H., Hamid, S., Reghmit, A.E. et Sahir-Haloune, F. (2020).** Détermination et caractérisation des sidérophores synthétisés par quelques souches de *Pseudomonas spp. fluorescents* phytobénéfiques. *Revue Nature et Technologie*. ISSN: 1112-9778 – EISSN: 2437-0312. Uri : <http://www.univ-chlef.dz/revuenatec>

**Bergheul S. (2018).** Etude de l'activité antimicrobienne et bioinsecticide de *Ruta Chalepensis L.*, *R. Angustifolia Pers.* et *Haplophyllum Tuberculatum* (Forsk.) A. Juss.vis-a-vis de quelques bioagresseurs de la culture de tomate (*Lycopersicum Esculentum Mill*). Thèse De Doctorat. Universite Abdelhamid Ibn Badis – Mostaganem. 9p.

**Bhattacharjee, R.B., Singh, A., Mukhopadhyay, S.N. (2008)** Use of nitrogen-fixing bacteria as biofertilizer for nonlegumes: prospects and challenges. *Appl Microbiol Biotech.* Vol-80(2): 199–209Pp.

**Birinchi, K.S., Sudheer, K.Y., Surendra S. et Singh, H.B. (2015).** Microbial consortium-mediated plant defense against phytopathogens: Readdressing for enhancing efficacy. *Soil Biology et Biochemistry.* Vol-87: 25-33Pp.

**Bissett, J.A. (2004).** A revision of the genus *Trichoderma*. II. Infrageneric classification. (b) Can. J. Bot., 1991. Vol-73: 2280-2300Pp.

**Bossis, E., Lemanceau P., Latour X. et GARDAN, L. (2000).**The taxonomy of *Pseudomonas fluorescens* and *Pseudomonas putida*: current status and need for revision. *Agronomie.* Vol-20: 51-63Pp.

**Bouhairi, S. (2017).** *Bacillus subtilis* : caractères et applications. Thèse de doctorat. Université Mohammed v-rabat.134p.

**Boukerma, L. (2012).** Effet Des Pgp ( *Pseudomonas spp. fluorescents*) sur le biocontrol et induction de la résistance systémique (irs) chez la tomate vis-à-vis de la fusariose vasculaire. Thèse de magister. Ecole Nationale Supérieure Agronomique El-Harrach, Alger. 22p.

**Boukerma, L. (2017).** Biotisation des plantes (*Solanum lycopersicum* et *Arabidopsis thaliana*) par les pgprs et elicitation des réactions de défense inductible. Thèses De Doctorat. Ecole Doctorale : Biotechnologies Végétales.147p.

**Bouamra, F. (1992).** Activité antagoniste chez les *Pseudomonas fluorescens* en lutte biologique vis-à-vis du *Fusarium oxysporum f sp lycopersici* sur tomate cultivée sous serre. Thèse Ingénieur Etat. Université Blida .69p.

**Bounoua, M.D.** Essais d'utilisation des *Pseudomonas spp.* et *Bacillus spp.* dans le biocontrol de *Fusarium oxysporum f.sp. lycopersici* sur tomate et *Verticillium dahliae* de l'olivier. Mémoire de magister. Université d'Oran. 90p.

**Bouras, F.Z. (2018).** Isolment et caractérisation des microorganismes stimulateurs de la croissance de lentille (*lens culinaris*). Thèse de doctorat. Université Djillali Libas de SBA. 129p.

**Bouzaata, Ch. (2016).** Valorisation des sous produits de quatre variétés de tomate industrielle (*solanum esculentum l*) dans l'est algérien. Thèse de doctorat. Université Badji Mokhtar – Annaba.141p.

**Blancard, D. (1997).** Les maladies de la tomate : observer, identifier, lutter. Edition INRA, station de phytopathologie végétale, Monfavet. 170-179Pp.

**Chanforan, C. (2010).** Stabilité de microconstituants de la tomate (composés phénoliques, caroténoïdes, vitamines c et e) au cours des procédés de transformation : études en systèmes modèles, mise au point d'un modèle stoechio-cinétique et validation pour l'étape unitaire de préparation de sauce tomate. Thèse de doctorat. Université D'avignon Aix Marseille.400p.

**Chaux, C.L. et Foury, C.L. (1994).** Cultures légumières et maraichères. Tome III : légumineuses potagères, légumes fruit .Tec et Doc Lavoisier, Paris. 563p.

**Crowley, D.E. (2006).** Microbial siderophores in the plant rhizosphere. In: Barton, Ll and Abadia, I. (Eds) Iron Nutrition In Plants And Rhizospheric Microorganisms. Springer, Dordrecht.169-198Pp.

**Cornelis, P. (2010).** Iron uptake and metabolism in *Pseudomonads*. [\*Applied Microbiology and Biotechnology\*](#). Vol-86: 1637–1645Pp.

- Couteaudier, Y., Letard, M., Alabouvette, C. et Louvet, J. (1985).** Lutte biologique contre la fusariose vasculaire de la tomate. Résultats en serre de production. *Agronomie, Edp Sciences*. Vol-5 (2): 151-156Pp.
- Cheffi Azzabou, M. (2019).** Contrôle biologique des maladies de dépérissement de l'olivier par la souche oee1 de *Bacillus velezensis* et étude des mécanismes de bio-contrôle impliqués. Thèse de Doctorat. Université De Sfax Ecole Nationale D'ingénieurs De Sfax Tunisie. 30p.
- Demeule, E. (2020).** Effet répressif de *Bacillus subtilis* et de *Bacillus pumilus* envers *Rhizoctonia solani* sur tomate et concombre de serre. Mémoire. Université Laval. 64p.
- Elouissi, M. (2016).** Contribution à l'étude de la bio-écologie des populations de la mineuse de la tomate *Tuta absoluta* (Lepidoptera, Gelechiidae) en vue de l'optimisation de son contrôle dans la région de Mascara. Thèse de doctorat. Université Abdelhamid Ibn Badis De Mostaganem. 239p.
- Fadhela, M.M. (2017).** Activités biologiques de champignons endophytes isolés du palmier dattier (*Phoenix Dactylifera L.*). Thèse de Doctorat. Ecole Nationale Supérieure Agronomique D'el Harrach. 22p.
- Fuchs, J.G. (1993).** Paramètres influençant la lutte biologique contre la fusariose vasculaire de la tomate et la pourriture noire des racines de concombre: du laboratoire à la pratique. Thèse de doctorat. L'école Polytechnique Fédérale Zurich. 12p.
- Grasselly, D., Navez, B., Letard, M. (2000).** Tomate, pour un produit de qualité. Ed .Centre technique interprofessionnel des fruits et légumes, Bergère, Paris.201p.
- Ghorri, S. (2015)** Isolement des microorganismes possédant une activité anti- *Fusarium*. Thèse de doctorat. Université frères Mentouri.144p.
- Guiraud, J.P. (1998).** Microbiologie alimentaire. Ed. Dunod, 652p.
- Guido, V.B. et Ben, J.J.L. (2001).** Molecular basis of plant growth promotion and biocontrol by rhizobacteria. *Current Opinion in Plant Biology*. Vol 4: 343–350Pp.
- Haiquan, H., Meijuan, H., Guosheng, F., Xuefei, L., Jihua, W., Qing, D., et Qixiang, Z. (2013).** Isolation and characterization of 1-aminocyclopropane- 1-carboxylate (acc) deaminase-containing plant Growth-Promoting Rhizobacteria from carnation soil and roots. Vol. 7(50): 5664-5668Pp.

- Hamini, N. (2011).** Diversité Génétique Des Populations De *Fusarium* Pathogène De La Tomate Sur Le Pourtour Méditerranéen. Thèse De Doctorat. Université D'oran. 24p.
- Handeisman, J., Raffel, S., Mester, E. H. et Wunderlich, L. et Grau, C.R. (1990).** Biological control of damping-off of alfalfa seedlings with *Bacillus cereus* UW85. *Applied of Environment of Microbiology*. Vol-56 (7): 13-718Pp.
- Herati, N., Seghir, S. (2019).** Etude d'antagoniste *in vitro* et *in vivo* de *Pseudomonas spp fluorescents* vis-à-vis des deux agents phytopathogènes de la tomate ( *Fusarium oxysporum lycopersici* et *Botrytis cinerea*). Mémoire. Centre Universitaire Abdelhafid Boussouf-Mila. 92p.
- Harman, G.E., Howell, C.R., Viterbo, A., Chet, I. et Lorito, M. (2004).** *Trichoderma* species-opportunistic, avirulent plant symbionts. *Nat Rev Microbiol*. Vol-2: 43-56Pp.
- Harman, G. E. (2006).** Overview of mechanisms and uses of *Trichoderma spp*. *Phytopathology*. Vol-96: 190-194Pp.
- Holt, J.G., Krieg, N.R., Sneath, P.H.A., Staley, J.T. et Williams, S.T. (1994).** Bergey's Manual of Determinative Bacteriology, Baltimore, Williams and Wilkins. Vol-9: 787p.
- Idris, H.A., Labuschagne, N. et Korsten, N. (2007).** Screening rhizobacteria for biological control of *Fusarium* root and Crown root of sorghum in Ethiopia. *Biological Control*. Vol-40 (1): 97-106Pp.
- Jose Miguel, B., Jose´ Pozo, M., Azco´N, R. et Concepcio´n, A.A. (2005).** Microbial Co-Operation In The Rhizosphere. *Journal Of Experimental Botany*. Vol-56: 417p.
- Hibar, Kh., Daami-Remadi, M., Khiareddine, H. et El Mahjoub, M. (2005).** *Biotechnol. Agron. Soc. Environ*. Vol-9 (3): 163–171Pp.
- Khelil-Radji, F.Z.A. (2015).** Evaluation du potentiel hydrocarbonoclaste des bactéries marines isolées de la cote oranaise. Thèse de doctorat. Université d'oran 1. 207p.
- Laradj, Z. Kh. (2017).** Isolement et caractérisation des rhizobactéries promotrices de la croissance des plantes capables de lutter contre le *Fusarium*. Thèse de doctorat. Université Djillali Liabes De Sidi Bel Abbes. 109p.

**Latigui, A. (1984).** Effets des différents niveaux de fertilisation potassique sur la fructification de la tomate cultivée en hiver sous serre nom chauffée. Thèse Magister. INA El-Harrach.

**Lugtenberg, B., Kamilova, F. (2009).** Plant-Growth-Promoting Rhizobacteria. *Annu. Rev. Microbiol.* Vol-63 : 541-556Pp.

**Lazreg, F. (2014).** Importance de la fonte de semis du pin d'Alep (*Pinus Izalepensis MILL*) dans lerd- Ouest Algérien : Identification morphologique et moléculaire des espèces du genre *Fusarium* et *Globisporangium*, pouvoir pathogène et moyens de lutte. Thèse de doctorat. Université Abou Bker Belkaid Telmcen. 247p.

**Lecomte, Ch. (2016).** Fusariose du cyclamen : détection préventive du risque et contrôle biologique. Thèse de doctorat. Université De Bourgogne. 240p.

**Lepoivre, p., et Semal, J. (1988).** La lutte boilologique en phytopathologie végétale. Traité de pathologie végétale. Ed Presse agronomique de Gembloux, Les moisissures d'intérêt médical. Cahier de formation N°25. Biologie médicale. Paris.éd: 465-487Pp.

**Lepoivre, P. (2003).** Phytopathologie: bases moléculaires et biologiques des pathosystèmes etfondements des stratégies de lutte. De Boeck Université, Bruxelles, Belgium. 432p.

**Lydie, S. (2010).** La lutte biologique : vers de nouveaux équilibres économiques. Edition Quae. Science en partage. Versailles cedex. 151-163Pp.

**Orozco- Mosqueda, M.D.C., Bernard, R. G., Santoyo, G. (2020).** Acc deaminase in Plant Growth-Promoting Bacteria (PGPB): an efficient mechanism to counter salt stress in crops. 11p.

**Figueiredo, M.D.V.B., Bonifacio, A., Rodrigues, A.C. et Fernando de Araujo, F. (2016).**Plant Growth-Promoting Rhizobacteria: Key Mechanisms of Action. *Springer Science+Business Media Singapore.* Vol-10: 23-37Pp.

**Messiaen, CM. Blancard, D., Rouxel, F. et Lafon, R. (1991).** Les maladies des plantes maraichères, INRA Paris. 522p.

**Mezaache, S. (2012).** Localisation des déterminants de la suppression de quelques souches de *Pseudomonas* Isolées de la Rhizosphère de la pomme de terre. Thèse de doctorat. Université Ferhat ABBAS Sétif. 221p.



- Mihai, N.L. (1998).** Reconnaissance de signaux eliciteurs d'origine fongique impliqués dans les mécanismes de défense des plantes. Le Modèle Fusarium -Ru Bus. Thèse de doctorat. Université De Bucarest. 24-25Pp.
- Mohie, M. K., Gamal, F. M., Mohamed, S. Sh. (2011).** Fourier transformer infrared spectroscopy for quality assurance of tomato products. *Journal of American Science*, Vol-7(6): 559-572Pp. Uri: <http://www.americanscience.org>
- Moustaine, M., Elkahkahi, R., Benbouazza, A., Benkirane, R. et Achbani, E.H. (2017).** Effect of plant growth promoting rhizobacterial (PGPR) inoculation on growth in tomato (*Solanum Lycopersicum L.*) and characterization for direct PGP abilities in Morocco. Vol-2: 2456-1878Pp.
- Nelson, P.E., Dignani, M.C., Anaissie, E.J. (1994).** Taxonomy, biology, and clinical aspects of *Fusarium* species. *Clin Microbiol Rev.* Vol-7: 479–504Pp.
- Oulebsir- Mohandkaci, H. (2012).** Evaluation de l'impact biologique de quelques souches locales de *Bacillus sp.* et *Pseudomonas spp. fluorescents* vis a vis du criquet migrateur *Locusta migratoria cinerascens* (Orthoptera: Acrididae). Thèse de Doctorat. Ecole Nationale Supérieure Agronomique El Harrach-Alger. 202p.
- Palleroni, N.J. (1993).** *Pseudomonas* classification. A new case history in the taxonomy of gram-negative bacteria . *Antonie van Leeuwenhoek.* Vol-64 (3-4): 231-251Pp.
- Rakotoarimanga, N., Zananirina, J., Ramamonjisoa, D. et Ramanankierana, H. (2014).** Lutte biologique antifongique : *Actinomycètes* du sol rhizosphérique antagonistes de *Fusarium* isolé du fruit de tomate (*Solanum lycopersicum L., 1753*). *pourri Afrique SCIENCE.* Vol-10(3): 243 – 255Pp.
- Ravel, J., Cornelis, P. (2003).** Genomics of pyoverdine-mediated iron uptake in *Pseudomonads.* *Trends Microbiol.* Vol-11:195–200Pp.
- Rekibi, F. (2015).** Analyse compétitive de la filière tomate sous serre. Cas de la Wilaya de *Biskra.* Thèse de doctorat. Université Mohamed Khider *Biskra.* 189p.
- Rishi, K., Garima, P., Nitesh, J. et Pavan, K.A. (2015).** Plant Growth Promoting Rhizobacteria: Mechanism And Current Prospective. Vol-6: 9p.

- Rodrigues, A.A., Forzani, M.V., Soares, R.D.S., Sibov, S.T. et Gonçalves Vieira, J.D. (2016).** Isolation and selection of plant growth-promoting bacteria associated with sugarcane. - *Pesq. Agropec. Trop., Goiânia*. Vol-46 (2): 149-158Pp.
- Saba, H., Vibhash, D., Manisha, M. et Prashant, K.S., Farhan, H. et Tauseef, A. (2012).** *Trichoderma* a promising plant growth stimulator and biocontrol agent. *Mycosphere*. Vol-3(4): 524–531Pp.
- Saber, W.I.A., Abd ELHal, K.M., Ghonocm, K.M. (2009).** Research Journal of Microbiology. Vol-4 (8): 256-300Pp.
- Samuels, G. J. ; Petrini, O., et Mangui, S. (1994).** Morphological and macromolecular characterization of *Hypocrea schweinitzii* and its *Trichoderma* anamorph. *Mycologia*. Vol-86: 421-435Pp.
- Salisbury, F.B. (1994).** The role of plant hormones. In: Wilkinson RE (ed) Plant–environment interactions. Marcel Dekker, New York, USA. 39–81Pp.
- Sayuj, K. (2015).** Histological and molecular approaches for resistance to *Fusarium oxysporum f.sp. radidis-vanillae*, causal agent of root and stem rot in vanilla spp. (*orchidaceae*), thèse de doctorat, Université De La Reunion Faculté Des Sciences Et Technologies Umr « Peuplements Végétaux Et Bio-Agresseurs En Milieu Tropical » Cirad – Université de la Réunion. 18P.
- Sebihi, F.Z. (2016).** Effet PGPR des souches de *Pseudomonas fluorescens* isolées de la rhizosphère du blé cultivé dans la région de Constantine. Thèse de doctorat. Université Des Frères Mentouri-Constantine. 113P.
- Sebihi, F.Z., Saoudi, M., Derouiche F., Bendjemana, K., Benguedouar, A., Benhizia, Y. et Sanchez, J. (2020).** Effect Of Pgpr Inoculation On Durum Wheat Growth Varieties. *Asian Jr. of Microbiol. Biotech. Env. Sc.* Vol-22 (4) : 676-684Pp.
- Shankra, N., Van Lidt de jeud, J., Goffau, M., Hilmi, M., Van Dam, B. et Florijin A. (2005).** La culture de la tomate : production, transformation et commercialisation. 5ème Ed. foundation agromica et CTA, Wageningen.9P.
- Sihem, Z. (2011).** Contribution a la lutte intégrée contre *Tuta absoluta* sur tomate en plein champ. Mémoire de magister. Ecole national supérieur agronomique El-Harrach. 92P.

**Si Mohammed, A. (2017).** Thèse de doctorat. Caractérisation et lutte biologique vis-à-vis de *Fusarium oxysporum*. Université Ahmed Ben Bella. 124P.

**Singh J.Sh. et Singh, D. P. (2013).** Plant Growth Promoting Rhizobacteria (PGPR): microbes in sustainable agriculture. *Springer Science+Business Media Dordrecht*. 361-378Pp.

**Singh, A., Mehta, S., Singh, H.B. et Nautiyal, C.S. (2003).** Biocontrol of collar rot disease of betelvine (*Piper betel* L.) caused by *Sclerotium rolfsii* by using rhizosphere competent *Pseudomonas fluorescens* NBRI-N6 and *Pseudomonas fluorescens* NBRI-N. *Current Microbiology*. Vol-47 : 153-158Pp.

**Smahi, A. (2008).** Contrôle biologique de la fusariose vasculaire de la tomate causée par *Fusarium oxysporum f.sp.lycopersici*. Thèse de magister. Université d'Oran. 142P.

**Srivastava, R., Khalid, A., Singh, U.S. et Sharma, A.K. (2010).** Evaluation of arbuscular mycorrhizal fungus, fluorescent *Pseudomonas* and *Trichoderma harzianum* formulation against *Fusarium oxysporum f. sp. Lycopersici* for the management of tomato wilt. *Biological Control*. Vol-53: 24-31Pp.

**Subramaniam, N., Sundaram, L. (2020).** Siderophore producing *Pseudomonas spp.* Isolated from rhizospheric soil and enhancing iron content in *Arachis hypogaea* L. plant. *International Journal of Agricultural Technology*. Vol-16(2): 429-442Pp.

**Szczalba, M., Kopta, T., Gazstoł, M. et Sezkara, A. (2019).** Comprehensive insight into arbuscular mycorrhizal fungi, *Trichoderma spp.* and plant multilevel interactions with emphasis on biostimulation of horticultural crops. *Journal Of Applied Microbiology*. Vol-127 : 630-647Pp.

**Timmusk, S. (2003).** Mechanism of action of the plant growth promoting bacterium *paenibacillus polymyxa*. *Acta universitatis Upsaliensis*. Vol-91 : 554-5802Pp.

**Trapet, P. (2015).** Incidence physiologique et étude du mode d'action de la pyoverdine de *Pseudomonas fluorescens* chez *Arabidopsis thaliana* : liens avec l'homéostasie du fer, la croissance et les défenses. Thèse de doctorat. Université De Bourgogne. 269P.

**Verma, J.P., Yadav, J., Tiwari, KN., Surampalli, R.Y. et Val'ero, J.R. (2013).** Effect of indigenous *Mesorhizobium spp.* and plant growth promoting rhizobacteria on yields and

nutrients uptake of chickpea ( *Cicer arietinum* L.) under sustainable agriculture. *Ecol Engin.* Vol-51: 282–286Pp.

**Vinale, F., Sivasithamparam, K., Ghisalberti, E.L. Marra , R., Barbetti, M.J., Li, H., Woo, S.L.et Lorito, M. (2008).** Physiological and Molecular Plant Pathology. Vol-72 : 80–86Pp.

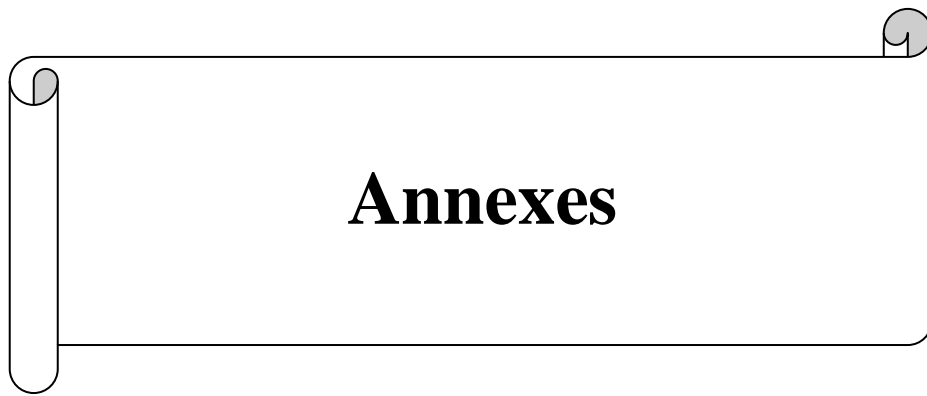
**Woo, S.L., Scala, F., Ruocco, M. et Lorito, M. (2006).** The molecular biology of the interactions between *Trichoderma spp.* , phytopathogenic fungi, and plants. *Phytopathology.* Vol-96 : 181–185Pp.

**Yedidiaa, I., Benhamou, N., Kapulnik, I. et Cheta, I. (2000).** Induction and accumulation of pr proteins activity during early stages of root colonization by the mycoparasite *Trichoderma Harzianum* Strain T-203. *Plant. Physiol. Biochem.* Vol-38 : 863–873Pp.

**Yezli, W. (2012).** Etude morphologique, pouvoir pathogène et activité protéolytique chez *Fusarium oxysporum f.sp. albedinis*. Mémoire de magister. Université d’Oran. 107p.

**Zaim, S. (2016).** Essai de lutte biologique contre le *Fusarium oxysporum f. sp. ciceris* a l'aide des microorganismes de la rhizosphère de la culture du pois chiche. Thèse. Université Abdelhamid Ibn Badis De Mostaganem. 38p.

**Zenasni, A. (2018).** Isolement des souches de *Pseudomonas spp. fluorescents* rhizosphériques à partir de sol agricole et évaluation de leur rôle dans la croissance végétale et le biocontrôle des phytopathogènes. Mémoire. Centre Universitaire Belhadj Bouchaib d’Aïn-Témouchent.100p.



# **Annexes**

## **Annexe 01 : Les milieux de culture**

### **Milieu PDA (*Potato Dextrose Agar*)**

250 g pomme de terre

20 g Agar

20 g Glucose

1L d'eau distillé

Le milieu a été autoclavé pendant 20 min à 121°C.

### **Milieu PDB (*Potato Dextrose Bouillon*)**

250 g pomme de terre

20 g Glucose

1L d'eau distillé

Le milieu a été autoclavé pendant 20 min à 121°C.

### **Milieu Luria Bertani (LB)**

5 g Extrait de levure

10 g Tryptone

5 g Chlorure de sodium

15 g Agar

Le milieu a été autoclavé pendant 20 min à 121°C.

### **Milieu Luria Bertani bouillon**

5 g Extrait de levure

10 g Tryptone

5 g Chlorure de sodium

1L d'eau distillé

Le milieu a été autoclavé pendant 20 min à 121°C.

**Milieu King B (KB)**

20 g peptone

10 ml Glycérol

10 g Sulfate de potassium ( $K_2SO_4$ )

1.5 g Hydrogénophosphate de potassium ( $K_2HPO_3$ )

1.5 g Sulfate de magnésium heptahydraté ( $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ )

12 g Agar

1L d'eau distillé

Le milieu a été autoclavé pendant 20 min à 121°C.

**Milieu King B Bouillon**

20 g peptone

10 ml Glycérol

10 g Sulfate de potassium ( $K_2SO_4$ )

1.5 g Hydrogénophosphate de potassium ( $K_2HPO_4$ )

1.5 g Sulfate de magnésium heptahydraté ( $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ )

1L d'eau distillé

Le milieu a été autoclavé pendant 20 min à 121°C.

**Milieu Pikovskaya (PVK) solide de bleu de bromophénol (Pikovskaya, 1948)**

2.5 g Hydrogénophosphate de potassium ( $K_2HPO_4$ )

2.5 g  $CaCO_3$

0.5 g sulfate d'ammonium ((NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>)

0.2 g Chloride de potassium (KCL)

0.1 g Sulfate de magnésium heptahydraté (MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O)

10 g Glucose

0.005 g Sulfate de fer (FeSO<sub>4</sub>)

0.25 g Bleu de bromophénol

20 g Agar

1L d'eau distillé

Le milieu a été autoclavé pendant 20 min à 121°C.

#### **Eau peptoné**

10 g peptone

5 g Chlorure de sodium

1L d'eau distillé

Le milieu a été autoclavé pendant 20 min à 121°C.

#### **Milieu TLB (Tryptophane Luria Bertani)**

16 g Tryptophane broth (1 g Tryptophane ; 10 g tryptone ; 5 g Chloride de sodium)

5 g Extrait de levure

15 g Agar

1 L d'eau distillé

Le milieu a été autoclavé pendant 20 min à 121°C.



### **Milieu TKB (Tryptophane King B)**

16 g Tryptophane broth (1 g Tryptophane ; 10 g tryptone ; 5 g Chloride de sodium)

10 ml Glycérol

10 g Sulfate de potassium ( $K_2SO_4$ )

1.5 g Hydrogénophosphate de potassium ( $K_2HPO_4$ )

1.5 g Sulfate de magnésium heptahydraté ( $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ )

12 g Agar

1L d'eau distillé

Le milieu a été autoclavé pendant 20 min à 121°C.

### **Gélose à l'amidon**

3 g Extrait de levure

5 g Peptone

2 g Amidon

15 g Agar

1L d'eau distillé

Le milieu a été autoclavé pendant 20 min à 121°C.

## **Annexe 02 : Les Solutions et réactifs**

### **Les Solutions**

#### **Solution de Salkowski**

2% de  $\text{FeCl}_3$  (0,5 M)

35% d'acide perchlorique

#### **Picrate de sodium**

5% Acide picrique

2% Carbonate de sodium anhydre

#### **Eau oxygénée**

### **Réactifs**

Violet de Gentiane

Iode lugol

L'alcool

Fuchsine

Vert de malachite

Nessler

**Annexe 03 : Appareillages**

- Appareil rotatif évaporation (*BÜCHI*) *made in Germany*
- Autoclave (*Sanoclav*) *made in Germany*
- Bain marie (*Memmert*) *made in China*
- Balance (*Adventurer*) *made in China*
- Centrifugeuse (*Hettich*) *made in Germany*
- Étuve (*Memmert*) *made in China*
- Incubateur agitateur (*IKA*) *made in France*
- Lampe à UV (254nm) (*VL-4.C*) *made in France*
- Microscope optique (*Motic*) *made in china*
- Plaque chauffante (*VELP scientifica*)
- Réfrigérateur
- Spectrophotomètre UV-1280 (*SHIMADZU*) *made in China*
- Vortex (*VELP scientifica*) *made in Italy*

---

## Annexe 04 : Principe des colorations

### Coloration de Gram

Le principe de la coloration de Gram consiste à la préparation d'un frottis avant de commencer la coloration, les étapes sont les suivantes :

- Déposer sur une lame propre une goutte d'eau physiologique stérile
- Prélever un fragment de colonie à l'aide d'une anse de platine
- Dissocier soigneusement la colonie dans la goutte d'eau, puis sécher et fixer le frottis au-dessus de la flamme de bec benzène sans trop chauffer (Leyral et Joffin, 2001).

Après ces étapes et une fois refroidi, on entame la coloration de Gram :

1. Recouvrir la lame de violet de Gentiane et laisser agir 1 minute. Le violet de gentiane colore le cytoplasme des bactéries.
2. Jeter l'excès de colorant dans un bûcher.
3. Recouvrir la lame de Lugol et laisser agir 1 minute, Le Lugol (composé iodé) est un mordant qui permet de fixer le violet dans les bactéries.
4. Rincer très brièvement en faisant couler l'eau de robinet sur la lame au-dessus du frottis (pas directement sur le frottis), et éliminer l'excès d'eau.
5. Égoutter l'alcool sur la lame pour la décoloration jusqu'à ce que le violet ne s'écoule plus du frottis (5 à 10 secondes).
6. Rincer rapidement à l'eau de robinet.
7. Recouvrir la lame de la fuchsine pendant 30 secondes. Ce colorant permet de visualiser les bactéries Gram- décolorées à l'étape précédente. Cette coloration moins forte que le violet n'affecte pas la couleur des Gram+.
8. Rincer rapidement à l'eau de robinet.
9. Sécher puis observer au microscope optique (objectif x 40 puis x 100 à immersion) (Singleton, 2005).

### Coloration de vert de Malachite

On a effectué deux méthodes pour cette coloration.

Le principe de la première méthode de la coloration des spores au vert de malachite est présenté en deux étapes :

1. La préparation du frottis :
  - sur une lame propre déposer une goutte d'eau physiologique stérile

- A l'aide d'une anse de platine prélever un fragment de colonie
  - Dissocier soigneusement la colonie dans la goutte d'eau, puis sécher et fixer le frottis au-dessus de la flamme de bec benzène sans trop chauffer.
2. Après la fixation du frottis, on recouvert avec une solution de vert de malachite et on laisse agir a chaud sur une plaque chauffante pendant 15 minutes à partir de l'émission de vapeur, la préparation est ensuite lavée et colorée à la fuchsine pendant 5 minutes puis rincée et séchée.(observation x 40 puis x 100 a immersion).les spores apparaissent colorées en vert tandis que le reste des bactéries non sporulées sont colorées en rouge-rosé.

Le principe de la deuxième méthode de la coloration des spores au vert de malachite est le suivant :

1. la préparation du frottis (décrite au-dessus).
2. Après la fixation du frottis, on recouvre la lame avec une solution de vert de malachite, on jette l'excès du colorant et on fait passer la lame vingt fois sur la flamme du bec benzène, ensuite on laisse la lame devant le bec pour bien sécher. Après, on la rince par l'eau de robinet et on colore à la fuchsine pendant 5 minutes, puis on rince et on sèche (observation x 40 puis x 100 a immersion).

**Mémoire de fin de cycle pour l'obtention du diplôme de Master  
en Mycologie et Biotechnologie Fongique**

**Date de soutenance : 20/09/2021**

**Présenté par : BENTAYEB Roumeissa Badra  
BOUFEKHED Maya**

**Thème : L'antagonisme de *Pseudomonas sp.*, de *Bacillus sp.* et de *Trichoderma sp.*  
vis-à-vis l'agent causal de la fusariose racinaire de la tomate**

## Résumé

La présente étude a été effectuée dans le but de lutter contre le champignon phytopathogène "*Fusarium oxysporum*". qui a été isolé à partir des racines d'une tomate infectée. L'identification du genre a été effectuée selon les caractères culturels macroscopiques et morphologiques microscopiques. La lutte biologique contre ce phytopathogène, est mise en évidence en utilisant les PGPR dans notre cas les *Pseudomonas*, *Bacillus* (isolées à partir du sol agricole de la wilaya de Biskra) et les TR (*Trichoderma*). Des tests d'antagonisme par méthode de confrontation avec le champignon phytopathogène ont été utilisés et ont donné de bons résultats. Ces essais de confrontations entre *F. oxysporum* et les souches antagonistes (*Pseudomonas sp. fluorescente*, *Bacillus sp.* et *Trichoderma sp.*) d'une façon directe et indirecte sur un milieu de culture solide a révélé une inhibition de la croissance mycélienne de l'isolat phytopathogène. Ce travail a suggéré que l'antagoniste bactérien et fongique pourrait être un moyen de lutte potentiel de la pourriture racinaire de la tomate. L'application de micro-organismes comme agents de lutte biologique est importante, car ils peuvent augmenter l'activité microbienne bénéfique qui s'étend pendant une longue période de temps.

**Mots clés :** Champignon phytopathogène, lutte biologique, PGPR, TR, test d'antagonisme.

**Laboratoire de recherche :** Laboratoire de Microbiologie (RDC), Faculté des Sciences de la Nature et de Vie. Université des Frères Mentouri Constantine 1.

## Jury d'évaluation :

**Présidente du jury :** Melle. ABDELAZIZ O.

M. C. B. - UFM Constantine 1.

**Promotrice :** Melle. BELMESSIKH A.

M. A. A. - UFM Constantine 1.

**Examinatrice :** Mme. LEGHLIMI H.

M. C. A.- UFM Constantine 1.

**Année universitaire : 2020/2021**