



الجمهورية الجزائرية الديمقراطية الشعبية  
République Algérienne Démocratique Et Populaire  
وزارة التعليم العالي والبحث العلمي  
Ministère De L'enseignement Supérieur Et De La Recherche Scientifique



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

جامعة قسنطينة 1 الإخوة منتوري  
كلية علوم الطبيعة والحياة

**Département : Microbiologie**

**قسم :**

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

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

**Filière : Sciences Biologiques**

**Spécialité : Microbiologie Appliquée**

**N° d'ordre :**

**N° de série :**

**Intitulé :**

---

***Etude de l'antagonisme bactérien contre les champignons phytopathogènes « Analyse potentiel  
des mécanismes impliqués dans le biocontrôle »***

---

**Présenté par : Khanaoui Yasmine**

**Le : 12/06/2024**

Khouder Riane

Limouni Hadjer

**Jury d'évaluation :**

**Président : ALMI Hiba (MCB - U Constantine 1 Frères Mentouri).**

**Encadrant : BENSERRADJ Ouafa (MCA - U Constantine 1 Frères Mentouri).**

**Examineur(s): MILET Asma (MCB - U Constantine 1 Frères Mentouri).**

**Année universitaire  
2023-2024**

# Remerciements

*Nous adressons nos remerciements les plus sincères à notre encadrante, **BENSERRADJ Ouafa**, Enseignante à la Faculté des Sciences de la nature et de la vie Université frères Mentouri Constantine. Quoique nous disions, les mots ne sauraient exprimer notre profonde gratitude pour avoir dirigé ce travail. Ses encouragements, ses conseils et sa patience nous ont beaucoup aidé à surmonter toutes les difficultés.*

*Nos remerciements les plus vifs s'adressent aussi aux membres de jury **Dr ALMI Hiba** comme présidente et **Dr MILETT Asma** comme examinatrice, pour l'intérêt qu'elles ont porté à notre recherche tout en acceptant d'évaluer, d'examiner et de juger ce travail*

*Nous remercions l'ingénieure du laboratoire de Mycologie biotechnologie et de l'activité microbienne Madame **ABBAZ Samira** qui nous a aidé pour la réalisation de la partie pratique.*

*A toute personne qui a participé de près ou de loin, directement ou indirectement à la réalisation de ce travail.*

## *Liste des figures*

<b>Figure 01 :</b> Les symptômes de la fusariose chez le blé.....	06
<b>Figure 02 :</b> Cycle de <i>Fusarium sp.</i> .....	07
<b>Figure 03 :</b> Symptômes d'alternariose sur feuilles et fruits de tomate.....	08
<b>Figure 04 :</b> Cycle évolutif d' <i>Alternaria sp.</i> .....	09
<b>Figure 05 :</b> Site d'échantillonnage Teleghma (Mila).....	16
<b>Figure 06 :</b> Photo des feuilles de blé présentant des symptômes.....	21
<b>Figure 07 :</b> Méthode de confrontation directe par stries entre les souches bactériennes et les agents phytopathogènes .....	24
<b>Figure 08 :</b> Confrontation entre l'agent phytopathogène et l'agent antagoniste par contact direct sur milieu PDA.....	25
<b>Figure 09 :</b> Fermentation des souches antagonistes.....	26
<b>Figure 10 :</b> Extraction liquide-liquide.....	27
<b>Figure 11 :</b> Chromatographie sur couche mince.....	27
<b>Figure 12 :</b> Test de catalase.....	30
<b>Figure 13 :</b> Test mannitol mobilité des bactéries isolées et le témoin.....	31
<b>Figure 14 :</b> Test de Citrate.....	32
<b>Figure 15 :</b> Tests de rouge méthyle et Voges Proskauer (RM et VP).....	32
<b>Figure 16 :</b> Test d'uréase et d'indole.....	33
<b>Figure 17 :</b> Test de nitrate réductase.....	33
<b>Figure 18 :</b> Résultats d'Api 20 E après 24h d'incubation à 30°C.....	35

## *Liste des tableaux*

<b>Tableau 01 :</b> La classification générale des champignons phytopathogènes et leurs caractéristiques.....	04
<b>Tableau 02 :</b> Quelques maladies fongiques qui touchent les plantes.....	05
<b>Tableau 03 :</b> Aspects macroscopiques et microscopiques des isolats bactériens.....	28
<b>Tableau 04 :</b> Résultats du test catalase, oxydase et nitrate.....	34
<b>Tableau 05 :</b> Résultats des tests biochimiques (mannitol mobilité, RM, VP, TSI, urée, indole et citrate).....	34
<b>Tableau 06 :</b> Les différentes activités enzymatiques des bactéries isolées.....	36
<b>Tableau 07 :</b> Aspects macro et microscopiques des champignons phytopathogènes isolés.....	39
<b>Tableau 08 :</b> Résultats du test d'antagonisme in vitro utilisant la méthode des stries.....	42
<b>Tableau 09 :</b> Les diamètres de croissance mycélienne des souches témoins.....	43
<b>Tableau 10 :</b> Taux d'inhibition de la croissance mycélienne par confrontation directe par la méthode des stries.....	43

## *Table des matières*

### *Liste des figures*

### *Liste des tableaux*

Introduction.....	01
-------------------	----

## **Partie bibliographique**

### **Chapitre 1 : Les champignons phytopathogènes**

1. Généralités.....	03
2. Classification des champignons phytopathogènes.....	03
3. Les maladies cryptogamiques.....	04
3.1. La fusariose.....	05
3.1.1. Symptômes.....	05
3.1.2. Cycle biologique.....	06
3.2. L'alternariose.....	07
3.2.1. Cycle biologique.....	08

### **Chapitre 2 : Contrôle biologique**

1. Définition du biocontrôle.....	10
2. Antagonisme.....	11
2.1. Antibiose.....	12
2.2. Compétition.....	12

2.3. Parasitisme.....	13
2.4. Enzymes lytiques.....	13
3. Intérêt du Biocontrôle.....	13
4. Agents de biocontrôle.....	14
4.1. Le genre <i>Bacillus</i> .....	14
4.2. Le genre <i>Pseudomonas</i> .....	15

## **Partie expérimentale**

### **I. Matériel et méthodes**

1. Isolement des Bactéries antagonistes.....	16
1.1 L'échantillonnage.....	16
1.2. Isolement.....	16
1.3. Purification des souches antagonistes.....	17
1.4. Identification des souches antagonistes.....	17
1.4.1. Caractères morphologiques.....	17
1.4.2. Etude des caractères biochimiques.....	17
2. Isolement des champignons phytopathogènes.....	21
2.1 Echantillonnage.....	21
2.1. Isolement.....	22
2.2. Purification.....	22
2.3. Identification de l'agent phytopathogène.....	22

3. La mise en évidence des enzymes de dégradation de la paroi fongique.....	23
3.1. Recherche de l'activité amylolytique.....	23
3.2. Recherche de l'activité cellulolytique.....	23
3.3. Recherche de l'activité protéolytique.....	23
3.4. Recherche de l'activité pectinolytique.....	23
3.5. Recherche de l'activité chitinolytique .....	24
4. Antagonisme <i>in vitro</i> des bactéries antagonistes, à l'égard des champignons phytopathogènes isolés	24
4.1. Méthode de confrontation directe par stries.....	24
4.2. Méthode de confrontation directe par disque.....	24
5. Production par Fermentation et extraction des métabolites bioactifs .....	26
5.1. Production par fermentation.....	26
5.2. Extraction des métabolites bioactifs.....	26
5.3. Séparation des molécules bioactives par Chromatographie sur couche..... mince	27

## **Résultats et discussion**

1. Isolement des bactéries antagonistes.....	28
1.1. Identification des isolats bactériens antagonistes.....	28
1.1.1. Identification macro et microscopique.....	38

1.1.2. Identification biochimique .....	30
1.2. La mise en évidence de l'activité enzymatique.....	35
2. Isolement des champignons phytopathogènes.....	38
2.1. Identification des champignons phytopathogènes.....	38
3. Antagonisme <i>in vitro</i> des bactéries antagonistes, à l'égard des champignons phytopathogènes isolés .....	41
4. Production par fermentation et extraction des métabolites bioactifs.....	45
4.1. Séparation des molécules par Chromatographie sur couche mince (CCM)....	45
<b>Reference</b> .....	50

**Annexe**

**Résumé**





***Introduction***

Les plantes subissent les attaques de nombreux bio-agresseurs. Par ailleurs, la majorité des maladies des plantes sont causées par les champignons telluriques, largement distribuées dans le sol, provoquant les pourritures des cultures aussi ils endommagent des nombreuses espèces d'arbres forestiers. À l'instar des autres pays, les maladies dues aux champignons telluriques sont rencontrées en Algérie. Entres autres les fusarioses qui affectent diverses cultures : des lentilles (Belabid, 2004), du pois chiche (Bouregghda et Bouzned, 2009) et le palmier dattier (Sabaou, 1983). Par ailleurs, l'helminthosporiose (Bouzerzour, 1994), les taches chocolat (Bouznad, 2001) et la verticilliose (Bellahcene, 2005) menacent les cultures en Algérie.

Les microorganismes pathogènes et surtout les champignons telluriques, sont difficiles à contrôler, parce qu'ils peuvent survivre dans le sol pour de longues périodes (Tschen, 1985).

Pour lutter contre ces maladies, l'application illimitée de pesticides dans les sols peut entraîner la pollution de l'environnement et les eaux souterraines. En outre, l'efficacité des fongicides chimiques est souvent compromise par l'émergence de pathogènes résistants.

Face à l'aggravation des problèmes de lutte contre les maladies phytopathogènes, des recherches sérieuses sont nécessaires pour identifier d'autres méthodes alternatives pour la protection des végétaux, qui dépendent moins de substances chimiques et qui sont plus respectueux à l'environnement. La lutte biologique est l'une des méthodes prometteuses, qui consiste à combattre une maladie causée par un organisme au moyen d'un autre organisme (Corbaz, 2003). Parmi ces microorganismes les bactéries que l'on trouve naturellement dans le sol de la zone de la rhizosphère qui correspond à la zone du sol dans laquelle la microflore tellurique est soumise aux influences des racines, sont les meilleurs candidats pour appliquer en forme de cellules vivantes. Ils sont connus pour leur production de métabolites bioactifs tel que : *Bacillus*, *Streptococcus*, *Pseudomonas* (Campbell et Greaves 1990; Wastover *et al.*, 1997)

Actuellement en Algérie la lutte chimique est la seule moyenne utilisée pour lutter contre les maladies phytopathogènes, alors il est nécessaire de trouver de nouvelle méthode de traitement contre ces maladies provoquées par des moisissures qui causent des pertes graves en rendement dans le domaine de l'agriculture.

De ce fait, le présent travail consiste à

- Isolement et identification morphologique des agents phytopathogènes à partir des échantillons de Blé présentant des symptômes de maladies ;
- Isolement, identification et sélection des bactéries antagonistes à partir du sol vis-à-vis des agents phytopathogènes;
- Caractérisation des souches bactériennes antagonistes performante et évaluation de leur capacité à produire des enzymes hydrolytiques (amylase, pectinase, chitinase et protéase);
- Etude de l'effet antagoniste de ces bactéries isolées sur les agents phytopathogènes par la méthode de confrontation par contact direct.



*Partie  
bibliographique*

## Chapitre 1 : Les champignons phytopathogènes

### 1. Généralités

Les champignons représentent un groupe hétérogène de microorganismes pluricellulaire ubiquistes pouvant se développer à l'état saprophyte ou parasite sur de nombreux substrats (Bennett *et al.*, 2003).

Les champignons phytopathogènes ou dites telluriques constituent un groupe d'organismes microscopiques hétérotrophes, présentant des structures et des caractéristiques biologiques extrêmement diversifiées (Kirk *et al.*, 2001). Ils sont à l'origine de la plupart des maladies cryptogamiques chez les plantes, ces champignons sont capables d'infecter n'importe quel tissu de la plante, en allant de la racine jusqu'au fruit, et ce peu importe le stade de croissance de la plante (Abdelkader, 2012).

La plupart des champignons phytopathogènes peuvent produire des mycotoxines qui conduisent aux différents symptômes de l'infection chez les plantes (Boudih, 2011). Ces mycotoxines sont des métabolites secondaires, de faible poids moléculaire, et qui sont capables d'induire un effet toxique à de faibles concentrations (Tola et Kebede, 2016).

La contamination des plantes par les mycotoxines peut se produire avant la récolte lorsque le végétal est en croissance, ou après la récolte pendant la transformation, le conditionnement, la distribution et le stockage des produits alimentaires (Pereira *et al.*, 2014). Parmi les champignons phytopathogènes qui sont connus comme étant producteur de mycotoxines, on cite : *Aspergillus*, *Fusarium*, *Alternaria* et *Penicillium*.

### 2. Classification des champignons phytopathogènes

Les champignons phytopathogènes représentent environ 1000 espèces différentes. Ils appartiennent aux différents groupe du règne des eumycocètes ou « champignons vrais » : Ascomycètes, Basidiomycètes, Chytridiomycètes, Zygomycètes et Deutéromycètes (champignons imparfaits) (Tableau 1).

**Tableau I** : La classification générale des champignons phytopathogènes et leurs caractéristiques

Division	Les principaux caractéristiques	Références
Ascomycota	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Reproduction sexuée avec des spores endogènes (ascospores).</li> <li>• Mycélium septé (cloisonné).</li> <li>• Spores non flagellées.</li> </ul>	(Canard et Senequier- Crozet, 2016)
Bazidiomycota	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Reproduction sexuée avec des spore exogènes (basidiospores).</li> <li>• Mycélium septé (cloisonné), septomycètes.</li> <li>• Pores non flagellées.</li> </ul>	(Canard et Senequier- Crozet, 2016)
Chytridiomycota	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Ancêtre de tous les champignons.</li> <li>• Reproduction sexuée et asexuée.</li> <li>• Mycélium siphonné, siphomycètes.</li> <li>• Spores flagellées.</li> </ul>	( Kiffer et Morelet, 1997)
Deuteromycota	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Pas de reproduction sexuée (reste inconnue).</li> <li>• Mycélium cloisonné, septomycètes.</li> <li>• Spores non flagellées.</li> </ul>	( Kiffer et Morelet, 1997)
Glomeromycota	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Pas de reproduction sexuée.</li> <li>• Mycélium siphonné (non cloisonné).</li> <li>• Spores non flagellées.</li> </ul>	(Blandeau, 2012 ;Canard et Senequier- Crozet, 2016)
Zygomycota	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Selon le mode de reproduction on trouve deux classes :</li> <li>• Zygomycètes : reproduction par mitospores (forme asexuée) ;</li> <li>• Trichomycète : reproduction par zygosporos (forme sexuée).</li> </ul>	(Lennartsson, 2012)

### 3. Les maladies cryptogamiques

Les maladies cryptogamiques sont causées par plusieurs champignons phytopathogènes, transportés par le vent, la pluie ou par contact, les spores de ces champignons se disséminent et se déposent sur les plantes. Là, elles germinent et pénètrent les tissus, après une période d'incubation, les champignons se développent et ainsi les premiers symptômes apparaissent : feuilles nécrosées, rameaux tachés, etc. (Agrios, 2005) (Tableau 2).

Ces maladies peuvent avoir des conséquences économiques, sociales et écologiques à l'échelle mondiale. L'organisation des Nations Unies pour l'alimentation et l'agriculture estime qu'entre 20 et 40% des rendement mondiaux des cultures sont réduits chaque année en raison des dommages causés par les bioagresseurs y compris les phytopathogènes (FAO, 2015).

**Tableau 2 :** Quelques maladies fongiques qui touchent les plantes (Blancard, 2009).

Maladie	Agent infectieux	Maladie	Agen infectieux
Mildiou	<i>Phytophthora infestant</i>	Fusariose	<i>Fusarium oxysporum f.sp.lycopersici</i>
Alternariose	<i>Alternaria tomatophila</i>	Verticilliose	<i>Verticillium albo-atrum et verticillium dahliae</i>
Moisissure grise	<i>Botrytis cinerea</i>	Cadosporiose	<i>Pasalorafulva</i>
Septoriose	<i>Septoriahy copersici</i>	Racine liégeuses	<i>Pyrenocha et alycopersici</i>
Oïdium	<i>Oïdium neolyopersici</i>	Anthracnose	<i>Colletotrichum coccodes</i>

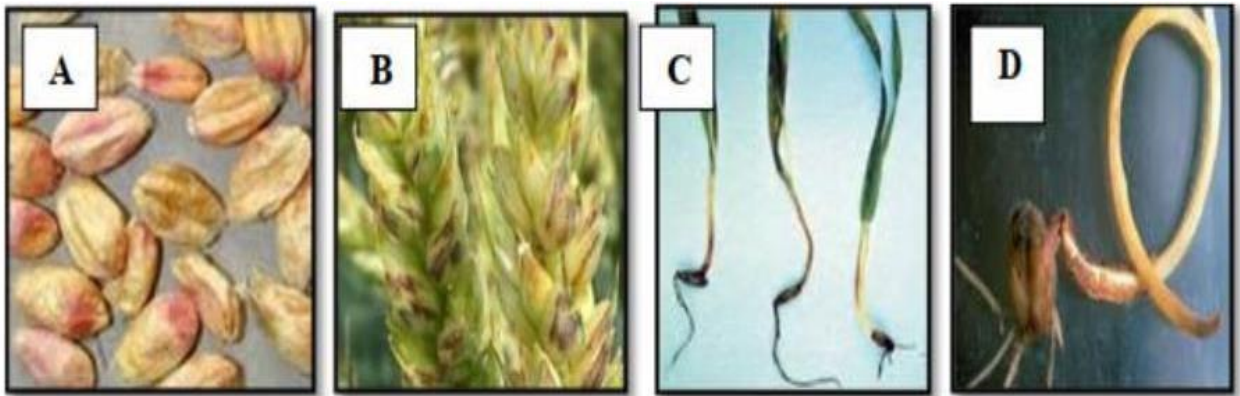
### 3.1. La fusariose

La fusariose est une maladie fongique nuisible sur une gamme de la majorité des céréales. Elle peut être causée par une vingtaine d'espèces du genre *Fusarium* (Bettou et Righi, 2018). Cette maladie présente une incidence directe sur les rendements provoquant une diminution de qualité et de nombre de grains par épi accompagnée du risque de présence de mycotoxine dans les grains (Derdj, 2017).

#### 3.1.1. Symptômes

Ces maladies d'origine tellurique peuvent survenir à tous les stades de développement des céréales, elles attaquent tous les organes des plantes depuis les racines jusqu'aux épis. Les symptômes sont très visibles sur champ car elles provoquent généralement un flétrissement des organes (BETTOU et RIGHI, 2018). Ces parasites se développent sur les grains mûrs qui peuvent être ratatinés, légers, blancs crayeux ou parfois roses. On les trouve aussi sur les racines sous forme de pourritures brunes et molles. Rarement, quelques symptômes sont remarqués sur

les feuilles sous forme des taches brunâtres ovales et verdâtre virant au marron et au dessèchement (MAHFOUD et LASBAHANI, 2015). Sur les plantes adultes, on observe une brûlure totale ou partielle des épis. Les premiers symptômes apparaissent au centre de l'épi d'où ils progressent ensuite vers le haut et vers le bas sous forma d'un blanchiment d'une partie ou de la totalité de l'épi (**Figure 1**) (SEDRATI et LAKEHAL, 2018)

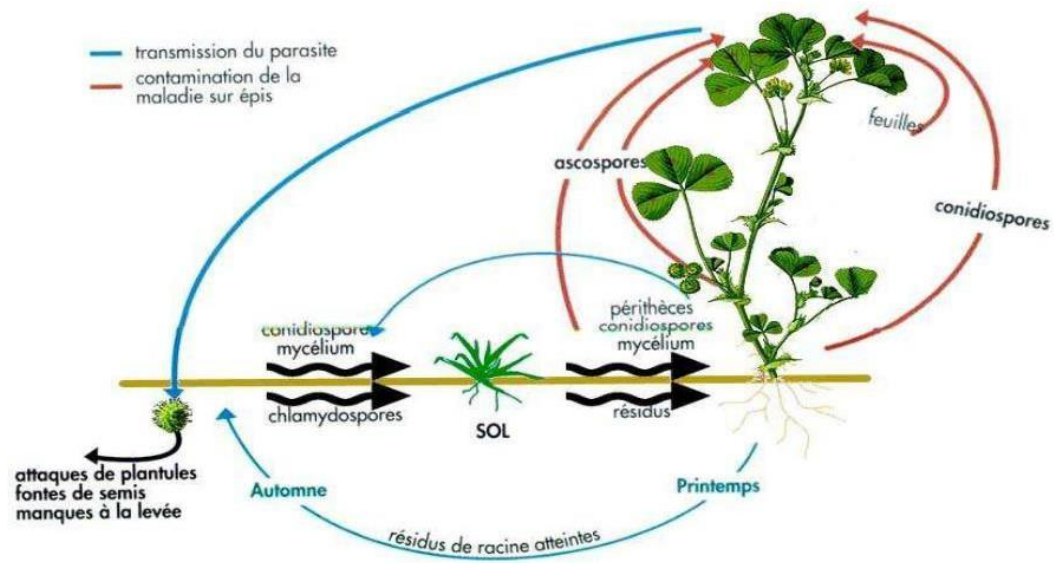


**Figure 01** : Les symptômes de la fusariose chez le blé: A) grains de blé infecté par le *Fusarium* au stade de germination, B) pourriture des tiges et des racines au stade plantule, C) épis de blé fusarioses présentant des symptômes de nécroses; D) grains de blé provenant d'épis variablement infectés (ORLICI et BENKARA, 2018).

### 3.1.2. Cycle biologique

Les spores de *Fusarium* se déposent sur les épis avec l'aide du vent et des éclaboussures. Les conditions les plus propices à l'infection sont des périodes de 48 à 72 heures de forte humidité et des températures de 24 à 30 °C. Des périodes plus longues d'humidité élevée combinées à des températures fraîches peuvent aussi provoquer l'infection (**Figure 2**) (ABDI, 2015). La gravité de la fusariose, qui varie selon le champ et l'année, dépend des conditions climatiques, du stade de croissance de la plante et de la présence du pathogène. Plus l'infection survient plus la maladie est grave (Caron, 2000 ).





**Figure 2** Cycle de *Fusarium sp.* : Illustration des différents modes d'action (Caron, 2000)

### 3.2. L'alternariose

L'alternariose est une maladie cryptogamique causée par le champignon parasite *Alternaria*, la gamme de plantes hôtes concernées par l'alternariose est très variée (carotte : *Alternaria dauci* , oignons : *Alternaria porri*, pomme de terre : *Alternaria solani*, etc.), et certaines espèces peuvent provoquer d'importants dégâts sur des espèces cultivées occasionnant des pertes financières significatives (Logrieco *et al.*, 2009). C'est le cas par exemple de l'alternariose de la tomate qui est une maladie importante et largement distribuée dans le monde, causant des pertes économiques de rendement, cette maladie est provoquée par *Alternaria solani* et *Alternaria alternata* (Milet, 2017).

L'alternariose se reconnaît facilement par les lésions nécrotiques sur les feuilles, qui sont principalement concentriques et souvent entourées de tissu chlorotique jaune (**Figure 03**) (Belosokhov *et al.*, 2017).

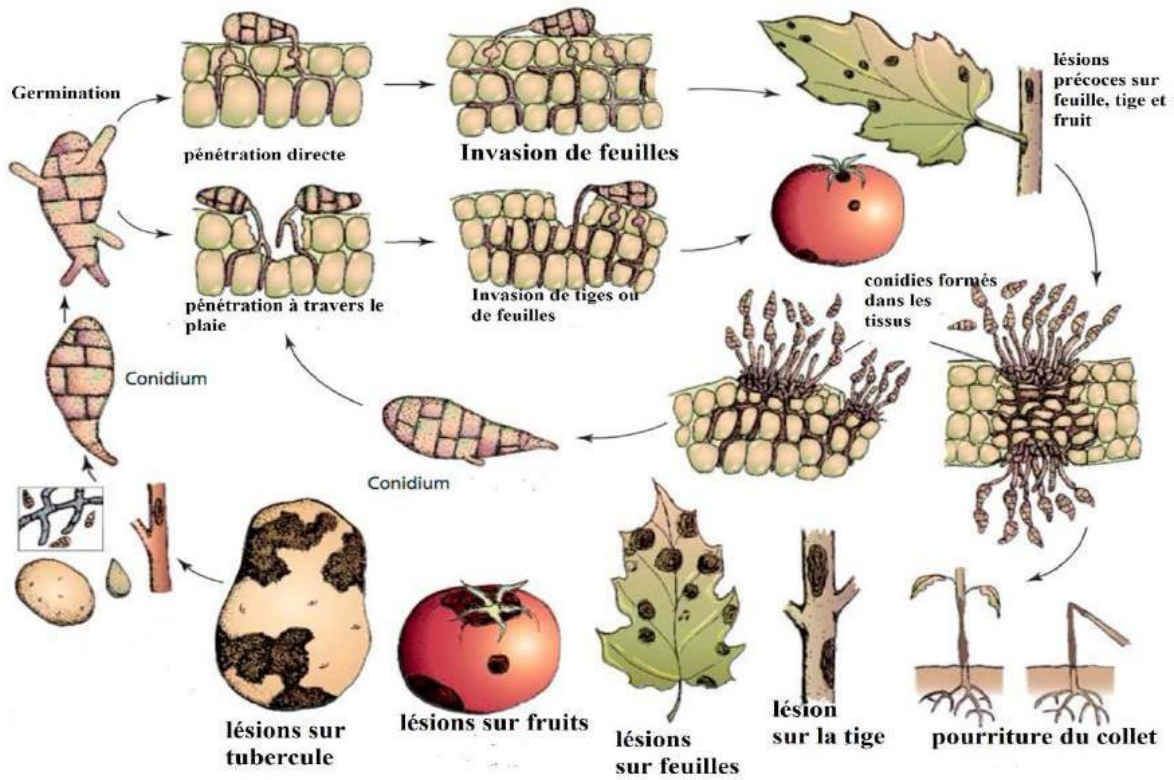


**Figure 03** : Symptômes d'alternariose sur feuilles (A) et fruits (B) de tomate (Agrios, 2005).

### 3.2.1. Cycle biologique

Les espèces d'*Alternaria* vivent dans le sol, les débris végétaux, les graines et les hôtes alternatifs sous la forme de conidies ou de mycéliums, qui peuvent servir de sources primaires d'inoculum. L'épaisse paroi cellulaire des conidies permet à ces champignons de s'adapter aux conditions climatiques défavorables. Les conidies germent à une température de 8 à 32°C dans des conditions fraîches et humides en présence d'humidité pour former des tubes germinatifs. Les tubes germinatifs pénètrent directement dans les tissus de l'hôte ou pénètrent par les stomates ou les plaies, provoquant ainsi une infection. Les lésions apparaissent après 2 à 3 jours d'infection en fonction des conditions environnementales, de l'âge des feuilles et de la sensibilité du cultivar, et les spores sont produites 3 à 5 jours après l'apparition des lésions (Adhikari *et al.*, 2017).

En général, une longue période d'humidité est nécessaire pour la production de spores, mais les spores sont également produites dans des conditions alternées d'humidité et de sécheresse. Tout d'abord, les conidiophores se développent pendant les nuits humides, qui produisent ensuite des spores ou des conidies dans une autre nuit humide après la période de lumière du jour et de sécheresse. Dans l'étape suivante, les conidies sont rapidement dispersées par le vent et les éclaboussures de pluie et continuent le cycle de la maladie dans d'autres parties saines de la même plante ou de plantes différentes (**Figure 04**) (Adhikari *et al.*, 2017).



**Figure 04:** Cycle évolutif d'*Alternaria* sp. (Adhikari et al., 2017).

## Chapitre 2 : Contrôle biologique (Biocontrôle)

### 1. Définition du biocontrôle

Le terme de contrôle biologique et son synonyme abrégé de biocontrôle ont été utilisés dans différents domaines de la biologie, notamment la phytopathologie. En pathologie végétale, le terme s'applique à l'utilisation d'antagonistes microbiens pour supprimer les maladies afin de contrôler les populations de ravageurs de la récolte (Cook, 1993).

Selon le Conseil national de la recherche des États-Unis, les agents de lutte biologique devraient être définis comme l'utilisation d'organismes naturels ou génétiquement modifiés et l'utilisation de leurs gènes ou leurs produits métaboliques afin de réduire ou supprimer les effets nocifs des agents pathogènes (khasa, 2017).

Selon Jyoti et Singh, (2016) la définition du biocontrôle diffère selon la cible de suppression ; nombre, type et source d'agents biologiques ; et le degré et le moment de l'intervention. Plus généralement, le contrôle biologique est la suppression des activités nuisibles d'un organisme par un ou plusieurs autres types d'organismes, souvent appelés ennemis naturels.

Selon Guo, (2020), le contrôle biologique implique l'utilisation d'ennemis naturels pour réduire les populations de ravageurs. Il est rentable avec des conséquences environnementales négatives minimisées.

Selon Mukerji, (2000) un agent de lutte biologique idéal devrait posséder un certain nombre de caractéristiques, à savoir :

- Taux de survie élevé dans le sol pendant une période prolongée.
- Forte probabilité de contact avec l'agent pathogène.
- Actif dans les conditions environnementales requises.
- La multiplication de masse doit être simple et peu coûteuse.
- Doit être efficace et économique.
- Ne devrait pas être un risque sur la santé.

Les microorganismes utilisés en contrôle biologique sont principalement des bactéries, des champignons, des levures (Gerbore, 2013). Deux termes sont parfois rencontrés pour nommer ces derniers :

1. Celui de ABC, pour « Agent de biocontrôle », est utilisé pour le microorganisme dont l'action est directe sur l'agent pathogène.
2. Lorsque le microorganisme a une action sur la plante, le terme de PGPM microorganismes favorisant la croissance des plantes « en anglais Plant Growth Promoting Microorganism » est employé pour les micro-organismes ont le potentiel d'augmenter la croissance des cultures en améliorant l'efficacité de l'utilisation des nutriments, en tolérant les stress biotiques et abiotiques et en résistant aux maladies (Sellitto et al., 2021). Ce groupe de microorganismes inclus les PGP-B pour les bactéries, PGP-F (Fungi) pour les champignons, PGP-Y (Yeast) pour les levures et PGP-R pour les rhizobactéries.

Les différents agents microbiens de lutte biologique les plus communément connus sont *Agrobacterium sp.*, *Bacillus spp.* et *Pseudomonas spp.* qui sont des agents bactériens et *Aspergillus spp.*, *Penicillium sp.*, *Ampelomyces sp.*, *Candida sp.*, *Coniothyrium sp.*, *Gliocladium sp.* et *Trichoderma spp.* qui sont des agents fongiques (Gawai, 2018).

## 2. Antagonisme

L'antagonisme désigne une d'inhibition ou une action défavorable d'un organisme sur la croissance et l'activité d'un autre microorganisme pathogène. C'est le cas d'un grand nombre de bactéries et/ou champignons.

Le phénomène d'antagonisme est considéré comme étant le moyen de lutte biologique le plus efficace, puisqu'il interagi directement avec l'agent pathogène et/ou indirectement c'est-à-dire avec la plante hôte (Tomashow, 1996).

L'antagonisme est l'action d'opposition entre deux systèmes, deux substances, deux fonctions au deux organismes ; créant une situation néfaste pour l'un ou pour l'autre. L'antagonisme stimule la formation des spores et provoque un développement de forme, de taille et de structure des hyphes, de la direction du développement, cessation complète du développement et raccourcissement des segments d'hyphes ou, parfois même lyse du mycélium fongique (WELLER, 1988). Les principaux modes d'action de l'antagonisme microbien sont :

## 2.1. Antibiose

La sécrétion de substances antibiotiques par les microorganismes est un phénomène fréquent. Certains métabolites sont capables d'interférer avec la germination, la croissance mycélienne et/ou la sporulation des agents phytopathogènes. D'autres entraînent le relargage de composés cellulaires suite à la perturbation de la perméabilité cellulaire. L'antibiose est le mode d'action le plus étudié chez les agents de lutte biologique (**Jijakli, 2003**). Elle consiste à la production par l'agent antagoniste d'antibiotiques efficaces contre l'agent pathogène (**Corbaz, 1990**). Ces antibiotiques vont ralentir ou arrêter la croissance de l'agent pathogène. La fonte des semis du coton due à *Pythium ultimum* peut être combattue par un enrobage des semences avec la souche de *Pseudomonas fluorescens* Pf 5. Cette souche produit un antibiotique, la polyulutéline. La fonte des semis est ainsi réduite de façon significative aussi bien par l'utilisation de ce *Pseudomonas* comme agent d'enrobage que par l'utilisation de l'antibiotique purifié (**Howell et Stipanovic, 1980**).

## 2.2. Compétition

La compétition pour les éléments nutritifs entre en jeu lorsqu'il y a simultanément consommation du même composé par plusieurs microorganismes. Pour être un compétiteur efficace, un agent antagoniste doit être capable d'utiliser rapidement et efficacement les éléments nutritifs présents en faible concentration sur les organes de la plante (**Jijakli, 2003**).

En occupant la même niche écologique qu'un agent pathogène, un microorganisme peut entrer en compétition avec l'agent pathogène au niveau des nutriments, ce qui peut diminuer ou même empêcher la croissance de cet agent pathogène. Par exemple, certaines bactéries produisant des sidérophores ont un avantage écologique. Les sidérophores de ces microorganismes captent le fer, pouvant le rendre ainsi non disponible pour l'agent pathogène ce qui, conséquemment, limite sa croissance. Ce mécanisme est souvent attribué aux agents antagonistes de l'espèce *Pseudomonas fluorescens* (**Corbaz, 1990**). Des sidérophores produits par *P. fluorescens* formeraient un complexe avec les métaux du sol et les rendraient non disponibles pour les autres microorganismes de son environnement dont le *Pythium ultimum*, causant la fonte des semis (**Howell et Stipanovic, 1980**).

Outre la compétition nutritionnelle, la compétition spatiale contribue aussi à la réduction des infections racinaires par les agents phytopathogènes (**Benítez, 2004**). En effet, les microorganismes ayant la capacité de coloniser les racines comme les bactéries promotrices de

la croissance des plantes (Plant Growth Promoting Bacteria, PGPB) protègent les racines et occupent les sites d'infection aux agents phytopathogènes (**Benítez, 2004 ; Compant, 2005**).

### 2.3. Parasitisme

Ce mécanisme de lutte consiste en une interaction directe entre deux microorganismes où les tissus vivants de l'un constituent une base nutritive pour l'autre (**Helluy et Holmes 2005**). Il implique l'invasion des cellules de l'agent pathogène par le microorganisme antagoniste (**Corbaz, 1990**). L'agent antagoniste utilisera des enzymes lytiques tels que des glucanases, des chitinases et des lysozymes pour dégrader les parois de l'agent pathogène. *Valueva et Mosolor* (2004) ont montré que les enzymes utilisées par les antagonistes ont souvent une activité en mélange ou en synergie avec les antibiotiques. Par exemple, il a été démontré que les hyphes de l'agent pathogène *Rhizoctonia solani* et les spores de l'agent pathogène *Cochliobolus sp.* Peuvent être perforées dans le sol par des myxobactéries du genre *Polyangium* et des amibes *vampyrellides*. Cette dégradation entraîne une diminution de la population des agents pathogènes. Certains actinomycètes produisent aussi des chitinases et glucanases pour dégrader les parois de *Fusarium oxysporum* (**El-Tarabily, 1997 ; Sabaou, 1998 ; Errakhi, 2008**).

### 2.4. Enzymes lytiques

Divers micro-organismes exercent leurs propriétés antagonistes par l'intermédiaire d'enzymes extracellulaire qui lysent les parois cellulaires des micro-organismes sensibles, qu'ils peuvent utiliser comme aliment. Ce phénomène propre aux bactéries et aux champignons, peut affecter tous les groupes de micro-organismes du sol. Les parois des organismes-cibles sont digérées par des enzymes extracellulaire (chitinases, glucanases et cellulases). Parfois accompagnés de toxines destinées à immobiliser ou à tuer les proies. Le contenu des cellules ainsi dénudées diffuse dans le milieu, ou d'autres enzymes notamment des protéases, assurent sa dégradation. Les produits de digestion sont absorbés par le microorganisme responsable de la lyse (**DOMMARGUES et MANGENOT, 1970**). Parmi ces micro-organismes on trouve les Eubactéries, les actinomycètes mycolytiques, les Myxobactéries et les Myxomycètes (**KATZNELSON et COLL, 1964**).

## 3. Intérêt du Biocontrôle

Les principaux avantages du biocontrôle sont son innocuité, sa spécificité, son acceptabilité sociale potentielle, l'absence de développement de résistance chez les ravageurs, son adaptabilité aux cultures et la potentielle valeur ajoutée aux produits ainsi cultivés (**NOEMIE,**

2010). En plus de son rôle dans la restauration de la biodiversité dans l'écosystème, aussi il présente un rôle important et efficace dans le contrôle des maladies phytopathogènes (HAMEL, 2016). Il peut être utilisé en remplacement aux autres luttés. Il peut s'agir de l'introduction d'un organisme pour lutter contre un ravageur exotique (lutte biologique classique), de l'augmentation de l'occurrence d'un ennemi naturellement présent en rajoutant dans le milieu (lutte biologique par augmentation) ou en protégeant son milieu (lutte biologique par protection). Sont principalement utilisés des insectes, bactéries, nématodes et champignons (NOEMIE, 2010). Le bio contrôle est considéré comme une voie alternative à l'utilisation des produits chimiques qui constituent un danger sur l'environnement et sur l'homme. L'utilisation de plusieurs modes d'action par un seul agent antagoniste et sa capacité d'adaptation à la rhizosphère contribuent à ce que la biocontrôle devient plus durable que les produits chimiques. Plusieurs microorganismes ont montré leur efficacité dans la protection du blé. Les genres *Bacillus*, *Lysobacter* et *Pseudomonas* sont les agents bactériens les plus étudiés ainsi que les levures des genres *Rhodotorula*, *Sporobolomyces* et *Cryptococcus* (HAMEL, 2016). Parmi les champignons antagonistes les plus utilisés dans le contrôle biologique, nous citons les genres : *Trichoderma* (BENMEHIDI et BOUKAABACHE, 2018).

#### 4. Agents de biocontrôle

Le contrôle biologique avec les microorganismes bénéfiques permet d'augmenter le rendement en supprimant directement l'inoculum pathogène et/ou en induisant la résistance des plantes. Plusieurs travaux ont été entrepris pour la sélection des antagonistes aux microorganismes phytopathogènes afin de les utiliser comme agents potentiels de lutte biologique (Si Amar, 2017).

Quelques micro-organismes sont connus par leur capacité d'occuper la rhizosphère et de coloniser les tissus internes des plantes appelés également des endophytes (Berg et al., 1994) et seulement quelques bactéries antagonistes ont été identifiées comme des agents potentiels efficaces contre les champignons phytopathogènes (Wilhelm et Taylor, 1965) appartenant au genres *Pseudomonas*, *Bacillus* ou *Streptomyces* (Berg et al., 2001 ; Mercado-Blanco et al., 2004 ; Tjamos et al., 2004).

##### 4.1. Le genre *Bacillus*

Le genre *Bacillus* est très hétérogène, comprend au moins 36 espèces.



Ce sont en générale des bacilles unicellulaire à GRAM +, oxydase négatif, catalase positif, mobiles sauf *Bacillus anthracis*.

Les nombreuses espèces du genre présentent un large éventail de capacités physiologiques qui leur permettent de vivre dans tous les milieux naturels. Une seule endospore est formée par cellule. Les spores résistent à la chaleur, au froid, aux radiations, à la dessiccation et aux désinfectants (Turnbull et al., 1991).

*Bacillus* est le genre le plus abondant dans la rhizosphère, et l'activité PGPR de certaines de ces souches est connue depuis de nombreuses années, ce qui permet une large connaissance des mécanismes impliqués. Il existe un certain nombre de métabolites libérés par ces souches (Charest *et al.*, 2005), qui affectent fortement l'environnement en augmentant la disponibilité des nutriments des plantes. Les espèces de *Bacillus* sont naturellement présentes à proximité immédiate des racines des plantes (Sivasakthi *et al.*, 2014).

#### 4.2. Le genre *Pseudomonas*

*Pseudomonas* sont des bactéries aérobies à Gram négatif, omniprésentes dans les sols agricoles et bien adaptées à la rhizosphère. Les pseudomonades possèdent de nombreux traits qui les rendent des excellents agents de lutte biologique. Il s'agit notamment de la capacité de croître rapidement et d'être produit en masse ; utiliser rapidement les exsudats de graines et de racines ; coloniser et se multiplier dans la rhizosphère ; produire un large spectre de métabolites bioactifs (c.-à-d. antibiotiques, sidérophores, volatiles et substances favorisant la croissance) ; concurrencer agressivement d'autres microorganismes ; et s'adapter aux contraintes environnementales (Weller et al., 2002 ; Weller, 2007).

Les *Pseudomonas* possèdent de nombreux traits qui les rendent bien adaptés en tant qu'à agents de biocontrôle. La promotion directe de la croissance des plantes par les *Pseudomonas* PGPR implique généralement de fournir à la plante un composé synthétisé par la bactérie ou de faciliter l'absorption des nutriments de l'environnement. Les mécanismes directs de la promotion de la croissance des plantes impliqués par cette bactérie sont (1) la production de phytohormones (indole acide acétique IAA, cytokinines, Aminocyclopropane-1-Carboxylate (ACC) Désaminase) et, (2) la fixation de l'azote, (3) la production de sidérophore et (4) la solubilisation du phosphate (Panpatte et al., 2016).



*Matériel et Méthodes*

Le présent travail est réalisé au niveau du laboratoire de Mycologie , Biotechnologie et de l'activité antimicrobienne Université des frères Mentouri Constantine 1. Il porte sur la lutte biologique contre les maladies phytopathogènes provoquées par des moisissures qui causent des pertes graves en rendement dans le domaine de l'agriculture par l'utilisation des bactéries antagonistes.

## 1. Isolement des Bactéries antagonistes

### 1.1. Echantillonnage

L'agent antagoniste de cette étude a été isolé à partir de la région Teleghma, wilaya de Mila. En fait, les prélèvements de sol ont été effectués dans la zone rizosphérique à une profondeur de 9 à 10 cm de la surface à l'aide d'une spatule stérile et recueilli dans un récipient stérile, et les feuilles de blé ont été placées dans un sac stérile. Les sacs ont été amenés au laboratoire où ils sont conservés à 4°C jusqu'à leur utilisation (**Figure 05**).



**Figure 05** : Site d'échantillonnage Teleghma (Mila)

### 1.2. Isolement

L'isolement a été effectué selon la méthode de suspension dilution. Dans des conditions d'aseptise, 1 g de sol a été prélevé de chaque échantillon est transféré dans un tube contenant 9 ml d'eau physiologique stérile, puis agités sur un vortex pendant 5 min pour obtenir une solution mère homogène. Une série de dilution est ensuite préparée par des prélèvements successifs de 1 ml jusqu'à produire la dilution  $10^{-4}$ . Un volume de 0,1 ml est utilisé dans un

ensemencement en surface pour inoculer les milieux Gélose Nutritive et LB (Annexe). Les boîtes sont ensuite incubées à 30°C pendant 24h. Les différents types de colonies bactérienne apparues sur les milieux ont été sélectionnées et réensemencées dans les mêmes conditions précédentes jusqu'à leur purification (**Rahman *et al.*, 2012**).

### **1.3. Purification des souches antagonistes**

Après avoir isolé les souches bactériennes, la purification qui est une étape très importante et très délicate, qui prend beaucoup de temps car c'est un échantillon contenant des milliers de micro-organismes. Après la première inoculation sur les boîtes de Pétri, différentes colonies ont été obtenues, chaque colonie d'apparence différente a été ensemencée séparément. Incuber les boîtes ensemencées à 37°C pendant 24 heures. La purification des souches a été réalisée par des sous-cultures successives en milieu solide gélose nutritif (GN) jusqu'à l'obtention de colonies de même aspect et couleur dans les boîtes de Pétri (Botton *et al.*, 1990).

### **1.4. Identification des souches antagonistes**

Une identification approfondie a été réalisée, en suivant une approche taxonomique qui consiste à étudier quelques caractères morphologiques et biochimiques

#### **1.4.1. 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 ont été établies afin de différencier le type de Gram (Gram positif ou Gram négatif), les bacilles et les coques (Oulebsir- Mohandkaci, 2012).

#### **1.4.2. 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 la catalase**

Ce test met en évidence l'existence d'enzyme de catalase qui est responsable de la décomposition du peroxyde d'hydrogène en eau et oxygène, qui est synthétisé par la plupart des aérobies. La technique consiste à déposer une goutte de peroxyde d'hydrogène sur une lame

de verre, ensuite mettre une colonie bactérienne et l'étaler à l'aide d'une anse de platine (Singleton 2005).

L'interprétation du résultat se fait immédiatement : La formation des bulles d'oxygène (gaz) indique la présence de catalase sinon la bactérie est catalase négative.

#### ➤ **Recherche de l'oxydase**

Ce test se fait pour détecter les bactéries productrices d'enzyme cytochrome oxydase notamment les Gram négatif, la méthode classique est d'étaler le matériel bactérien par l'anse de platine sur le disque oxydase.

La lecture du résultat est après 10 secondes, la coloration du disque au couleur violet signifie que la bactérie est oxydase positif (aucune coloration désigne un résultat négatif) (Bousseboua, 2005).

#### ➤ **Test de mannitol mobilité**

Ce test permet d'identifier les bactéries qui sont capable de dégrader le mannitol ainsi que la mobilité de ces derniers (un milieu faiblement gélosé) (Singleton, 2005).

Ce milieu est ensemencé par une piqure centrale et incubé pendant 24h.

- L'interprétation de résultat : virage d'un indicateur coloré de pH (qui indique l'acidification de milieu), (jaune) : mannitol positif, (rouge) : mannitol négatif.
- Le trouble autour de la piqure centrale qui marque la mobilité.

#### ➤ **Test de Citrate**

Ce test facilite la détermination des espèces bactériennes qui utilisent le citrate comme seule source de carbone (Singleton, 2005).

Encensement de la pente du milieu citrate de Simmons (gélosé incliné), par des stries longitudinales à partir d'une suspension bactérienne a l'eau distillé stérile avec de l'anse de platine (Bousseboua, 2005).

Le résultat est révélé par le virage d'indicateur coloré de pH (alcalinisation) : (bleu) citrate positif, (vert) citrate négatif, incubé pendant 24h à 37 °C.

### ➤ **Tests de rouge méthyle et Voges-Proskauer (RM et VP)**

Ce test sert à étudier la voie de fermentation du glucose chez les bactéries, notamment la différenciation des Entérobactéries (bacilles Gram négatif). Le test RM révèle les Gram négatif forte productrices (produire suffisamment) d'acide, ainsi que le test VP indique la production du métabolite spécifique de la fermentation butanediolique qui est l'acétone et la fermentation des acides mixtes (VP-) qui est observé par la coloration (Singleton, 2005).

L'inoculation est dans le milieu Clark et Lubs par une goutte d'une suspension bactérienne, incubé à 37°C, pendant 48 heures. Des gouttes de rouge de méthyle et Voges-Proskauer sont ajoutées après l'incubation, afin de diviser le tube avec trouble en deux tubes.

Le résultat est interprété comme suite : Une couleur rouge (RM+), Une couleur jaune (VP-), coloration rouge (VP+).

### ➤ **Production d'uréase et d'indole**

La mise en évidence de l'indole est détectée à partir de dégradation du tryptophane (Singleton, 2005), et d'enzyme de l'uréase.

Le milieuensemencé est incubé pendant 48 heures à 37°C après l'incubation, un virage de couleur spontané en rouge qui traduit l'alcalinisation de milieu l'absence de ce dernier signifie un résultat négatif (uréase-), une goutte de réactif Kovacs est ajoutée (Singleton, 2005) pour détecter l'indole (dans le même tube).

Le résultat est positif si l'indole se dissout dans le réactif avec une couleur rouge formant un anneau surnageant.

### ➤ **Fermentation des sucres**

La gélose triple sucre-fer ou triple sugar iron (TSI) est un milieu différentiel tubulaire utilisé pour déterminer la fermentation des glucides et la production de H<sub>2</sub>S, il contient trois glucides : glucose (0,1 %), saccharose (1 %) et lactose (1%). TSI est similaire à la gélose de fer de Kligler, sauf que celle de Kligler ne contient que deux glucides : le lactose et le glucose (Lehman, 2005).

A l'aide d'une anse de platine on aensemencé la surface par des stries serrées, puis le culot par simple piqûre, il est essentiel de dévisser partiellement le bouchon pour faciliter les échanges gazeux. L'incubation à 37°C pendant 18 à 24 heures.

- La fermentation du glucose se traduit par La formation de gaz se manifeste par l'émergence de bulles dans le culot, ou par la création d'une poche de gaz qui détache entièrement le milieu du fond du tube.
- Lactose : si l'acidité est faible et neutralisée par l'utilisation des acides aminés, donc une alcalinisation (lactose -). L'acidification qui traduit l'oxydation du lactose (lactose +) et caractérisé par un virage du rouge de phénol au jaune.
- Un précipité de sulfure de fer noir, indique la réduction dans l'anaérobiose de thiosulfate en H<sub>2</sub>S (souche dite H<sub>2</sub>S+).

#### ➤ **Test de nitrate réductase**

Ce test identifie l'organisme qui est capable de réduire le nitrate (par le nitrate réductase) en nitrite.

Dans un bouillon nitrate (eau peptone par exemple), la souche bactérienne est cultivée pendant un ou plusieurs jours, ensuite l'addition des deux réactifs pour détecter le nitrite (qui désigne la réduction de nitrate).

La lecture de résultat est donc révélée par la coloration du milieu : La couleur rouge témoigne soit l'absence de nitrate, ou le nitrite forme a été déjà réduit en ammoniac ou azote, pour confirmer on ajoute de poudre de zinc (utilisée pour la réduction de nitrate en nitrite), donc la couleur rouge qui apparaitre confirme l'absence de nitrate dans la souche testée.

#### ➤ **Galerie biochimique (API 20 E)**

Cette galerie forme un système de tests biochimiques miniaturisés le plus connue, elle comprend 20 tests utilisés pour l'identification des bactéries Gram négatifs (les entérobactéries), caractérisé par des milieux de culture déshydratés (Bousseboua, 2005).

Vue qu'il y'a des tests biochimiques en commun entre la galerie Api 20 E et la galerie Api 50 CH spécifique pour les bactéries appartenant au genre *Bacillus*, et selon la disponibilité de la galerie Api 20 E, et pour compléter l'identification une étude des bactéries a été effectuée avec cette dernière. En effet, le système API20 E Bio Mérieux (Appareillage et Procédé d'Identification) il s'agit d'une version miniaturisée et standardisée des techniques biochimiques conventionnelles d'identification bactérienne. Quand une suspension bactérienne de densité convenable est répartie dans les différentes alvéoles qui composent la micro-galerie

(contenant de substrats déshydratés), les métabolites produits durant la période d'incubation se traduisent par des changements de couleur spontanés ou révélés par addition de réactifs (Camille, 2007).

- **Préparation de la galerie**

A partir d'une culture pure (de 18 à 24 heures) une suspension bactérienne a été préparée dans un tube contenant 10mL d'eau distillée stérile. L'inoculation de la galerie a été réalisée en suivant le mode opératoire du fabricant, en notant que : pour les tests CIT, VP, GEL, les tubes et les cupules doivent être remplis par la suspension bactérienne, tandis que pour les tests ADH, LDC, ODC, H<sub>2</sub>S et URE, les cupules ont été remplies avec huile de paraffine. L'incubation de la galerie a été effectuée à 30°C pendant 24 heures. La lecture des réactions de la galerie a été effectuée après l'incubation, en appliquant le tableau de lecture principale (Annexe) (Camille, 2007) .

## 2. Isolement des champignons phytopathogènes

Vu l'ampleur des dégâts qu'ils causent sur la culture de blé, les agents responsables des maladies cryptogamiques du blé ont été choisis comme modèle dans l'étude de l'antagonisme.

### 2.1. Echantillonnage

L'échantillonnage a été effectué le mois de Mars 2024 à partir de feuilles de blé cultivé dans la région de Teleghma (Mila) . Des feuilles présentant les symptômes d'infection ont été récupérées. Les feuilles infectées présentant des taches brunes et des signes de présence de champignons superficiels sur la surface (**Figure 06**).



**Figure 06.** Photo des feuilles de blé présentant des symptômes



## 2.2. Isolement

Les parties infectées sont coupées en petits morceaux, et sont trempés dans une solution de l'hypochlorite de sodium (2%) pendant deux minutes et dans une solution d'alcool 70% pendant une minute pour la stérilisation de surface puis dans de l'éthanol pendant une minute. Ces parties ont ensuite été lavées trois fois avec l'eau distillée stérile, séchées entre papier filtre stérile, puis placées sur des boîtes de Pétri contenant le milieu PDA . Les boîtes ont été incubées à 30°C pendant 7 jours avec une observation quotidienne (Nysanth *et al.*, 2022) .

## 2.3. Purification

L'opération a été effectuée dans le milieu PDA à pour but de faciliter l'identification des champignons. Les fragments ont été prélevés avec une anse de platine stérile et déposés sur de nouvelles boîtes de Petri. Les boîtes ont été incubées à 30°C pendant 7 jours (Botton *et al.*, 1990).

## 2.4. Identification de l'agent phytopathogène

L'identification des isolats fongiques est basée sur des études macroscopiques et microscopiques (Botton *et al.*, 1990).

### ➤ Observation macroscopique

Il est nécessaire de caractériser ces isolats sur milieu PDA par l'aspect de colonies qui sert de critère essentiel d'identification à l'oeil nu champignons filamenteux, il se forme des colonies cotonneuses, veloutées, poudreuses, ou granuleuses. La couleur des colonies est un facteur d'identification essentiel. Les couleurs les plus courantes sont le blanc, le crème, le jaune, l'orange, le brun et le noir. Les pigments peuvent être modifiés (Botton *et al.*, 1990).

### ➤ Observation microscopique

L'identification du genre fongique est basée sur la structure du mycélium (cloison ou non cloisonné), le type des spores, leur forme et leur couleur. L'examen microscopique d'une colonie fongique se fait après réalisation d'un étalement entre lame et lamelle, l'examen à l'objectif 40 est suffisant pour mettre en évidence la plupart et des éléments importants (Chabasse, 2002).

### 3. La mise en évidence des enzymes de dégradation de la paroi fongique

Les bactéries antagonistes utilisent diverses stratégies antagonistes contre les phytopathogènes, notamment la synthèse des sidérophores, d'antibiotique et d'enzymes hydrolytiques. Ces enzymes (amylases, protéases, cellulase, pectinases, chitinases) sont également impliquées dans la dégradation des parois cellulaires des champignons phytopathogènes (Roohallah *et al.*, 2024).

Pour tester l'activité enzymatique chez les bactéries isolées nous avons préparé 5 cultures avec 5 milieux spécifiques pour chaque enzyme, incubée à 30°C pendant 24 à 48 heures.

#### 3.1. Recherche de l'activité amylolytique

Un ensemencement par des stries sériés est effectué dans un milieu de culture contient 1% d'amidon. Après l'incubation une solution iodine (Lugol) est ajoutée et laissée en contact pendant 5 à 10 min (Ekka et Namdeo, 2018), la production d'amylase est révélée par la formation d'un halo clair autour des stries de la bactérie.

#### 3.2. Recherche de l'activité cellulolytique

Pour la cellulase on a préparé un milieu à base de carboxyméthylcellulose (CMC) (McDonald *et al.*, 2020) qui a été ensemencé par les disques des bactéries.

La lecture nécessite une coloration par une solution de rouge Congo (0.1%), après 10 à 15 min la formation d'un halo autour les colonies confirme que la souche produit cette enzyme.

#### 3.3. Recherche de l'activité protéolytique

L'inoculation est réalisée dans un milieu de culture a 5% de lait écrémé, les souches isolées productrices de protéase développent un halo autour des colonies, l'absence de ce dernier signifie l'absence de protéase.

#### 3.4. Recherche de l'activité pectinolytique

L'ensemencement est réalisé dans un milieu à base de pectine, après incubation, les boîtes sont inondées par une solution d'acétate de cuivre et laissées en contact pendant 10 min, le résultat positif se traduit par l'apparition d'un halo claire autour des colonies.

### 3.5. Recherche de l'activité chitinolytique

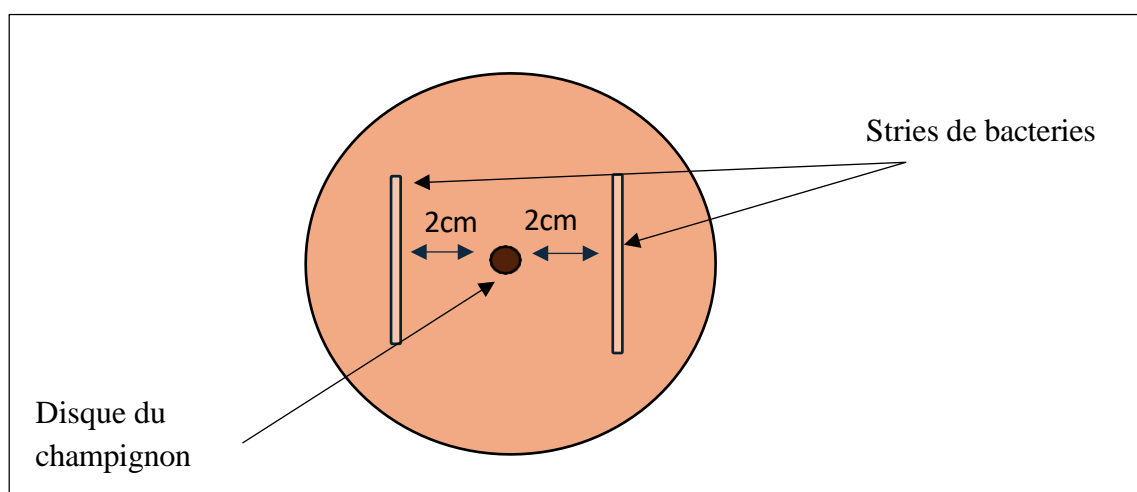
L'ensemencement des bactéries isolées a été effectué dans un milieu contenant la chitine comme seule source de carbone, après incubation, la présence de colonies violettes diffusées dans le milieu indique la dégradation de la chitine.

## 4. Antagonisme *in vitro* des bactéries antagonistes, à l'égard des champignons phytopathogènes isolés

L'action antagoniste des bactéries a été évaluée par différents tests. Cette dernière consiste à réaliser *in vitro* des confrontations directe et indirecte entre les bactéries et les champignons phytopathogènes (Nysanth *et al.*, 2022) .

### 4.1. Méthode de confrontation directe par stries

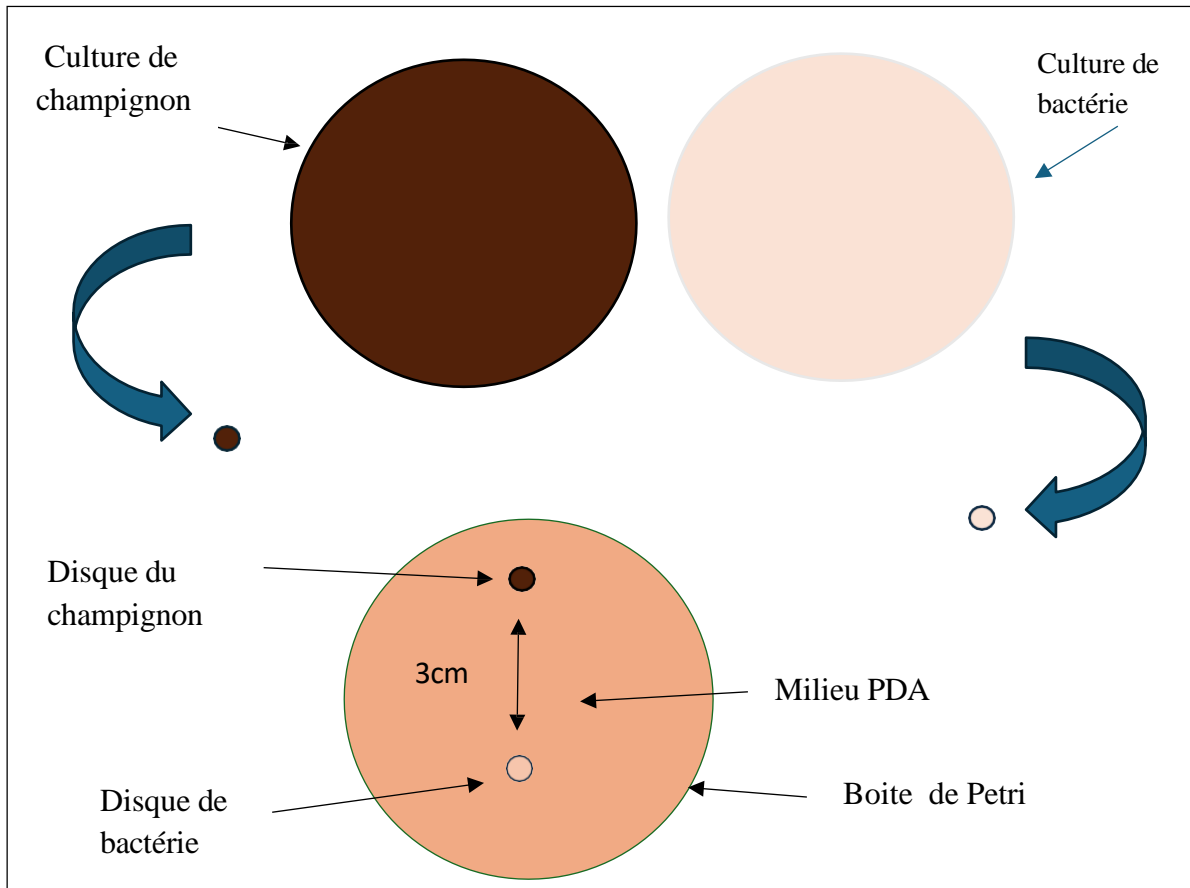
Le test de confrontation directe est réalisé dans des boîtes de Petri contenant le milieu PDA. Un disque de jeune culture mycélienne de 6 mm de diamètre a été déposé au centre de la boîte entourée par deux stries de la culture bactérienne. La distance entre les disques et les stries est de 2 cm (Figure 07). Chaque bactérie a été testée sur les différents champignons phytopathogènes isolés, ainsi deux répétitions ont été effectuées pour chaque confrontation (Bactérie/champignon). L'incubation est réalisée à 28°C, observée quotidiennement pendant 10 jours. Les témoins sont des monocultures réalisées pour chaque champignon (Nysanth *et al.*, 2022) .



**Figure 07** : Méthode de confrontation directe par stries entre les souches bactériennes et les agents phytopathogènes (Nysanth *et al.*, 2022).

#### 4.2. Méthode de confrontation directe par disque

Cette technique consiste à placer dans la même boîte de Pétri contenant un milieu PDA, deux pastilles gélées (6 mm de diamètre), l'une portant l'agent phytopathogène et l'autre l'agent antagoniste. Les deux pastilles ont été placées suivant un axe diamétral à 3 cm et à équidistance du centre de la boîte (Figure 08). Le repiquage a été effectué en même temps. L'incubation a été réalisée à 30°C pendant dix jours (Hibar, 2005). Le témoin négatif pour tester les souches fongiques en leur absence de bactéries (Kumar, 2002).



**Figure 08** : Confrontation entre l'agent phytopathogène et l'agent antagoniste par contact direct sur milieu PDA (Hibar, 2005).

##### ✓ Pourcentage d'inhibition

La notation du diamètre moyen des colonies traitées est réalisée tous les jours pendant sept jours. L'évaluation de l'inhibition est estimée par le calcul du pourcentage d'inhibition (Ghazy et El-Nahrawy, 2021) de la croissance mycélienne selon la formule décrite par [Ajjjah et al.](#), (2023).

$$I(\%) = (1 - D_n/D_o) \times 100$$

I(%) : Représente l'inhibition moyenne de la croissance mycélienne

Dn : Le diamètre moyen du champignon pathogène

Do : Le diamètre moyen du champignon témoin

## 5. Production par Fermentation et extraction des métabolites bioactifs

### 5.1. 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.

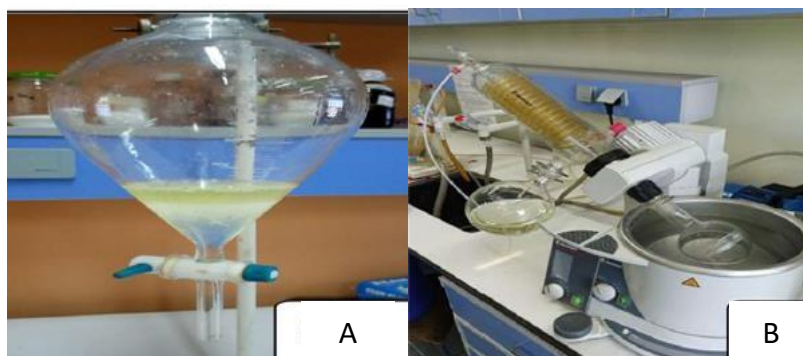
Le milieu LB broth (Annexe 01) est utilisé, des erlens meyers de 250 ml, contenant 100 ml de chaque milieu ont été inoculés par une boîte raclée d'une culture âgée de 24h pour chaque souche des bactéries antagonistes et incubés sous agitation de 150 rpm pendant 72h à une température de 28°C. Après fermentation, les erlens meyers des souches de bactéries antagonistes ont été utilisées pour effectuer l'extraction des métabolites secondaires (Figure 09).



**Figure 09** : Fermentation des souches antagonistes

### 5.2. 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 différents 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 10 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).

### 5.3. Séparation des molécules bioactives par 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 spots, 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 11). 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 11** : Chromatographie sur couche mince.



*Résultats et discussion*

Ce travail porte sur l'isolement des bactéries à effet antagoniste à partir du sol dans le cadre de les utiliser en tant qu'agent de bio contrôle contre les agents phytopathogènes isolés à partir des feuilles de la plante du blé qui montraient plusieurs symptômes de maladies.

## 1. Isolement des bactéries antagonistes

Les cultures réalisées ont abouti à l'obtention de colonies bactériennes à divers aspects, textures et couleurs. Six isolats bactériens ont été obtenus.

### 1.1. Identification des isolats bactériens antagonistes

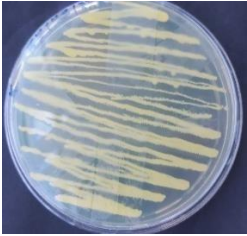
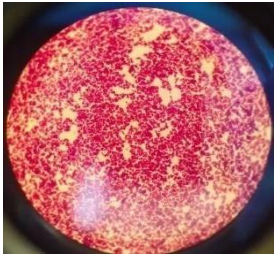
L'identification des isolats bactériens obtenus a été effectuée par : Observation macroscopique et microscopique et des tests biochimiques.

#### 1.1.1. Identification macro et microscopique

L'examen macroscopique a été effectuée après 2 purifications successives avec la coloration de Gram (examen microscopique), ce qui permis de déterminer les caractéristiques macroscopiques, le mode regroupement, la morphologie et le Gram des isolats bactériens.




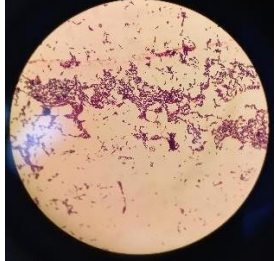

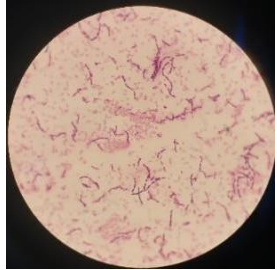
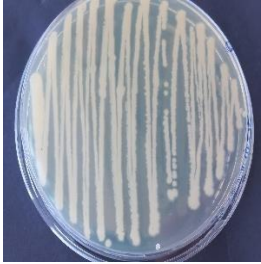
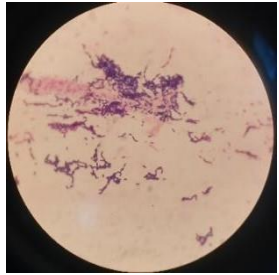
La coloration de Gram montre que les isolats sont de Gram négatif et Gram positif et de forme bacilles et coccobacilles isolées ou regroupés en paire ou en chaînettes et une souche de forme cocci. Le tableau 03 illustre les résultats obtenus


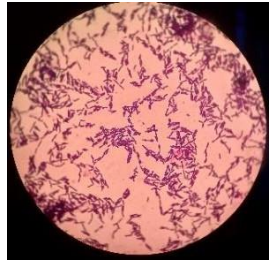
**Tableau 03** : Aspects macroscopiques et microscopiques des isolats bactériens

Souches	Aspect macroscopique	Photo	Aspect microscopique	Photo
Souche B	Forme : circulaire Relief : Plate Taille : Petite Surface : Lisse Opacité : Opaque Couleur : Jaune Consistance : Crémeuse		Cocci sarcines Gram –	



--	--	--	--	--

<p>Souche C</p>	<p>Circulaire Plate Moyenne Lisse Opaque Blanchâtre Crémeuse</p>		<p>Bacille en amas Gram –</p>	
<p>Souche D</p>	<p>Filamenteuse Plate Petite Regueuse Opaque Blanchâtre Sèche</p>		<p>Bacille Gram +</p>	
<p>Souche E</p>	<p>Circulaire Plate Petite Lisse Opaque Blanchâtre Muqueuse</p>		<p>Bacille Gram + En chainettes</p>	
<p>Souche G</p>	<p>Circulaire Plate Petite Lisse Opaque Blanchâtre Crémeuse</p>		<p>Bacille Gram + En chainettes</p>	

Souche H	Circulaire		Bacille Gram +	
	Plate			
	Petite			
	Lisse			
	Opaque			
	Blanchâtre			
	Crémeuse			

Les résultats de la forme des bactéries à partir de l'observation microscopique révèlent une dominance des bacilles. Plusieurs études ont montré la présence d'un grand nombre des bactéries très variés présentant différentes formes telles que la forme bâtonnet, la forme spirale et la forme Cocci (Khan et al.,2010). Parmi celle- ci, les bacilles en forme de bâtonnet semblent être les plus abondants dans le sol (khan *et al.*,2010). Ce qui correspond à notre résultat.

### 1.1.2. Identification biochimique

#### ✓ Test de catalase

Le test de la catalase a montré que les six isolats sont catalase positive ; nous avons observé une formation des bulles après le dépôt de peroxyde d'oxygène ( $H_2O_2$ ). Les résultats de ce test sont illustrés dans la figure 12



**Figure 12** : Test de catalase

En effet, le résultat de ce test montre que toutes les bactéries isolées sont capables de produire cette enzyme

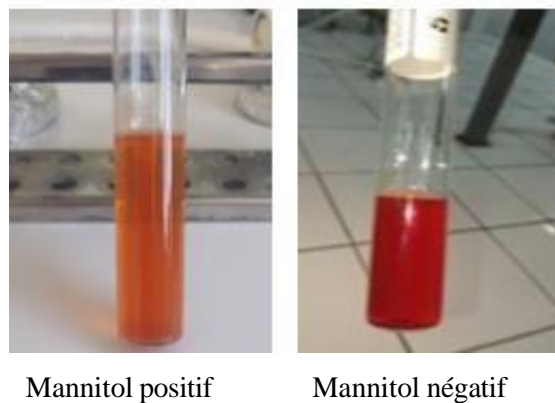
#### ✓ Test d'oxydase

L'absence de coloration violette des disques d'oxydase chez tous les isolats testés signifie qu'elles sont oxydase négatives, et qu'elles sont dépourvues d'enzyme cytochrome oxydase.

#### ✓ Test de mannitol mobilité

Le milieu de mannitol mobilité permet l'étude de la fermentation de mannitol et la mobilité des isolats bactériens. La lecture de ce test est possible grâce à la présence d'un indicateur de pH et qui est le rouge de phénol. Le virage de couleur au jaune indique qu'il y a une acidification du milieu. La diffusion de toutes les souches dans le milieu indique la mobilité de ces dernières dans le milieu.

Le test du mannitol mobilité a dévoilé que les six bactéries (B,C ,D,E,G et H) sont mobiles et sont mannitol positif car elles ont la capacité de fermenter le mannitol (Figure 13)

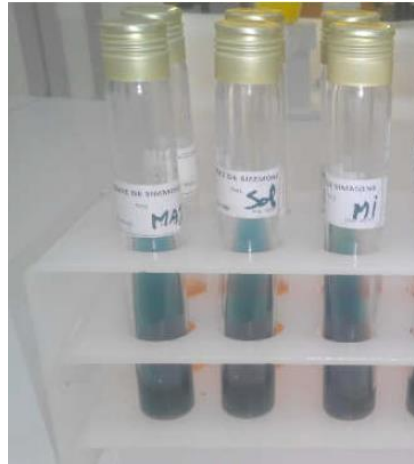


**Figure 13** : Test mannitol mobilité des bactéries isolées et le témoin

#### ✓ Test de citrate

Ce test permet la mise en évidence des bactéries qui utilisent le citrate comme seule source de carbone, que la souche H qui a présenté un virage de couleur du milieu en bleu, Cela signifie que cet isolat utilise le citrate comme source de carbone et d'énergie, ce qui entraîne une élévation du pH du milieu et un indicateur de pH change de couleur.

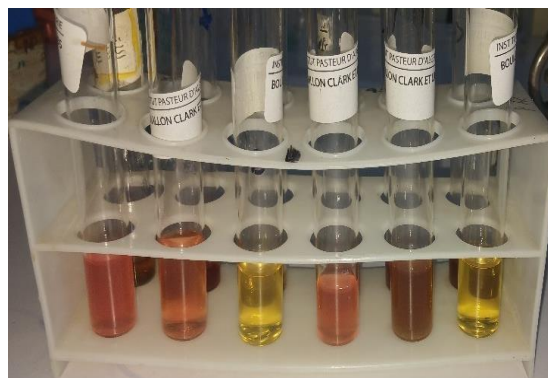
Les souches B, C, G, et D n'utilisent pas le citrate comme source de carbone ce qui maintient le pH du milieu inchangeable (Figure 14).



**Figure 14 :** Test de Citrate

✓ **Tests de rouge méthyle et Voges- Proskauer (RM et VP)**

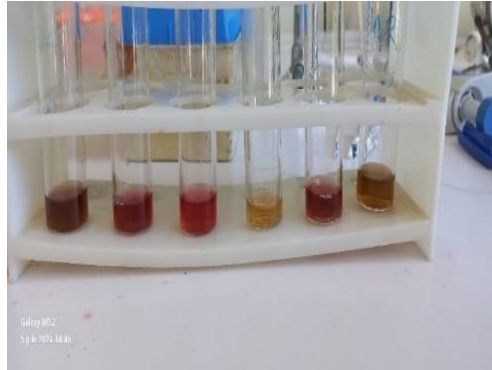
- Pour le test RM : L'acidification du milieu qui a été détecté par la coloration en rose a été remarquée chez les souches D, E et H donc ces trois souches ont la capacité de fermenter le glucose en acides mixte. Tandis que des souches B, C et G ont montré un résultat négatif.
- Pour le test VP : Qui permet de déterminer les bactéries qui produisent l'acétone, la coloration rouge qui indique le résultat positif qui a été observé chez les isolats de C, E et H (les souches (VP+) produisent de l'acétone), les isolats (B, G et D) qui ne produisent pas d'acétone ont montré un résultat négatif (VP-) (Figure 15).



**Figure 15 :** Tests de rouge méthyle et Voges- Proskauer (RM et VP)

### ✓ Test d'uréase et d'indole

L'absence de virage de couleur spontané (coloration en rouge) excepté dans le milieu, ce traduit l'absence d'uréase, et pour détecter la production d'indole à l'aide de Kovacs qui a donné un anneau rouge dans la surface de milieu chez les isolats B, D, G et H, indiquant la dégradation de tryptophane en indole.



**Figure 16 :** Test d'uréase et d'indole

### ✓ Fermentation des sucres utilisation de milieu TSI (Triple Sugar Iron)

L'oxydation a été marquée chez tous les isolats testés ; ils ont dégradé le glucose, le lactose et le saccharose, mais sans réduction des sulfates en sulfures d'hydrogène  $H_2S$  ce qui justifie l'absence de coloration noire dans le culot du tube

### ✓ Test de nitrate réductase

Toutes Les souches testées ont montré la présence de nitrate par le changement de couleur en rouge observé après l'addition des réactifs nitrate 1 et nitrate 2, ce qui signifie qu'elles possèdent le nitrate réductase (Figure 17).



**Figure 17 :** Test de nitrate réductase

La lecture des résultats des tests biochimiques a été réalisée après 72h pour tous les tests les résultats sont résumés dans les tableaux 04 et 05

**Tableau 04 :** Résultats du test catalase, oxydase et nitrate.

Isolat bactérien	Catalase	Oxydase	Nitrate
SoucheB	+	-	+
SoucheC	+	-	+
SoucheD	+	-	+
SoucheE	+	-	+
SoucheG	+	-	+
SoucheH	+	-	+

**Tableau 05 :** Résultats des tests biochimiques (mannitol mobilité, RM, VP, TSI, urée, indole et citrate).

Souche bactérienne	Citrate	RM	VP	Mannitol	Mobilité	TSI	Urée	Indole
Souche B	-	-	-	+	+	-	-	+
Souche C	-	-	+	+	+	-	-	-
Souche D	-	+	-	+	+	-	-	+
Souche E	-	+	+	+	+	-	-	-
Souche G	-	-	-	+	+	-	-	+
Souche H	+	+	+	+	+	-	-	+

#### ✓ La galerie Api 20 E

Ce test a été effectué selon la disponibilité de la galerie Api 20E et vu qu'elle a des tests biochimiques en commun avec API 50 CH spécifique pour les bactéries appartenant au genre *Bacillus*. Les résultats sont mentionnés dans la figure 15



**Figure 18 :** Résultats d'Api 20E après 24h d'incubation à 30°C

En effet, selon les caractères macroscopiques, microscopiques et les tests biochimiques, les isolats bactériens B, C, D, E, G, H ont été identifiés, en présomptive, comme : Staphylocoque , *Bacillus sp1*, *Bacillus sp2* , *Bacillus sp3*, *Bacillus sp4* et *Bacillus sp5* (Ait Kaki *et al.*, 2013 ; Youcef ALI, 2014 ; Milet, 2017).



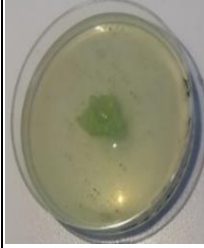




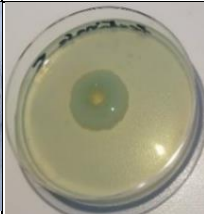




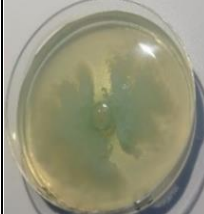
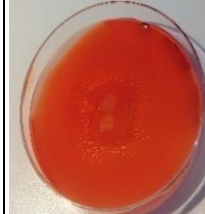

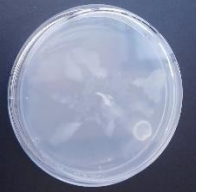

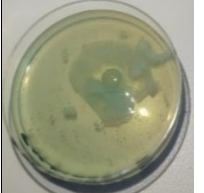
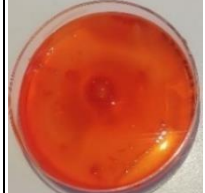
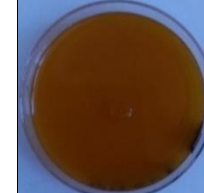
De plus, La présence des bactéries du genre *Bacillus* dans le sol cerealier (Blé) a été investigué dans plusieurs études, telle que de Abbo *et al.* (2012) qui ont isolé des souches de *Bacillus spp* à partir du sol pour les utiliser en tant qu'agents de lutte biologique.


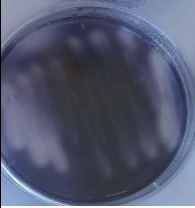
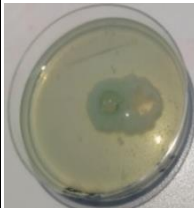





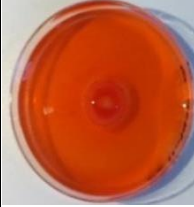

### 1.2. La mise en évidence de l'activité enzymatique

Le test de l'activité enzymatique chez les bactéries a été examiné sur plusieurs milieux de culture avec des substrats spécifiques, l'activité a été révéler selon le halo formé. Le tableau (06) suivant illustre les résultats obtenus.



**Tableau 06 :** Les différentes activités enzymatiques des bactéries isolées

Souche bactérienne	Protéase	Amylase	Pectinase	Cellulase	Chitinase
Souche B					
Résultat	+	+	-	-	-
Souche C					
Resultat	+	+	+	+	-
Souche D					
Résultat	+		+	+	-
Souche E					
Résultat	+	+	+	+	-

Souche H					
Résultat	+	+	+	+	+
Souche G					
Résultat	+	+	+	+	-

Les activités enzymatiques illustrées dans le tableau 06 ont été révélées par la détection des zones d'hydrolyse qui se caractérisent par la formation d'un halo clair autour des disques de colonies.

**-L'activité protéolytique :** Ce test est réalisé dans un milieu gélosé 5% de lait. La présence d'un halo clair autour des colonies indique la présence de protéase chez les souches H, D, E, G (*Bacillus spp*), B (*Staphylocoque*) et la souche C. Ce dernier est formé par la dégradation des protéines du lait par l'enzyme protéase produite par ces souches du genre *Bacillus*. Le genre *Bacillus* est probablement la source bactérienne la plus importante de protéases et est capable de produire des rendements élevés d'enzymes protéolytiques (Contesini *et al.*, 2017). L'étude de la production de protéases par *Staphylococcus* est essentielle, notamment en raison de son rôle dans les infections et la création de biofilms (Vandecandelaere, 2014).

**-L'activité amylolytique :** Le halo blanc des colonies et la coloration du milieu de culture indiquent la dégradation de l'amidon par l'amylase. Toutes souches de *Bacillus spp* et *Staphylocoque* produisent de l'amylase. La production d'amylase par *Bacillus* est très connue et plusieurs souches de *Bacillus* telles que *B. subtilis*, *B. cereus* et *B. amyloliquefaciens* sont isolées et criblées pour la production d'amylase (Simairat *et al.*, 2017).

**-L'activité cellulolytique :** Les souches présentent un halo clair après l'inondation du révélateur de rouge Congo sont H, D, G, E (*Bacillus sp.*), et B (*Staphylococcus*) ce qui confirme leur pouvoir de dégrader la cellulose et donc produire la cellulase. *Bacillus sp.* SMIA-2, pourrait devenir une source potentielle d'enzymes dégradant la lignocellulose pour des applications industrielles telles que l'industrie des détergents (Silvania *et al.*, 2015).

**-L'activité pectinolytique :** Après l'incubation et l'inondation par la solution d'acétate de cuivre, le halo blanc formé est observé pour toutes les souches ce qui indique la capacité de ces souches de produire la pectinase . *Bacillus sp.* (BIOSMNF02) produit la pectinase en utilisant la pectine de citrus comme substrat unique (Satpathy *et al.*, 2023).

**-L'activité chitinolytique :** Ce test est réalisé en utilisant un milieu de culture contenant de la chitine comme seule source de carbone et d'azote, La coloration en violet foncé des colonies de la souche H (*Bacillus sp.*) indique sa production de l'enzyme chitinase, tandis que celles qui ne produisent pas ce dernier sont incolores (B, D, G, C et E). *Bacillus licheniformis* a servi de système d'expression pour produire de la chitinase de manière hétérologue, ce qui a entraîné une amélioration de son activité( Qiet *al.*, 2024).

## 2. Isolement des champignons phytopathogènes

L'isolement des champignons phytopathogènes a été effectué à partir des feuilles infectées de blé, l'ensemencement a lieu sur milieu de culture PDA (Potato Dextrose Agar) l'un des milieux les plus fréquemment utilisés pour cultiver des mycètes (Barwant et Lavhat, 2020).

### 2.1. Identification des champignons phytopathogènes

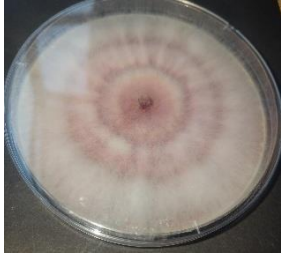
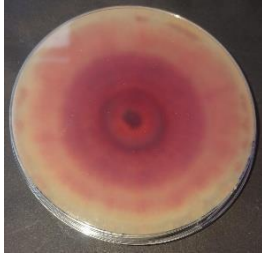
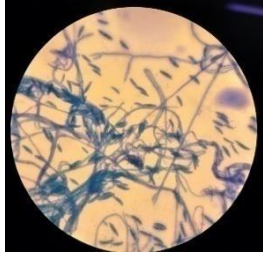




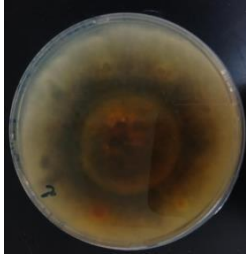
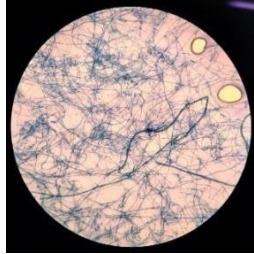

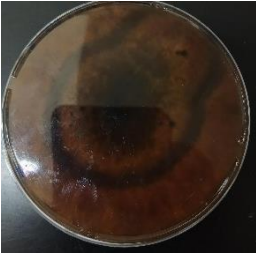
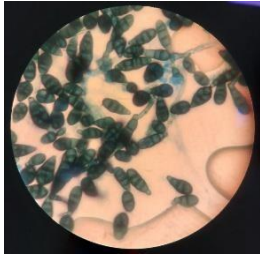
L'identification des agents phytopathogènes a été réalisée par l'observation macroscopique et microscopique des isolats fongiques obtenus

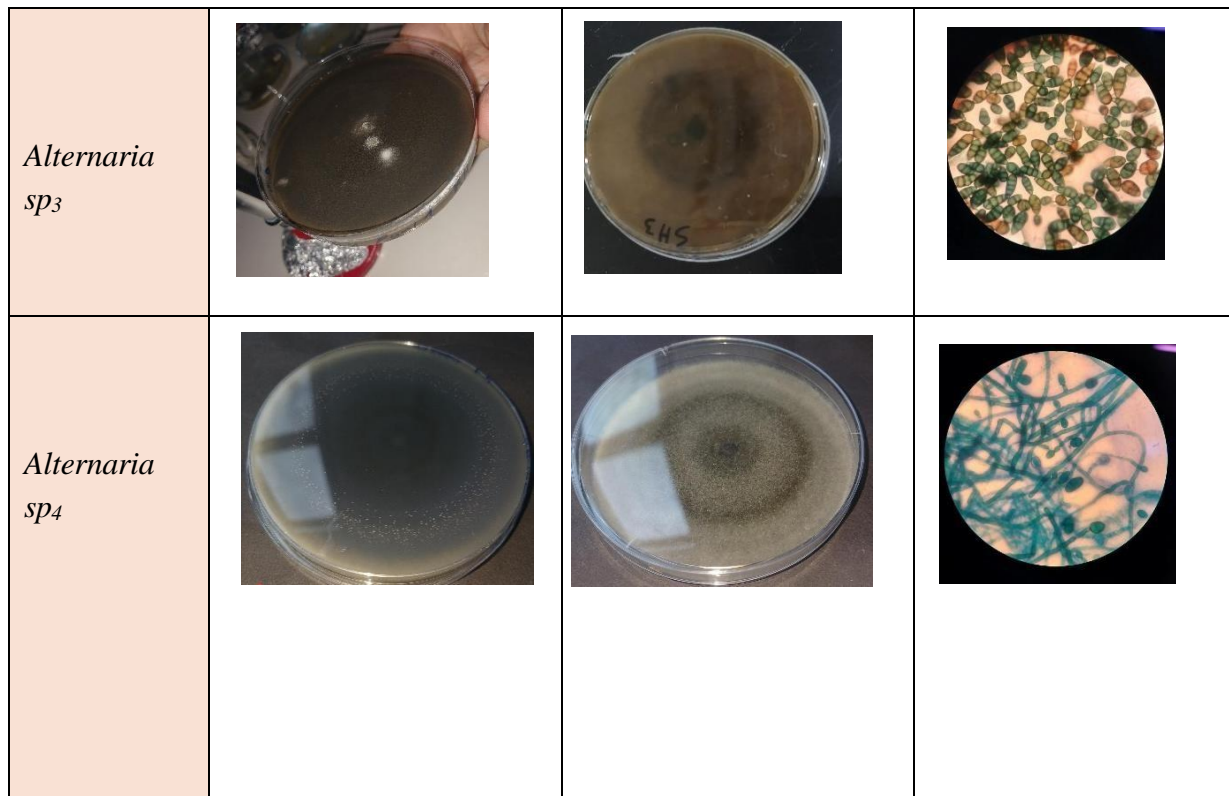
Les résultats de l'observation macroscopique des colonies mycéliennes ont été établis en fonction de la texture et de la couleur des colonies (recto et verso).

Pour l'étude microscopique, elle a été effectuée après une coloration simple à l'aide du bleu de méthylène et la technique de scotch.

Le Tableau 07 résume l'aspect macroscopique et microscopique des souches fongiques purifiées.

**Tableau 07** : Aspects macro et microscopiques des champignons phytopathogènes isolés

	Observations macroscopiques Recto	Observations macroscopiques verso	Observations microscopiques
<i>Fusarium sp1</i>			
<i>Fusarium sp2</i>			
<i>Alternaria sp1</i>			
<i>Alternaria sp2</i>			



- L'isolat S1 a les caractéristiques suivantes : un aspect cotonneux ; une Couleur Blanche et rose ; Macroconidies fusiformes cloisonnées ; Les microconidies sont dispersées parmi le mycélium (elles sont de petite taille par rapport aux macroconidies) ; des phialides cylindriques solitaires ou groupées.

Les résultats de cette étude préliminaire (aspect macroscopique et microscopique) indiquent que l'isolat S1 appartient au genre *Fusarium*.

- **L'isolat S2** a les caractéristiques suivantes : un aspect cotonneux ; une Couleur Blanche ; Un filament septé ; des conidies fusiformes et cloisonnées ; absence de chlamydospores ; des phialides cylindriques solitaires ou groupées

Les résultats de cette étude préliminaire (aspect macroscopique et microscopique) indiquent que l'isolat S1 appartient au genre *Fusarium*

-**L'isolat S3** a les caractéristiques suivantes : Aspect cotonneux ; couleur grise à noire ; hyphes septés ; **Mycélium** sombre **Conidies** prosopores en chaîne foncées

Les résultats de cette étude préliminaire (aspect macroscopique et microscopique) indiquent que l'isolat S3 appartient au genre *Alternaria*

- **L'isolat S4** a les caractéristiques suivantes : Aspect cotonneux ; couleur grise à noire ; hyphes septés ; filaments pigmentés en brun ; les conidiophores sont cloisonnés, brunes, pluricellulaires d'aspect piriforme ou ovoïde avec une partie basale arrondie et une extrémité apicale allongée en bec plus ou moins important

Les résultats de cette étude préliminaire (aspect macroscopique et microscopique) indiquent que l'isolat S4 appartient au genre *Alternaria*

- **L'isolat S5** a les caractéristiques suivantes : Aspect duveteux ; couleur grise à noire ; hyphes septés ; filaments pigmentés en brun ; les conidiophores sont cloisonnés, brunes, pluricellulaires d'aspect piriforme ou ovoïde avec une partie basale arrondie et une extrémité apicale allongée en bec plus ou moins important

Les résultats de cette étude préliminaire (aspect macroscopique et microscopique) indiquent que l'isolat S5 appartient au genre *Alternaria*

- **L'isolat S6** a les caractéristiques suivantes ; Aspect cotonneux ; couleur grise à noire ; hyphes septés ; filaments pigmentés en brun ; les conidiophores sont cloisonnés, brunes, pluricellulaires d'aspect piriforme ou ovoïde avec une partie basale arrondie et une extrémité apicale allongée en bec plus ou moins important

Les résultats de cette étude préliminaire (aspect macroscopique et microscopique) indiquent que l'isolat S6 appartient au genre *Alternaria*

### **3. Antagonisme *in vitro* des bactéries antagonistes, à l'égard des champignons phytopathogènes isolés**

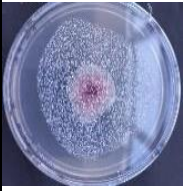



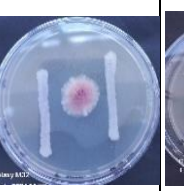





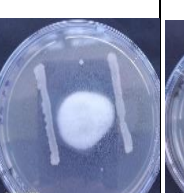

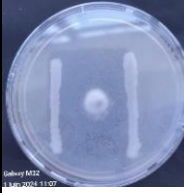
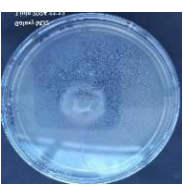



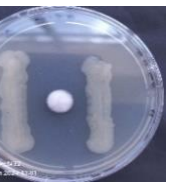

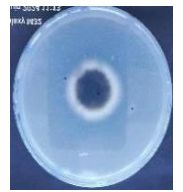

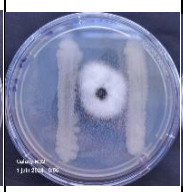
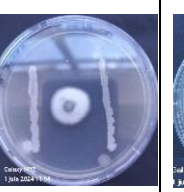


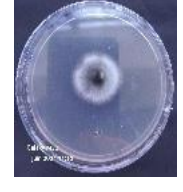

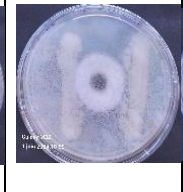
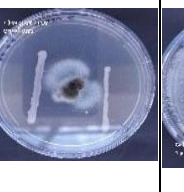
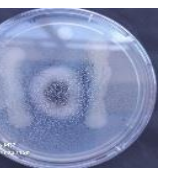
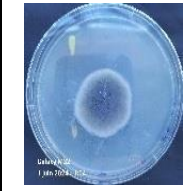

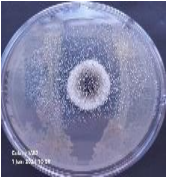


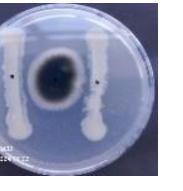
Les test d'antagonisme *in vitro* ont été réalisé sur milieu PDA, à travers la diffusion dans l'agar par l'utilisation de 2 méthodes la première méthode qui repose sur la déposition des disques de champignon et de bactérie d'une position en face et la deuxième qui consiste a mettre 2 stries au 2 côtes du disque de l'agent phytopatogene .

Les résultats ont été évalué selon le diamètre du coonie mycélienne en comparant avec le témoin dans une période de 5 jours.

Les résultats de la première méthode ont été annulés à cause des contaminations de la plupart des boites par des champignons indésirables.

Le tableau 08 suivant illustre l'effet exercé par les souches bactériennes isolées selon la méthode des stries.

**Tableau 08** : Résultats du test d'antagonisme *in vitro* utilisant la méthode des stries

	Souche B	Souche C	Souche D	Souche E	Souche G	Souche H
<i>Fusarium sp1</i>						
<i>Fusarium sp2</i>						
<i>Alternaria sp1</i>						
<i>Alternaria sp2</i>						
<i>Alternaria sp3</i>						
<i>Alternaria sp4</i>						

Les diamètres des colonies mycéliennes de l'agent phytopathogène sont mesurés et comparés au témoin. Les diamètres des témoins mesurés sont présentés dans le tableau 09

**Tableau 09 :** Les diamètres de croissance mycélienne des souches témoins

Diamètre de croissance	B	C	D	E	G	H	Témoin
<i>Fusarium sp1</i>	23 mm	21mm	12mm	28mm	21mm	20mm	42mm
<i>Fusarium sp2</i>	34mm	29mm	31mm	30mm	32mm	25mm	42mm
<i>Alternaria sp1</i>	16mm	14mm	10mm	9mm	11mm	11mm	19mm
<i>Alternaria sp1</i>	34mm	22mm	22mm	24mm	21mm	21mm	41mm
<i>Alternaria sp1</i>	34mm	21mm	23mm	29mm	12mm	22mm	44mm
<i>Alternaria sp1</i>	35mm	42mm	25mm	30mm	21mm	21mm	45mm

D'après les résultats présentés ci-dessous (tableau 10), Le test antagoniste a permis d'obtenir un taux d'inhibition variant entre 48% et 72% par les différentes bactéries isolées du genre *Bacillus* sur *Fusarium sp1*, *Alternaria sp1*, *Alternaria sp2*, *Alternaria sp3* et *Alternaria sp4*. Cependant la souche *Bacillus sp* (G) a développé un meilleur effet d'inhibition vis-à-vis *Alternaria sp3*.(72,72%) suivie de l'effet de *Bacillus sp* (D) sur *Fusarium sp1* (71,42%).

**Tableau 10 :** Taux d'inhibition de la croissance mycélienne par confrontation directe par la méthode des stries

Champignon / Bactérie	B	C	D	E	G	H
<i>Fusarium sp 1</i>	45,23%	50%	71 ,42%	33.33%	50%	52%
<i>Fusarium sp2</i>	19,04%	30,95%	26,19%	28,57%	23,80%	40,47%
<i>Alternaria sp1</i>	15,78%	26,31%	47,36%	52,63%	42,10%	42,10%
<i>Alternaria sp2</i>	17 ,07%	46.34%	46.34%	41,46%	48,7%	48,7%
<i>Alternaria sp3</i>	22,72%	52,27%	47,72%	34,09%	72,72%	50%
<i>Alternaria sp4</i>	22,22%	6.6%	44,44%	33,33%	53,33%%	53,33%



Les résultats ont montré une inhibition de la croissance mycélienne de l'agent phytopathogène, ce qui indique une interaction antagoniste entre ces bactéries et l'agent pathogène, notamment pour les genres de *Bacillus*.

*B. pumilus* est l'un des membres les plus fréquemment de *Bacillus sp* qui peut être utilisé dans la lutte biologique des phytopathogènes fongiques. Jusqu'à présent, un certain nombre de souches de *B. pumilus* présentant des propriétés de biocontrôle contre les phytopathogènes fongiques (Dobrzyński *et al.*, 2023).

En comparant avec la souche B (*Staphylococcus*) qui n'a pas exercé un effet sur tous les champignons isolés avec un pourcentage maximal de 45.23% qui a été avec le *Fusarium sp*.

La bactérie C a présenté un effet moyen d'un pourcentage de 52.27% sur *Alternaria sp1* (inhibition moyenne) et 50% contre *Fusarium sp* (rose).

- ***Bacillus sp* avec *Fusarium sp1***

La souche D montre le taux d'inhibition le plus élevé à 71,42 %, indiquant une forte capacité antagoniste contre le *Fusarium sp1*. Les autres souches G et H et E montrent des taux d'inhibition varie de 52 % (H) à 50%(G) jusqu'à 33.3% (E). Ces résultats suggèrent que certaines souches de *Bacillus* ont un potentiel modéré à élever pour inhiber la croissance de *Fusarium sp*.

- ***Bacillus sp* avec *Alternaria sp***

Pour *Alternaria sp1* : La souche E a le taux d'inhibition le plus élevé à 52,63 %, suivi par D à 47,36 %. Cela montre que ces souches de *Bacillus* ont un potentiel significatif pour inhiber cet isolat phytopathogène de champignon. Les autres souches présentent des taux d'inhibition variés, moins élevés.

Les deux espèces d'*Alternaria sp2* et *Alternaria sp3* ; la souche G montre le taux d'inhibition le plus élevé à 72,72 %, suivi par H à 50 % et C à 52,27 %.

Pour *Alternaria sp4*, les souches H et G montrent des taux d'inhibition élevés à 53,33 %, suggérant une efficacité modérée

L'activité antagoniste investiguée dans ce travail peut être expliquée par le pouvoir de ces souches performantes à produire des substances antifongiques, capables de dégrader la paroi des champignons. (Tserkovniak *et al.*, 2009). Ce travail a été élaboré par plusieurs études telles que Melo et Full. (2000) et Raaijmakers *et al.* (2002).

Plusieurs autres travaux ont rapporté que les espèces du genre *Bacillus* ont un effet antagoniste contre les champignons phytopathogènes par antibiose, compétition ou parasitisme direct. De plus, l'activité antagoniste se manifesterait par la dégradation de la paroi cellulaire du champignon pathogène par l'utilisation d'enzymes extracellulaires lytiques (BERRADA, 2012). D'autres études montrent que des bactéries de ce genre ont été signalées pour leur efficacité dans le contrôle de *B. cinerea* (AJOUZ, 2009), où l'antibiotique gramicidine S secrété par l'agent de protection biologique *Brevibacillus brevis* inhibe par exemple la germination et la croissance mycélienne de ce champignon selon HAGGAG (2008).

#### **4. Production par fermentation et extraction des métabolites bioactifs**

Après une fermentation liquide de 3 jours sous agitation, nous avons obtenu une biomasse visible un trouble transparent, 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'Eppendorf.

##### **4.1. Séparation des molécules par Chromatographie sur couche mince (CCM)**

Les résultats obtenus après l'analyse quantitative CCM des molécules bioactives produites par les souches antagonistes ont permis de détecter un seul spot avec différents Rf

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



*Conclusion et perspectives*

Ce travail se focalise sur la recherche des bactéries développant une activité antagoniste contre les agents phytopathogènes, afin de les utiliser dans le domaine de bio-contrôle

Pour l'isolement des souches bactériennes antagonistes, nous avons choisi de faire un prélèvement de sol agricole céréalier (Blé) provenant de la Wilaya de Mila. Ceci nous a permis d'isoler 6 bactéries (B, C, D, E, G et H). L'étude des caractéristiques morphologiques et biochimiques a montré que les souches bactériennes isolées (C, D, E, G et H) appartiennent au genre *Bacillus*. Tandis que la souche B appartient au genre *Staphylocoque*.

Par ailleurs, l'étude de l'activité enzymatique a révélé le pouvoir des souches bactériennes isolées à produire les enzymes, en l'occurrence : l'amylase ; la pectinase ; la protéase et la chitinase.

Concernant les agents phytopathogènes, l'exploration des échantillons de Blé(feilles), cultivés dans la région de Teleghma (Mila), présentant des différents symptômes de maladies fongiques a permis de sélectionner six moisissures phytopathogènes en se basant sur les caractères macroscopiques et microscopiques qu'ils s'agissent de *Fusarium sp1*, *Fusarium sp2*, *Alternaria sp1*, *Alternaria sp2*, *Alternaria sp3* et *Alternaria sp4*

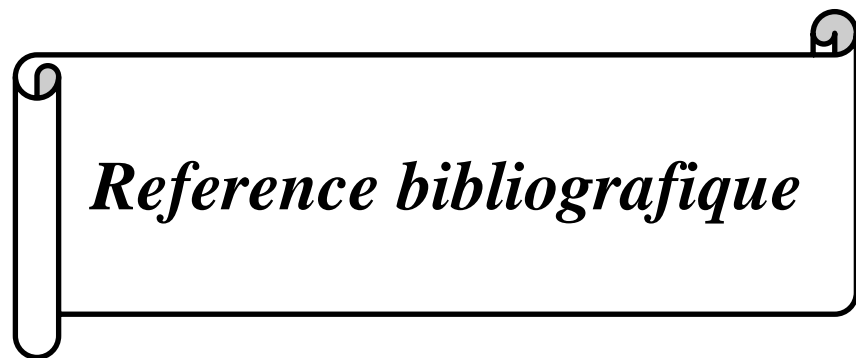
L'essai de confrontation directe entre les champignons phytopathogènes et des souches bactériennes antagonistes a révélé une inhibition de la croissance mycélienne du pathogène, lors du contact direct entre le pathogène et l'antagoniste

Le test antagoniste a permis d'obtenir un taux d'inhibition variant entre 48% et 72% par les différentes bactéries isolées du genre *Bacillus* sur *Fusarium sp1*, *Alternaria sp1*, *Alternaria sp2*, *Alternaria sp3* et *Alternaria sp4*. Cependant la souche *Bacillus sp* (G) a développé un meilleur effet d'inhibition vis-à-vis *Alternaria sp3*. (72,72%) suivie de l'effet de *Bacillus sp* (D) sur *Fusarium sp1* (71,42%).

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 se basant sur ces résultats, il est important d'élargir les points suivants comme perspectives :

- ✓ Identification génétique des souches bactériennes antagonistes et des isolats fongiques.
- ✓ Elargir les tests des isolats bactériens sur une gamme plus large de champignons phytopathogènes.
  
- ✓ Identifier les métabolites bioactifs des souches antagonistes



*Reference bibliografique*

## A

- Abdelkader Fahima. Etude comparative de l'infection des sols par quelques champignons pathogènes en conditions de semis direct et de travail conventionnel, Production Végétale et Agriculture de Conservation, mémoire de magister, ferhat abbas., 2012, Setif.
- Agrios G.N. (2005). *Plant pathology. 5 th ed. Elsevier Academic Press. USA UK.*
- Ajijah N., Fiodor A., Dziurzynski M., Stasiuk R., Pawlowska J., Lukasz D., Pranaw K. (2023). Biocontrol potential of *Pseudomonas protegens* ML15 against *Botrytis cinerea* causing gray mold on postharvest tomato (*Solanum lycopersicum* var. *cerasiforme*). *Frontiers in Plant Science*. [en ligne], 14 (page consultee le 07/06/2024). <https://www.frontiersin.org/journals/plant-science/articles/10.3389/fpls.2023.1288408/full#B27>

## B

- Belosokhov, A.F. Belov, G.L. Chudinova, E.M. Kokaeva, L.YU. Elansky, S.N.(2017).*Alternaria spp. and Colletotrichum coccodes in potato leaves with early blightsymptoms.PAGV -Special Report. (18). 181-190.*
- Blancard D.,Laterrot M.,Marchoux G., candresse T.(2009). Les maladies de la tomate. (Eds).INRA. Paris.
- Blandeau E. (2012). *Etat des lieux du potentiel anticancéreux de neuf champignons macroscopiques*. Thèse de doctorat, Université de Angers. France
  - Boudih S. (2011). *Identification des moisissures et leurs métabolites secondaires colonisant des supports papiers. Evaluation de la toxicité sur des cellules épithéliales respiratoires invitro*. Thèse de doctorat. Université Paris Est. Paris.
  - Bousseboua H. (2005). *Elements de Microbiologie*. 183-192p.

## C

- Canard B. et Senequier-Crozet A. (2016). *Les champignons endophytes : impact sur les*

*écosystèmes et production de molécules d'intérêt thérapeutiques*. Thèse de doctorat, Université de Grenoble Alpes. France.

- Cook, V., et Cook, V. J. (1993). *Linguistics and second language acquisition*. London : Macmillan.
- Corbaz R. 1990 .*Principes de phytopathologie et de lutte contre les maladies des plantes*. Presses polytechniques et universitaire romandes (première édition). Lausanne. Suisse, 286p.

## **D**

- Derj D. (2017). Effet des actinomycètes sur l'agent phytopathogène (*Fusarium* spp) chez le ble dur (*Triticum durum* Dest). Mémoire Master : Biotechnologie végétales et métagénomique. Msila : Université Mohamed Boudiaf., 86p.

## **G**

- Ghazy N et El-Nahrawy S. (2020). Siderophore production by *Bacillus subtilis* MF497446 and *Pseudomonas koreensis* MG209738 and their efficacy in controlling *Cephalosporium maydis* in maize plant. *Archives of Microbiology* [en ligne]. 203 (page consultée le 08/06/2024). <https://link.springer.com/article/10.1007/s00203-020-02113-5>
- Gerbore J. (2013). Lutte biologique contre un champignon pathogène impliqué dans l'esca de la vigne par utilisation de l'oocyste *Pythium oligandrum* (IDoctoral dissertation, Pau).
- Guo, Y. (2020). Le concept de désir imaginatif et ses applications dans l'esthétique, la Métaphysique et l'épistémologie (Doctoral dissertation, Sorbonne université).
- Kirk, P.M., Cannon, P.F., David, J.C., Egham, U.K. and Stopes, J.A. (2001). *Ainsworth and Bysby's Dictionary of fungi*, 9<sup>th</sup> edn .CABI. Bioscience.UK. Center and central Bureau Voie. Utrecht. The Net.

## **H**



- Hibar, M. D.R. (2005). Effet inhibiteur in vitro et in vivo de *Trichoderma harzianum* sur *Fusarium oxysporum* f.sp. *radicislycopersici*. Tunisie: Laboratoire de Phytopathologie. École supérieure d'Horticulture de Chott-Mariem. 4042 Sousse.
- Hamel A. (2016). ETUDE DE L'antagonisme de *Trichoderma* SP vis-à-vis de la Fusariose du ble en Algérie. Mémoire de Master : moyen de lutte et bio régulateur. Boumerdes, 99p.

## **J**

- Jijakly M.H. (2003). La lutte biologique en phytopathologie, In : Phytopathology. Lepoivre P.(Eds). De Boeck, Bruxelles.

## **K**

- Kolla R. (2023) Biocontrôle par les racines de *Genista tricuspidata* contre les Microorganismes phytopathogènes. Mémoire Master. Université Saad Dahleb Blida - 1-,55p.
- Kumar, NR., Arasu, VT et Gunasekaran, P. (2002). Génotypage de composés antifongiques produisant des rhizobactéries favorisant la croissance des plantes, *Pseudomonas fluorescens*. Sciences actuelles, 1463-1466.

## **L**

- Lennartsson R.P. (2012). *Zygomycètes and cellulose residuals : hydrolysis, cultivation and applications*. Thèse de doctorat, Université de Borås, Suède.
- Logrieco, A. Moretti, A. Solfrizzo, M. (2009). *Alternaria toxins and plant diseases: an overview of origin, occurrence and risks*. *World Mycotoxin Journal*. 2 (2) : 129-140.

## **M**

- Milet, A. (2017). *Isolement de microorganismes à partir du sol des régions arides et sélection d'isolats à effet antagoniste sur l'agent de l'Alternariose*. Thèse de Doctorat en Biotechnologies, Biologie et Environnement. Université des Frères Mentouri - Constantine 1.31-34.
- Mahfiud A., Lasbahani A. (2015). Approche de lutte contre les maladies fongiques du ble

: etude de l'efficacitede troismolecules antifongique (in vitro). Mémoire de Master : biotechnologie des mycetes. Constantine. universite des freres Mentouri Constantine 70p.

- Métagénomique. Msila : Université Mohamed Boudiaf, 86p.

## **N**

- Neomie L. (2010). Lutte biologique aux ravageurs : Applicabilite au Quebec. These de doctorat : Environnement. Canada. Universite de Sherbrooke, 103p.
- Nysanth N., Sivapriya S., Natarajan C., et Anith K., (2022). Novel in vitro methods for simultaneous screening of two antagonistic bacteria against multiple fungal phytopathogens in a single agar. *3 Biotech.* [en ligne], 12 (6), (page consultée le 08/06/2024). <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC9151952/>.

## **O**

- Orlici Z. et Benkara O. (2018). Contribution a l'étude de la flore fongique de semances de ble dur de compagne dans la region nord de Constantine. Mémoire.

## **P**

- Pereira V.L., Fernandes J.O., Cunha S.C. (2014). *Mycotoxins in cereals and related foodstuffs: A review on occurrence and recent methods of analysis.* Trends Food Sci. Technol. ;36:96–136.

## **R**

- REZIN A, BOUKEZIOU F. (2021). Mémoire Master : Mycologie et biotechnologie fongiques. Université Frère Mentouri Constantine 1., 78 p.

## S

- Singleton P. (2005). Bacteriologie. France : Dunod. 483-488p -(ANTIQ.SCIEN.EXA)
- Si Amar H., (2017). Application des bacilles thermophiles dans la lutte biologique.
- Mémoire De Master en Microbiologie Appliquée. L'université de Tlemcen. P43.

## V

- Valueva T.A. and Mosolov V.V. (2004). Role of inhibitors of proteolytic enzymes in
- Plant defense against phytopathogenic microorganisms. Biochem. 69, 1305-1309.

## W

- Wilhelm S, Taylor JB (1965). Control of Verticillium wilt of olive through natural Recovery and resistance. Phytopathology, 55 :310 –316.

---

## Milieux de Culture

### Milieu PDA (Potato Dextrose Agar)

- 250 g de pomme de terre
  - 20 g d'agar
  - 20 g de glucose
- 1000 ml eau distillée  
Autoclavé pendant 20 min à 121°C

### Milieu Luria Bertani Bouillon (LB)

5 g d'extrait de levure  
10 g de tryptone  
5 g de chlorure de sodium  
1000 ml eau distillée

### Milieu Lait Gélosé à 20% d'Agar

100 g de lait écrémé  
20 g d'agar  
1000 ml eau distillée

- Dissoudre l'agar dans de l'eau distillée chaude, à giter jusqu'à homogénéisation, stériliser par autoclavage à 121°C pendant 20 min, ajouter le lait écrémé stérile juste avant l'utilisation du milieu.

### Milieu Gélosé à 5% de Lait Écrémé

50 ml de lait écrémé  
10 g d'agar  
1000 ml eau distillée

---

**Milieu Gélose à Amidon 1%**

Gélose nutritive (préparée avec 1000 ml d'eau distillée)

10 g d'amidon

**Milieu CMC-Agar**

20 g de CMC (carboxyméthylcellulose)

5 g d'extrait de levure

15 g d'agar

1000 ml eau distillée

**Milieu Pectine-Agar**

5 g de pectine

5 g d'extrait de levure

20 g d'agar

1000 ml eau distillée

**Indicateurs Colorés**

- **Rouge Congo à 0,1%**

0,1 g de Rouge Congo

100 ml d'eau distillée

Dissoudre 0,1 g de Rouge Congo dans un petit volume d'eau distillée puis compléter le volume jusqu'à 100 ml

**Eau iodée (Lugol)**

1 g d'iode

2 g d'iodure de potassium

100 ml d'eau distillée

This work is part of the study of biological control by the use of antagonistic bacteria against phytopathogenic fungi by applying an *in vitro* antagonism test, the bacterial strains were isolated from cereal soil from the region of Telerghma (wilaya of Mila) in the north-east of Algeria. The isolation and morphological identification of the phytopathogenic agent was carried out from wheat leaves collected from the Telerghma region (Wilaya of Mila) which present symptoms of fungal diseases, making it possible to obtain 6 fungal isolates. in this case: *Fusarium sp1*, *Fusarium sp2*, *Alternaria sp1*, *Alternaria sp2*, *Alternaria sp3* and *Alternaria sp4*

The exploration of soil samples resulted in the isolation of six bacterial isolates. These isolates were tested for their antagonistic effect, by the direct contact confrontation technique where we found that only five bacterial isolates C, D, E, H and G possess an antifungal effect against the phytopathogenic agents obtained previously, with rates inhibition which vary between 30.95% and 72.72%. However, the G bacteria developed the best inhibition effect. Morphological identification and biochemical tests of the selected bacterial isolates showed that four strains belonging to the *Bacillus* genus (*Bacillus sp1*, *Bacillus sp2*, *Bacillus s3*, *Bacillus sp4*).

This impact is due to the ability of this strain to produce antifungal substances. Enzymatic activity tests revealed the power of the selected strains to produce enzymes, namely amylase, pectinase, protease and chitinase.

This work suggested that the bacterial antagonist could be a potential control against wheat pathogens. The application of microorganisms as biocontrol agents is important because they can increase beneficial microbial activity that extends over a long period of time.

**Keywords:** Antagonistic bacteria – Phytopathogenic fungi – Bio control

يندرج هذا العمل في إطار دراسة المكافحة البيولوجية باستخدام البكتيريا المضادة ضد الفطريات الممرضة للنبات من خلال تطبيق اختبار التضاد في المختبر، حيث تم عزل السلالات البكتيرية من تربة الحبوب من منطقة تلاغمة (ولاية ميله في الشمال الشرقي). الجزائر. تم إجراء العزل والتحديد الشكلي للعامل المعرض للنبات من أوراق القمح المجمعة من منطقة تظهر عليها أعراض الأمراض الفطرية، مما مكن من *Fusarium sp1 Fusarium sp2* تلاغمة (ولاية ميله) والتي *Alternaria sp1 Alternaria sp2, Alternaria sp3, Alternaria sp3, Alternaria sp4.* الحصول على 6 عزلات فطرية، في هذه الحالة

أسفر فحص عينات التربة عن عزل ستة عزلات بكتيرية. تم اختبار تأثير هذه العزلات التضادية بتقنية المواجهة بالتلامس حيث وجد أن خمس C, D, E, G, H المباشر تمتلك تأثيراً مضاداً للفطريات ضد العوامل المسببة للأمراض النباتية التي تم عزلها بكتيرية فقط أفضل تأثير تليطي أظهرت الحصول عليها سابقاً، وبنسب تثبيط تتراوح بين 30.95 % و 72.72%. التشخيص المورفولوجي والاختبارات الكيموحيوية للعزلات البكتيرية المختارة وجود *Bacillus* ومع ذلك، طورت بكتيريا (*Bacillus sp1 Bacillus sp2 Bacillus s3 Bacillus sp4* أربع سلالات تنتمي إلى جنس )

ويرجع هذا التأثير إلى قدرة هذه السلالة على إنتاج مواد مضادة للفطريات كشفت اختيارات النشاط الأنزيمي عن قدرة السلالات المختارة على إنتاج الإنزيمات وهي الأميليز والبكتيناز والبروتياز والكتيناز

يشير هذا العمل إلى أن المضاد البكتيري يمكن أن يكون عنصر تحكم محتمل في أمراض القمح بعد استخدام الكائنات الحية الدقيقة كعوامل للمكافحة الحيوية أمراً مهماً لأنها يمكن أن تزيد من النشاط الميكروبي المفيد الذي يمتد على مدى فترة طويلة من الزمن

الكلمات المفتاحية البكتيريا المتضادة – الفطريات الممرضة للنبات – المكافحة الحيوية

Année universitaire : 2023-2024

Présenté par : Khanaoui Yasmine

Khoudou Riane

Limouni Hadjer

**Etude de l'antagonisme bactérien contre les champignons phytopathogènes « Analyse potentiel des mécanismes impliqués dans le biocontrôle »**

**Mémoire pour l'obtention du diplôme de Master en Microbiologie Appliquée**

**Résumé**

Ce travail s'inscrit dans le cadre de l'étude de la lutte biologique par l'utilisation des bactéries antagonistes contre les champignons phytopathogènes en appliquant un test d'antagonisme *in vitro*, les souches bactériennes ont été isolées à partir d'un sol céréalier de la région de Telerghma (wilaya de Mila) au nord-est d'Algérie. L'isolement et l'identification morphologique de l'agent phytopathogène a été effectué à partir de feuilles de blé prélevées au niveau de la région de Teleghma (Wilaya de Mila) qui présentent des symptômes de maladies fongiques ont permis d'obtenir 6 isolats fongiques, en l'occurrence : *Fusarium sp<sub>1</sub>*, *Fusarium sp<sub>2</sub>*, *Alternaria sp<sub>1</sub>*, *Alternaria sp<sub>2</sub>*, *Alternaria sp<sub>3</sub>* et *Alternaria sp<sub>4</sub>*.

L'exploration des échantillons du sol, a abouti à l'isolement de six isolats bactériens. Ces isolats ont été testés pour leur effet antagoniste, par la technique de confrontation par contact direct où nous avons constaté que seulement cinq isolats bactériens C, D, E, H et G possèdent un effet antifongique contre les agents phytopathogènes obtenus auparavant, avec des taux d'inhibition qui varient entre 30,95% et 72,72%. Cependant, la bactérie G a développé le meilleur effet d'inhibition. L'identification morphologique et les tests biochimiques des isolats bactériens sélectionnés ont montré que quatre souches appartenant au genre *Bacillus* (*Bacillus sp<sub>1</sub>*, *Bacillus sp<sub>2</sub>*, *Bacillus sp<sub>3</sub>*, *Bacillus sp<sub>4</sub>*).

Cet impact est dû à la capacité de cette souche à produire des substances antifongiques. Les tests de l'activité enzymatique ont révélé le pouvoir des souches sélectionnés à produire les enzymes, en l'occurrence l'amylase, la pectinase, la protéase et la chitinase.

Ce travail a suggéré que l'antagonisme bactérien pourrait être un moyen de lutte potentiel contre les agents pathogènes du blé. 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-clefs :** Bactéries antagonistes – Champignons phytopathogènes – Bio contrôle

**Laboratoires de recherche :** Laboratoire mycologie, de biotechnologie et de l'activité antimicrobienne de (U Constantine 1 Frères Mentouri).

**Président :** ALMI Hiba (MCB - U Constantine 1 Frères Mentouri).

**Encadrant :** BENSERRADJ Ouafa (MCA - U Constantine 1 Frères Mentouri).

**Examineur(s) :** MILET Asma (MCB - U Constantine 1 Frères Mentouri).



