



UNIVERSITE KASDI MERBAH OUARGLA
FACULTE SCIENCES DE LA NATURE ET DE LA VIE
DEPARTEMENT DES SCIENCES BIOLOGIQUES



Mémoire de fin d'études en vue d'obtention du diplôme de
MASTER ACADEMIQUE

Domaine: Sciences de la nature et de la vie

Filière: Science biologique

Spécialité: Microbiologie Appliquée

Thème

**Etude *in vitro* de l'antagonisme de quelques
champignons phytopathogènes de la luzerne
(*Medicago sativa* L.) par les bactéries rhizobiennes**

Réalisé par: AHMAHMA Rania et BESSEDDIK Yousra

Soutenu publiques le: 29 /06 /2021

Devant le jury:

Président	Mlle SALHI N.	Pr.	UKM Ouargla
Promoteur	M. AZIB S.	MCB	UKM Ouargla
Co-Promoteur	M^{me} ATTAB S.	MAA	UKM Ouargla
Examineur	M. Bradai L.	Pr.	UKM Ouargla

Année Universitaire: 2020 / 2021

REMERCIEMENTS

*Avant tous nous tenons à remercier **ALLAH**, le miséricordieux, le tout puissant et le plus clément qui nous aide et nous donne le courage de tout faire. Ces quelques lignes vont nous permettre de remercier les personnes qui ont contribué de près ou de loin à la réalisation de ce travail soit au niveau scientifique mais aussi personnel, et sans qui, notre travail n'aurait pu aboutir.*

*Nous tenons à remercier plus vifs remerciements à notre promoteur Docteur **AZIB Salim** à ses précieux conseils avisés, ses reconnaissances et encouragement pour être disponible de faire ce travail. Malgré ses nombreuses charges, il a toujours été attentif et disponible. Nous aimerions le remercier pour tout le temps qu'il nous a consacré tout au long de cette année, tant sur le plan personnel que scientifique.*

*Un immense merci est adressé également à Madame **ATTAB Sarah** pour sa gentillesse, ses précieux conseils et sa disponibilité.*

*Tous nos sincères remerciements pour les membres du jury **M. BRADAI L** et **SALHI Nesrin** qui ont accepté de lire et d'évaluer notre manuscrit et de participer à notre jury de mémoire.*

*Nous remercions Monsieur **BARADAI L.** et les ingénieurs du laboratoire microbiologique de la faculté de médecine université Kasdi Merbah Ouargla, de nous avoir accueillis au sein du laboratoire.*

*Un grand merci à Monsieur **BOUZEGUAGUE S.**, responsable du laboratoire Bio-ressources Sahariennes (BRS).*

*Nous tenons à remercier également aux ingénieurs des laboratoires pédagogiques, FSNV, université **KASDI Merbah-Ouargla**, pour leur gentillesse, leurs ses aides et leur reconnaissance.*

Un grand merci à nos familles respectives pour leur soutien et leur affection sans retenue au cours de nos longues années d'études.

DEDICACE



*Je dédie ce modeste travail à celle qui m'a
donné la vie,
Tendresse, qui s'est sacrifiée pour mon bonheur
et ma réussite, à ma mère
A mon père,
À m'encourager, à me donner l'aide et à me protéger.
Que dieu les gardes et les protège,
A mes adorables sœurs Mébarka , Yamina, Ouarda,
Wannassa ,Soumia et Chaima
A mon frère Daoud et sa femme Asma
A mon oncle Mastour
A ma grande famille*

BESSEDDIK

*A ma Chère Rania
A tous ceux qui m'ont encouragé à aller jusqu'au
bout de ce travail*

*A mes chères collègues de section de Microbiologie Appliquée
master 02*



Yousra

DEDICACES



A mon très cher père

*Ce travail est dédié à mon cher père **Laich**, décédé trop tôt, qui m'a toujours poussé et motivé dans mes études. J'espère que, du monde qui est sien maintenant, il apprécie cet humble geste comme preuve de reconnaissance de la part d'un fils qui a toujours prié pour le salut de son âme. Puisse Dieu, le tout puissant, l'avoir en sa sainte miséricorde !*

*A ma très chère mère « **Nafissa** »*

Autant de phrases aussi expressives soient-elles ne sauraient montrer le degré d'amour et d'affection que j'éprouve pour toi. Tu m'as comblé avec ta tendresse et affection tout au long de mon parcours. Tu n'as cessé de me soutenir et de m'encourager durant toutes les années de mes études. Qu''ALLAH'' te protéger et te donne la santé, le bonheur et la longue vie.

*A la mémoire de mon grand-père maternelle « **Larouci Mohamed El-Taher** » Puisse Dieu vous avoir en sa sainte miséricorde et que ce travail soit une prière pour votre âme.*

*A ma chère sœur : **Roumaissa**.*

*A tous mes frères : **Ibrahim, Houssam, Mouhamed Elkhames et Mouhamed El-Amine**.*

*A tous mes oncles : **Mahrez, Naceur, salaheddine et Billal**.*

*A tous mes tantes : **Saida, Saliha, Chafia et Nessrine**.*

A tous mes cousin et cousine.

*A ma très chère binôme **Yousra**.*

A tous mes amies.

A tous ceux qui ont contribué à m'aider pour la réalisation de ce modeste mémoire et tous ceux qui ont m'aidé d'avoir atteint le but voulu.



Rania

Liste des abréviations

%	Pourcentage
A	<i>Alternaria</i>
AN	Amikacine
Amx	Amoxicillin
C	Chloramphénicol
C	<i>Curvularia</i>
CS	Colistine
E	Erythromycine
E	El Oued
F	<i>Fusarium</i>
FA	Acide Fusidique
HCN	Cyanure d'Hydrogène
ISR	Investissement Socialement Responsable
K	Kanamycine
LPWG	Legume Phylogeny Working Group
NaCl	Chlorure de Sodium
O	Ouargla
P	Penzylpénicilline
PDA	Potato Dextrose Agar
PGPR	Plant Growth-Promoting Rhizobacteria
PR	Pathogenesis-related Protein
R	Mesure de la croissance mycélienne
S	<i>Stemphylium</i>
SP	Spiramycine
VA	Vancomycine
YEM	Yeast Extract Mannitol
YMB	Yeast Mannitol Broth

Liste des figures

N°	Titre	Page
Figure 1	Méthode de confrontation directe par stries entre les souches rhizobiennes et les agents phytopathogènes	19
Figure 2	Méthode de confrontation directe par disque entre les souches rhizobiennes et les agents phytopathogènes	20
Figure3	Méthode de confrontation indirecte entre les souches rhizobiennes et les agents phytopathogènes	20
Figure4	étude des types d'inhibition	22
Figure 5	Histogramme représentant les pourcentages d'inhibition de la croissance mycélienne en confrontation directe par stries avec les rhizobiennes antagonistes	24
Figure 6	Histogramme représentant les pourcentages d'inhibition de la croissance mycélienne en confrontation directe par disques avec les rhizobiennes antagonistes	26
Figure 7	Inhibition induite par les souches rhizobiennes contre les agents phytopathogènes	28
Figure 8	Histogramme représentant les pourcentages d'inhibition de la croissance mycélienne en confrontation indirecte avec les rhizobiennes antagonistes	30

Liste des photos

N°	Titre	page
Photo 1	La luzerne <i>Medicago sativa</i> L.	12
Photo 2	les souches fongiques utilisées après le repiquage et revivification	17
Photo 3	Aspect des souches rhizobiennes après le repiquage et revivification	18
Photo 4	Tubes contenant les suspensions rhizobiennes étudiées	21
Photo 5	Résultats de confrontation directe par stries	25
Photo 6	Résultats de confrontation directe par disques	27
Photo 7	Résultats de l'étude des zones d'inhibition	29
Photo 8	Résultats de confrontation indirecte	31
Photo 9	Résultats de confrontation directe par stries (Gx 40)	32
Photo 11	Résultats de confrontation directe par disques (Gx 40)	33

Liste des tableaux

N°	Titre	Page
Tableau 1	Origine des champignons phytopathogènes	16

Table des matières	
Remerciements	
Dédicaces	
Liste des abréviations	I
Liste des figures	II
Liste des photos	III
Liste des tableaux	III
Introduction	1
Chapitre I: Revue bibliographique	
I. Généralités sur les interactions plantes-microorganismes	3
I.1. Intérêt de la symbiose	4
I.1.1. Caractéristiques de la relation symbiotique Rhizobia- <i>Fabaceae</i>	4
I.2. les <i>Fabaceae</i> : généralités et taxonomie	4
I.3. Les Rhizobia : Généralités et taxonomie	5
I.3.1. Taxonomie des rhizobia	6
I.3.2. Le genre <i>Ensifer</i> (formellement <i>Sinorhizobium</i>)	6
I.4. La symbiose légumineuse-rhizobium	7
I.4.1. Établissement de la symbiose	7
I.5. Types d'interactions plantes-pathogènes	7
I.5.1. Commensalisme	9
I.5.2. Antagonisme	9
I.5.2.1. Mode d'action des agents antagonistes	9
I.5.2.1.1. Antagonisme direct	9
I.5.2.1.1.1. Compétition pour la nutrition et l'espace	9
I.5.2.1.1.2. Hyperparasitisme	10
I.5.2.1.1.3. Mutualisme	10
I.5.2.1.1.4. Antibiose	10
I.5.2.1.2. Antagonisme indirect	11
I.5.2.1.2.1. Introduction de la résistance chez l'hôte	11
I.5.2.1.2.2. Production d'HCN	11
I.6. La Luzerne	11
I.6.1. Généralité sur la luzerne	11

I.6.2. Maladies fongiques de la luzerne	12
I.6.2.1. Alternariose	13
I.6.2.2. Curvulariose	13
I.6.2.3. Fusariose	14
I.6.2.4. Stemphyliose	14
Chapitre II : Matériels et méthodes	
II.1. Matériels biologiques	16
II.1.1. Provenance des souches fongiques	16
II.1.1.1. Repiquage et revivification des souches fongiques	16
II.1.2. Provenance des souches rhizobiennes	17
II.1.2.1. Repiquage et revivification des souches rhizobiennes	18
II.2. Méthodes	18
II.2.1. Etude des antagonismes <i>in vitro</i> entre les champignons phytopathogènes et les bactéries rhizobiennes nodulent la Luzerne (<i>Medicago sativa</i> L.)	18
II.2.1.1. Méthode de confrontation directe par stries	18
II.2.1.2. Méthode de confrontation directe par disques	19
II.2.1.3. Méthodes de confrontation indirecte	20
II.2.1.4. Préparation des suspensions rhizobiennes	21
II.2.1.4. Types d'inhibition	21
II.2.2. Méthode d'observation microscopique après confrontation	22
Chapitre III : Résultats et discussions	
III.1. Méthode de confrontation directe	24
III.1.1. Par stries	24
III.1.2. Par disques	26
III.1.2.3. Types d'inhibition	28
III.2. Méthode de confrontation indirecte	30
III.3. Observation microscopique	32
Conclusion et perspectives	36
Références bibliographiques	38
Annexes	43
Résumé	

Introduction

Introduction

Les plantes subissent les attaques de nombreux bio-agresseurs. Parmi eux, les champignons pathogènes causent des maladies sur tous les organes des plantes. Ils appartiennent à de nombreux genres et espèces des différents phylums de champignons vrais (Ascomycètes, Basidiomycètes, Deutéromycètes et Zygomycètes) et plus largement aussi au phylum des Oomycètes (micro-organismes fongiques, phylogénétiquement proches des algues que des champignons (Lepoivre, 2003).

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. En raison de l'aggravation des problèmes en matière de contrôle des maladies fongiques, une recherche sérieuse est nécessaire pour identifier des méthodes alternatives pour la protection des végétaux, qui sont moins dépendantes des produits chimiques et sont plus respectueuses à l'environnement (Prapagdee et al., 2008).

La lutte biologique est l'une des méthodes prometteuses, elle consiste en l'utilisation des microorganismes antagonistes. Les rhizobia sont considérés comme des antagonistes très efficaces des champignons phytopathogènes. Ils ont été signalés comme des inhibiteurs significatifs de la croissance des champignons pathogènes tels que : *Pythium*, *Macrophomina phaseolina*, *Fusarium*, *Rhizoctonia* et *Phytophthora* (Bardin et al., 2004 ; Kumar et al., 2006 ; Hemissi et al., 2011 ; Ozgonen et Gulcu, 2011), d'où l'intérêt d'étudier l'action des souches de rhizobia sur la croissance et l'inhibition de certains champignons phytopathogènes des plantes cultivées et en particulier de la luzerne.

L'objectif de ce travail est de mettre en évidence l'activité antagoniste *in vitro* des rhizobia isolés des nodules racinaires de la luzerne (*Medicago sativa* L.) poussant principalement dans les régions de Ouargla et El Oued envers des champignons isolés également de la même plante.

Ce mémoire est élaborée en trois chapitres: le premier chapitre consiste en une revue bibliographique traitant la taxonomie des rhizobia et les légumineuses, la symbiose légumineuse-rhizobium, les types d'interaction plante-pathogène et les maladies fongiques infectant la luzerne. Les deux autres chapitres sont consacrés aux matériels et méthodes utilisés et les résultats obtenus et leur discussion.

Revue bibliographique

I. Généralités sur les interactions plantes-microorganismes

Les interactions entre la plante hôte et les microorganismes peuvent être soit facilitatrices, soit antagonistes pour un indicateur donné comme la croissance de la plante (Souchie *et al.*, 2006 ; Stinson *et al.*, 2006).

Ces deux catégories d'interactions se manifestent également entre les microorganismes telluriques (Duponnois et Plenchette, 2003 ; Duponnois, 2006).

Parmi les groupes fonctionnels composant la microflore tellurique, certains jouent un rôle majeur dans l'amélioration de la croissance et de la survie des plantes en augmentant notamment la biodisponibilité d'éléments minéraux qui constitue fréquemment la principale contrainte au bon développement du végétal. Dans cette perspective, de nombreux microorganismes telluriques ont été considérés comme des bio fertilisants potentiels dans le cadre d'une agriculture durable à faible apport d'intrants (Rodriguez et Fraga, 1999 ; Johansson *et al.*, 2004 ; Matiru et Dakora, 2004 ; Douds *et al.*, 2005 ; Gentili et Jumpponen, 2006).

Il s'agit notamment des champignons mycorhiziens qui améliorent la nutrition hydrique et minérale (Duponnois *et al.*, 2005 ; Lambers *et al.*, 2008) et la protection phytosanitaire (Leyval et Joner, 2001 ; Joner et Leyval, 2003) des plantes ainsi que des bactéries fixatrices d'azote qui sont capables de piéger l'azote atmosphérique et de le rendre accessible aux plantes (Samba *et al.*, 2002 ; Matiru et Dakora, 2004).

Des processus de mobilisation d'éléments nutritifs à partir de formes complexes de phosphates organiques et inorganiques ont également été mis en évidence chez ces microorganismes (Chabot *et al.*, 1996 ; Alikhani *et al.*, 2006).

En revanche, il existe des microorganismes phytopathogènes dans les sols susceptibles de réduire fortement la survie et le développement des végétaux (Miller *et al.*, 1997 ; Nyvall, 1999). Le processus d'infection d'une plante par un pathogène débute en générale par des échanges de signaux moléculaires. Dès contact, l'entrée se fait par des ouvertures naturelles (stomates, lenticelles), des blessures (poils cassés, dégâts du gel) ou par attaque de la couche protectrice (cutinases et pectinases, injection par vecteur). Des échanges moléculaires s'opèrent également lors de cette contamination-pénétration. Le pathogène se multiplie ou non après une phase de latence. La colonisation se poursuit et des symptômes apparaissent.

Deux types de relations peuvent s'établir: biotrophe (le parasite exploite la cellule végétale sans la tuer) ou nécrotrophe (destruction de la cellule végétale) (Lepoivre, 2003).

I.1. Interactions symbiotiques

En biologie, plusieurs définitions du terme « symbiose » existent. Au sens large, le terme « symbiose » définit une interaction entre deux espèces intimement liées sur le long terme, peu importe sa nature (Bary, 1879). Le sens premier de la symbiose se base donc simplement sur la coexistence de deux organismes et les effets de l'un sur l'autre peuvent être favorables (+), neutres (0) ou défavorables (-). Pourtant, le terme de symbiose évoque plutôt un échange à bénéfices réciproques entre deux espèces (Lefèvre *et al.*, 2010).

Les interactions entre les plantes et les communautés microbiennes du sol reposent sur des bases de signalisation/communication mais surtout sur des relations trophiques. Les plantes dépendent des microorganismes pour leur nutrition et leur santé et les microorganismes dépendent des plantes pour leur fournir les nutriments nécessaires à leur croissance (Lepinay, 2013).

Le cas le plus étudié est celui des relations symbiotiques entre des bactéries et des plantes, (surtout les légumineuses), réalisant la fixation de l'azote atmosphérique.

I.1. 1. Caractéristiques de la relation symbiotique rhizobia - *Fabaceae*

La symbiose se caractérise par la présence d'organes particuliers, situés au niveau de la racine appelés nodosités, au sein desquels la bactérie réduit l'azote atmosphérique en ammoniac assimilable par la plante, en contrepartie, la plante fournit à son symbiote une niche écologique et les substrats carbonés issus de la photosynthèse, nécessaire à son métabolisme (Debellé *et al.*, 2007).

I.2. Les *Fabaceae* : Généralités et Taxonomie

Les légumineuses sont des végétaux regroupés dans la famille des Fabacées (*Fabaceae*). Ces espèces sont notamment utilisées dans les secteurs de l'agronomie car riches en protéines (haricot, pois, lentille, soja, trèfle, luzerne...), en agroforesterie (production de bois, huiles, résines...) et également dans la restauration des sols dégradés concept de « plante hôte » (Yahara *et al.*, 2013).

Avec près de 770 genres et plus de 19 500 espèces, les légumineuses sont, après les orchidées et les astéracées, la troisième plus grande famille d'angiospermes en terme de richesse spécifique (Lewis *et al.*, 2013; LPWG, 2013).

D'un point de vue biogéographique, les légumineuses ont une distribution cosmopolite et jouent des rôles écologiques importants dans quasiment tous les biomes terrestres, même les plus extrêmes (Schrire *et al.*, 2005).

Une des caractéristiques les plus visibles pour reconnaître une légumineuse (à quelques exceptions près), est de posséder un seul carpelle supérieur à une loge, une placentation marginale, avec deux à plusieurs ovules disposés en deux lignes alternatives sur un placenta unique (Lewis *et al.*, 2005).

Jusqu'en 2017, ces trois sous-familles chez les *Fabaceae* étaient : *Mimosoideae*, *Papilionoideae* et *Caesalpinioideae* (LPWG, 2009). Cependant, les systématiciens ont repéré que des analyses phylogénétiques de plus en plus nombreuses indiquaient un problème de classification dans ces sous-familles, notamment au niveau de celle des *Caesalpinioideae* considérée comme une sous-famille paraphylétique (Käss & Wink, 1996).

Des tribus et sous-tribus de légumineuses ne présentant pas de monophylies sont retrouvées et de ce fait, un travail de reclassification a été entrepris par (LPWG, 2013).

Les auteurs ont ainsi pu redéfinir les sous-familles des *Leguminosae* en se basant sur le gène *matK* (Azani *et al.*, 2017). Un des changements majeurs proposé par les auteurs est la création de six sous-familles distinctes au sein des légumineuses : *Caesalpinioideae* (incluant le clade des *Mimosoideae*, *Cercidoideae*, *Detarioideae*, *Dialioideae*, *Duparquetioideae*, et *Papilionoideae*).

I.3. Les rhizobia : Généralités et taxonomie

En 1888, Beijerinck a rapporté l'isolement de « bactéries » dans les radicelles des papilionacées cultivées, puis a infecté avec ces cultures les racines de *Vicia faba*. Il a appelé ces bactéries *Bacillus radicolica*. Plus tard, en 1889, Frank a changé ce nom en *Rhizobium*, avec à l'origine une seule espèce *Rhizobium leguminosarum* (Oke et Long, 1999). À partir du début des années 1960, les bactériologistes ont commencé à utiliser une grande variété de caractères morphologiques, nutritionnels et métaboliques (Graham, 1964, Moffet et Colwell, 1968), ainsi que sérologique (Graham, 1963 ; Vincent, 1970) ; ce qui conduisit à une distinction claire entre rhizobia à croissance rapide et ceux à croissance lente (Graham, 1964 ; Elkan, 1992).

À partir des années 80, avec l'introduction des méthodes génétiques, la diversité des rhizobia a été mise en évidence. Ce qui a conduit à une augmentation progressive du nombre de genres. Parallèlement, il y a eu aussi augmentation significative du nombre de validation des espèces publiées. L'amélioration et le développement dans les méthodes d'étude des cellules rhizobiennes a permis de proposer une classification appropriée (Graham et *al.*, 1991 ; Vandamme et *al.*, 1996).

L'isolement et la caractérisation de nouvelles bactéries nodulaires chez différentes plantes hôtes ont conduit à nommer de nombreuses espèces de rhizobia. En 1990, il n'y avait qu'une seule espèce bactérienne connue pour noduler le haricot commun dans le monde : *Rhizobium leguminosarum* biovar *viciae*, une espèce qui nodulait la féverole *Rhizobium leguminosarum* biovar *phaseoli* et deux espèces qui nodulaient le soja *Bradyrhizobium japonicum* et *Rhizobium fredii*.

I.3.1. Taxonomie des rhizobia

Les premières classifications des rhizobia étaient basées sur des tests d'inoculations croisées entre rhizobia et leurs plantes hôtes (Fred et *al.*, 1933).

Ensuite, la validité de la classification a été orientée vers la taxonomie polyphasique moderne qui a conduit à la description claire et vaste de nombreux microorganismes (Willems et Collins, 1993).

Selon Shamseldin et *al.* (2016) in Azib (2020), environ 238 espèces de rhizobia réparties dans 18 genres ont été identifiées.

La plupart des rhizobia connus appartiennent aux genres des α -*Proteobacteria* dans les familles suivantes: *Rhizobiaceae* (*Rhizobium*, *Ensifer* (syn. *Sinorhizobium*), *Allorhizobium*, *Pararhizobium*, *Neorhizobium*, *Shinella*), *Phyllobacteriaceae* (*Mesorhizobium*, *Aminobacter*, *Phyllobacterium*), *Brucellaceae* (*Ochrobactrum*), *Methylobacteriaceae* (*Methylobacterium*, *Microvirga*), *Bradyrhizobiaceae* (*Bradyrhizobium*), *Xanthobacteraceae* (*Azorhizobium*) et *Hyphomicrobiaceae* (*Devosia*), et certains appartiennent aux genres des β -*Proteobacteria* de la famille des *Burkholderiaceae* (*Paraburkholderia*, *Cupriavidus*, *Trinickia*) (Andrews et Andrews, 2017 ; Estrada-de los Santos et *al.*, 2018).

I.3.2. Le genre *Ensifer* (formellement *Sinorhizobium*)

Le genre *Sinorhizobium*, objet de notre étude, a été décrit par (Chen et *al.*, 1988). Les cellules du genre *Ensifer* ont des mensurations similaires à celles de *Rhizobium*, mobiles par des flagelles polaires ou péritriches. La croissance optimale de ce genre est comprise

entre 25-30°C, un pH de 6 à 8 mais tolère des pH allant de 5 à 10.5, et une concentration de 10 g/l de NaCl (Young, 2010).

Selon la bibliographie actuelle, le genre *Ensifer* compte environ 22 espèces (Azib, 2020).

I.4. La symbiose légumineuse-rhizobium

Décrite pour la première fois par Frank. (1889), la symbiose légumineuse-rhizobium est un modèle d'étude d'association entre eucaryote et procaryote. Elle constitue une association extrêmement importante du point de vue écologique et agronomique (Rajaonarimany, 2010).

Les plantes de la famille des légumineuses forment une symbiose particulière avec les rhizobia. Il en résulte la formation de nodules, qui sur les racines, fixent l'azote. Chaque variété de légumineuse a tendance à n'être compatible qu'avec un seul type de microsymbiote (Wakeford, 2004).

Cette symbiose est une association entre les plantes légumineuses et des bactéries du type *Rhizobium* permettant de réduire l'azote atmosphérique en des formes assimilables par les plantes. A bénéfice réciproque, cette association donne lieu à des interactions multiples entre les deux partenaires (Fossou, 2011). Les bactéries obtiennent l'accès à une source d'énergie et les plantes récupèrent les composés azotés produits dans les nodules. Lorsque toutes les conditions sont réunies, les légumineuses peuvent couvrir l'intégralité de leurs besoins grâce à la fixation symbiotique.

I.4.1. Établissement de la symbiose

L'organogenèse des nodules comporte plusieurs étapes (Patriarca et al., 2004) qui débutent par un dialogue moléculaire (flavonoïdes, facteurs Nods), nécessaire à la reconnaissance mutuelle entre la plante et ses symbiotes (Oldroyd, 2013).

Dans les conditions de faible teneur en azote, les racines des légumineuses sécrètent des flavonoïdes spécifiques, chimioattractifs, détectables par les bactéries (Gulash et al., 1984 ; Kape et al., 1991). Les rhizobia reconnaissent ces flavonoïdes et sont attirés vers la plante. Les facteurs de nodulation sont des molécules de signalisation composées de lipochitoooligosaccharides sécrétés par le rhizobium et répondent de façon spécifique selon l'espèce végétale (Geurts et Bisseling, 2002 ; Geurts et al., 2005 ; Oldroyd et al., 2011). Après reconnaissance entre les deux partenaires symbiotiques, il s'ensuit un attachement

des bactéries à la surface des poils absorbants et pénétration de celles-ci dans les racines conduisant à la formation des nodules (Azib, 2020).

I.5. Types d'interactions plantes-pathogènes

Les champignons sont des organismes eucaryotes ne constituent pas une entité monophylétique mais forment au contraire un groupe très hétérogène dont la caractéristique essentielle commune est la nutrition hétérotrophe par absorption, celle-ci pouvant prendre la forme du saprophytisme, du parasitisme ou de la symbiose (Nasraoui, 2006). Les champignons phytopathogènes établissent des interactions antagonistes avec les plantes (Vander, 2003).

Champignons sont responsables de près de la moitié des maladies connues à ce jour chez les plantes cultivées (Lepoivre, 2003). Ils sont à eux seuls responsables de 70% de pathologie végétale. Par conséquent, des pertes agricoles notables, comprises entre 10 % et 30 % ou plus, variables entre cultures et entre continents sont recensées (Esquerre-Tugaye, 2001).

Les champignons phytopathogènes sont capables d'infecter n'importe quel tissu à n'importe quel stade de croissance de la plante. La plupart des champignons possèdent deux modalités de reproduction : la reproduction asexuée dite « imparfaite » ou végétative et la reproduction sexuée « dite parfaite » (Lepoivre, 2003).

La phytopathologie ou étude des maladies des plantes n'est cependant pas ancienne en tant que science. Dans un premier temps les savants ont décrit les différentes maladies et les agents infectieux, éventuellement les moyens de les combattre. Ce n'est qu'ensuite que les études furent entreprises sur les mécanismes d'infection, les relations hôte-parasite, sur la physiologie, les phénomènes de sensibilité ou de résistance et bien d'autres sujets qui forment l'essence même de la phytopathologie (Corbaz, 1990). Les maladies des plantes sont aussi vieilles que l'agriculture. En effet, dès son origine, l'agriculture créa des conditions favorables aux maladies des plantes cultivées en concentrant des populations de plantes sur des surfaces limitées et en effectuant des cultures successives de la même plante (Xhaard, 2011).

Celles-ci sont à l'origine de pertes de rendement qui entraînent des pertes économiques, voire des famines dans les cas les plus dramatiques. Le cas le plus tristement

célèbre est celui de l'introduction en Europe en 1844 de *Phytophthora infestans*, agent du mildiou de la pomme de terre, causant la grande famine Irlandaise de 1845 à 1852, qui fit près d'un million de morts et poussa deux millions d'Irlandais à émigrer vers d'autres continents (Xhaard, 2011).

Encore aujourd'hui, la principale maladie du riz, la pyriculariose causée par *Magnaporthe oryzae*, cause des pertes mondiales annuelles équivalentes à l'alimentation de 60 millions de personnes. De même, une nouvelle souche de rouille noire du blé apparue en Ouganda en 1999 représente une nouvelle menace de famine dans certains pays d'Asie (Xhaard, 2011).

I.5.1. Commensalisme

Le commensalisme existe au niveau de la rhizosphère notamment par des changements dans les conditions environnementales (humidité, pH, le potentiel osmotique, etc...) par un micro-organisme rendant ainsi un climat favorable pour le développement d'un autre. Aussi, certains organismes dégradent ou neutralisent des substances toxiques favorisant ainsi la croissance des autres (Curl et Truelove, 1986).

I.5.2. Antagonisme

L'antagonisme microbien est un phénomène entre deux organismes (l'antagoniste et le pathogène) (Pal et McSpadden Gardener, 2006).

Cette alternative consiste à utiliser des microorganismes pouvant être antagonistes des agents pathogènes et /ou éliciteurs des plantes, et aussi ces microorganismes ont la capacité de stimuler directement la croissance des plantes (Hinsinger et Marschner, 2006).

En écologie, le terme d'antagonisme désigne une inhibition ou une action défavorable d'un organisme vis-à-vis d'un autre à l'intérieur d'une population microbienne mixte (Curl et Truelove, 1986).

L'antagonisme se manifeste généralement soit par une compétition, un hyperparasitisme, une production de sidérophores ou par une antibiose.

I.5.2.1. Modes d'action des agents antagonistes

La protection conférée par un microorganisme de lutte biologique s'appuie sur un ou plusieurs mécanismes d'action tels que la compétition (pour éléments nutritifs, l'oxygène et l'espace), l'antibiose, le parasitisme, la diminution de l'agressivité du pathogène et l'induction de la résistance chez la plante. L'étude de ces mécanismes d'action est une étape importante dans le développement de la lutte biologique (Jijakli, 2003).

I.5.2.1.1. Antagonisme direct

I.5.2.1.1.1. Compétition pour la nutrition et l'espace

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 par rapport aux nutriments, ce qui peut diminuer ou même empêcher la croissance de cet agent pathogène. Par exemple, certains champignons produisant des sidérophores ont un avantage écologique. Ces sidérophores captent le fer, pouvant le rendre ainsi non disponible pour l'agent pathogène ce qui, conséquemment, limite sa croissance. Outre la compétition nutritionnelle, la compétition spatiale contribue aussi à la réduction des infections racinaires par les agents phytopathogènes (Benítez et *al.*, 2004). En effet, les microorganismes ayant la capacité de coloniser les racines comme les bactéries promotrices de la croissance des plantes (PGPR) protègent les racines et occupent les sites d'infection aux agents phytopathogènes (Benítez et *al.*, 2004 ; Compant et *al.*, 2005).

I.5.2.1.1.2. Hyperparasitisme

L'hyperparasitisme est l'attaque directe d'un microorganisme par un autre dans un but nutritionnel. La rhizosphère qui héberge une large variété de populations microbiennes, constitue un milieu favorable pour l'apparition du parasitisme (Gagné et *al.*, 1984).

I.5.2.1.1.3. Mycoparasitisme

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.

I.5.2.1.1.4. 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.

Revue bibliographique

L'antibiose est le mode d'action le plus étudié chez les agents de lutte biologique (Jijakli, 2003). Elle consiste en la production par l'agent antagoniste d'antibiotiques efficaces contre l'agent pathogène. Ces antibiotiques vont ralentir ou arrêter la croissance de l'agent pathogène (Corbaz, 1990).

I.5.2.1. 2. Antagonisme indirect

I.5.2.1.2.1. Induction de la résistance chez l'hôte

Des microorganismes intervenant dans la lutte biologique sont capables aussi de déclencher une résistance systémique induite (ISR) chez la plante hôte, ce qui peut rendre l'hôte plus résistant à l'agression future exercée par des agents pathogènes (Jijakli, 2003). L'induction des systèmes de résistance chez la plante a été démontrée pour la première fois par Kempe et Sequira. (1983). Ces derniers ont remarqué que des prétraitements par des bactéries ont protégé des tubercules de pomme de terre des infections de *Pseudomonas solanacearum*.

Le microorganisme antagoniste peut consister en une souche avirulente occupant la même niche écologique qu'un agent pathogène. L'induction des systèmes de résistance se manifeste par des modifications au niveau de la composition des parois cellulaires ou la libération des éliciteurs. Ces derniers sont des substances mettant en branle les mécanismes de défense de la plante. Celle-ci produira alors des phytoalexines et des protéines PR qui lui confèrent une résistance systémique (Agrios, 1988 ; Toussaint, 1996).

I.5.2.1.2.2. Production d'HCN

Les cyanides sont des métabolites secondaires produits par plusieurs microorganismes. Ils peuvent être produits directement à partir de la glycine ou à partir des glycosides cyanogènes. L'action bénéfique de cette molécule, est liée à la lutte biologique, à l'induction des mécanismes de défense des plantes et à antagonismes (Bakker et Schippers, 1987). La présence des endophytes dans les tissus de la plante peuvent influencer la production des métabolites volatils de la plante (Rini et Sulochana, 2007 ; Baysal et *al.*, 2008).

I.6. La luzerne

I.6.1. Généralité sur la luzerne

La luzerne cultivée est l'une des plantes fourragères les plus répandues dans le monde. Cultivée dans les régions équatoriales jusqu'aux limites du cercle polaire arctique, elle est retrouvée dans les zones tempérées chaudes où elle trouve son plus grand développement (Mazoyer et *al.*, 2002).

La luzerne appartient à la famille des légumineuses, caractérisée par sa capacité à fixer l'azote atmosphérique, grâce à une symbiose existante entre la plante et une bactérie qui se développe dans son système racinaire (Mauriès, 1994). Elle est utilisée comme fourrage pour quatre raisons, car elle constitue : Une source d'azote pour d'autres cultures d'assolement, une culture propre à améliorer les sols, une source complète d'éléments nutritifs pour la production de viande et de lait et un aliment de haute qualité pour les chevaux. Elle peut s'adapter à de nombreux types de sol mais elle tolère mal les sols acides (pH inférieur à 5) ou très humides, qui sont plus propices au trèfle violet (Marble, 1993).

La luzerne a été classée scientifiquement par Linné en 1753 dans le genre *Medicago*, avec comme nom binomial *Medicago sativa* L.



Photo 1 : Morphologie de la luzerne (*Medicago sativa* L.) (Childers, 2008)

1) fleur ; 2) fleur épanouie ; 3) fleur ouverte ; 4 et 5) un pétale ; 6) une inflorescence en stade fructification ; 7) une gousse ; 8) un grain ; 9) coupe longitudinale d'un grain.

I.6.2. Maladies fongiques de la luzerne

Divers agents pathogènes menacent la production de luzerne. On peut citer : la tache noire printanière de la tige et des feuilles (*Phoma medicaginis* Malbr. et Roum.), tache noire estivale de la tige et des feuilles (*Cercospora medicaginis* Ellis et Everh.), tache commune (*Pseudopeziza medicaginis* (Lib.) Sacc.), tache foliaire *Leptosphaerulina* (*Leptosphaerulina briosiana* Pollacci. J. H. Graham et Luttrell), tache *Stemphylium* (*Stemphylium* spp.). ces dernières peuvent entraîner de graves pertes de rendement pour la luzerne (Nutter et al., 2002 ; Wilcoxson et al., 1973). En plus de la perte de rendement

quantitatif, certains agents pathogènes foliaires, dont *Fusarium spp.* et *Alternaria spp.* (Scudamore et Livesey, 1998) peuvent réduire la qualité du fourrage en produisant des mycotoxines (Barbetti, 1995). Aux États-Unis, Nutter et *al.* (2002) ont signalé jusqu'à 40 % de pertes de rendement sur les feuilles malades dans les champs. En raison du manque de cultivars de luzerne résistants à la plupart des champignons pathogènes (Nutter et *al.*, 2002), les fongicides et la récolte précoce sont généralement recommandés pour minimiser les pertes d'herbe. Bien que les effets du génotype de l'hôte ou des agents pathogènes sur le développement d'un certain nombre de maladies de la luzerne a déjà été signalé (Barbetti, 1987 ; Barbetti, 1991 ; Gray, 1983 ; Rizvi et Nutter, 1993 ; Tivoli et *al.*, 2006), les effets des conditions environnementales sur les maladies les plus foliaires de la culture ne sont pas clairement comprises.

I.6.2.1. Alternariose

Selon Maiti et *al.* (2007), les symptômes de l'alternariose sont d'abord sous la forme de petites taches ferrugineuses brunâtres (2 à 8 mm) éparpillées à l'extrémité des folioles. Avec le temps, les taches grossissent (jusqu'à 20 mm) et deviennent de forme irrégulière, puis se fusionnent et s'entourent d'un halo jaune. L'organisme causal est identifié comme étant *A. longipes* sur la base d'observations culturelles et morphologiques, ainsi que de tests de pathogénicité.

Au Brésil, Mariana et *al.* (2015) ont remarqué que les plants de luzerne présentent des symptômes de la tache alternarienne caractérisés des formations sombres devenant des taches arrondies d'environ 1 mm à 3 mm de diamètre qui apparaissent sur les deux bords et au centre des folioles. Après caractérisation, il a été conclu qu'il s'agit du premier signalement d'*Alternaria alternata* au Brésil.

I.6.2.2. Curvulariose

Selon Imran et *al.* (2021), différentes espèces du genre *Curvularia* peuvent infecter la luzerne. Parmi celles-ci, *Curvularia buchloes* cause des taches foliaires brunes uniques, imbibées d'eau et entourées de halos jaunes visibles sur les feuilles.

I.6.2.3. Fusariose

L'agent pathogène de la fusariose de la luzerne a d'abord été reconnu comme *F. oxysporum* var. *medicaginis* (Weimer, 1928). Il est actuellement connu sous le nom de *F. oxysporum* *F.sp. medicaginis* (Armstrong et Armstrong, 1981). Les autres noms ne sont pas d'usage courant.

Les symptômes de la maladie comprennent des stries brun foncé ou rougeâtre apparaissant dans la stèle de la racine pivotante, apparaissant en coupe transversale sous forme de petits anneaux, partiels ou complets. Une décoloration olive à brune s'étend dans la partie basale de la tige. Au fur et à mesure que la maladie progresse, les vaisseaux se bouchent et les plantes flétrissent. Le blanchiment des feuilles et des tiges s'ensuit et une teinte rougeâtre se développe souvent dans les feuilles. Un seul côté d'une plante peut être affecté au début. Après plusieurs mois, la plante entière meurt. La maladie progresse généralement lentement dans les peuplements de luzerne et seules les plantes éparses présentent des symptômes à la fois. Une perte considérable de peuplement peut se produire sur plusieurs années (Frosheiser et Barnes, 1978).

I.6.2.4. Stemphyliose

Un champignon, identifié comme *Stemphylium botryosum* avec le stade parfait *Pleospora herbarum*, est décrite comme provoquant une maladie du trèfle rouge (*Trifolium pratense*) et de la luzerne dans le Wisconsin. La maladie attaque principalement les feuilles, produisant des lésions irrégulières, brun foncé à noires, souvent entourées d'un halo de couleur paille, mais elle peut parfois produire de petites lésions linéaires noires sur les tiges et les pétioles. Les lésions sur les feuilles augmentent rapidement et fusionnent, et les pétioles se brisent parfois au niveau du locus d'infection.

Le champignon pénètre généralement dans les tissus foliaires par les stomates, mais peut également pénétrer directement entre les cellules épidermiques, se développant de manière intercellulaire qui tue les cellules hôtes sur son chemin (Smith, 1940).

Matérielle et méthodes

Matériel et méthodes

Objectif

Dans ce chapitre, traitant le biocontrôle des maladies fongiques, nous allons expliquer les protocoles et les méthodes utilisés pour l'évaluation des propriétés antagonistes de trois souches rhizobiennes sur des agents pathogènes de la luzerne sous conditions contrôlées *in vitro*.

Cette étude a été réalisée au niveau du laboratoire de Microbiologie, département des sciences biologiques de l'université de Ouargla.

II.1. Matériels biologiques

II.1.1. Provenance des souches fongiques

Quatre souches fongiques ont été utilisées, préalablement isolées et identifiées à partir de *Medicago Sativa* L. (La luzerne), cultivée au sein de l'exploitation agricole de l'université. Ces souches fongiques appartiennent à des genres différents à savoir : *Alternaria*, *Curvularia*, *Fusarium* et *Stemphylium* (salhi et Habhoub, 2020). L'origine des champignons phytopathogènes est mentionnée dans le tableau 1 :

Tableau 1: Origine et des champignons phytopathogènes

Souches fongiques	Année d'isolement	Organes touchés
<i>Alternaria sp.</i>		les feuilles et la tige
<i>Curvularia sp.</i>		les feuilles
<i>Fusarium sp.</i>	2020	centre de la racine
<i>Stemphylium sp.</i>		les tiges

II.1.1.1. Repiquage et revivification des souches fongiques

A l'aide d'une anse de platine stérile, on gratte au bord de la colonie un fragment du mycélium et on le dépose au centre de la nouvelle boîte de pétri contenant le milieu PDA

Matériel et méthodes

dont la composition est donnée en annexe 1. L'incubation des cultures est effectuée à 28°C pendant 4 à 7 jours (Harir, 2010) (Photo2).

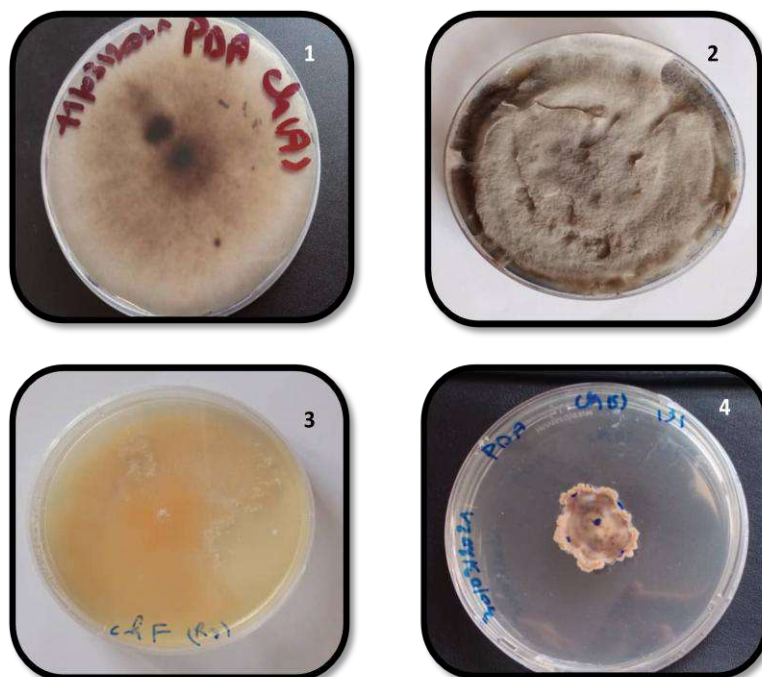


Photo 2: les souches fongiques utilisées après le repiquage et revivification : 1) *Alternaria sp.*; 2) *Culvularia sp.*; 3) *Fusarium sp.*; et 4) *Stemphylium sp.*

II.1.2. Provenance des souches rhizobiennes

Les souches rhizobiennes utilisées dans cette étude nous ont été offertes par M. AZIB. Ces dernières ont été caractérisées sur les plans phénotypique et génotypique et appartiennent à l'espèce *Sinorhizobium mililoti*. Elles ont été isolées à partir de nodosités de *Medicago Sativa* L., cultivée dans les wilayas de Ouargla et d'El Oued. La caractérisation phénotypique a montré une diversité de réponses. Les souches présentaient un large spectre de tolérance au NaCl et aux pH alcalins et neutres. En général, toutes les souches ont présenté une bonne croissance à 28 °C et 37 °C et une mauvaise croissance aux températures extrêmes (4°C et 45°C). Elles ont la capacité de résister à différentes antibiotiques (SP, VA, C, FA, K, CS, AN) (Azib, 2020).

Matériel et méthodes

II.1.2.1. Repiquage et revivification des souches rhizobiennes

Les souches rhizobiennes ont été conservées à 4°C. En premier lieu, elles sont réactivées par un repiquage de quelques colonies sur milieu YMA dont la composition est donnée en annexe 2 et puis incubées à 28°C pendant 3 jours (Vincent, 1970) (Photo 3).



Photo 3 : Aspect des souches rhizobiennes après le repiquage et revivification : 1) E141 ; 2) E543; 3) O211.

II.2. Méthodes

II.2.1. Etude des antagonismes *in vitro* entre les champignons phytopathogènes et les bactéries rhizobiennes nodulent la Luzerne (*Medicago sativa* L.)

L'action antagoniste des bactéries a été évaluée par différents tests. Ces derniers consiste à réaliser *in vitro* des confrontations directe et indirecte entre les bactéries rhizobiennes et les champignons phytopathogènes (Bezert *et al.*, 1996) .

II.2.1.1. Méthode de confrontation directe par stries

Le test de confrontation directe est réalisé dans des boites de Petri contenant le milieu YMA. Un disque de jeune culture mycélienne de 6 mm de diamètre a été déposé au centre de la boite entouré par deux stries de la culture bactérienne. La distance entre les disques et les stries est de 2 cm. Chaque bactérie a été testée sur les quatre champignons, ainsi trois répétitions ont été effectuées pour chaque confrontation (rhizobiennes/champignon). L'incubation est réalisée à 28°C, observée quotidiennement pendant 10 jours. Les témoins sont des monocultures réalisées pour chaque champignon.

Le champignon estensemencé dans un milieu YMA. La lecture des résultats consiste à mesurer la distance parcourue par le champignon en direction de l'antagoniste bactérien (Figure 1). Ainsi, le pourcentage d'inhibition de la croissance mycélienne est calculé selon l'équation suivante décrite par Idris *et al.* (2007) :

Matériel et méthodes

$$(\%) \text{ Inhibition} = [(R_{\text{témoin}} - R_{\text{test}}) / R_{\text{témoin}}] \times 100$$

$R_{\text{témoin}}$: Mesure de la croissance mycélienne normale de champignon témoin.

R_{test} : Mesure de la croissance mycélienne influencée par la bactérie.

A partir de 20 % on peut parler d'inhibition.

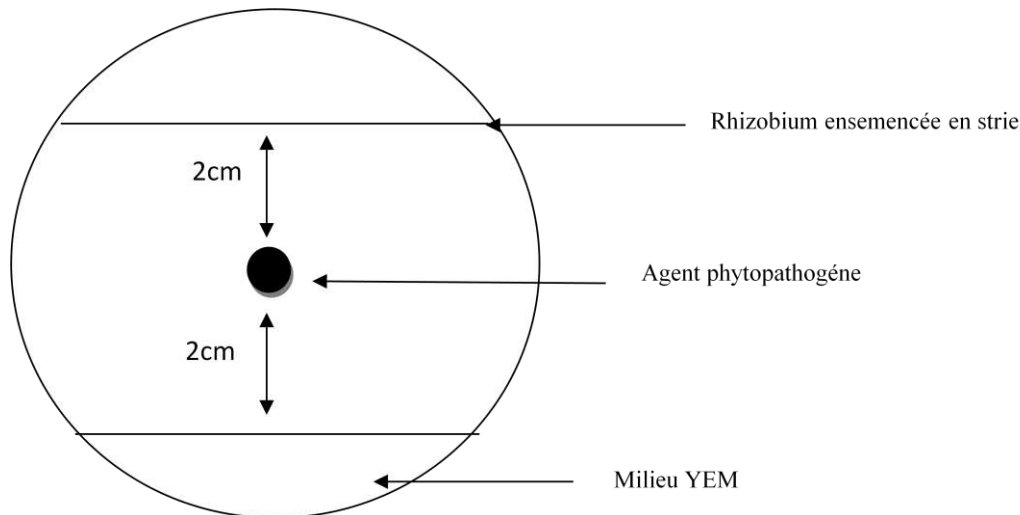


Figure 1: Méthode de confrontation directe par stries entre les souches rhizobiennes et les agents phytopathogènes, Idris et *al.* (2007)

II.2.1.2. Méthode de confrontation directe par disques

Selon Aghighi et *al.* (2004), le test de confrontation directe est réalisé dans des boîtes de Petri contenant le milieu YMA. Un disque de jeune culture mycélienne de 6 mm de diamètre a été déposé au centre de la boîte de Petri entouré par trois disques de la culture bactérienne, la distance entre les disques est de 2 cm. Chaque bactérie a été testée sur les quatre champignons, ainsi trois répétitions ont été effectuées pour chaque confrontation rhizobium/champignon. L'incubation est réalisée à 28°C, observée quotidiennement pendant 10 jours. Figure (2)

La lecture des résultats se fait comme décrit précédemment.

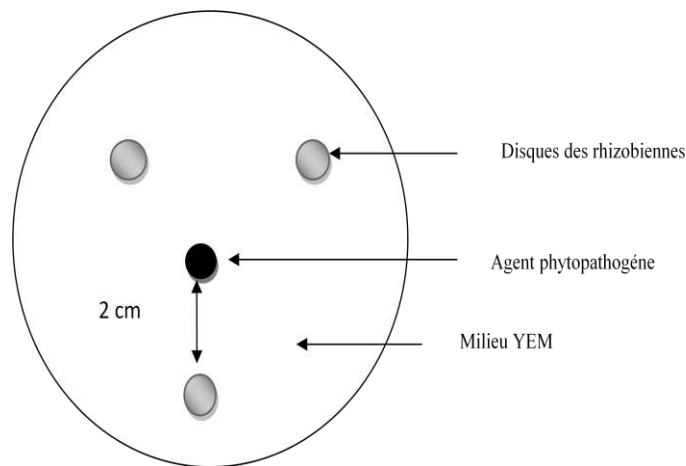


Figure 2: Méthode de confrontation directe par disque entre les souches rhizobiennes et les agents phytopathogènes (Willis, 1962 ; Aghighi et *al.*, 2004)

II.2.1.3. Méthodes de confrontation indirecte

Le champignon et la bactérie sont ensemencés dans une boîte de Petri dans deux compartiments différents. Le disque de champignon a été déposé au centre de fond d'une boîte de pétri contenant le milieu PDA. La suspension bactérienne standardisée a été étalée sur une autre boîte de Petri contenant une fine couche du milieu YMA. Les deux boîtes sans leurs couvercles ont été reliées entre elles par un parafilm et incubées à 28°C pendant 10 jours. Trois répétitions pour chaque confrontation ont été réalisées. Les boîtes témoins sont ensemencées uniquement par le champignon. L'objectif est d'observer si la présence de la bactérie ralentit la croissance du champignon (Trivedi et *al.*, 2006) (Figure3).

La lecture des résultats se fait comme décrit précédemment.

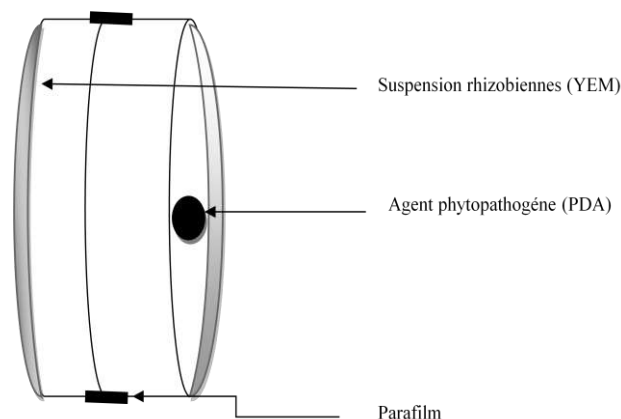


Figure 3 : Méthode de confrontation indirecte entre les souches rhizobiennes et les agents phytopathogènes (Trivedi et *al.*, 2006)

Matériel et méthodes

II.2.1.4. Préparation des suspensions rhizobiennes

Selon Boussena. (2019), la préparation de suspension rhizobiennes se fait selon les étapes suivantes :

- 1- Préparer le milieu YMB.
- 2- Stériliser la pipette Pasteur.
- 3- Ouvrir le tube et flambé son ouverture.
- 4- Aspirer 10 ml du milieu YMB avec la pipette Pasteur.
- 5- Flamber après refermer le tube.
- 6- Stériliser l'ance.
- 7- Prélever une colonie et ensemercer le tube (X3 répétitions), photo (4)

Les souches bactériennes sont incubées à 28°C pendant 72h sur un incubateur agitateur (200 tr/min) (Vincent, 1970 ; *in* Azib, 2020).



Photo 4: tubes contenant les suspensions rhizobiennes étudiées.

II.2.1.4. Etude des types d'inhibitions

Selon Boughachiche. (2012), un disque de champignon est déposé au centre d'une boîte Petri contenant le milieu YMA, entouré par trois disques des zones d'inhibition (où l'arrêt de croissance des souches pathogènes testées a été observé) avec une distance de 2 cm (figure 4). Trois répétitions sont réalisées pour chaque test. Les boîtes sont incubées à 28°C pendant 5 à 7 jours.

La lecture des résultats se fait comme décrit précédemment.

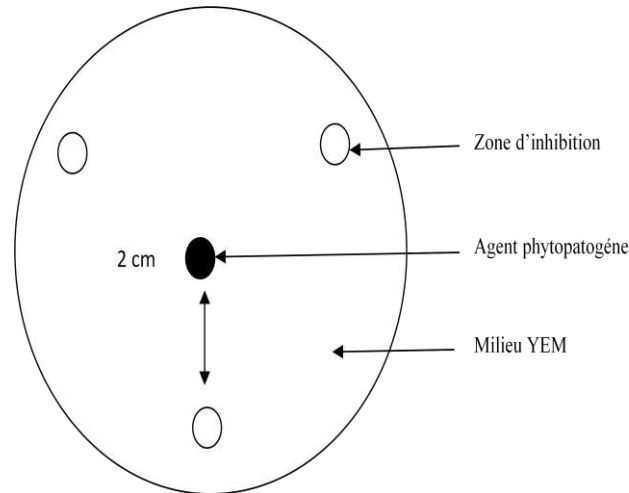


Figure 4 : étude des types d'inhibition, Boughachiche (2012).

II.2.2. Méthode d'observation microscopique après confrontation

Des spores et des filaments mycéliens des souches fongiques ont été prélevés, puis déposés sur des lames contenant une goutte de l'eau physiologique ou bien une goutte de rouge Congo (Bottiger, 1884) qui permet la coloration de la chitine et de la callose ce qui permet d'avoir une meilleure observation.

Cette étape a été effectuée au niveau de laboratoire microbiologique de la faculté de Science de la nature et de vie –université Kasdi Merbah Ouargla.

L'observation microscopique permet la visualisation de la forme du mycélium, la présence ou l'absence de septum et les caractéristiques des fructifications et des spores (Leslie et Summerell, 2006). Cette étape a été faite au niveau de laboratoire microbiologique de la faculté de médecine d'université de Ouargla .

Résultats et discussions

Résultats et discussions

III.1. Méthode de confrontation directe

III.1.1. Par stries

Après 10 jours de confrontation en culture directe, l'activité antifongique *in vitro*, a mis en évidence une action inhibitrice des champignons phytopathogènes testés. Les résultats de ce test ont montré que la croissance mycélienne enregistrée chez les témoins est supérieure à celle des interactions rhizobiennes/champignon.

Les taux d'inhibition de la croissance mycélienne varient selon les souches bactériennes. Les résultats du test d'antagonisme sont représentés dans la (figure 4 et photo 5).

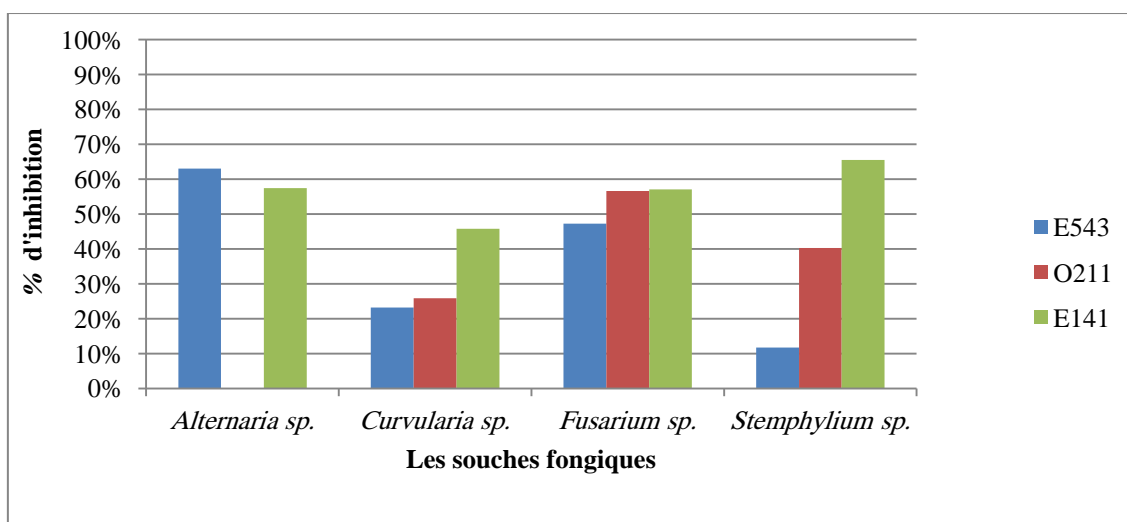


Figure 5 : Histogramme représentant les pourcentages d'inhibition de la croissance mycélienne en confrontation directe par stries avec les souches rhizobiennes antagonistes.

Les plus importants pourcentages d'inhibition de la croissance mycélienne des quatre champignons ont été obtenus avec la souche E141 (45.80 % pour *Curvularia sp.*, 57.08 % pour *Fusarium sp.*, 57.44 % pour *Alternaria sp.* et 65.45% pour *Stemphylium sp.*), suivie par les souches E543 et O211 respectivement. Elles présentent un pouvoir d'inhibition, vis-à-vis de : *Alternaria sp.*, *Curvularia sp.* et *Fusarium sp.*, oscillant entre 23% et 65% et un pouvoir d'inhibition faible d'environ 11% vis-à-vis de *Stemphylium sp.*

Cependant, la souche O211 inhibe la croissance des trois champignons (*Curvularia sp.*, *Fusarium sp.* et *Stemphylium sp.*), à 25% et 56 % et aucune inhibition n'est enregistrée pour *Alternaria sp.*

Résultats et discussions

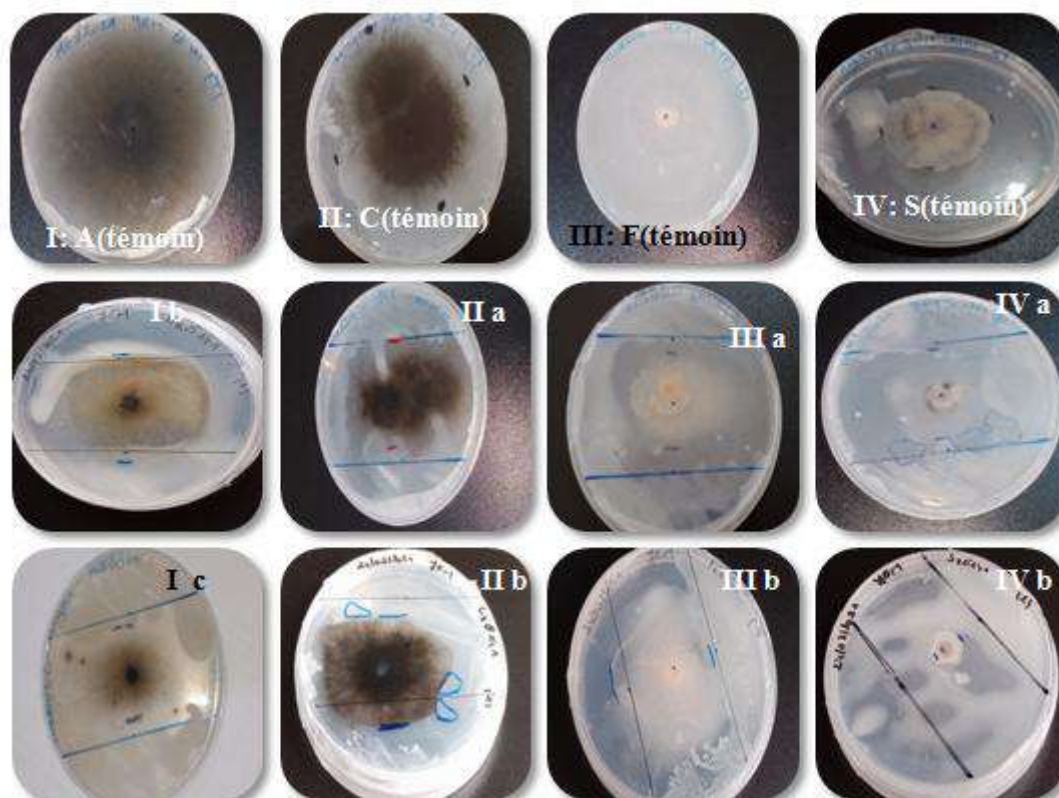


Photo 5 : Résultats de confrontation directe par stries : I) A témoin ; Ib) A vs E141 ; Ic) A vs E543 ; II) C témoin ; IIa) C vs O211 ; IIb) C vs E141 ; III) F témoin ; IIIa) F vs O211 ; IIIb) F vs E141 ; IV) S témoin ; IVa) S vs O211 ; IVb) S vs E141.

Les résultats obtenus montrent que pour la souche antagoniste la plus performante, E141, la zone d'inhibition est tellement grande qu'il n'y a pas eu de contact physique avec le pathogène, concluant que la bactérie produit des métabolites antifongiques, tel que décrit par Montealegre et *al.* (2003).

Selon Williams et Asher. (1996), la différence entre les pourcentages d'inhibition des souches fongiques testées suggère que le mode d'action et/ou le type des métabolites produit par les bactéries peut varier, mais aussi que ces bactéries sont taxonomiquement différentes.

Dans le présent travail, les résultats montrent que la souche E141 présente un pouvoir antagoniste très important (57%-65%) contre les quatre souches fongiques utilisées.

Contrairement à nos résultats, Antoun et *al.* (1978) ont constaté que les pourcentages d'inhibition étaient faibles entre le rhizobium et *Stemphylium sp.* qui est de

Résultats et discussions

20% et il est de 6% pour *Fusarium sp.* D'autre part, Chakraborty. (2006) a constaté que *Fusarium sp.* été inhibé juste de presque 8%. Mutluru et Konada ont constaté que *Curvularia sp.* est inhibé de 13%, un résultat proche du notre (11%) vis-à-vis la souche E543.

III.1.2. Par disques

Après 10 jours de confrontation en culture directe, l'activité antifongique *in vitro*, met en évidence une action inhibitrice des champignons phytopathogènes testés.

Les résultats des taux d'inhibition montrent que la croissance mycélienne varient selon les souches bactériennes (voir photo 6 et la figure 6).

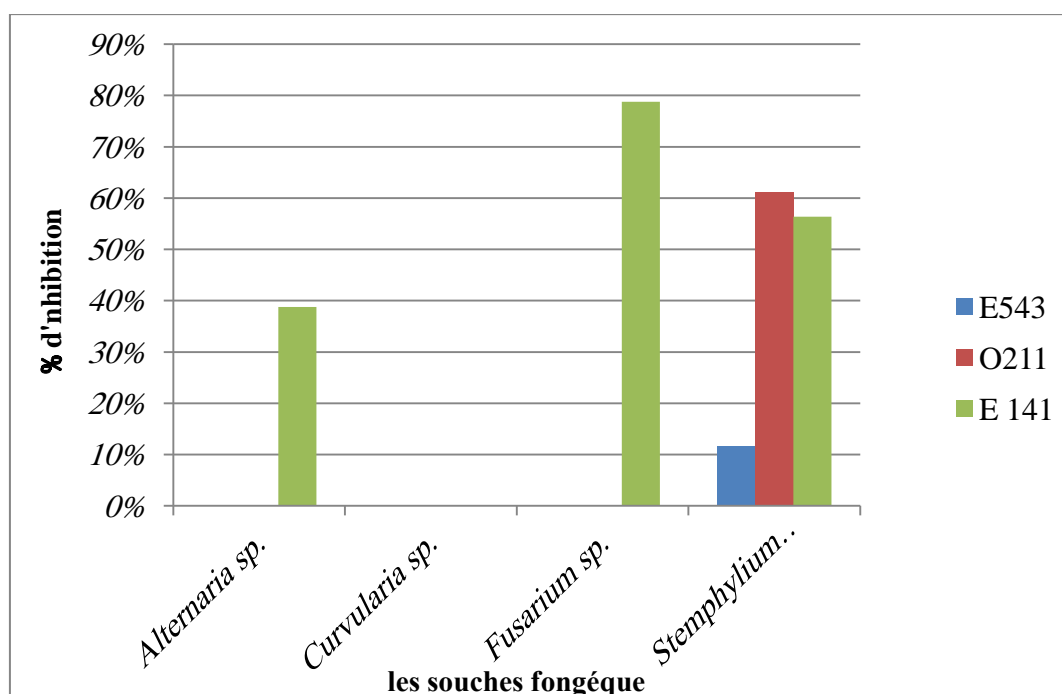


Figure 6: Histogramme représentant les pourcentages d'inhibition de la croissance mycélienne en confrontation directe par disques avec les rhizobiennes antagonistes.

La figure 6, donne une première idée sur le comportement de chacune des 3 souches de rhizobia vis-à-vis des souches fongiques. Les pourcentages d'inhibition les plus élevés sont compris entre de 38% et 78%, observés envers *Alternaria sp.*, *Fusarium sp.* et *Stemphylium sp.* avec la souche E141, tandis que l'absence d'inhibition est observée en présence de *Curvularia sp.* avec toutes les souches bactériennes et chez *Fusarium sp.* et *Alternaria sp.* avec les souches E543 et O211.

Résultats et discussions

La souche E141, a révélé une diminution visible de la croissance de toutes les espèces fongiques par un pourcentage moyen de 56%, par contre l'effet inhibiteur de la souche E543 issue était seulement de 11%.

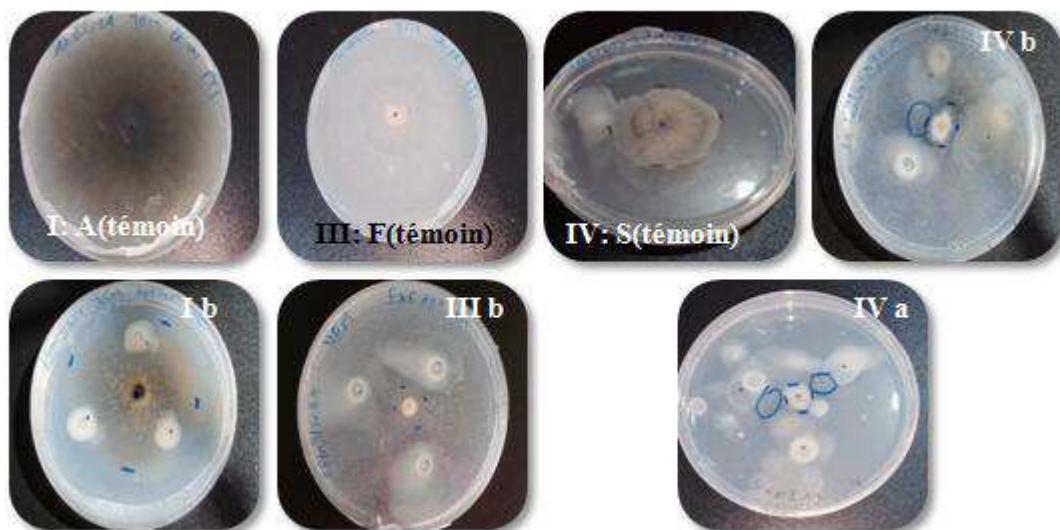


Photo 6 : Résultats de confrontation directe par disques : I) A témoin ; Ib) A vs E141 ; III) F témoin ; IIIb) F vs E141 ; IV) S témoin ; IVa) S vs O211 ; IVb) S vs E141.

La différence entre les pourcentages d'inhibitions de nos souches suggère que le mode d'action et/ou le type de métabolite produit par les isolats peut varier.

Les résultats montrent que pour les souches les plus performantes, la zone d'inhibition est tellement grande qu'il n'y a pas eu de contact physique avec le pathogène concluant que la bactérie produit des métabolites antifongique, comme décrit par Montealegre et *al.* (2003).

La comparaison de nos résultats avec ceux de la bibliographie nous a été un peu difficile à faire, à cause du manque de travaux traitant la luzerne d'un coté, et les résultats contrastés trouvés de l'autre coté. Pour l'*Alternaria sp.*, nos résultats ont montré que seule la souche E141 était inhibitrice, ce qui concorde avec ceux de Lakhali et *al.* (2009) ayant constaté une inhibition par certaines souches seulement. Même constat pour *Fusarium sp.*, où Arfaoui et *al.* (2006) ont montré que seulement quelques souches de rhizobium ont réduit significativement sa croissance.

Résultats et discussions

III.1.2.3 Types d'inhibition

Après 7 jours d'incubation, des résultats partiels ont été obtenus après confrontations entre les souches fongiques et les zones d'inhibitions obtenues des deux tests précédents. Ces derniers ont montré que la croissance mycélienne des souches témoins est plus importante que celle obtenue après confrontations (voir photo 7 et figure 7).

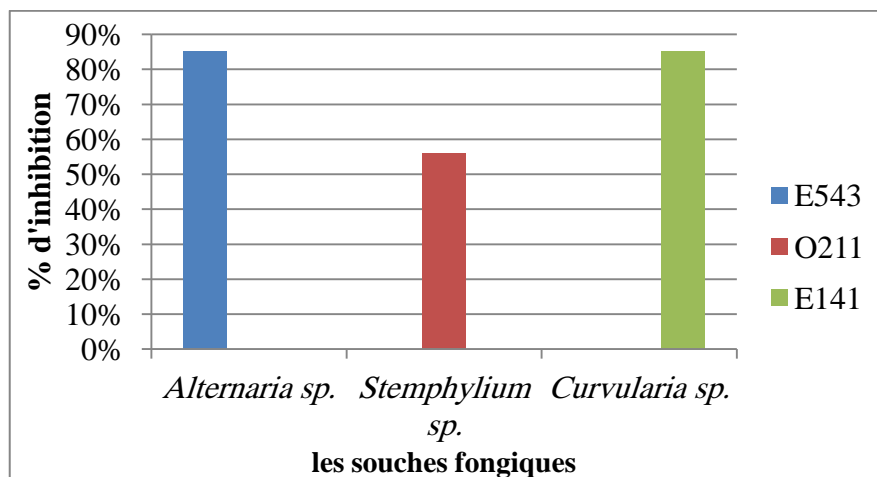


Figure 7: Inhibition induite par les souches rhizobiennes contre les agents phytopathogènes.

Nous avons remarqué que les souches testées à enregistré la meilleur zone d'inhibition entre *Alternaria sp.* vis à vis la souche E543 (85,22%), *Curvularia sp.* (85,25%) vis-à-vis la souche E141. Pour *Stemphylium sp.* vis à vis la souche O211 on réaliser un taux d'inhibition (55,84%).

Une zone d'inhibition très claire à été observée entre l'agent phytopathogène et l'antagoniste, cela pourrait être causé par des antibiotiques produits par ces provoquant l'inhibition de la croissance mycélienne, décrire par Bentiz et *al.* (2004) ; Haggag et Mohamed (2007).

Selon Augustin et *al.* (2005) ; Hacene et *al.* (2000), le diamètre de la zone d'inhibition peut varier en fonction du milieu du culture et de la température d'incubation.

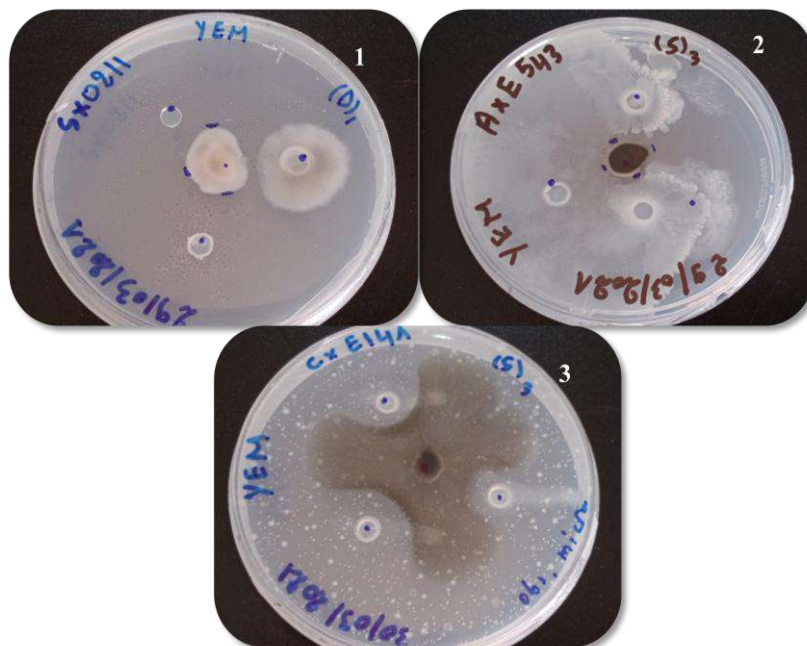


Photo 7: Résultats de l'étude des zones d'inhibition : 1) S vs O211 ; 2) A vs E543 ; 3) C vs E141.

Après incubation, les souches sélectionnées ont montré une bonne activité inhibitrice vis à vis des souches pathogènes testés et ce par l'apparition d'une zone d'inhibition suivie par un arrêt de croissance pour la plus part des souches pathogènes testées. Nous constatons qu'il y a une variabilité de diamètre des zones d'inhibitions, cette variation dépend des espèces antagonistes utilisés et aussi des agents fongique étudiés.

Plusieurs chercheurs ont analysé microscopiquement la zone de contact entre l'agent pathogène et l'antagoniste pendant le test d'antagonisme par confrontation directe. L'action d'antibiose se manifeste par l'injection des substances (enzymes ou antibiotiques) qui détruisent le mycélium du pathogène (Daami-Remadi et El Mahjoub, 2001; Howell, 2003; Fang et *al.*, 2005 ; St-Leger et Wang, 2010; Sandhu et *al.*, 2012).

III.2. Méthodes de confrontation indirecte

La compartimentation évite le contact entre le milieu de culture supportant le rhizobium et le milieu de culture sur la quel se trouve le champignon, empêchant ainsi la diffusion des substances dans le milieu de culture. Seule une substance volatile produite

Résultats et discussions

par la bactérie pourra dans cet essai provoquer une inhibition de la croissance du champignon. Les résultats obtenus dans cette expérience sont présentés dans la photo (8) et la figure (8).

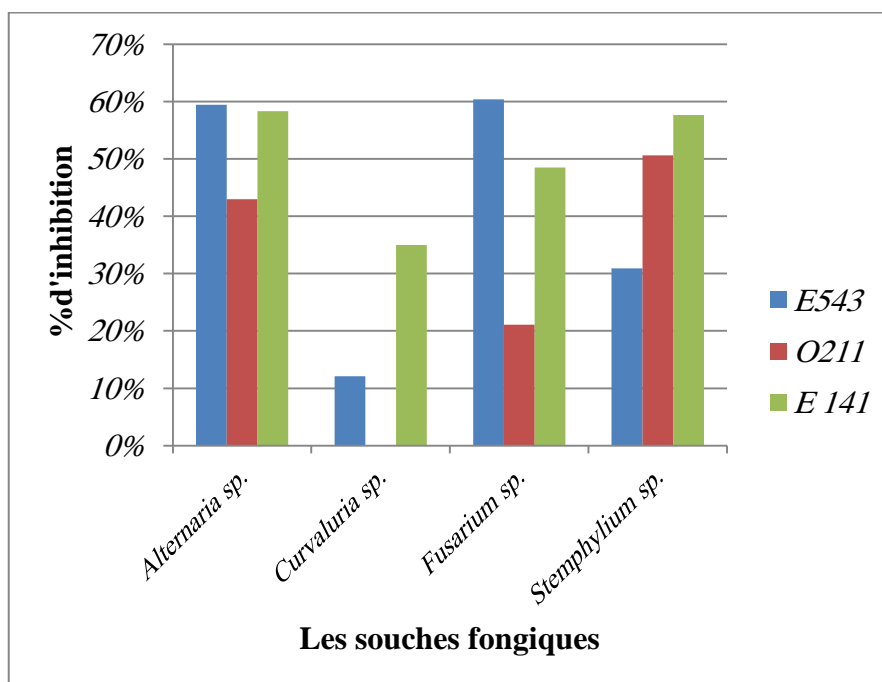


Figure 8 : Histogramme représentant les pourcentages d'inhibition de la croissance mycélienne en confrontation indirecte avec les rhizobiennes antagonistes.

D'après les résultats obtenus, on constate que malgré l'absence d'un contact direct entre les champignons testés et les souches bactériennes, certaines de ces dernières ont pu exercer une activité inhibitrice sur le développement des colonies des champignons.

Ceci s'expliquerait par la capacité de ces antagonistes à produire des substances volatiles qui sont capables de limiter et même de stopper la croissance des champignons.

Les tests indirects ont révélé que toutes les souches testées présentent un effet antagoniste contre les quatre champignons phytopathogènes utilisés à l'exception de O211 qui ne présente aucune activité antifongique contre *Curvularia sp.*

Les plus importants pourcentages d'inhibition de la croissance mycélienne des quatre champignons ont été obtenus avec la souche E141 et atteignent les valeurs de 58.33 % pour *Alternaria sp.*, 35 % pour *Curvularia sp.*, 48.53 % pour *Fusarium sp.* et 57.66 % pour *Stemphylium sp.*

Résultats et discussions

Les souches E543 et E141, présentent un pouvoir d'inhibition important vis-à-vis trois champignons : *Alternaria sp.*, *Fusarium sp.* et *Stemphylium sp.*, avec un taux d'inhibition variant entre 30% et 60%, et un pouvoir d'inhibition faible d'environ 12,09% vis-à-vis *Curvularia sp.*

Cependant la souche O211 inhibe la croissance d'un trois champignon (*Alternaria sp.*, *Fusarium sp.* et *Stemphylium sp.*), avec un taux d'inhibition de 21% et 50 %.

Certaines souches présentent une efficacité plus spécifique, par exemple la souche E543 provoque une inhibition plus importante de 60% sur la croissance de *Fusarium sp.* et une inhibition très faible sur *Curvularia sp.* qui est de 12%.

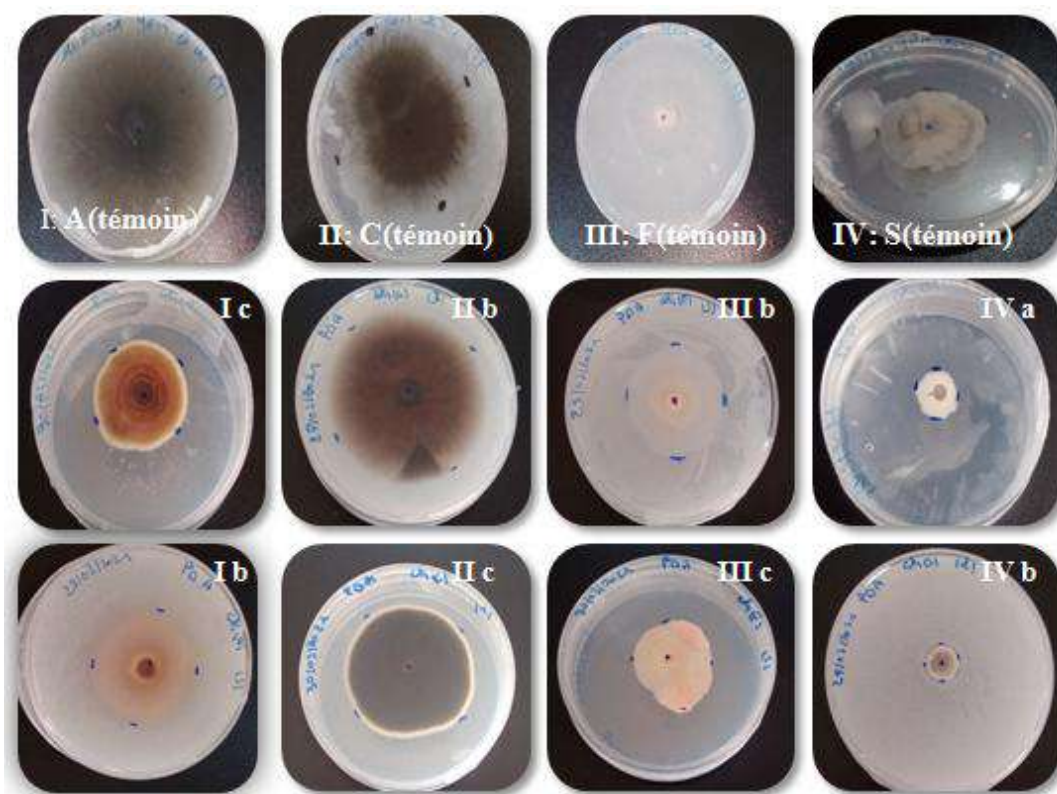


Photo 8 : Résultats de confrontation indirecte: I) A témoin ; Ib) A vs E141 ; Ic) A vs E543 ; II) C témoin ; IIb) C vs E141 ; IIc) C vs E543 ; III) F témoin ; IIIb) F vs E141 ; IIIc) F vs E543 ; IV) S témoin ; IVa) S vs O211 ; IVb) S vs E141.

Selon Moore-Landecker et Stotzky. (1972), certaines bactéries produisent des substances antibiotiques volatiles qui inhibent fortement la croissance et la sporulation de plusieurs champignons phytopathogènes.

Résultats et discussions

Les taux d'inhibition varient selon les études effectuées. D'ailleurs, nos résultats ne concordent pas avec ceux de Bordeleau et *al.* (1977) qui montrés que le pourcentage d'inhibition de *Fusarium sp.* est de 7%. Les différences d'intensité du pouvoir inhibiteur de nos souches pourraient être liées à la nature et la quantité de substances sécrétées.

III.3. Observation microscopique

Les résultats de l'observation microscopiques de la confrontation direct et indirect (à l'état frais / après coloration par rouge Congo) entre les agents phytopathogènes et les souches rhizobiennes (Gx 40) sont montrés dans les photos suivantes (9 et 10)

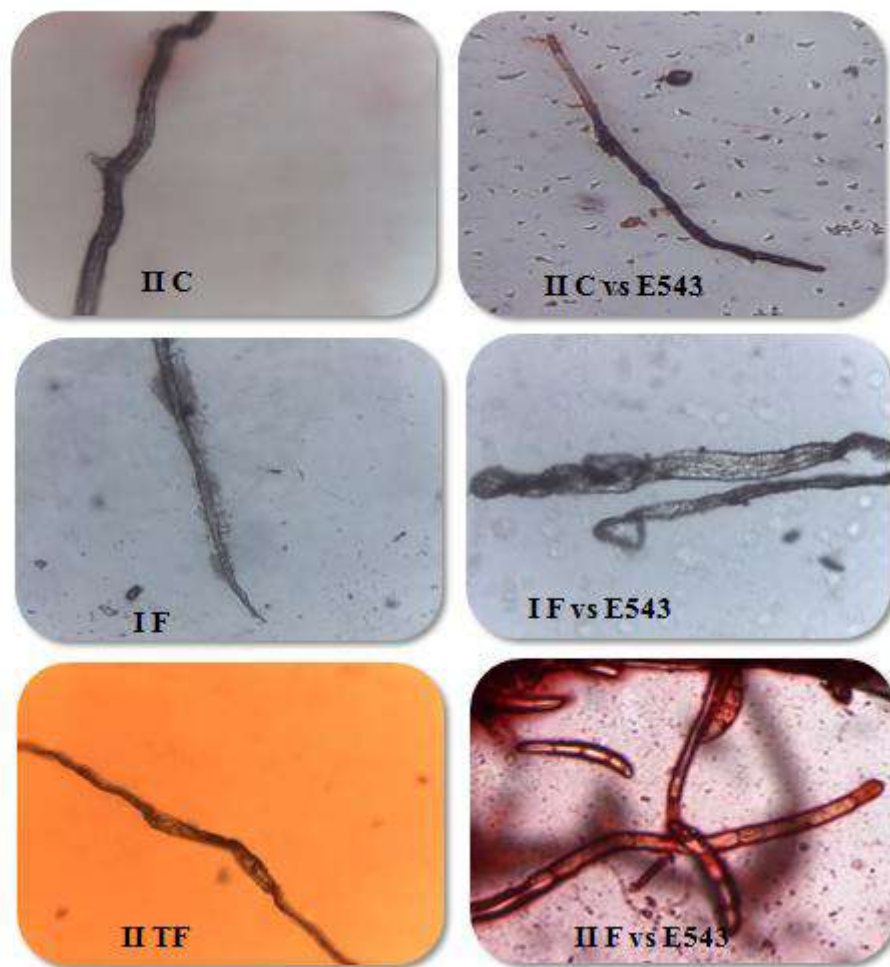


Photo 9 : Résultats de confrontation direct par stries :I) à l'état frais; IF) F témoin; I F) F vs E543.

II) après la coloration par rouge Congo : IIC) C témoin; II C) C vs E543; II F) F témoin; II F) F vs E543.

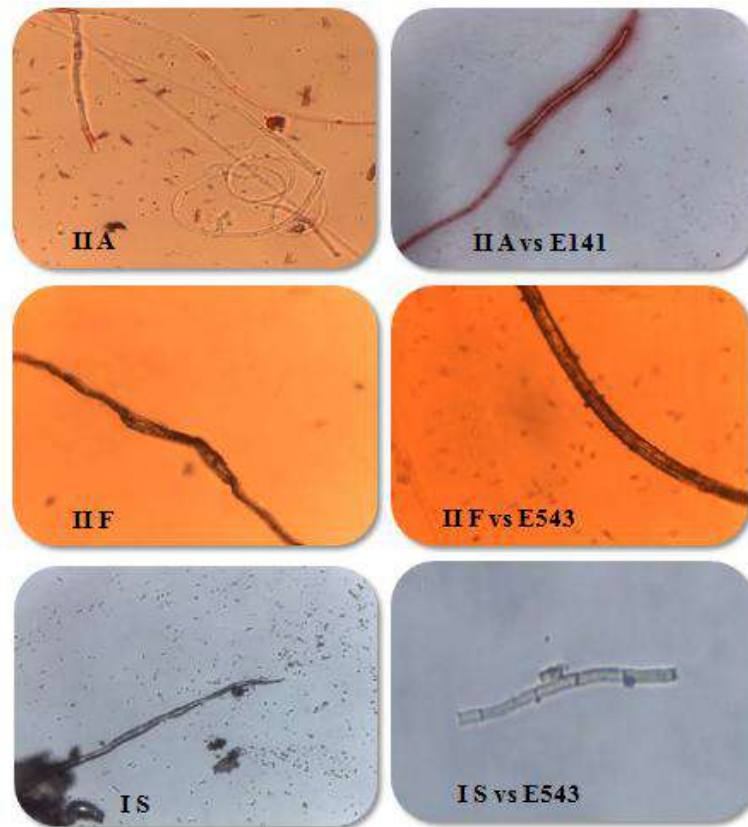


Photo 10 : Résultats de confrontation direct par disques :I) à l'état frais; IS) S témoin; I S) S vs E543.

II) après la coloration par rouge Congo : IIA) A témoin; II A) A vs E141; II F) F témoin; II F) F vs E543.

L'observation microscopique est par comparaison au témoin montre plusieurs différences apparaissent dans :

- les diamètres de mycélium : confrontation par stries (IIC avec C vs E 543).

Par disques (IIF avec F vs E543).

- les tailles de mycélium : Par stries (IF avec F vs E543).

Par disques (IS avec S vs E543).

- le nombre de mycélium : Par stries (IIF avec F vs E543).

Par disques (IIA avec A vs E141)

Conclusion et perspectives

Conclusion et perspectives

Les travaux présentés dans la mémoire visaient l'étude d'une stratégie de lutte biologique envers les champignons phytopathogènes isolés de la luzerne infectée par certaines bactéries rhizobiennes. A cet effet, trois souches de rhizobia ont été testées sur quatre souches de champignons. En effet, la suppression des espèces fongiques a varié selon les souches de rhizobia qui présentaient des degrés d'inhibition différents.

La souche rhizobienne E141 a montré la plus importante capacité d'inhibition, elle a inhibé plus de 75% des espèces fongiques contre *Fusarium sp.* *Stemphylium sp.* et *Alternaria sp.* Avec un taux allant de 38 à 78%.

La production de substances antifongiques telles que les protéases, ainsi que celle des sidérophores peuvent être à l'origine de ce pouvoir de suppression des champignons qui infectent la plante.

Le contrôle biologique des plantes par les microorganismes est une alternative très prometteuse à l'utilisation prolongée de pesticides, qui sont souvent coûteux, s'accumulent dans les plantes, et ayant des effets néfastes sur l'environnement.

Nous estimons que les résultats auxquels nous sommes parvenus restent partiels et méritent d'être poursuivis et beaucoup restent à faire:

- L'application de ces tests d'antagonisme sur d'autres agents phytopathogènes et même les réaliser *in vivo*.
- Purifier et identifier la nature chimique des métabolites secrétés à partir les zones d'inhibition.

Références bibliographiques

Références bibliographiques

- **Aghighi. S., Shahidi Boujar G. H. , Rawashdeh R ., Batayneh S., Saadoun I., 2004.**First report of antifungal spectra of activity of Iranian actinomycetes strains against *Alternaria salani*, *Alternaria alternate*, *Fusarium solani*, *Phytophthora negasperma*, *Verticillium dahlia* and *Saccharomyces cerevisiae*. Asian Journal of Plant Sciences. 4, 463-471.ISSN 1682-3974.
- **Ahmed Idris, H., Labuschagne, N., Korsten, N. 2007.** Screening rhizobacteria for biological control of *Fusarium* root and crown rot of sorghum in Ethiopia.Biological control, 40, pp.77-106.
- **Antoun. H ., et al., 1978.** Actinomycètes antagonistes des champignons et n'affectant pas le *Rhizobium mililoti*. Volume 24, No 5, May1978.
- **Arfaoui, A., Sifi B., Boudabous A., El Hadrami I. and Chérif M. (2006)** Identification of Rhizobium Isolates Possessing Antagonistic Activity against *Fusarium oxysporum f.sp. ciceris*, the causal agent of fusarium wilt of chickpea Journal of Plant Pathology, 88 (1), 67-75.
- **Augustin S. K., Bhavsar S., et al., 2005.**Production of a growth dependent metabolite active against dermatophytes by *Streptomyces rochi* AY,39. Indien J.Med.Rrs., 121(3): 164-170.
- **Azani N, Babineau M, Bailey CD, Banks H, Barbosa AR, Pinto RB, Boatwright JS, Borges LM, Brown GK, Bruneau A, et al. 2017.** A new subfamily classification of the *Leguminosae* based on a taxonomically comprehensive phylogeny The Legume Phylogeny Working Group (LPWG). *Taxon* 66: 44–77.
- **Azib. S., 2020.** La symbiose rhizobium-luzerne : étude de la diversité rhizobienne et essais d'inoculation en vue d'améliorer les rendements en fourrage dans le Sahara septentrional est-algérien. DOCTORAT ès SCIENCES, Spécialité : Ecologie Saharienne et Environnement. Université Kasdi-Merbah Ouargla.
- **Benítez T., Rincón A. M., Limón M. C. and Codón A. C. (2004).** Biocontrol mechanisms of *Trichoderma strains*. Int. Microbiol. 7, 249-260.
- **Bezert G., Chappe P., Mourey A et Loubinoux B. (1996).** Action de Bacillus et d'Actinomycètes sur les champignons de bleuissement du bois. Bulletin des Académie et Société Lorraines des Sciences. 35 (3): 177-190.

Références bibliographiques

- **Bordeleau. L. M., et al., 1977.** Effet des substances volatiles produites par rhizobium sur la croissance radiales de quelques champignons phytopathogènes. Volume 58. No 2 et 3, P 92-95.

- **Bounoua M. D. (2008).** Essais d'utilisation des *Pseudomonas sp* et *Bacillus sp*. Dans le biocontrôle de *Fusarium oxysporum F.sp. lycopersici* sur tomate et *verticillimdahliae* sur l'olivier. Thèse de Magister. Biotechnologie. Université d'Oran. Algérie.

- **Chakraborty. Uand. Chakraborty. B. N (2006):** Interaction of Rhizobium leguminosarum and Fusarium solani f.sp. pisi on pea affecting disease development and phytoalexin production. PP. 120-123.

- **F. Boughachiche. 2012.** Étude de molécules antibiotiques secrétées par des souches appartenant au genre *Streptomyces*, isolées de Sebkha. Université Mentouri-Constantine ,79-92p.

- **Fossou, Kouakou Romain. 2001.** Diversité génétique des rhizobia associés à un champ de pois d'angole (*CajanuscajanL*).Diplôméd'Agronomie Approfondie (DAA) en Agronomie et Productions Végétales. Ecole Supérieure d'Agronomie (ESA) de l'institut national polytechnique Félix HouphouëtBiogny de Yamoussoukuro.Centre de la cote d'Ivoire.

- **Hacene H., Daoudi-Hamdad F., et al., 2000.** H107 a new aminoglycoside *anti-Pseudomonas* antibiotic produced by a new strain of *Spirillospora* Microbios., 102(402):69-77.

- **Haggag, M. W., (2007)** Colonization of exopolysaccharide producing *Paenibacillus polymyxa* on *peanut* roots for enhancing resistance against crown rot disease. Afr. J. Biotech. 6:13 1568-1577.

- **Howell C. R., 2003.** Mechanisms employed by *Trichoderma species* in the biological control of plant diseases: the history and evolution of current concepts. Plant Diseases, 87: 4–10.

- **Isleib J. Michigan State University Extension, (2011).** A closer look at leaf diseases of alfalfa.

Références bibliographiques

- **Kanouni. L., 2019.** Inhibition des champignons phytopathogènes phytopathogènes par *Rhizobium*. Doctorat 3^{ème} cycle de Microbiologie. Université Ferhat Abbas -Sétif 1.
- **Kgatle M. G., Flett B., Truter M. et Aveling, T. A. S. (2020).** Control of *Alternaria leaf* blight caused by *Alternaria alternata* on sunflower using fungicides and *Bacillus amylolique faciens*. Crop Protection, 132, 105146.
- **Lakhal A., Bensoltane A. and Atik F. (2009):** Antimicrobial activity on phytopathogenic fungi by *Rhizobium* strains isolated from nodules on *Vicia faba* roots in west of Algeria. Egypt J. of Appl Sc 24 (10B): 432-446
- **Lepoivre P. (2003).** Phytopathologie : Bases moléculaires et biologiques des pathosystèmes et fondements des stratégies de lutte. Les presses agronomiques de Gembloux, 1^{ère} Ed ; Editions De Boeck Université, Bruxelles.
- **Leslie J. F. et Summerell B. A. (2006).** Techniques for Growing and Maintaining *Fusarium*. The *Fusarium* Laboratory Manual, 21-30.
- **Moenne-locoz ., Powell J., Higgins P., McCarthy J., O’Gara F. (1998).** An investigation of the impact of biocontro *Pseudomonas fluorescens* F113 on the growth of sugar beet and the performance of subsequent clover- *Rhizobium* symbiosis. Applied Soil Ecology. 7:225-237.
- **Montealegre, J. R, Reyes, R., Perez, 2. M., Herrera, R., Silva, P., Besoain, X. 2003.** Selection of bioantagonistic bacteria to be used in biological control of *Rhizoctonia solani* in tomato, Electronic Journal of Biotechnology, 6(2), PP.115-127.
- **Moore-Landecker E et Stotzky G. (1972).** Inhibition of fungal growth and sporulation by volatile metabolites from bacteria. Canadian Jornal of Microbiology. 18: 957- 962.
- **Mutluru Sridevi et Konada V. Mallaian., 2008.** Factors effectinase activity of *Rhizobium sp* from *Sesbania sesban*, June 2008 .Biologia 63(3):307-312.
- **Orloff S. (1996).** Intermountain Alfalfa Management. Agriculture & Natural Resources.
- **Rajaonarimany, Elinarindra., 2010.**Influence de la diversité mycorhizienne sur la symbiose *Dalbergia trichocarpa*–rhizobia et sur structure de la microflore tellurique. Mémoire de diplôme d’étude approfondie en sciences de la vie Université d’Antananarivo.p99.

Références bibliographiques

- **Suty L., 2010.** La lutte biologique: Vers de nouveaux équilibres écologiques. Eds Quae, 323 p.

- **The Angiosperm Phylogeny Group. 2009.** An update of the Angiosperm Phylogeny Group classification for the orders and families of flowering plants: APG III. *Botanical Journal of the Linnean Society* 161: 105–121.

- **Trivedi, P., Pandey, A., Palmi, L. M. S. 2006.** *In vitro* evaluation of antagonistic properties of *Pseudomonas corrugates*. *Microbiological Research*, Doi: 10.1016/j.micres.2006.06.07.

- **Vincent J M., 1970:** A Manual for the Practical Study of Root Nodule Bacteria. Oxford: Blackwell Scientific.

- **Wakford, Tom. 2004.** Aux origines de la vie : Quand l'homme et le microbe s'appriivoisent. Editions de Boeck Université. Bruxelles. ISSN: 1378-4080.

- **Williams, G. E., Asher, M. J. C. 1996.** Selection of rhizobacteria for the control of *Pythium ultimum* and *Aphanomyces cochlioides* on sugar-beet seedlings. *Crop Prot.*, 15, pp. 479-486.

- **Zhang W., Liu J., Huo P. et Huang Z. (2017).** *Curvularia malina* causes a foliar disease on hybrid Bermuda grass in China. *European Journal of Plant Pathology*, 151(2), 557-562.

Annexes

Annexes

Annexe 1 : milieu de culture PDA

PDA (Potato Dextrose Agar)

PDA 40 g

Eau distillée 1000ml

PH = 5,4

Annexe 2: milieu de culture YMA

YMA (Yeast Mannitol Agar)

Mannitol 10 g

K₂HPO₄ 0,5g

Mg SO₄ 7H₂O 0,2 g

NaCl 0,1 g

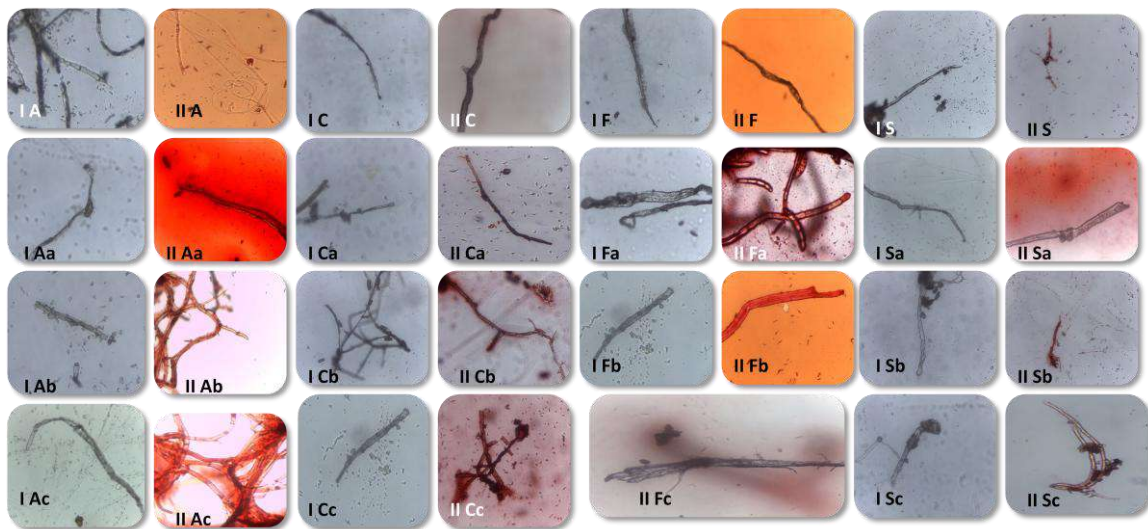
Extrait de levure 0,5 g

Eau distillée 1000 ml

Agar 15g

PH = 7,0

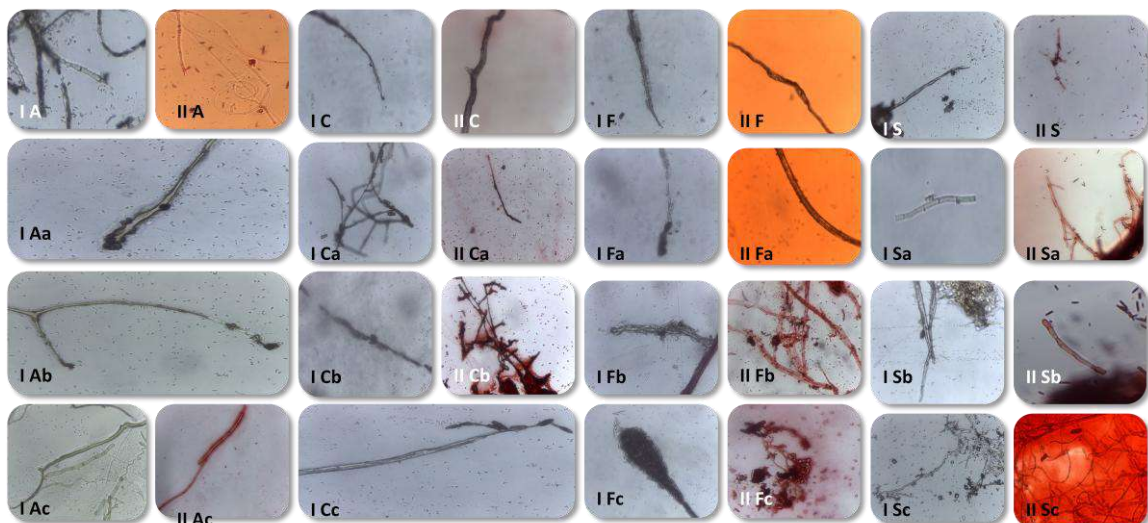
Annexe 3: Résultats de confrontation directe par stries



I) à l'état frais; IA) A témoin; I Aa) A vs E543; I Ab) A vs O211; I Ac) A vs E141; IC) C témoin; I Ca) C vs E543; I Cb) A vs O211; I Cc) A vs E141; IF) F témoin; I Fa) F vs E543; I Fb) F vs O211; IS) S témoin; I Sa) S vs E543; I Sb) S vs O211; I Sc) S vs E141.

II) après la coloration par rouge Congo : IIA) A témoin; II Aa) A vs E543; II Ab) A vs O211; II Ac) A vs E141; IIC) C témoin; II Ca) C vs E543; II Cb) A vs O211; II Cc) A vs E141; II F) F témoin; II Fa) F vs E543; II Fb) F vs O211; II Fc) F vs E141; IIS) S témoin; II Sa) S vs E543; II Sb) S vs O211; II Sc) S vs E141.

Annexe 4: Résultats de confrontation directe par disques



Annexes

I) à l'état frais; IA) A témoin; IAa) A vs E543; I Ab) A vs O211; I Ac) A vs E141; IC) C témoin; ICa) C vs E543; I Cb) A vs O211; I Cc) A vs E141; IF) F témoin; IFa) F vs E543; IFb) F vs O211; I Fc) F vs E141; IS) S témoin; ISa) S vs E543; I Sb) S vs O211; I Sc) S vs E141.

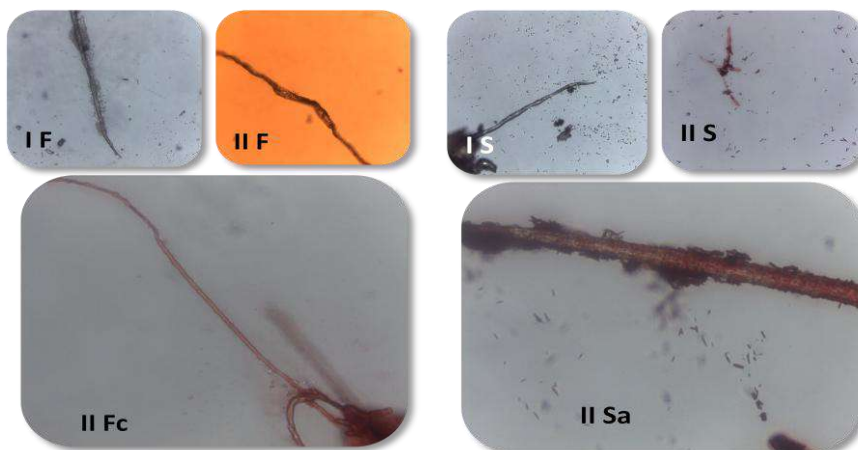
II) après la coloration par rouge Congo : IIA) A témoin; II Ac) A vs E141; IIC) C témoin; II Ca) C vs E543; II Cb) A vs O211; II F) F témoin; II Fa) F vs E543; II Fb) F vs O211; II Fc) F vs E141; IIS) S témoin; II Sa) S vs E543; II Sb) S vs O211; II Sc) S vs E141.

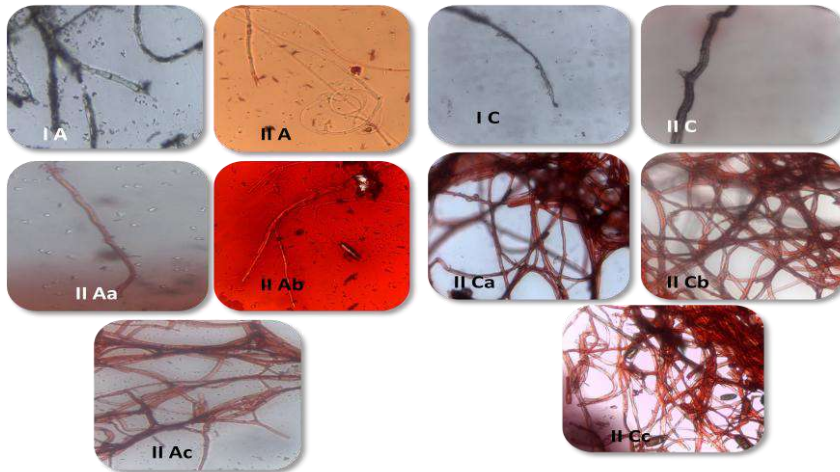
Annexe 5: Résultats d'étude les types d'inhibitions



1) C vs E141; 2) A vs E543; 3) S vs O211

Annexe 6: Résultats de confrontation indirecte





I) à l'état frais ; IA) A témoin ; IC) C témoin ; IF) F témoin ; IS) S témoin.

II) après la coloration par rouge Congo : IIA) A témoin ; II Aa) A vs E543 ; II Ab) A vs O211 ; II Ac) A vs E141 ; IIC) C témoin ; II Ca) C vs E543 ; II Cb) A vs O211 ; II Cc) A vs E141 ; II F) F témoin ; II Fc) F vs E141 ; IIS) S témoin ; II Sa) S vs E543.

Etude *in vitro* de l'antagonisme de quelques champignons phytopathogènes de la luzerne (*Medicago sativa* L.) par les bactéries rhizobiennes

Résumé

Cette étude a été réalisée pour évaluer l'effet antagoniste de trois rhizobiums symbiotiques de la luzerne (E543, E141 et O211), isolés et caractérisés des sols sahariens et de quatre souches des champignons phytopathogènes (*Fusarium sp.*, *Curvularia sp.*, *Alternaria sp.* et *Stemphylium sp.*) isolés de la même plante.

Les résultats ont démontré l'efficacité des isolats de rhizobiennes et les isolats fongiques *in vitro*. La plupart des rhizobia inhibaient la croissance mycélienne des agents pathogènes. Le meilleur contrôle de la maladie a été obtenu avec l'isolat E141 qui a inhibé plus de 75% des espèces fongiques, suivie par E543 et O211 respectivement. La plus forte inhibition fongique a été obtenue contre *Fusarium sp.*, *Stemphylium sp.* et *Alternaria sp.* Avec un taux allant de 38 à 78%.

Les mots clés: rhizobia, antagonisme *in vitro*, maladies fongiques, région saharienne.

In vitro study of the antagonism of some phytopathogenic fungi of alfalfa (*Medicago sativa* L.) by rhizobial bacteria

Abstract

This study was carried out to evaluate the antagonistic effect of three symbiotic rhizobia of alfalfa (E543, E141 and O211), isolated and characterized from Saharan soils and of four strains of phytopathogenic fungi (*Fusarium sp.*, *Curvularia sp.*, *Alternaria sp.* and *Stemphylium sp.*) isolated from the same plant.

The results demonstrated the efficacy of rhizobial isolates and fungal isolates *in vitro*. Most rhizobia inhibited the mycelial growth of pathogens. The best disease control was obtained with the E141 isolate which inhibited more than 75% of the fungal species, followed by E543 and O211 respectively. The strongest fungal inhibition was obtained against *Fusarium sp.*, *Stemphylium sp.* and *Alternaria sp.* With a rate ranging from 38 to 78%.

The key words: rhizobia, *in vitro* antagonism, fungal diseases, Saharan region.

الدراسة في المختبر لتضاد بعض الفطريات الممرضة لنبات البرسيم (*Medicago sativa* L.) بواسطة البكتيريا الجذرية

المخلص

أجريت هذه الدراسة لتقييم التأثير المضاد لثلاثة أنواع من البكتيريا القادرة على تثبيت الآزوت على مستوى العقيدات المتواجدة في جذور نبات البرسيم (E543، E141 و O211)، معزولة من التربة الصحراوية، وأربع سلالات من الفطريات الممرضة للنبات (*Fusarium sp.*، *Curvularia sp.*، *Alternaria sp.* و *Stemphylium sp.*) من نفس النبات.

أظهرت النتائج فاعلية عزلات البكتيريا والفطريات في المختبر. معظم هذه البكتيريا (rhizobium) تمنع نمو الفطريات المسببات الأمراض. تم الحصول على أفضل مقاومة للمرض باستخدام العزلة E141 التي تثبت أكثر من 75% من الأنواع الفطرية، تليها E543 و O211 على التوالي. تم الحصول على أقوى تثبيط فطري ضد *Fusarium sp.*، *Stemphylium sp.* و *Alternaria sp.* بنسبة تتراوح من 38 إلى 78%.

الكلمات المفتاحية: ريزوبيا، عداوة، أمراض فطرية، صحراء