



République Algérienne Démocratique et Populaire

Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique

Université Constantine 1

Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie

Département de Microbiologie

en collaboration avec l'Université de Liège (Belgique)

**Thèse en vue de l'obtention du diplôme de Doctorat troisième cycle
en Biotechnologie, Biologie et Environnement/Option: Bioprocédés et
Biotechnologie, Applications Mycologiques**

Intitulé :

**Recherche de nouvelles potentialités de bactéries du genre *Bacillus* pour
l'agriculture et l'agroalimentaire**

Présentée par : **Asma AIT KAKI**

Devant le jury :

Président : **Pr. A. Boulahrouf**

Université Constantine 1 (Algérie)

Codirecteurs de thèse :

Pr. N. Kacem Chaouche

Université Constantine 1 (Algérie)

Pr. Ph. Thonart

Université de Liège (Belgique)

Examineurs :

Pr. A. Guechi

Université Setif (Algérie)

Pr. A. Zitouni

E.N.S (Kouba-Algérie)

Pr. F. Delvigne

Université de Liège (Belgique)

Année universitaire 2013-2014

REMERCIEMENTS

Le présent travail est le fruit d'une longue chaîne de sacrifices, de courages et de privations. Il n'aurait pas abouti sans le concours de nombreuses personnes qui de près ou de loin ont contribué à sa réalisation. C'est avec une profonde gratitude que je les remercie...

Je tiens particulièrement à exprimer mes sincères remerciements aux Professeurs Philippe Thonart et Nouredine Kacem Chaouche, Promoteurs et initiateurs de cette thèse et qui m'ont donné l'opportunité de me lancer dans cette aventure qu'est la recherche. Merci pour votre aide, patience, compréhension, soutien et précieux conseils qui m'ont permis d'évoluer dans la réalisation de cette thèse...

Un grand merci à toute l'équipe du laboratoire de Mycologie, Biotechnologie et de l'Activité Antimicrobienne (LAMYBAM) : Mounira, Mounia, Asma, Insaf, Hajer, Sara et Imene.... Pour leur collaboration et serviabilité qu'elles m'ont témoignées durant ces dernières années. Merci Mounia de m'avoir appris les techniques de base de microbiologie. Mounira et Asma, je vous remercie énormément pour votre collaboration dans le travail au champ, merci pour m'avoir aidé à planter le pois chiche et à l'arroser régulièrement lors de mes absences répétées. Merci beaucoup mes très chères amies...

Un Grand merci également à toute l'équipe du Centre Wallon de Biologie Industrielle (CWBI) qui m'a appris et initié à la réalisation des manipulations de laboratoire dans les différents domaines de microbiologie, chimie analytique et biologie moléculaire... Merci Sabri, Alina, Wissal, Alaa, Cristoph, Julien, Chi, Gérémi et Manu ...

Un remerciement spécial à Gérémi, Laurent et Florent pour m'avoir appris à manipuler les bioréacteurs de l'usine « Artechno- Liège», pour produire les spores de Bacillus. Merci beaucoup chers collègues pour votre patience et aide permanente. Malgré mon insistance pour réexpliquer des

détails techniques de manipulation du bioréacteur et mes questions répétitives sur le fonctionnement des machines, vous étiez toujours patient pour me répondre et pour réparer les panes qui survenaient à chaque fois (que je provoquais de temps à autre **J**) ...

Ma profonde reconnaissance aux Dr Ahmed Sabri, Dr Taha Hosni et Dr Emmanuel Jourdan qui ont consacré beaucoup de leurs temps pour me transmettre leurs connaissances dans le domaine des « Bacillus », ce qui m'a énormément aidé à réorienter mes recherches...

Une profonde reconnaissance aussi au Dr Nicolas Smargiasso qui a beaucoup contribué à la partie d'identification de nouvelles variantes de fengycines... Merci pour tous les efforts que tu as fournis pour m'apprendre à interpréter les spectres de masses et pour me corriger l'article que j'ai rédigé sur cette partie... C'est un grand plaisir de collaborer avec des scientifiques comme toi...

Merci encore chère Alina pour m'avoir corrigé l'anglais du texte de mes articles...

Merci aussi chère Cécile pour ta disponibilité permanente, à chaque fois que j'ai besoin de commander des produits et pour m'aider à trouver un logement pour des courtes durées lors de mes séjours en Belgique... merci beaucoup tu as toujours été serviable...

Je n'arrive pas à trouver de mots suffisamment forts pour exprimer la reconnaissance que j'ai à l'égard du Dr Nassim Moula que ce soit sur le plan professionnel ou personnel. Nassim, merci pour ton soutien permanent, ta présence précieuse aux moments durs que j'ai vécu en Belgique. Merci pour m'avoir donné l'opportunité de collaborer avec toi dans plusieurs travaux de recherche qui m'ont permis d'explorer le domaine de la qualité des aliments. Merci aussi de m'avoir transmis ta passion pour l'économie et la sociologie en menant avec moi plusieurs discussions dans ce domaine et m'offrant les livres « la cité de la joie » et « Repenser la pauvreté ». J'espère continuer à explorer avec toi de nouveaux domaines...

Je voudrais aussi exprimer ma profonde reconnaissance à mes amis de Belgique avec lesquels j'ai passé de très bon moments : Yasmine, Wissal, Alaa, Diana, Basma, Wafa, Fadwa et les petits Mimou, Sami et Yara...Merci pour vos prières, votre disponibilité et vos aides.

Je remercie le programme Averroès qui m'a octroyé une bourse de recherche, me permettant ainsi de consacrer tous mon temps à réaliser tranquillement mon travail de recherche...

Il est à noter que le travail exposé dans cette thèse a été réalisé en co-tutelle entre l'université Mentouri 1 de Constantine (Algérie) et l'université de Liège (Belgique).

Merci enfin à tous ceux que j'aurais oublié de citer ici et qui normalement le mériteraient...

Cette thèse est dédiée à

mes parent qui ont fait de moi ce que je suis,

mon cher Sofiane,

mes adorables frères Bilal et Mohamed Nacer et leurs femmes,

mes âmes sœurs Houda et Manel,

tous mes cousins et cousines que j'aime,

tous les membres de ma famille qui méritent être aimés

et à tous mes amis pour avoir rendu mon quotidien récréatif et passionnant

Table des matières

Résumé.....	
Abstract.....	
Liste des abréviations.....	
1-Introduction générale.....	1
2-Revue Bibliographique	3
2.1- Aperçu sur l’agriculture dans le monde: Bref historique.....	3
2.2- Dangers de l’emploi intensif des pesticides à usage agricole.....	5
2.2.1- Dangers liés à la santé humaine.....	5
2.2.2- Effet des pesticides sur la biodiversité	6
2.3- Gestion des problèmes liés aux pesticides.....	7
2.3.1- Conventions et codes du droit international à l’environnement.....	7
2.3.2- Législations régissant les pesticides	8
2.3.2.1- L’union Européenne	8
2.3.2.1- L’Algérie	9
2.4- De la lutte chimique à la production intégrée.....	10
2.5 - Maladies des plantes.....	11
2.5.1- Définition.....	11
2.5.2- Pathologies fongiques des plantes.....	12
2.5.3- Principaux symptômes de maladies fongiques.....	13
2.5.3.1- Dépérissement.....	13
2.5.3.2- Flétrissement.....	13
2.5.3.3- Nécrose, macération et pourriture.....	14
2.5.3.4- Taches	15
2.6- Interactions plantes- pathogènes.....	15
2.7- Biopesticides et alimentation bio.....	18
2.7.1- Les biopesticides.....	18
2.7.1.1-Définition et classification.....	18
2.7.1.2- Marché des biopesticides.....	19
2.7.1.3- Les biopesticides à base de <i>Bacillus</i>	20
2.7.1.4- Avantages et inconvénients des biopesticides microbiens.....	23
2.7.1.5- Utilisation efficace des biopesticides.....	24

2.7.2- Bref aperçu sur l'alimentation biologique.....	25
2.8- Les lipopeptides: Structure, classification et rôles dans le phénomène du biocontrôle.....	29
2.8.1-Structure des lipopeptides.....	29
2.8.2- Rôles des lipopeptides liés au biocontrôle.....	31
2.8.2.1- Colonisation des racines des plantes.....	31
2.8.2.2- Antagonisme.....	32
2.8.2.3- Induction du système de défense des plantes.....	33
3- Matériel et méthodes	34
3.1- Échantillonnage.....	34
3.2- Analyses physicochimiques des échantillons prélevés.....	34
3.3- Isolement des bactéries du genre <i>Bacillus</i>	34
3.4- Sélection de souches antifongiques.....	35
3.5- Identification des souches de <i>Bacillus</i> sélectionnées.....	35
3.5.1- Extraction de l'ADN.....	35
3.5.2- Amplification des gènes étudiés par PCR.....	36
3.5.3- Purification de l'ADN.....	36
3.5.4- Séquençage des gènes amplifiés et traitement des séquences.....	37
3.6- Détermination du taux de sporulation.....	37
3.7- Détection de l'activité enzymatique.....	38
3.8- Analyse des lipopeptides (LPs) par spectrométrie de masse couplée à l'HPLC.....	38
3.9- Identification de nouvelles molécules de fengycines.....	39
3.10- Détection de la phytohormone, acide indole 3 acétique (IAA).....	39
3.11- Test de production des sidérophores.....	40
3.12- Test d'antagonisme sur milieu gélosé à base d'exsudats racinaires.....	40
3.13- Production industrielle des spores de <i>Bacillus</i>	41
3.14-Effet in situ des souches de <i>Bacillus</i>	41
3.14.1- Dans des conditions de pots.....	41
3.14.2- Etude au champ	42
3.14.3- Analyses statistiques.....	42
4- Résultats	43
4.1- Analyses physicochimiques des échantillons explorés.....	43
4.1.1- Echantillons de l'eau.....	43

4.1.2- Echantillons du sol.....	43
4. 2- Recherche et isolement des bactéries du genre <i>Bacillus</i> à activité antifongique.....	44
4.3- Taux d'inhibition de la croissance fongique développé par les isolats de <i>Bacillus</i>	45
4.4- Identification des isolats bactériens à activité antifongique.....	46
4.5- Evaluation du taux de sporulation des souches sélectionnées.....	47
4.6- Production des substances antifongiques.....	48
4.6.1- Enzymes dégradant la paroi des cellules fongiques.....	48
4.6.1- Enzymes dégradant la paroi des cellules fongiques.....	49
4.6.3- Détermination de la nature de nouvelles variantes de fengycines.....	53
4.7-Tests de production de l'IAA et des siderophores.....	61
4.8- L'activité antifongique développée par les bactéries sélectionnées sur les exsudats racinaires.....	62
4.9- Production des souches de <i>Bacillus</i> à l'échelle industrielle.....	64
4.10.1- Dans les conditions de pots.....	64
4.10.1.1-Variété : <i>CV. Flipe 13 90</i>	64
4.10.1.2- Variété : <i>Mega grain tradind CO. (P) : Kabuli</i>	66
4.10.2- En plein champ.....	67
5- Discussion	71
8- Conclusion et perspectives.....	79
Références bibliographiques.....	81
Annexe.....	95
Articles publiés	
Articles projets.....	

Résumé

L'exploration des échantillons en provenance de divers environnements de l'Est Algérien (du lac salé de Ain M'lila et de la rhizosphère d'une plante adjacente ; de l'eau de la source thermique d'Oued El-Athmanya et du sol environnant ; de la rhizosphère de la plante *Calendula officinalis*, cultivée en serre à Setif) a abouti à l'obtention de 39 isolats de *Bacillus* et de *Paenibacillus*, dont 28 % sont sélectionnés pour leur capacité à inhiber la croissance de certaines moisissures phytopathogènes comme : *Alternaria alternata*, *Aspergillus niger*, *Botrytis cinerea*, *Cladosporium cucumerinum*, *Fusarium oxysporium* et *Fusarium sp.* Le calcul du taux d'inhibition de la croissance fongique par les isolats sélectionnés, réalisé, à titre d'exemple, sur *F. oxysporium* et *B. cinerea*, a permis d'obtenir des valeurs variant entre 39% et 84% suivant l'isolat. L'identification moléculaire des isolats sélectionnés par l'analyse d'ADN-16S et du gène « *gyrase-A* » a montré que les isolats de Ain M'lila appartiennent à *Bacillus amyloliquefaciens*, ceux isolés d'Oued El Athmanya sont : *B. amyloliquefaciens*, *B. atrophaeus* et *B. mojavensis*, enfin, les bactéries isolées de la rhizosphère de *C. officinalis*, sont : *Paenibacillus polymyxa*, *B. velezensis*, *B. amyloliquefaciens* et *B. subtilis* subsp. *spizezenii*. Les souches de *Bacillus* sélectionnées développent, dans les conditions de culture en fioles, des taux de sporulation importants variant entre $8 \cdot 10^8$ et $27 \cdot 10^8$ spores/ml., alors que, le taux de sporulation chez *P. polymyxa* est insignifiant. Seuls les isolats de *B. amyloliquefaciens* sont capables de produire de la protéase. Cependant, l'activité cellulosique est observée chez toutes les espèces de *Bacillus* étudiées exceptant le *B. atrophaeus* qui a été le seul à produire de la chitinase. Toutes les espèces étudiées ont les mêmes capacités à produire les trois familles de lipopeptides (iturines, fengycines et surfactine), les siderophores et l'indole 3 acide acétique (IAA). Toutefois, le *P. polymyxa* (18SRTS) produit, dans les conditions expérimentales, une meilleure concentration d'IAA (54µg/ml). Par ailleurs, il est à mettre en exergue que, les *B. amyloliquefaciens* isolés du lac salé et de la source thermique produisent de nouvelles variantes de fengycines. En effet, il a été mis en évidence que **le *B. amyloliquefaciens* (ET), produit de nouveaux homologues de fengycines A et B, ayant des chaînes d'acides gras à 20 et à 18 atomes de carbone, respectivement, et deux nouvelles variantes de fengycines (fengycine X et Y) à cycles peptidiques dont la structure diffère de celle des fengycines conventionnelles.** L'activité antifongique de certains isolats (*B. amyloliquefaciens* (ET), *B. atrophaeus* (6SEL), *B. mojavensis* (9SEL), *B. amyloliquefaciens* (9SRTS) et *B. subtilis* subsp. *spizezenii* (23SRTS)) sur milieux gélosés à base d'exsudats racinaires de tomate, de courgette et d'haricot, obtenus à différentes températures a été observée, vis-à-vis d'*Alternaria alternata* et de *F. oxysporium*. En complément, les souches *B. atrophaeus* (6SEL), *B. amyloliquefaciens* (9SRTS) et *B. subtilis* sub sp *spizezenii* (23SRTS), ont fait l'objet d'une production industrielle avec un taux de survie, après lyophilisation, très appréciable et leurs test *in situ* en serre et en champs sur le pois chiche a révélé une capacité intéressante de biofertilisation, de phytostimulation et de biocontrôle, ce qui justifie largement l'objectif assigné à cette recherche.

Mots clés : *Bacillus*, *Paenibacillus*, lipopeptides, fengycines, phytostimulation, biocontrôle, siderophores, IAA.

Abstract

The exploration of samples obtained from diverse environments of Eastern Algeria (a salt lake of Ain M'lila and the rhizosphere of an adjacent plant; the water of a thermal source of Oued El-Athmanya and the environing soil and the rhizosphere of *Calendula officinalis*, cultivated in a greenhouse in Setif) allowed the obtaining of 39 isolates of *Bacillus* and *Paenibacillus* genera. 28 % of these isolates are screened for their capacity to inhibit the growth of some phytopathogenic fungi as: *Alternaria alternata*, *Aspergillus niger*, *Botrytis cinerea*, *Cladosporium cucumerinum*, *Fusarium oxysporium* and *Fusarium sp.* The inhibition rate developed by the screened isolates against *F. oxysporium* and *B. cinerea* varies between 39% and 84% according to the isolate. The molecular identification of the screened bacteria by 16S-DNA and *gyrase-A* gene analysis shows that strains isolated from Ain M'lila are identified as *B. amyloliquefaciens*, those isolated from Oued El Athmanya belongs to *B. amyloliquefaciens*, *B. atrophaeus* and *B. mojavensis*, and finally, bacteria isolated from *C. officinalis* rhizosphere are *B. velezensis*, *Paenibacillus polymyxa*, *B. amyloliquefaciens* and *B. subtilis* subsp. *spizezenii*. The screened strains develop, in flasks conditions, important sporulation yields varying between 8×10^8 and 27×10^8 spores/ml, while, the sporulation yield of *P. polymyxa* is insignificant. Only *B. amyloliquefaciens* strains are able to produce protease. However, the cellulase activity is observed in all *Bacillus* species studied here, except the *B. atrophaeus* which is the sole strain able to produce chitinase. All *Bacillus* species have the same capacity to produce the three lipopeptides families (iturin, fengycin and surfactin), siderophores and the indole 3 acetic acid (IAA). In contrast, *P. polymyxa* (18SRTS) produces in the same experimental conditions the best IAA concentration reaching 54µg/ml. **Moreover, it is to highlight that *B. amyloliquefaciens* strains isolated from a salt lake and a thermal source produce new fengycin variants. In fact, it has been demonstrated that *B. amyloliquefaciens* (ET), produces new homologues of fengycin A and B, having fatty acid chain with 20 and 18 carbon atoms, respectively, and two new fengycin variants (fengycin X and Y) with peptide cycle whose the structure differs from that of conventional fengycins.** The antifungal activity of some strains (*B. amyloliquefaciens* (ET), *B. atrophaeus* (6SEL), *B. mojavensis* (9SEL), *B. amyloliquefaciens* (9SRTS) and *B. subtilis* subsp. *spizezenii* (23SRTS)) on solid medium based on root exudates of tomato, zucchini and bean, obtained at different temperatures is observed, against *A. alternata* and *F. oxysporium*. In addition, *B. atrophaeus* (6SEL), *B. amyloliquefaciens* (9SRTS) and *B. subtilis* subsp. *spizezenii* (23SRTS) produced at the industrial scale, show an appreciable alive cells concentration after lyophilization. Furthermore, the *in situ* test of these strains under greenhouse and field conditions, on chickpea, reveal their interesting phytostimulation and biocontrol capacities, which largely justify the objective assigned by this research.

Keywords: *Bacillus*, *Paenibacillus*, lipopeptides, fengycin, phytostimulation, biocontrol, siderophores, IAA.

Liste des abréviations

AAC : Agriculture et agroalimentaire canada

ALS : Arysta life science

ARLA : Agence de réglementation de lutte antiparasitaire du Quebec

BIA: Biopesticides Industry Alliance.

C-LPs: Cyclic lipopeptides

COLEACP: Comité de Liaison Europe-Afrique-Caraïbes-Pacifique

CTB : Centre Trade Belge

EFSA: Autorité Européenne de Sécurité des Aliments

EMIVAR : Entreprise de Mise en Valeur & d'Aménagement Rural, Spa

EP: European Parliament

EPA : Environmental Protection Agency des États-Unis

EU: European Union

FAO: Food and Agriculture Organisation

FIBL: Forschungs institute fur biologischen Landbau (institute de recherché de l'agriculture biologique).

IFOAM: International Federation of Organic Agriculture Movements

PAN: Pesticide Action Network

PIP: Programme Initiatives Pesticides

PNUE : Programme Des Nations Unies Pour l'Environnement

SAICM: The Strategic Approach to International Chemicals Management

UNEP: United Nations Environnement Programme

US\$: Dollare Américain

WB: World Bank

Introduction

Introduction générale

L'arrêt de l'activité humaine liée à la vie nomade, où l'homme vivait de la chasse, de la cueillette et de la pêche, et l'apparition des premiers foyers d'agriculture, coïncidaient avec la naissance du néolithique, il y a 10 000 ans. À cette époque, la terre ne comptait qu'environ 5 millions d'êtres humains (Mazoyer, 2011). Au cours des millénaires et avec l'expansion continue de la population mondiale, l'agriculture a connu une forte intensification dans le monde industrialisé, un peu avant la seconde guerre mondiale, puis, dix à vingt ans plus tard, dans les pays en développement, donnant ainsi naissance à « La révolution verte ». Cette révolution agricole s'est caractérisée par l'adoption des méthodes permettant d'économiser la main-d'œuvre et par l'usage des organismes notamment génétiquement modifiés (OGM) et des produits chimiques de fertilisation (fertilisants) et de protection des plantes contre les ravageurs des cultures agricoles (pesticides) (Griffon, 2006). L'utilisation intensive de ces produits chimiques a provoqué de graves conséquences sur l'environnement et la santé de l'homme (Carson et Rachel, 1962).

Le contrôle d'usage des produits phytosanitaires chimiques reste toujours limité dans tous les pays du monde, ce problème est plus accentué dans les pays sous développés (Goldenman et PozoVera, 2008). Le monde donc face à cette situation, a adopté des politiques agraires alternatives, parmi lesquelles, on note l'agriculture intégrée et l'agriculture biologique. La gestion intégrée (IPM, integrated pest management) des cultures implique l'adoption des techniques respectueuses de l'environnement qui vise à minimiser l'usage des produits chimiques. En revanche, la production biologique exclut l'utilisation des produits phytosanitaires chimiques. Dans ce type d'agriculture, on utilise des produits phytosanitaires naturels dits : Biopesticides (COLEACP, 2011).

Il existe deux types de biopesticides sur le marché, en l'occurrence : les pesticides biochimiques qui sont des substances d'origine naturelle et/ou des molécules synthétiques qui leur ressemblent (Thakor, 2006) et les pesticides microbiens qui contiennent les microorganismes bénéfiques, tels que les bactéries, les champignons, les levures, les virus ou les protozoaires, comme matière active (BIA, 2013).

Les biopesticides bactériens représentent la majorité des biopesticides microbiens (Shoresh *et al.*, 2010) et les bactéries du genre *Bacillus* sont les plus étudiées dans la recherche scientifique et le plus exploité en agriculture. En effet, le US Food and Drug Administration

(USFDA) a confirmé que toutes les espèces du groupe *Bacillus subtilis* sont non pathogènes à l'homme. En outre, le genre *Bacillus* possède la possibilité de sporuler dans des conditions défavorables ce qui facilite sa production industrielle et sa formulation en un produit stable (Lolloo *et al.*, 2010). Par ailleurs, le genre *Bacillus* a la capacité d'échapper au phénomène de résistance des ravageurs car il développe plusieurs mécanismes de biocontrôle, de biofertilisation et de phytostimulation comme la plupart des PGPRs (plant growth promoting rhizobacteria), pour augmenter le rendement des cultures agricoles.

L'objectif de cette thèse est de caractériser les souches de bactéries du genre *Bacillus*, isolées de divers environnements de l'Est d'Algérie, à savoir : l'eau du lac salé d' Ain M'lila et la rhizosphère d'une plante située à sa proximité ; l'eau de source thermique d'Oued El Athmanya et le sol situé à sa proximité ; et enfin de la rhizosphère de la plante *Calendula officinalis*, cultivée en serre dans la région de Setif (Est Algérien), dans le but de les utiliser comme agents de biocontrôle (biopesticides), en agriculture. Pour cela, une synthèse des principales informations relatives à l'agriculture biologique et aux biopesticides en général et aux biopesticides à base de *Bacillus* en particulier, a été effectuée (revue bibliographique). La première partie de l'étude expérimentale repose sur l'isolement et la purification des bactéries du genre *Bacillus* par la technique du choc thermique, puis le screening des isolats possédant une activité antifongique vis à vis certaines moisissures phytopathogènes. La deuxième partie repose sur l'identification moléculaire des souches sélectionnées et la caractérisation de leur capacité à produire des enzymes hydrolytiques (cellulase, protéase et chitinase), des lipopeptides y compris l'identification de nouvelles variantes de fengycines détectées, de la phytohormone indol-3 acide acétique (IAA) et des siderophores. La troisième partie est consacrée à la production de certaines souches de *Bacillus*, à l'échelle industrielle dans un bioréacteur de 500 L, à l'unité de production « Artechno-Liège » en Belgique. Enfin, les biopesticides à base de *Bacillus* produits, ont été testés pour leurs effets de biocontrôle et de phytostimulation sur production de deux variétés de pois chiche en serre et en plein champ.

Revue
bibliographique

2- Revue bibliographique

2.1-Aperçu sur l'agriculture dans le monde: Bref historique

Il y a 10 000 ans, une révolution éclata à l'échelle planétaire donnant naissance au néolithique (nouvel âge de la pierre) marquant ainsi une grande étape de notre histoire. Cette révolution s'accompagna par une modification du mode de vie passant de nomade vivant de la chasse, de la cueillette et de la pêche à l'apparition des premières structures agricoles (figure 1). La terre ne comptait alors qu'environ 5 millions d'êtres humains. Cette révolution néolithique coïncidait également avec l'apparition des grandes forêts de feuillus et de conifères. L'homme engage la domestication des animaux et la culture des plantes. Les premières cultures de plantes et les premiers élevages d'animaux apparaissent au Proche-Orient, en Chine du Nord, au Mexique, au Pérou et en Papouasie-Nouvelle-Guinée. Cinq mille ans plus tard, la population mondiale avait été multipliée par dix. Sur les 50 millions terriens, nonante pour cent étaient des agriculteurs vivant désormais des fruits de la culture et de l'élevage, dont la pratique s'était généralisée.

Au cours des millénaires, les paysans se sont engagés à sélectionner et à cultiver des espèces végétales présentant un rendement plus élevé et une meilleure résistance à la sécheresse et aux maladies; ils ont construit des terrasses sur les versants des collines afin de conserver les sols et des canaux pour assurer la distribution de l'eau à travers leurs champs; ils ont remplacé la houe manuelle par la charrue tirée par des bœufs et se sont mis à utiliser le fumier animal comme engrais et le soufre contre les ravageurs (Mazoyer, 2011).

Un peu avant la seconde guerre mondiale et avec l'expansion continue de la population mondiale, l'agriculture a connu une forte intensification, d'abord dans le monde industrialisé puis, dix à vingt ans plus tard, dans les pays en développement donnant ainsi naissance à «la révolution verte». Cette expression a été utilisée aux États-Unis pour désigner l'évolution de l'agriculture et des systèmes de production dans la zone tropicale et en particulier, en Inde et au Pendjab. Depuis, le secteur agricole s'est mécanisé et standardisé (Cartillier, 1977), il a adopté des méthodes permettant d'économiser la main-d'œuvre et s'est mis à utiliser des plantes et notamment des organismes génétiquement modifiés (OGM) qui nécessitent l'utilisation de grandes quantités de produits chimiques pour nourrir et protéger les cultures contre les ravageurs des plantes. Ce progrès agricole a permis de réaliser des gains impressionnants de productivité. De ce fait, la production agricole et alimentaire a été

multipliée par 2,6, enregistrant en cinquante ans une progression qu'elle ne l'avait fait en dix mille ans (Griffon, 2006).



Figure1 Mode de vie de l'être humain au néolithique.

Source : Anonyme 1

Selon un rapport mondial de l'Organisation des Nations Unies pour l'Alimentation et l'Agriculture (FAO) sur l'alimentation, paru en 2006, l'agriculture mondiale peut nourrir 12 milliards d'êtres humains. Paradoxalement, alors que nous ne sommes que 6,2 milliards de terriens, 900 millions de personnes sont sous-alimentées. La révolution agricole a conduit à l'apparition d'un nouveau visage agricole qui s'est caractérisé, comme rapporté par Georges (1959), par une diversification de la nature des cultures, la quantité de moyens de production utilisés à l'hectare, les rendements, la densité de main-d'œuvre employée par hectare, les tailles d'exploitation et par les revenus par exploitation et par travailleur. De ce fait, la révolution agraire a contribué à l'accentuation des disparités sociales et économiques et régionales, à la déperdition du savoir traditionnel agricole, et dans certains pays à une accélération de l'exode rural. En effet, elle a surtout profité aux agriculteurs qui possédaient de grandes exploitations et un accès au crédit. La grande majorité des paysans était incapable de répondre aux lourdes exigences, en investissements de cette agriculture moderne et d'acheter les intrants chimiques coûteux, qui ont conduit au développement du crédit rural,

facteur de fragilisation financière pour ces petits agriculteurs. Ainsi, en Inde, plus de 25000 agriculteurs se sont donné la mort en treize ans. En outre, selon une étude publiée en 2002 dans la revue scientifique « *The Lancet* », le suicide des agriculteurs en régions rurales des pays du Sud a atteint un inadmissible taux de mortalité de 58 décès pour 100 000 habitants, alors que ce même taux est 4 fois moindre dans les pays développés.

Malgré les belles promesses de la révolution verte, le coût de production augmente rapidement et fortement. En Inde, la tonne du blé est, ainsi, passée de 30 dollars en 1984-1985 à 80 dollars en 1997-1998 et à 170 à 180 dollars en 2010 (Sylvie, 2010). Au Rwanda, le prix annuel moyen des denrées alimentaires de base sur les marchés locaux a augmenté de 24% entre 2006 et 2008 et de 27% et 34% pour le haricot et le maïs, respectivement, entre 2006 et 2009, alors que le taux d'inflation moyen sur cette période était de 9,8% (Milz, 2010).

En plus de cet aspect socio-économique négatif, de nombreux effets néfastes sont incombés à la révolution agraire. Parmi lesquelles on peut citer; la dégradation des terres, la salinisation des zones irriguées, l'extraction excessive imposée aux nappes aquifères souterraines, le renforcement des résistances des ravageurs, l'accumulation des résidus toxiques dans l'environnement et dans la chaîne alimentaire, le déboisement, les émissions de gaz à effet de serre et l'érosion de la biodiversité (Bruinsma, 2009 ; Tilman *et al.*, 2002).

2.2- Dangers de l'emploi intensif des pesticides à usage agricole

2.2.1- Dangers liés à la santé humaine

La Révolution verte nous a enseigné que l'emploi intensif de pesticides et d'engrais est nocif pour les écosystèmes et par conséquent pour la santé de l'animal et de l'homme. Plus de 150 études réalisées dans 61 pays et régions du monde ont abouti à la constatation de présence des résidus de pesticides dans les tissus adipeux, le cerveau, le sang, le lait maternel, le foie, le placenta, le sperme et le sang du cordon ombilical (Rachel, 1962). L'épidémiologie a ainsi montré que les personnes exposées aux pesticides encourent plus de risque, de développer de nombreuses pathologies telles que: le cancer (Pluygers *et al.*, 1994), les problèmes neurologiques (Jamal, 1997), les malformations congénitales (Bell *et al.*, 2001), les problèmes d'infertilité (Greenlee *et al.*, 2003), ou encore le système immunitaire affaibli (Thomas *et al.*, 1988). Jeyaratnam. (1990) a notifié que deux millions de cas de personnes ont été hospitalisées pour cause de tentatives de suicide avec des pesticides et a conclu que les intoxications par les pesticides peuvent constituer, dans certains pays en développement, un

grave problème de santé publique comme le sont les maladies contagieuses. Selon un rapport de la Banque mondiale (WB, 2008), 355.000 personnes dans le monde meurent chaque année d'empoisonnement involontaire dû à des pesticides.

2.2.2- Effet des pesticides sur la biodiversité

1 211 espèces d'oiseaux (12 % du total) sont considérées comme étant menacées dans le monde, et 86 % de celles-ci sont menacées par la destruction ou la dégradation de leur habitat. Pour 187 espèces d'oiseaux menacées dans le monde, la première source de pression est la pollution chimique, comprenant les engrais, les pesticides et les métaux lourds pénétrant les eaux de surface et l'environnement terrestre (Berny *et al.*, 1997).

Les herbicides peuvent provoquer des changements de végétation et d'habitat qui menacent les mammifères. En France, des renards ont été empoisonnés par des résidus de bromadiolone contenu dans le tissu corporel de leurs proies (Berny *et al.*, 1997). Au moins 25-35% des petits mammifères prédateurs (putois, hermines et belettes) échantillonnés ont été exposés aux rodenticides, et ce chiffre est peut-être sous-estimé (Shore *et al.*, 1999). Au Royaume- Uni, suite au contrôle de la population de rats aux rodenticides, les populations locales de mulots sylvestres, campagnols roussâtres et campagnols agrestes ont décliné de manière significative (Brakes et Smith, 2005).

Le nombre de vers de terre était 1,3 à 3,2 fois supérieur dans les parcelles biologiques comparées aux parcelles conventionnelles (Mäder *et al.*, 2002). Les insecticides à large spectre comme les carbamates, les organophosphorés et les pyréthroïdes peuvent provoquer le déclin de population d'insectes bénéfiques tels que les abeilles, les araignées et les coléoptères. Beaucoup de ces espèces jouent un rôle important dans le réseau alimentaire ou comme ennemis naturels des insectes nuisibles. Plusieurs hypothèses relient la surmortalité des abeilles connue en Europe, depuis le début des années 2000, à l'emploi de néonicotinoïdes. La Commission européenne a d'ailleurs proposé aux Etats membres de suspendre pendant deux ans l'utilisation de trois pesticides de la famille des néonicotinoïdes sur les semences, en granulés et en pulvérisation, pour les plantations qui attirent les abeilles (colza, tournesol, maïs et coton). D'après la FAO 71% des espèces cultivées qui fournissent 90% des aliments mondiaux, sont polinisées par des abeilles (Arbach, 2012).

Plusieurs études ont montré que l'utilisation intensive des pesticides affecte la fertilité du sol. La longueur des racines de plantes colonisées par les mycorhizes était ainsi 40% plus élevée dans les systèmes biologiques que dans les exploitations conventionnelles (Mäder *et al.*, 2002). Boldt et Jacobsen. (2006) ont montré aussi que les herbicides sulfonyles metsulfuron et dans une moindre mesure le chlorsulfuron sont à l'origine d'une réduction de la croissance des bactéries du sol *Pseudomonas*. Par ailleurs, en Afrique du Sud, l'activité des organismes du sol était plus importante dans les sols des vignobles biologiques que dans ceux des sites traités conventionnellement (Reinecke *et al.*, 2008). Le captane (un fongicide) et l'herbicide (glyphosate) ont également causé un changement parmi les espèces des communautés bactériennes du sol (Widenfalk *et al.*, 2008). Certains insecticides organophosphorés (le diméthoate par exemple) peuvent réduire l'activité et la biomasse des micro-organismes de sol (Eisenhauer *et al.*, 2009).

2.3- Gestion des problèmes liés aux pesticides

2.3.1- Conventions et codes du droit international à l'environnement

Les initiatives de lutte contre les problèmes liés aux pesticides et autres produits chimiques ne datent pas d'hier. Ainsi, elles ont précédé l'émergence du mouvement environnementaliste du début des années 1970. Les pesticides ont occupé une place centrale dans ces premières initiatives, suite à la mise en évidence des risques qu'ils provoquent sur l'environnement, y compris les impacts transfrontières nécessitant une action internationale (Rachel, 1962). Les années 1970 et 1980 ont vu l'adoption d'un certain nombre de conventions et d'initiatives concernant les produits chimiques en général et les pesticides en particulier, tant au niveau international que régional. Certains de ces accords internationaux sont contraignants pour les pays signataires, d'autres sont par nature volontaires et destinés à fournir des orientations aux gouvernements, aux industriels, à la société civile et aux autres parties prenantes clés. Parmi ces codes et conventions internationaux, on peut citer : *Le Code de conduite international pour la distribution et l'utilisation des pesticides*, élaboré par la FAO et adopté en 1985. Il demeure après sa révision le plus important en matière de gestion des pesticides (FAO, 2002); *La Conférence des Nations Unies sur l'environnement et le développement de 1992*, à Rio de Janeiro. Le Sommet de Rio vise principalement à travers ses objectifs à assurer un développement durable y compris le développement agricole durable, par la mise en œuvre du programme appelé « Agenda 21 » présenté dans le chapitre 14 (UNEP, 2013) ; *La Convention de Rotterdam*, adoptée en 1998 et mise en vigueur en 2004 (Anonyme 2); *La Convention de*

Stockholm sur les polluants organiques persistants (POP) a été agréée en 2001 et mise en vigueur en 2004 (Anonyme 3); et le Sommet mondial sur le développement durable de 2002 qui a donné naissance à l'approche stratégique de la gestion internationale des produits chimiques (SAICM) du PNUE, adoptée à Dubaï en 2006. La SAICM est un mécanisme volontaire général, toujours en cours d'élaboration (FAO, 2013).

2.3.2- Législations régissant les pesticides

2.3.2.1- L'union Européenne

Dans le cadre d'un programme de travail ambitieux démarré en 1992, la Commission Européenne a lancé au niveau communautaire une vaste opération de révision de toutes les substances actives entrant dans la composition des produits phytopharmaceutiques. Depuis fin 2003, les questions d'évaluation des risques sont traitées par la nouvelle Autorité Européenne de Sécurité des Aliments (EFSA), qui émet des avis et des conseils scientifiques afin de fournir des bases solides aux politiques et à la législation Européennes et aider la commission Européenne, le parlement Européen et les états membres de l'union Européenne (UE) à arrêter des décisions efficaces et opportunes en matière de gestion des risques. La législation Européenne sur les pesticides a été réformée en profondeur à travers le « paquet pesticides » adopté le 21 octobre 2009, ce règlement est entré en vigueur le 14 juin 2011. Ce paquet législatif contient le règlement (CE) n°1107/2009, relatif à la mise sur le marché et l'évaluation des produits phytopharmaceutiques; la directive 2009/128/CE instaurant un cadre communautaire d'action pour parvenir à une utilisation des pesticides compatible avec le développement durable ; la directive 2009/127/CE concernant les machines destinées à l'application des pesticides; et le règlement (CE) n°1185/2009 relatif aux statistiques. D'autres lois ont été mises en place, elles concernent l'emballage et l'étiquetage des préparations dangereuses y compris les pesticides (EC, N° 1272/2008); l'usage de pesticides dans l'agriculture biologique (EC/889/2008) et les pesticides dans les aliments végétaux, animaux et l'eau (EC.2000/60, EC.2008/105 et EC.98/83, respectivement). L'UE exige que les aliments vendus sur le marché ne doivent pas contenir des doses de résidus de pesticides qui dépassent les LMR (limites maximales de résidus), listé dans la réglementation (EC) 396/2005 et déterminées par l'EFSA. Toutes les LMRs Européennes peuvent facilement être recherchées dans la base de données des LMRs (Arbach, 2012).

2.3.2.1- L'Algérie

L'Algérie, partie prenante, dès le début du processus de négociation des Conférences Internationales des Nations Unies sur l'Environnement et le Développement Durable, contribue à la promotion d'un développement durable respectueux de l'environnement mondial. L'engagement du gouvernement Algérien pour une gestion rationnelle des ressources naturelles est évident, via le renforcement du cadre législatif et institutionnel et aux nombreux programmes lancés en matière d'éducation environnementale. L'encadrement des risques liés à l'exposition et à l'utilisation des substances chimiques en agriculture, repose sur l'enregistrement et le contrôle par les services du gouvernement, conformément aux dispositifs législatifs et réglementaires en place, notamment: la loi n°85-05 du 16/02/85, modifiée et complétée, relative à la protection et à la promotion de la santé; la loi n° 87-17 du 1er/08/87 relative à la protection phytosanitaire; la loi n°08-16 du 3 août 2008 portant orientation agricole; la loi n°09-03 du 25/02/09 relative à la protection du consommateur et à la répression des fraudes; et le décret exécutif n° 95-405 du 02 décembre 1995, relatif au contrôle des produits phytosanitaires à usage agricole, modifié et complété par le décret exécutif n°99-156 du 20 juillet 1999. Un comité scientifique évalue les risques de toxicité des pesticides pour l'homme et l'environnement et une réévaluation des produits homologués est possible ce qui peut mener soit à la suspension soit à l'annulation de l'homologation. Les autorités nationales du pays, en collaboration avec la FAO, ont mis en place des champs écoles de formation et de diffusion de l'information, en vue d'encourager une gestion rationnelle des produits phytopharmaceutiques dans le domaine de la lutte contre les ravageurs et maladies des cultures. L'Algérie s'est fixée comme priorité de développer et de généraliser les pratiques agricoles productives durables, de façon à assurer une utilisation rationnelle des produits phytopharmaceutiques. L'Algérie développe des solutions naturelles moins polluantes et des méthodes alternatives basée essentiellement sur la lutte biologique. Pour illustration, le Centre de Recherche Scientifique et Technique sur les Régions Arides a lancé en 2006 une station expérimentale dédiée aux bio-ressources au sud de l'Algérie où les chercheurs s'attellent à l'élaboration de référentiels en matière de lutte biologique et de biofertilisation pour la durabilité des agro-systèmes (Anonyme 4, 2011).

2.4- De la lutte chimique à la production intégrée

Bien que presque tous les gouvernements aient adopté des politiques pour lutter contre les problèmes causés par les pesticides, le contrôle de leur usage reste limité. Ce problème est encore plus accentué dans les pays en développement où les ressources pour faire appliquer la réglementation sont limitées, voire inexistantes, et où les conditions d'utilisation sont inappropriées ou contre-indiquées (Goldenman et PozoVera, 2008). En plus, malgré toutes les menaces que les pesticides présentent pour l'environnement et la santé de l'homme, les pays en développement et les pays fortement industrialisés continuent à utiliser de grandes quantités de ces produits dangereux (Jack Weinberg, 2009). Ainsi, la valeur globale du marché mondial des pesticides était d'approximativement 38 billion USD environ, en 2010 (figure 2). En plus, 25 000 pesticides à usage agricole dont 700 substances actives étaient estimés sur le marché mondial en 2012 (Arbach, 2012).

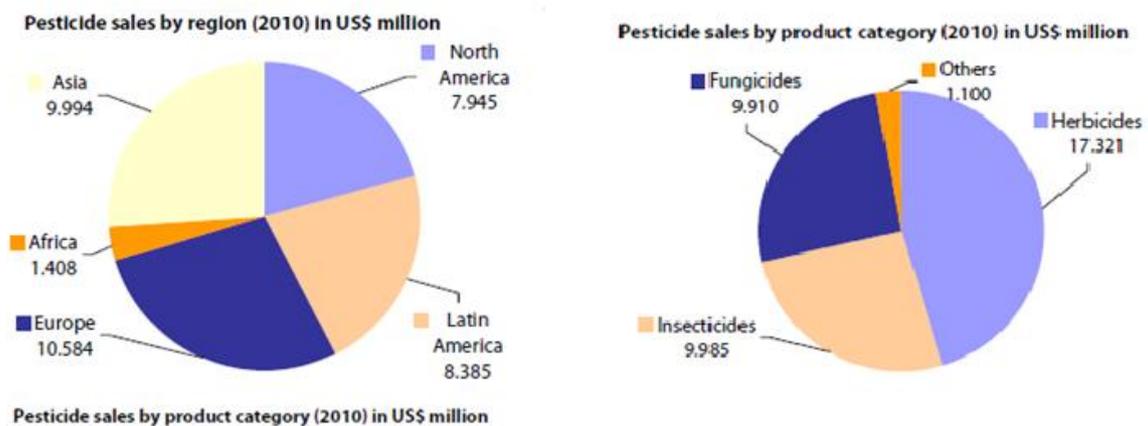


Figure 2 Le marché des produits phytosanitaires par région du monde et par catégorie des produits, en million US\$. Source: Arbach, 2012.

Les modèles de développement non durables nécessitent un usage intensif des pesticides qui nuisent à l'environnement, menacent les écosystèmes et la biodiversité, indispensables à notre sécurité alimentaire future. En effet, des appels en faveur de la modification profonde de nos systèmes agricoles et alimentaires se font de plus en plus fréquents et insistants. L'agriculture durable (ou soutenable, en traduction de l'anglais *sustainable*) est l'application à l'agriculture des principes du développement durable ou soutenable tels que reconnus par la communauté internationale à Rio de Janeiro en juin 1992. Il s'agit d'un système de production agricole qui vise à assurer une production pérenne de nourriture, de bois et de fibres en respectant les limites écologiques, économiques et sociales qui assurent la maintenance dans le temps de cette production. L'agriculture durable, elle, en se basant sur une gestion économe et

autonome des exploitations agricoles, garantit une efficacité économique et des revenus décents aux agriculteurs. Elle permet une baisse des charges, une diminution des coûts pour la collectivité tout en valorisant le travail. Elle est plus autonome par rapport aux aides publiques et plus en cohérence avec les ressources locales et les enjeux territoriaux. Elle se fonde sur une équité sociale qui permet de valoriser le travail et les emplois avec un partage équitable des richesses et des droits à produire. Multifonctionnelle, elle participe à la vie et au dynamisme des territoires ruraux, et crée des ponts entre le monde rural et les villes (Anonyme 5).

Les concepts et les stratégies développées dans le cadre de l'agriculture durable ont évolué vers le concept intégré de gestion des ressources naturelles (lutte intégrée ou *Integrated Crop Management* – ICM). La lutte intégrée est une démarche de planification et de gestion qui implique différentes méthodes de réduction des populations d'organismes nuisibles à des niveaux acceptables. La bonne gestion intégrée des cultures, implique l'adoption des techniques respectueuses de l'environnement, telles: obtention des semences ou du matériel de plantation (boutures, plants) de qualité ; choix des sols fertiles et des lieux adaptés à la plantation; adoption des écartements et des dispositifs adéquats de plantation; plantation des cultures pour faire coïncider leur période de croissance avec une faible incidence des ravageurs et des maladies; pratique de la rotation des cultures; adoption des pratiques adéquates de gestion hydrique; désherbage régulier; inspection régulière des champs; favorisation de l'accroissement des populations d'ennemis naturels (auxiliaires); adoption de bonnes pratiques de récolte; adoption des dispositifs de stockage propres et de qualité et réduction au minimum de l'application de pesticides chimiques (COLEACP, 2011). Cette diminution d'usage des produits phytosanitaires de synthèse est réalisée par l'introduction dans les stratégies de lutte antiparasitaire des produits naturels dits: biopesticides. La notion de l'agriculture biologique basée principalement sur l'utilisation de ces biopesticides sera discutée plus loin.

2.5 - Maladies des plantes

2.5.1- Définition

Une maladie de plantes peut être définie par une succession de réponses invisibles et/ou visibles à un microorganisme phytopathogène ou à la modification d'un facteur environnemental (température, pH, humidité et disponibilité d'oxygène), qui provoquent des bouleversements de forme, de fonction ou de l'intégrité de la plante. Il existe de ce fait, deux

types de maladies des plantes, à savoir: des maladies non infectieuses (abiotiques); et des maladies infectieuses (biotiques) causées par des champignons, des bactéries, des plantes supérieures parasites, des virus et viroïdes, des nématodes et des protozoaires (Sarah *et al.*, 2008). Oerke et ses collaborateurs. (1995) ont évalué de 1988 à 1990, les pertes jugées importantes de huit récoltes agricoles causées par des pathogènes de plantes, des insectes et des plantes adventices. Les résultats obtenus sont résumés dans le tableau 1. Par ailleurs, Strange et Scott. (2005) estiment qu'au moins 10% de la production globale mondiale de la nourriture est perdue à cause des maladies des plantes.

Tableau 1 Productions réelles et pertes estimatives de huit récoltes de 1988 à 1990, par parasite et par continent (billion de dollar \$ US) Source : Oerke *et al.*, 1995.

Région	Production réelle	Causes de pertes			
		Microbes pathogènes	Insectes	Adventices	Total
Afrique	13,3	4,1	4,4	4,3	12,8
Amérique du nord	50,5	7,1	7,5	8,4	22,9
Amérique Latine	30,7	7,1	7,6	7,0	21,7
Asie	162,9	43,8	57,6	43,8	145,2
Europe	42,6	5,8	6,1	4,9	16,8

2.5.2- Pathologies fongiques des plantes

Les champignons sont eux seuls responsables de 70% des pathologies végétales. En effet, sur les 100.000 espèces fongiques décrites dans la littérature, 8000, sont des pathogènes de plantes. Les maladies qu'elles provoquent sont qualifiées de cryptogamiques (David et Diane, 1993). En phytopathologie, la désignation des maladies se base sur une terminologie disparate. À l'origine, l'usage du symptôme le plus caractéristique a été adopté (le blanc, la rouille, le charbon, etc) pour la nomination de ces pathologies, suivi après par l'usage du suffixe ose accolé au nom du genre du champignon, (cercosporiose, alternariose, stemphyliose, etc.). Enfin, de manière aussi discutable, s'est installée la formule assimilant directement la maladie à son agent pathogène (ex. le Phoma, le Corynespora, etc.) (Declert, 1990). Les principales maladies fongiques listées par Bayer. (2001) sont résumées dans le tableau 2.

Tableau 2 Maladies fongiques touchant les principales cultures dans le monde (Source: Bayer, 2001).

Céréales	oïdium, rouilles, rhynchosporiose, septorioses (septoria) et maladie des taches brunes, caries et charbons
Riz	pyriculariose (pyricularia), rhizoctone (rhizoctonia) et autres maladies foliaires
Cultures légumières	fontes des semis, rouilles, pourritures des feuilles et des fruits, pourriture grise, oïdium et mildiou, maladies du feuillage et des fruits (ex. : alternariose, cercosporiose, etc.)
Pomme de terre	mildiou, rhizoctone, gale argentée
Vigne	oïdium et mildiou, pourriture grise
Fruits à pépins	tavelures, oïdium, moniliose
Fruits à noyau	moniliose
Mangue	cercosporiose
Arachides	rhizoctonia, sclerotinia, cercosporiose, rouille
Bananier	cercosporiose (maladie de Sigatoka touchant le système foliaire du bananier)
Colza	sclérotiniose, phoma lingam
Caféier	rouille du café

2.5.3- Principaux symptômes de maladies fongiques

2.5.3.1- Dépérissement

Le dépérissement d'une plante est synonyme de l'affaiblissement et de disparition progressive de la plante (figure 3-a). En effet, la croissance de la plante ralentit avant de s'arrêter, les feuilles et les apex des rameaux se décolorent et se flétrissent (Declert, 1990).

2.5.3.2- Flétrissement

Le flétrissement d'une plante correspond à son dessèchement et ou son vieillissement. Il s'agit de la diminution de la turgescence des tissus, entraînant une fanaison plus ou moins prononcée du feuillage (figure 3-b) et des jeunes rameaux. Ce symptôme peut survenir suite à un manque d'eau disponible dans le sol et/ou une évaporation exagérée. Les causes parasitaires du manque d'eau se situent à trois niveaux, en l'occurrence: l'altération des racines (défaut d'absorption); l'action des toxines parasitaires (dérégulation de la transpiration); et la trachéobactériose et/ou trachéomycose (défaut de circulation interne par altération du système conducteur de la plante) (Declert, 1990).



Figure 3 Principaux symptômes de pathologies fongiques des plantes
 (a): Dépérissement de l'aubergine Ndrouia (fusariose); (b):
 Flétrissement de l'aubergine (*Sclerotium rolfsii*). Source: Declert, 1990.

2.5.3.3- Nécrose, macération et pourriture

Ces trois termes sont souvent mal définis dans la littérature et par conséquent, utilisés confusément. La nécrose est l'état dégradé irréversible d'une cellule après une agression physico-chimique ou biologique (figure4-a). La macération est le résultat de dégradation des lamelles moyennes par action enzymatique des agents pathogènes, le plus souvent celle de la pectine-méthylestérase. Les tissus macérés prennent une texture de pâte molle, le plus souvent, l'épiderme ou l'épicarpe recouvrant le tissu altéré, sont décolorés en teinte sombre grise brune ou noire. Les tiges et les fruits macérés sont déprimés et les feuilles trouées (figure4-b). Enfin, la pourriture est l'état d'un organe après macération de ses tissus, elle intervient sur des organes variés tels que feuilles, rameaux et tiges, collets, racines et fruits (figure4-c) (Declert, 1990).



Figure 4 Principaux symptômes de pathologies fongiques (a) Nécrose totale de la feuille de melon (mildiou du melon); (b) Macération des feuilles de courge (*Rhizoctonia solani*); (c) Pourriture des racines de l'aubergine (*Pythium aphanidermatum*). Source: Declert, 1990

2.5.3.4- Taches

La tache est une aire plus ou moins bien définie sur une feuille, un fruit ou une tige, où la coloration est modifiée en raison de l'altération des tissus. On parle de taches nécrosées quand les cellules attaquées par les agents pathogènes sont mortes comme les taches de mildiou. Les noms attribués aux taches varient selon leur dimension, leur coloration et leur forme (figure5) (Declert, 1990).



Figure 5 Tache ocellée (*cercosporiose de la laitue*) (a); Rouille des feuilles du haricot (*Uromyces appendiculatus*) (b). Nécrose totale de la feuille de melon. (c).
Source: Declert, 1990.

2.6- Interactions plantes- pathogènes

Les plantes sont confrontées à une panoplie de microorganismes pathogènes. Néanmoins, les plantes mettent en place des barrières protectrices contre les bioagresseurs (cuticule, paroi pectocellulosique, etc.). Ces barrières mécaniques leur attribuent une résistance particulière, face aux agents pathogènes (Yu *et al.*, 2011). Parfois, ceux-ci réussissent à les franchir, déclenchant ainsi des mécanismes de défense chez la plante. Les agents pathogènes peuvent être biotrophes, nécrotrophes ou hemibiotrophes. Les premiers agents cités parasitent les cellules vivantes alors que les nécrotrophes se développent en tuant les tissus sur lesquels ils prolifèrent. Enfin, les hemibiotrophes commencent principalement leur cycle comme des biotrophes, puis passent à un stade déterminé de leur cycle à une phase nécrotrophe. Quand les mécanismes de défenses sont insuffisants pour lutter contre l'agent pathogène, la plante est dite sensible et l'interaction plante pathogène est compatible. En revanche, la reconnaissance précoce de l'agent agresseur par la plante qui permet la mise en place, par la plante, d'une réaction de défense efficace engendrant une incompatibilité des deux antagonistes (Ramiro, 2009).

Les interactions entre la plante et l'agent pathogène impliquent l'échange d'informations. Le pathogène reconnaît certains facteurs portés par l'hôte (Christensen, 2003) et modifie son métabolisme pour exercer son pouvoir pathogène et induire la maladie (Alfano et Collmer, 2004; Chang *et al.*, 2004). Comme indiqué ultérieurement, les plantes possèdent un système immunitaire leur permettant une réaction active aux agents pathogènes, par une grande diversité de réponses. La reconnaissance des composants étrangers par les plantes est coordonnée par des récepteurs spécialisés, qui déclenchent les réponses de défense de l'hôte après la détection de l'agent pathogène.

Deux types de réactions peuvent intervenir. En premier lieu, la résistance basale (ou non hôte) qui est déclenchée par des récepteurs généraux présents dans la membrane végétale et qui sont capables de reconnaître des signaux moléculaires communs aux microbes ou aux agents pathogènes (MAMPs ou PAMPs, pour microbial- or pathogen-associated molecular patterns), comme par exemple, les fragments de parois cellulaires, la chitine ou des motifs peptidiques du flagelle des bactéries (Ausubel, 2005; Chisholm *et al.*, 2006; Nurnberger et Kemmerling, 2006). Ce type de résistance réduit la sévérité des symptômes, mais ne suffit pas pour arrêter le développement de l'agent pathogène et de la maladie (ADAM, 2008).

La coévolution entre les agents pathogènes et les plantes mène au renforcement des mécanismes d'action des deux partenaires. D'un côté, les agents agresseurs commencent à sécréter des protéines effectrices de virulence qui sont délivrées dans les cellules hôtes (Jones et Dangl, 2006 ; Catanzariti *et al.*, 2007). D'un autre côté, les plantes développent des moyens pour reconnaître les protéines effectrices et agissent par le biais d'un mécanisme de défense robuste et rapide. C'est le deuxième type de résistance, connu sous plusieurs noms, tels que résistance spécifique, résistance hôte ou immunité déclenchée par des effecteurs (ETI pour, effector-triggered immunity). Cette résistance est basée sur le concept gène pour gène (Flor, 1971). Le système de résistance serait ainsi déterminé chez la plante par la présence d'un gène de résistance (*gène R*) qui directement ou indirectement, participerait à la reconnaissance du produit d'un gène d'avirulence (*gène avr*) du parasite (Flor, 1971; Vanderplank, 1984).

Cette forme de défense est caractérisée par deux types de réponses défensives inductibles qui se succèdent après l'infection initiale. La première, localisée et nommée, réponse hypersensible ou HR. Alors que la seconde est la résistance systémique acquise ou SAR (Adem, 2008). Des événements cellulaires clefs de la HR ont ainsi été identifiés, parmi lesquels la production de formes réactives de l'oxygène (ROS), la modification des flux

ioniques et l'activation de cascades de signalisation via des MAP kinases (figure 6), pour aboutir à la fin, à la mort cellulaire et à l'activation de gènes de défense (Heath, 1998; 2000). Plusieurs mécanismes de défense ont été mis en évidence, par ailleurs, tel le renforcement de la paroi cellulaire (Uma *et al.*, 2011); la synthèse des phytoalexines antimicrobiens (Jwa *et al.*, 2006); la synthèse des protéines PR (pathogenesis related proteins) ayant une activité hydrolytique, comme les 1,3-glucanases (PR-2); les chitinases (PR3, 4, 8 et 11); les endoprotéases (PR7); les défensine (PR-12); les thionines (PR-13) et certaines protéines de transfert de lipides (PR-14), ayant à la fois des propriétés antimicrobiennes et antifongiques (Sels *et al.*, 2008). Récemment, le rôle des phytohormones dans le réseau de signalisation des réactions de défense des plantes a été mis en évidence (figure 6). Plusieurs familles d'hormones ont été étudiées, tel l'acide salicylique, l'acide jasmonique, l'éthylène, l'acide abscissique, l'auxine, l'acide gibberilique, la cytokinine, les brassinostéroïdes et les hormones peptidiques (Bari et Jones, 2009).

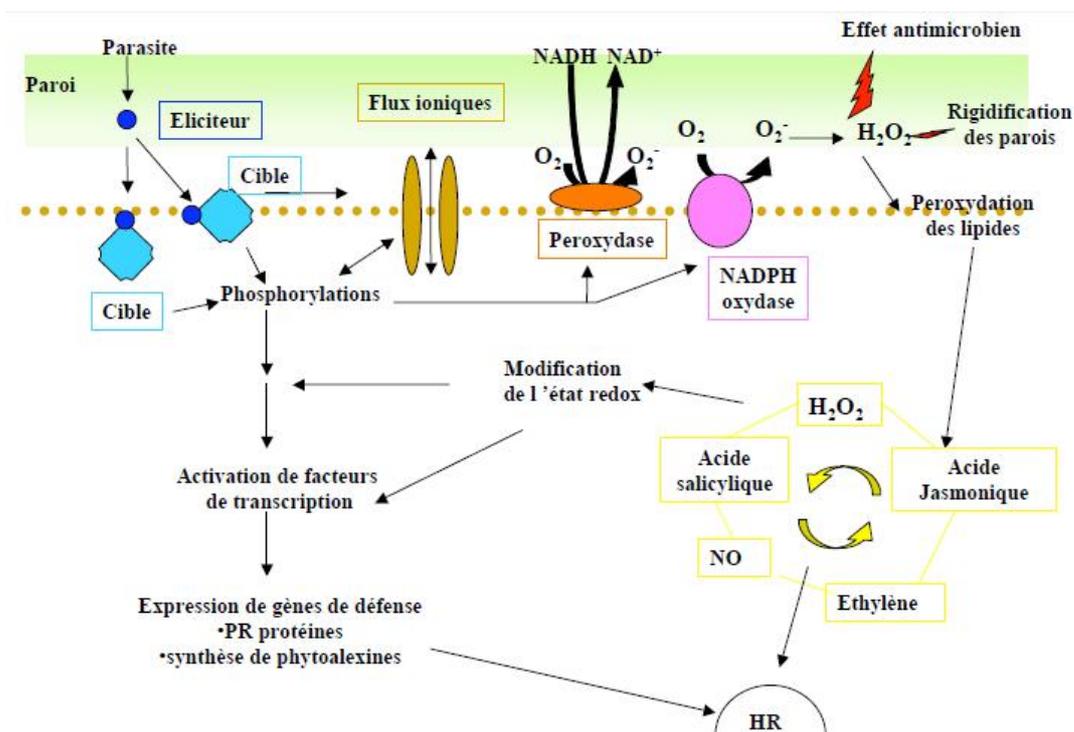


Figure 6 Schéma général des différents mécanismes de défense chez la plante, de la perception des éliciteurs du pathogène à l'activation des facteurs de transcription des gènes de résistance de la plante. Source: Delaggi, 2009.

La résistance systémique acquise (SAR pour systemic acquired resistance) se manifeste par la mobilisation des mécanismes de défense à la plante entière. Plus de 60% d'acide salicylique mesuré dans les zones non infectées de la plante provenait du transport d'acide salicylique initialement synthétisé au niveau des zones infectées (Shulaev *et al.*, 1997). Park *et al.* (2007) ont confirmé que le méthyl salicylate (MeSA), un composé volatil induit la résistance systémique acquise par voie aérienne ou encore après transport par le phloème. Contrairement à la SAR déclenchée par des agents pathogènes, la résistance systémique induite (induced systemic resistance, ISR) est stimulée par certaines rhizobactéries non-pathogènes (plant growth promoting rhizobacteria, PGPR) (Van Loon *et al.*, 1998). L'ISR n'est pas associée à l'accumulation du SA ni à l'activation de protéines PR (Pieterse *et al.*, 2001). En revanche, cette résistance contrôlée semble être dépendante de l'acide jasmonique et de l'éthylène (Beckers et Conrath, 2007).

2.7- Biopesticides et alimentation bio...

2.7.1- Les biopesticides

2.7.1.1-Définition et classification

Comme montré ci dessus, l'agriculture durable et la lutte intégrée ont été adoptées comme alternatives à la révolution verte qui a provoqué des dégâts environnementaux et socioéconomiques énormes. Contrairement à l'agriculture intégrée, l'agriculture biologique exclut l'utilisation des produits phytosanitaires chimiques et possède un cahier de charges officiel. Dans ce type d'agriculture on utilise des produits phytosanitaires naturels dits «Biopesticides» (COLEACP, 2011). Les biopesticides sont classés selon l'Agence de réglementation de lutte antiparasitaire du Québec (ARLA), Biopesticides Industry Alliance (BPIA) et Environmental Protection Agency des États-Unis (EPA), en plusieurs catégories, à savoir:

- **Agents antiparasitaires microbiens:** Ils regroupent des microorganismes naturels ou génétiquement modifiés, qui comprennent des bactéries, algues, champignons, protozoaires, virus, mycoplasmes ou rickettsies ainsi que des organismes apparentés;
- **Economes:** Ce sont des substances porteuses de message et produites par une plante ou par un animal ou, encore, des analogues synthétiques de cette substance, qui provoquent une réponse comportementale chez des individus appartenant à la même espèce ou à d'autres espèces. Les phéromones en sont des exemples.

- **Autres pesticides non classiques:** Cette catégorie inclut des aliments, des agents de préservation ou des additifs, des extraits végétaux et des huiles, etc.
- **Régulateurs de croissance des insectes (IGRs):** C'est l'ensemble de composés qui empêchent les insectes d'atteindre le stade reproductif. Ils agissent soit par dérèglement de l'activité hormonale des insectes ou de la synthèse de la chitine, principal constituant de leur exosquelette.
- **Acides organiques:** Il s'agit principalement des peracides, qui résultent de la combinaison du peroxyde d'hydrogène et des acides organiques. Ces composés sont largement utilisés dans la dépollution des eaux d'irrigation.
- **Minéraux/autres:** Ce sont des minéraux qui agissent comme des barrières qui empêchent les insectes d'atteindre les tissus des végétaux, comme le surround WP dont le principe actif est l'argile de Kaoline ou des inducteurs d'abrasion ou d'étouffement chez les insectes (huiles minérales, diatomaceous earth DE, etc.)

Au Canada, l'homologation et l'usage de biopesticides sont réglementés par les directives applicables de l'ARLA «DIR2001-02», «PRO2002-02» et «DIR2012-01» (ARLA, 2011). Il est à signaler que les pays de l'UE interdisent l'utilisation des OGM et leurs dérivés dans l'agriculture biologique et ont déterminé les différentes catégories de biopesticides et leur mise sur le marché dans la directive 2001/36/CE de la commission Européenne du 16 mai 2001 portant modification de la directive 91/414/CEE du Conseil (Anonyme 6).

2.7.1.2- *Marché des biopesticides*

En 2000, le marché des biopesticides était à l'état embryonnaire, la proportion des biopesticides vendus versus les pesticides chimiques n'atteignait que 0.25% (van Lenteren, 2000). Après cinq ans, le marché des biopesticides représentait 2.5% du marché global des pesticides qui était équivalent d'environ 26.7 milliard USD (Thakore, 2006). En 2006, Arysta life science (ALS) a estimé que le marché des biopesticides était de 541 millions \$ alors qu'en 2008 il a atteint 750 million USD (3% du marché global des pesticides), selon Global Industry Analysts (GIA). Le marché mondial des biopesticides est évalué à 1.3 milliards \$ en 2011 et devrait atteindre 3.2 milliards USD d'ici 2017. L'Amérique du Nord a dominé le marché mondial des biopesticides, représentant environ 40% de la demande de biopesticide mondial en 2011. L'Europe devrait être le marché à forte puissance dans un avenir proche en raison de

la réglementation stricte pour les pesticides et la demande croissante de produits biologiques (Anonyme 7).

2.7.1.3- Les biopesticides à base de *Bacillus*

Les biopesticides, à base de bactéries représentent la majorité des biopesticides microbiens (Shoresh *et al.*, 2010). Le genre *Bacillus* est le genre bactérien le plus étudié dans la recherche scientifique et le plus utilisé en agriculture. En effet, le US Food and Drug Administration (USFDA) a confirmé que toutes les espèces qu'englobe le groupe *Bacillus subtilis* sont non pathogène à l'homme. En plus, le genre *Bacillus* possède la possibilité de se sporuler dans des conditions défavorables ce qui facilite sa production industrielle et sa formulation en un produit stable (Harwood et Wipat, 1996; Lolloo *et al.*, 2010). Le tableau 3 résume l'ensemble des souches de *Bacillus* commercialisées dans le monde comme biofertilisants et agents de biocontrôle (Cawoy, 2012).

Tableau 3 Biopesticides bactériens appartenant au genre *Bacillus* homologués et utilisés comme agents de biocontrôle. Source: Cawoy *et al.*, 2012.

Product	Bioagent/ mode of action	Diseases / target pathogens	Crop	Company	Registered and commercialized
<i>Bacillus</i> spp.					
Avogreen®	<i>B. subtilis</i> / antibiosis	<i>Colletotrichum gloeosporioides</i> and <i>Cercospora</i> spot	Avocado	Ocean Agriculture	South Africa
Bacillus SPP®	<i>Bacillus</i> spp./ antibiosis	<i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>syringae</i> , <i>Xanthomonas campestris</i> pv. <i>vesicatoria</i> and <i>Clavibacter</i> <i>michiganensis</i> subsp. <i>michiganensis</i>	Several crops	Bio Insumos Nativa Ltda., Chile	Chile
Ballad®	<i>B. pumilus</i> / antibiosis, competition, growth promotion and resistance induction	Root rot (<i>Rhizoctonia oryzae</i>), rust (<i>Puccinia</i> spp., <i>Uromyces betae</i> , <i>Puccinia sorghi</i>), rice blast (<i>Pyricularia oryzae</i>), powdery mildew (<i>Peronospora manshurica</i> , <i>Erysiphe graminis</i> , <i>Erysiphe betae</i> , <i>Erysiphe polygoni</i>), leaf spot (<i>Cercospora</i> , <i>Cercospora beticola</i>) <i>Entyloma</i> , <i>Dreschlera</i> , <i>Exserotilum</i> <i>turcicum</i> , <i>Helminthosporium</i> , <i>Bipolaris maydis</i> , <i>Cochliobolus</i> <i>heterostrophus</i> , <i>Cochliobolus</i> , <i>Ceratobasidium</i> , <i>Ramularia</i>), bacterial spot (<i>Xanthomonas</i> spp.), Asian soybean rust (<i>Phakopsora</i> <i>pachyrhizi</i>), brown spot (<i>Septoria</i> <i>glycines</i>), white mold (<i>Sclerotinia</i> <i>sclerotiorum</i>)	Cereals, oil plants, sugar beet	AgraQuest Inc., USA	USA
Bio safe®	<i>B. subtilis</i> / antibiosis	Foliar blight	Soybean, bean, cotton	Lab. Biocontrole Farroupilha, Brazil	Brazil (not sold, only for use in the company)

Product	Bioagent / mode of action	Diseases / target pathogens	Crop	Company	Registered and commercialized
Companion®	<i>B. subtilis</i> / antibiosis, competition, growth promotion, resistance induction	Root rots (<i>Aspergillus</i> , <i>Golovinomyces cichoracearum</i> , <i>Fusarium oxysporum</i> , <i>Fusarium nivale</i> , <i>Magnaporthe poae</i> , <i>Phytophthora</i> , <i>Pythium</i> , <i>Rhizoctonia solani</i> , <i>Sclerospora graminicola</i> , <i>Sclerotinia minor</i>), leaf spot (<i>Alternaria</i> , <i>Botrytis cinerea</i> , <i>Colletotrichum orbicular</i> , <i>Colletotrichum</i> , <i>Didymella bryoniae</i> , <i>Erwinia carotovora</i> , <i>Erwinia tracheiphila</i> , <i>Plasmodiophora brassicae</i> , <i>Podosphaera xanthi</i> , <i>Pseudomonas syringae</i> , <i>Xanthomonas campestris</i>)	Cotton, bean, pea, soybean, peanut, corn, and others	Growth Products Ltd., USA	USA
EcoGuard™ Biofungicide	<i>B. licheniformis</i> / antibiosis and enzymes	Antracnose (<i>Colletotrichum graminicola</i>) and dollar spot (<i>Sclerotinia homeocarpa</i>)	Golf courses, sports turf, lawns, turf farms and arboretums	Novozymes A/S, Denmark. Novozymes Biologicals, USA	USA
Ecoshot	<i>B. subtilis</i>	Gray mold (<i>B. cinerea</i>)	Grape, citrus, vegetables, legumes and others	Kumiai Chemical Industry Japan	Japan

FZB24®WG, li and TB	<i>B. subtilis</i>	Root rot and wilts (<i>Alternaria</i> , <i>B. cinerea</i> , <i>Curvularia radicola</i> , <i>Curvularia inequalis</i> , <i>Corynebacterium michiganense</i> , <i>E. carotovora</i> , <i>Fusarium avenaceum</i> , <i>Fusarium culmorum</i> , <i>F.oxysporum</i> f. sp. <i>cucumerinum</i> , <i>F.oxysporum</i> f. sp. <i>dianthi</i> , <i>F. oxysporum</i> f. sp. <i>gerberae</i> , <i>F. oxysporum</i> f. sp. <i>gladioli</i> , <i>F.oxysporum</i> f. sp. <i>lycopersici</i> , <i>F.oxysporum</i> f. sp. <i>narcissi</i> , <i>Gaeumannomyces graminis</i> , <i>Gerlachia niveale</i> , <i>Phoma chrysanthemi</i> , <i>Phomopsis sclerotioides</i> , <i>Pyrenochaeta lycopersici</i> , <i>P.ultimum</i> , <i>R. solani</i> , <i>S. sclerotiorum</i> , <i>Stromatinia freesia</i> , <i>Verticillium spp.</i>)	Several crops	ABiTEP GmbH, Germany	Germany
HiStick N/T® / Subtillex® / Pro-Mix®	<i>B. subtilis</i>	Root rot and seed treatments (<i>Fusarium</i> , <i>Rhizoctonia solani</i> , <i>Aspergillus</i> , <i>Pythium</i> and <i>Alternaria</i>)	Soybean, ornamental plants and other crops	Becker Underwood, USA Premier Horticulture Inc., Canada	USA, Canada
Kodiak®	<i>B. subtilis</i> / antibiosis, competition, growth promotion, resistance induction	Soilborne diseases (<i>Rhizoctonia</i> and <i>Fusarium</i>)	Cotton	Gustafson Inc., USA	USA

Product	Bioagent/ mode of action	Diseases / target pathogens	Crop	Company	Registered and commercialized
Sonata®	<i>B. pumilus</i>	Powdery mildew (<i>Oidiopsis taurica</i> , <i>Erysiphe</i> spp., <i>Erysiphe cichoracearum</i> , <i>Ucinula necator</i> , <i>Sphaerotheca</i> spp., <i>Sphaerotheca macularis</i> , <i>Podosphaera leucotrica</i>), early blight (<i>Alternaria solani</i>), late blight (<i>Phytophthora infestans</i>), downy mildew (<i>Peronosporaspa</i> , <i>Pseudoperonospora</i> spp., <i>Bremia lactucae</i>)	Tomato, potato, grape, strawberry, cucurbits, peppers, apple, pear	AgraQuest Inc., USA	USA, Mexico, Peru, Switzerland, Germany
Sublic®	<i>Bacillus</i> sp.	Damping-off, root rot, and wilt (<i>Botrytis</i> , <i>Rhizoctonia</i> , <i>Colletotrichum</i> , <i>Sclerotinia</i> , <i>Macrophomina</i> , <i>Phomopsis</i> and <i>Pythium</i>)	Several crops	ELEP Biotechnologies Italy	Italy
Yield Shield®	<i>B. pumilus</i>	Root rot (<i>R. solani</i> and <i>Fusarium</i>)	Soybean	Bayer CropScience, USA	USA

2.7.1.4- Avantages et inconvénients des biopesticides microbiens

Les biopesticides microbiens montrent plusieurs avantages en comparaison avec les produits phytosanitaires de synthèse. Ils ont une action spécifique vis-à-vis des ravageurs, ils ne sont pas toxiques et se dégradent plus rapidement dans l'environnement (Thakore, 2006). Cette catégorie de biopesticides, en particulier les PGPRs (dont le genre *Bacillus* fait partie), ont des modes d'action variés et peuvent par conséquent supprimer la résistance chez le pathogène. Ils protègent la plante par plusieurs mécanismes directs et indirects, à savoir: la compétition, l'antagonisme direct et la stimulation du système immunitaire de la plante. Ils peuvent également promouvoir la croissance des plantes (biofertilisation et phytostimulation) et/ou stimuler les interactions entre les plantes et d'autres microorganismes bénéfiques (Antoun et Prevost, 2006). La biofertilisation se manifeste dans la solubilisation des nutriments insolubles dans le sol, par exemple, beaucoup de microbes bénéfiques du sol produisent des enzymes (phytase et phosphatases non spécifiques) et des acides organiques, pour solubiliser les formes insolubles du phosphate organique et inorganique, respectivement. En revanche, la phytostimulation est la promotion directe de croissance des plantes à travers la modulation de la balance hormonale. Les phytohormones incluent les cytokines, les gibberlines et les auxins (Francis *et al.*, 2010; Lugtenberg et Kamilova, 2009).

Dans la partie «marché des biopesticides» on a décrit la lente évolution du marché des produits respectueux de l'environnement. Ceci peut être attribuée aux quelques inconvénients

que possèdent les biopesticides. En effet, il est important de se rappeler que la plupart des biopesticides sont composés d'organismes vivants et leur efficacité est déterminée par les conditions biotiques et abiotiques du champ (Cawoy, 2012). En plus, leur production, basée principalement sur le processus de fermentation dans des bioréacteurs industriels est très complexe et comporte beaucoup de problèmes dont le plus sévère est celui de la contamination. Par ailleurs, la formulation des biopesticides microbiens en un produit stable et leur stockage affecte le taux de viabilité des cellules qui les constituent. En fin, le processus d'homologation des biopesticides est complexe, cher et dure longtemps. Ceci est observé beaucoup plus en Europe et au Canada, contrairement aux Etats Unis. Ces pays exigent ainsi en plus des tests toxicologiques, une démonstration approfondie du potentiel pesticide du produit et ce, sur plusieurs saisons et pour toutes les régions géographiques particulières (Rochefort, 2006).

2.7.1.5- Utilisation efficace des biopesticides

Les biopesticides ne sont généralement pas conçus comme « remède miracle » et devraient toujours être utilisés parallèlement avec d'autres stratégies de lutte contre les ennemis de cultures. Ainsi, les biopesticides jouent un rôle important et sont largement utilisés dans le cadre de l'agriculture intégrée (IPM: integrated pest management). Pour illustration, la gestion de la production des fleurs de «lys» au Brésil est montrée ci-dessous. La culture des fleurs de «lys» est menacée par plusieurs genres de champignons phytopathogènes. Parmi lesquels, les genres, *Botrytis*, *Phytophthora*, *Fusarium*, *Sclerotinia*, *Penicillium*, *Rhizoctonia* et *Pythium*. En 2000, pour résoudre ce problème, 30 produits phytosanitaires chimiques ont été utilisés pour 10.00 USD/m². L'augmentation des doses de ces produits chimique au cours des années est indispensable au bon contrôle de cette culture. Face à cette situation, un autre programme de production a été proposé dans le but de minimiser l'usage des pesticides chimiques. En fait, l'utilisation de ces derniers a été graduellement remplacée par des méthodes de contrôle biocompatibles. Dans un premier temps les pesticides les plus dangereux ont été éliminés progressivement, pendant deux ans. Ensuite, des procédures de fertilisation ont été mises en place, pour adapter le sol aux besoins des agents microbiens de biocontrol. Le traitement biologique était principalement basé sur l'utilisation des suspensions de *Trichoderma*, *Metarhizium*, *Clonostachys*, *Beauveria* et *Bacillus*, appliquées chaque semaine pour lutter contre *Botrytis* et autres pathogènes. Quand c'est nécessaire, l'huile de neem, la propolis, le phosphite et autres biopesticides biochimiques sont utilisés. Un programme d'assainissement est maintenu dans la serre par

élimination des parties de plantes malades. Les pièges à phéromones et le contrôle d'humidité sont aussi utilisés. Actuellement, aucun pesticide chimique n'est utilisé, exception faite pour l'insecticide «imidaclopride». Les coûts de contrôle sont estimés à 3.00 USD/m². Le succès de ce programme n'était pas seulement grâce à la substitution des pesticides chimiques par des biopesticides, mais également par considération de différentes pratiques culturelles (Wit *et al.*, 2009).

Une application efficace d'un biopesticide nécessite d'autres facteurs qu'ils doivent être respectés et qu'on trouve dans l'étiquette du produit. Ceci inclut, le pH et température de la solution microbienne préparée, les conditions de stockage, le temps d'application et le nombre de répétitions, la durée de conservation et la compatibilité avec d'autres produits (Filotas, 2010).

2.7.2- Bref aperçu sur l'alimentation biologique

Fin 2010, 9.3 millions d'hectares (y compris les surfaces en conversion) ont été cultivés par 219 555 exploitations selon le mode de production biologique dans les 27 Etats Membres de l'Union Européenne et l'agriculture biologique représentait 5.1% de la superficie agricole utilisée (SAU) en Europe. En outre, les 2/3 des surfaces bios de l'UE se situaient en Espagne, Italie, Allemagne, France, Royaume Uni et Autriche. Cette surface bio a en moyenne, augmenté de 6.1% en 2011 et de 10.8% en 2012 (IFOAM, 2012; Anonyme 8).

La plus grande partie des surfaces agricoles biologiques mondiales se trouvent en Océanie (30%) suivie de l'Europe (25%) et de l'Amérique latine (23%) (Abdellaoui, 2012). À l'échelle mondiale, environ 37.2 millions d'hectares de terres agricoles sont certifiées selon les normes de l'agriculture biologique, et il y a environ 1,8 million de producteurs d'aliments biologiques certifiés (AAC, 2013).

Le marché mondial des produits biologiques, qui était auparavant un marché à créneaux à petite échelle, a atteint une valeur de presque 63 milliards USD en 2011 (Anonyme 9). L'ouverture des marchés occidentaux a fourni des débouchés aux agriculteurs du Sud, pour lesquels la transition en culture biologique représente une opportunité de développement qui leur permet d'atteindre une meilleure rentabilité (CTB, 2009). La surface des terrains agricoles bio en Afrique et en Amérique latine, a ainsi atteint 9.5 millions d'hectares, cultivés dans 815 mille exploitations agricoles (figure 7-a) et gérés par environ 61.8% de l'ensemble des agriculteurs bio du monde (figure 7-b).

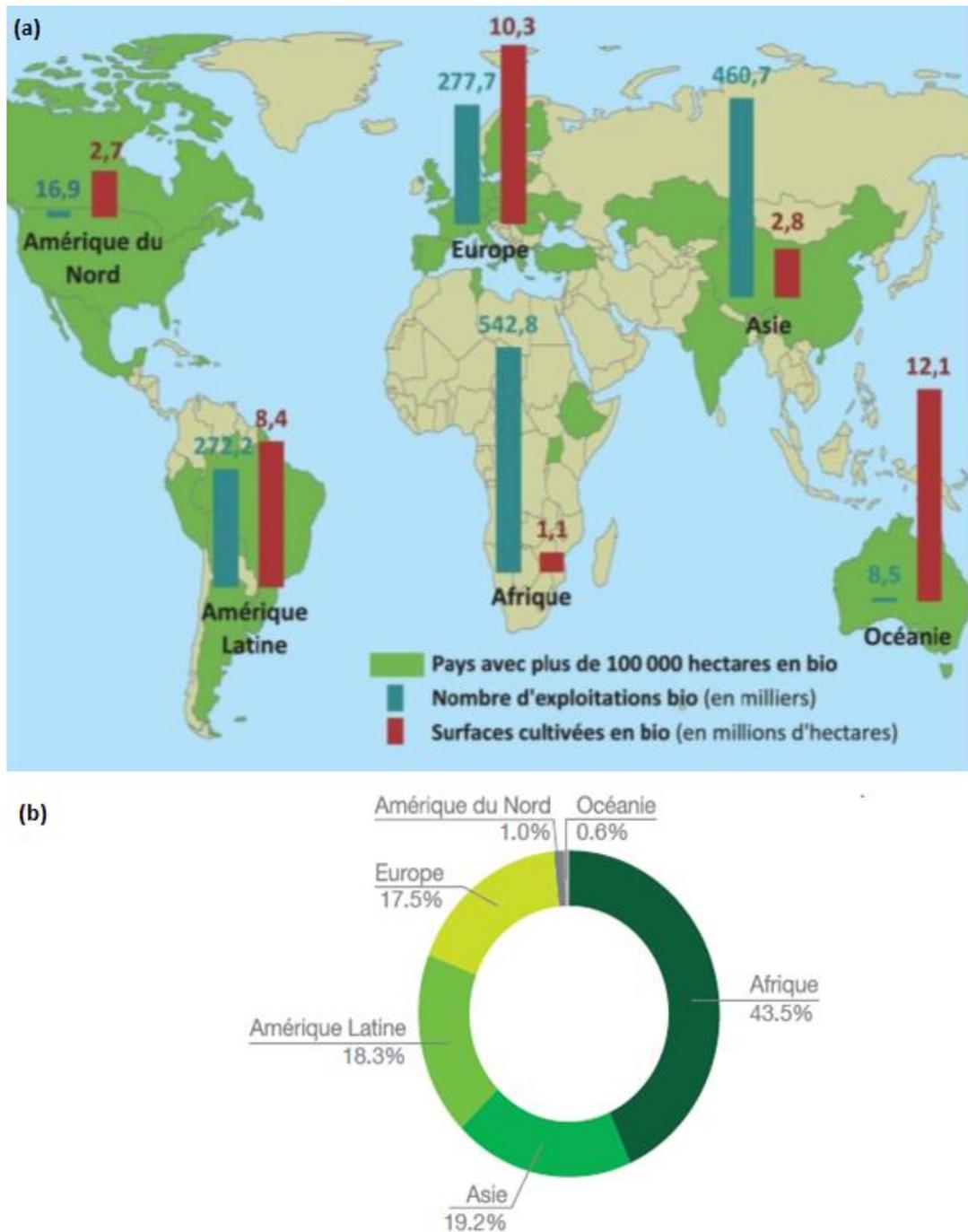


Figure 7 (a) La répartition et la surface des terrains agricoles bio (en millions d'hectares) et le nombre d'exploitations bio (en milliers) dans le monde. Source: IFOAM, 2012; (b) Répartition des agriculteurs bio dans le monde. Source: Anonyme 6

En Algérie, la superficie totale des terres agricoles bio a atteint 1118.2 hectares répartis dans 59 exploitations. Ces dernières se localisent dans les régions de Mascara, Relizane, Mila et Biskra. Les aliments bio produits sont commercialisés par plusieurs sociétés à savoir: ONCV (vin), SAEX (olive de table et huile d'olive), Ass producteur bio et Sarl Bionour (dattes

Deglet Nour) et Sarl Biodatt (dattes et fruits). Plusieurs organismes certificateurs contrôlent la qualité des produits bio Algériens, tels qu'Ecocert (tunisie), Ecocert (Roumanie), Ecocert et qualité (France) (figure 8).

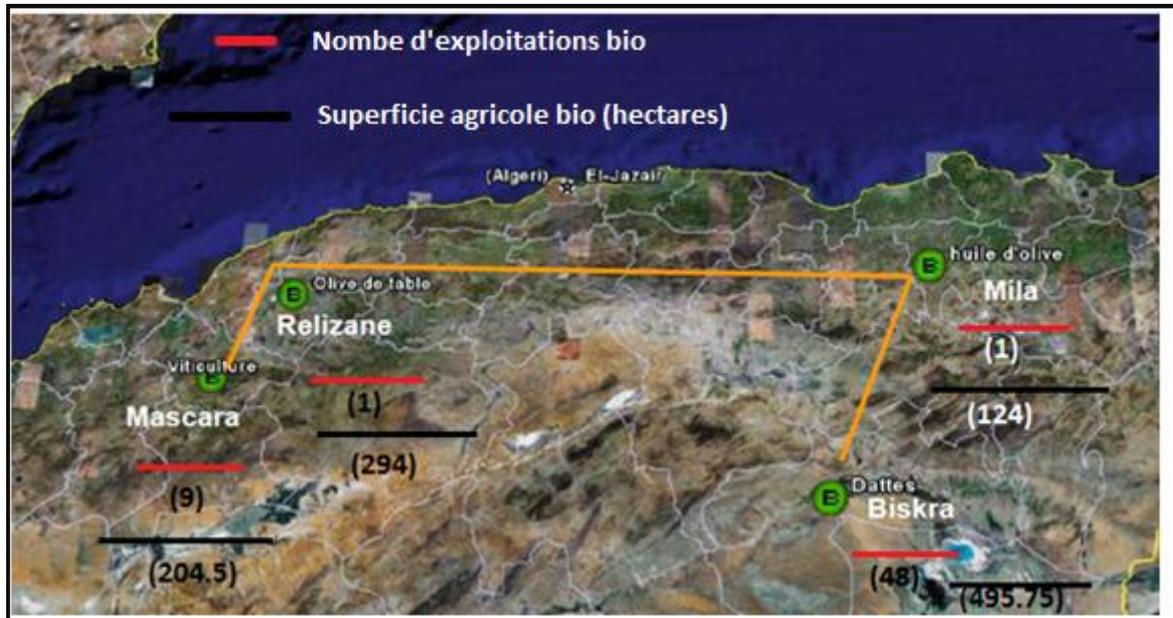


Figure 8 La superficie des terrains agricoles bios et le nombre d'exploitations bios dans les différentes régions d'Algérie. Source: Abdellaoui, 2012.

En Europe, la mention «biologique» ne peut s'appliquer à un aliment que si 95% au moins de ses ingrédients proviennent de l'agriculture biologique. Les pays de l'UE se sont entendus pour rédiger une réglementation commune pour ce type de production alimentaire. Les principaux textes communautaires sont :

- Le Règlement (CE) N° 834/2007 du Conseil du 28 juin 2007 relatif à la production biologique et à l'étiquetage des produits biologiques abrogeant le Règlement (CEE) N° 2092/91;
- Le Règlement (CE) N° 889/2008 de la Commission du 5 septembre 2008 détaillant les règles de production, d'étiquetage et de contrôle, avec son premier amendement sur les règles de productions pour la levure biologique;
- Le Règlement (CE) N° 1235/2008 du 8 décembre 2008, qui règle en détail l'importation de produits biologiques en provenance de pays tiers (CE, 2012).

Le facteur de confiance entre producteurs et consommateurs se manifeste dans le développement des labels bio et leurs systèmes de certification. Les labels bios confirment la conformité des produits aux différents cahiers de charges. Ces cahiers des charges sont des

documents évolutifs, susceptibles d'être actualisés et améliorés en permanence en fonction de l'évolution des capacités technologiques et de la réglementation générale (CTB, 2009). On distingue trois principaux types de « labels »: les labels officiels, les labels privés collectifs et les marques privées individuelles. Les labels officiels, sont ceux intégrés et reconnus par la législation d'un pays ou d'un groupe de pays. Le label de l'UE mis en vigueur depuis juillet 2010 et le label AB (Agriculture Biologique) en fait des exemples. Les labels privés collectifs sont établis par des ONG, des associations de défense du bio ou des associations professionnelles, comme en Belgique pour le label Biogarantie. Les marques privées individuelles sont conçues par un fabricant ou un distributeur. La plupart des grandes distributions disposent de leur marque, comme « Bio-Time » pour Colruyt ou « Bio » chez Delhaize ou encore « Bio, Le bien-être de la nature » chez Carrefour (figure 9).

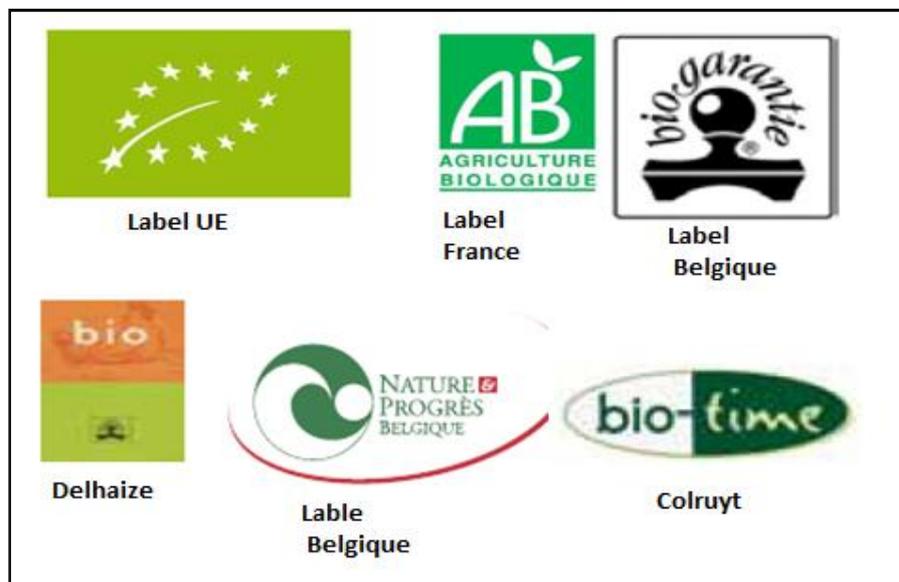


Figure 9 Les différents labels bio européens: Officiels (label UE, AB France) ; privés collectifs (biogarantie et nature & progrès- Belgique) et privées individuelles (bio-delhaize et biotime colruyt). Source: CTB, 2009).

2.8- Les lipopeptides: Structure, classification et rôles dans le phénomène du biocontrôle

2.8.1-Structure des lipopeptides

Les lipopeptides (LPs) se composent d'un cycle peptidique lié à une chaîne d'acide gras. Il existe trois grandes familles de LPs: surfactines, iturines et fengycines dont la structure générale est un cycle peptidique de 7 L- et D-acides α -aminés (iturines et surfactine) ou 10 L- et D-acides α -aminés: (fengycine et plipastatine) (Ongena et Jacques, 2008). Les lipopeptides sont synthétisés par des peptides non ribosomiaux synthétases (NRPSs) par le processus de «thiotemplate». En revanche, les polyketides synthétase (PKS) et les acides gras synthétases interviennent aussi dans la synthèse de la famille des iturines par le processus de «PKS/NRPS template» (Duitman *et al.*, 1999; Tsuge *et al.*, 2001; Hansen *et al.*, 2007).

La famille des surfactines englobe les variantes héptapeptidiques d'esperine, lichenysine, pumilacidine et de surfactine. Le cycle héptapeptidique est directement lié à une longue chaîne hydrocarbonée (C12-C16), par une liaison ester.

L'iturine A et C, bacillomycine D, F et L, et la mycosubtiline sont les six principales variantes de la famille des iturines. Dans le cas des iturines, l'héptapeptide est lié à l'acide gras (C14–C17) par une liaison amide.

La troisième famille comprend les fengycine A et B, ou plipastatine, si le Tyr₉ est de configuration D. C'est un acyldécapeptide cyclique formant une structure lactonique constituée d'une chaîne d'acide gras 3-hydroxylée ayant 14 à 19 atomes de carbone liée à l'acide α -aminé (L-Glu). Contrairement aux surfactines où la liaison ester est formée entre l'acide α -aminé C-terminal et le groupement hydroxyl de l'acide gras, la connexion de l'acide α -aminé C-terminal de la fengycine se fait avec le résidu Tyr₃ de la séquence d'acides aminés (figure 10).

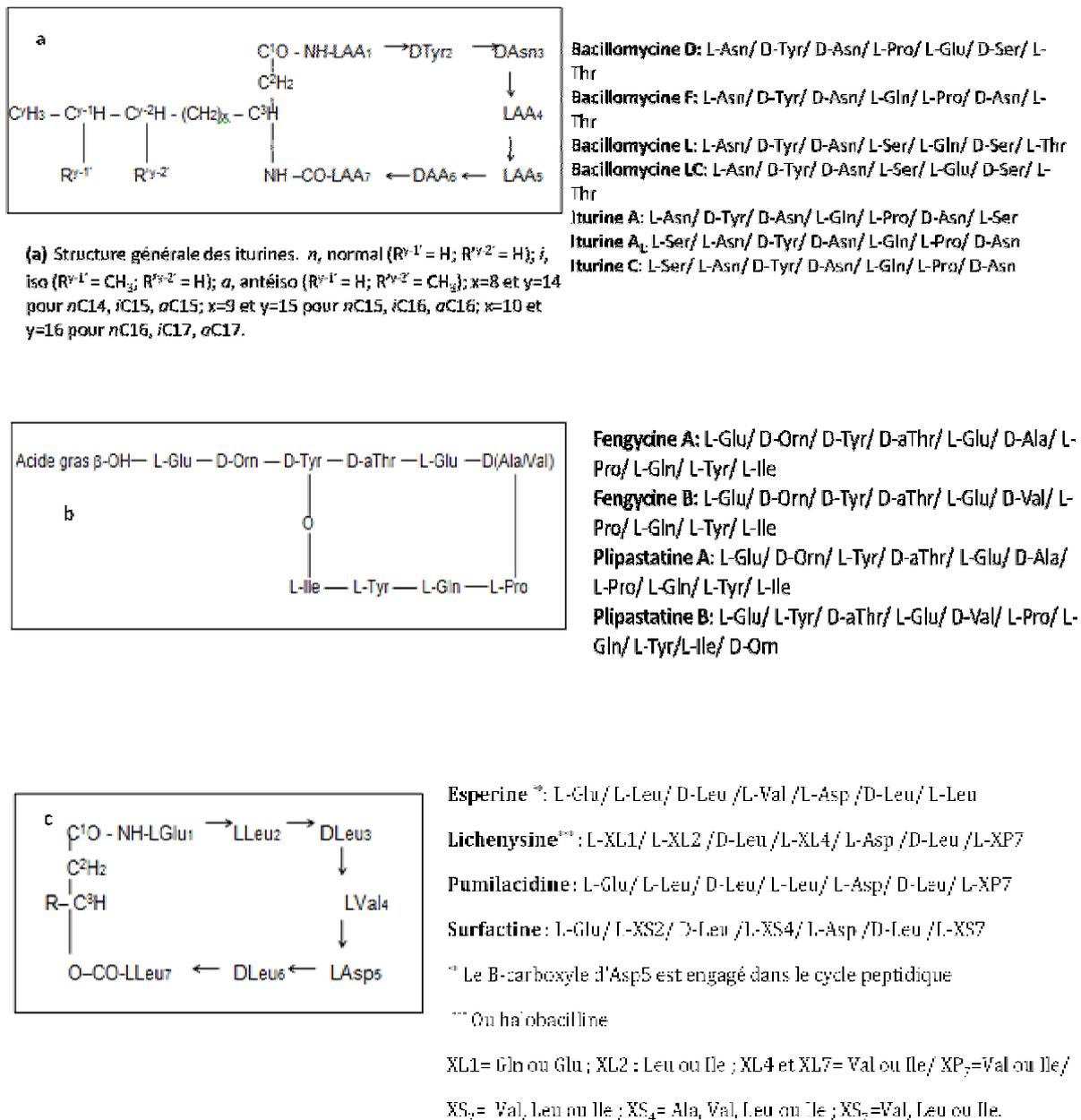


Figure 10 Structure de différentes variétés des trois familles de lipopeptides (a) iturines, (b) fengycines (C14-C18) et (c) surfactines (C12-C16).

Yu Li *et al.* (2012) et Pathak *et al.* (2012) ont décrit de nouvelles classes de fengycines, à savoir fengycine A-C19, fengycine C:C15 – C18, fengycine D: C15 –C18 et fengycine S: C15–C18 (figure 11-a) et fengycine A2, B2 et C (figure 11-b), respectivement.

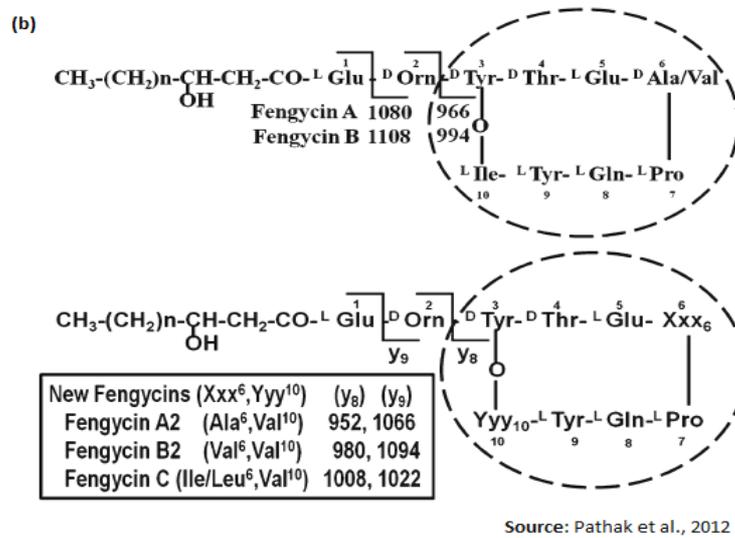
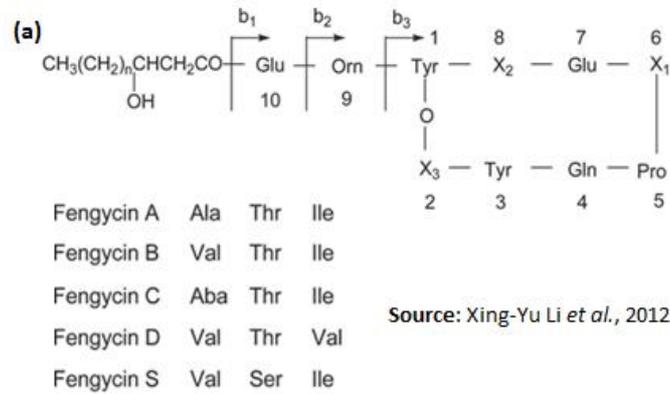


Figure 11 Structure de nouvelles variétés de fengycines (a): décrites par Yu Li *et al.*, 2012 et (b): décrites par Pathak *et al.*, 2012.

2.8.2- Rôles des lipopeptides liés au biocontrôle

Les lipopeptides interviennent dans plusieurs mécanismes de biocontrôle développés par les bactéries du genre *Bacillus* (figure 12). Ces mécanismes sont évoqués ci dessous:

2.8.2.1- Colonisation des racines des plantes

Les plantes créent un environnement nutritionnel et physicochimique spécifique pour le développement des microorganismes dans la rhizosphère (Bais *et al.*, 2006). La colonisation des racines par les *Bacillus* est un processus complexe dans lequel les lipopeptides peuvent intervenir à différents niveaux. L'attachement et l'agrégation des microcolonies sous forme de biofilm est à la base du phénomène de colonisation (Ramey *et al.*, 2004). Dans ce contexte, les études ont montré le rôle des surfactines et non pas des fengycines ou des iturines dans la

formation des pellicules dans l'interface eau-air (Peypoux *et al.*, 1999; Kinsinger *et al.*, 2003). Bais et ses collaborateurs ont mis en évidence le rôle des surfactines dans la formation d'un biofilm stable, de la souche *B. subtilis* 6051 sur les racines d'*Arabidopsis* (Bais *et al.*, 2004). La suppression de l'expression des surfactines dans cette souche diminue le taux de colonisation et le biocontrôle de la maladie causée par *Pseudomonas syringae* (Ahimou *et al.*, 2000). L'activité spécifique des surfactines dans l'adhésion cellulaire et / ou la formation de biofilm pourrait s'expliquer par sa topologie 3D, qui renforce son caractère amphiphile par rapport aux autres familles de LPS (Bonmatin *et al.*, 2003; Peypoux, 1999). Les colonies bactériennes se déplacent sur la racine pour atteindre la niche la plus riche en nutriments. Ceci s'effectue par le phénomène de «swarming». Il s'agit d'un mouvement guidé par les flagelles, il permet aux bactéries de se déplacer sous forme de biofilm tout au long de la surface des racines. Ce mouvement dépend principalement de la production des biosurfactants (Raaijmakers *et al.*, 2006; Daniels *et al.*, 2004). Il a été récemment démontré que les surfactines et les mycosubtilines fonctionnent comme des agents mouillants, en réduisant la tension de surface (Leclere *et al.*, 2006).

2.8.2.2- Antagonisme

Les activités antimicrobiennes des trois familles de lipopeptides ont été largement mises en évidence *in vitro*. En revanche, peu d'études associent le biocontrôle à la production *in planta* des lipopeptides. L'iturine A produite par le *B. subtilis* RB14 augmente le taux de germination des plantes de tomates et les protègeait contre le pathogène racinaire *Rhizoctonia solani* (Asaka et Shoda, 1996). La surproduction de la mycosubtiline par le *B. subtilis* ATCC 6633 a aussi conduit à une réduction de l'infection des plantules de tomate par *Pythium aphanidermatum* (Leclère *et al.*, 2005). La contribution des iturines et des fengycines dans le contrôle de la phyllosphère du melon infecté par *Podosphaera fusca* a été mise en évidence par la récupération de ces LPs des feuilles traitées et en utilisant la technique «LP déficient transformant» (Romero *et al.*, 2007). Preecha *et al.* (2010) ont démontré que la réduction de la sévérité de la maladie des plantes de soja causée par les *Xanthomonas axonopodis* pv. *glycines* (KU-K-46012) est due aux surfactines produites par le *B. amyloliquefaciens* (KPS46). Le *Bacillus subtilis* GA1 qui produit de quantités importantes de lipopeptides et plusieurs homologues de fengycines protège les fruits de pomme contre *Botrytis cinerea*. Le rôle des fengycines a été démontré par traitement des fruits par des extraits enrichis et par récupération de ce lipopeptide, des zones d'inhibitions sur les fruits traités (Touré *et al.*, 2004).

2.8.2.3- Induction du système de défense des plantes

L'implication des LPs dans le phénomène d'ISR a été démontrée sur divers pathosystèmes grâce à l'utilisation de LPs purifiés ou via l'utilisation de mutants possédant des motifs antigéniques modifiés. Les surfactines pures et les fengycines à moindre mesure fournissent le même effet d'induction de l'immunité des plantes de soja que celui établi par les cellules de la souche *B. amyloliquefaciens* (S499). Dans une approche complémentaire, la surexpression des gènes de fengycines et de surfactines par le *B. subtilis* 168 est associé à l'induction d'ISR dans des plantes de tomates et de soja (Ongena *et al.*, 2007). Le traitement des suspensions de cellules de tabac avec la surfactine seule, induit aussi des réactions immunitaires comme la phosphorylation, l'alcalinisation extracellulaire Ca^{2+} dépendante et le burst oxydative, sans provoquer la mort des cellules (Jourdan *et al.*, 2009).

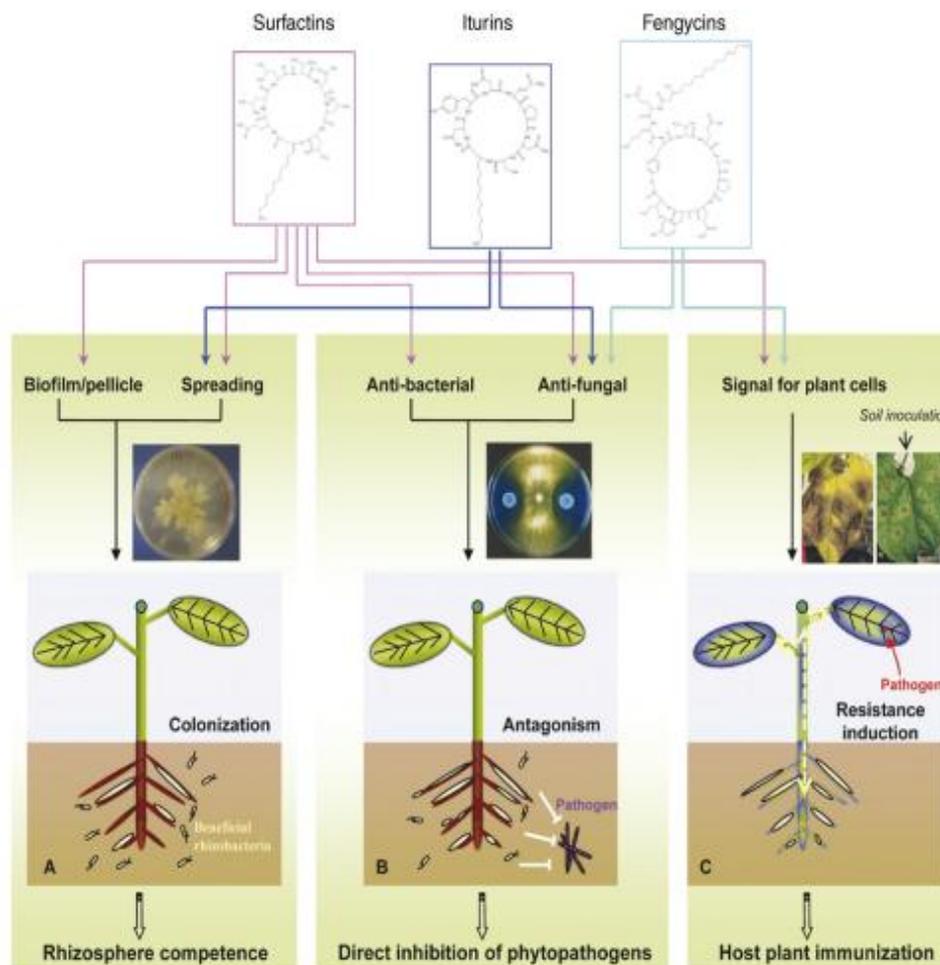


Figure 12 Rôle des trois familles de lipopeptides dans (A): colonisation des racines et formation de biofilms; (B) Antibiose directe par inhibition de croissances des phytopathogènes; (C) Induction du système immunitaire de la plante (ISR). Source: Ongena *et al.*, 2007.

Matériels et
méthodes

3- Matériel et méthodes

Les bactéries du genre *Bacillus* sont largement utilisées comme biopesticides, pour augmenter le rendement des cultures agricoles. La caractérisation phénotypique et génotypique de ce genre bactérien est largement étudié, sur des bactéries isolées à partir de la rhizosphère des plantes cultivées dans des champs agricoles (Beneduzi *et al.*, 2008; Pamela *et al.*, 2010; Aris *et al.*, 2011). En revanche, le but principal du présent travail est d'étudier les capacités de phytostimulation et de biocontrôle, *in vitro* et *in situ*, des bactéries du genre *Bacillus*, isolées de divers environnements de l'Est Algérien, en l'occurrence, le lac salé; la source thermale et la rhizosphère d'une plante médicinale cultivée en serre.

3.1- Échantillonnage

Les échantillons explorés dans cette étude, sont prélevés stérilement, à partir de trois sites situés à l'Est Algérien, à savoir :

- L'eau du lac salé d' Ain M'lila et la rhizosphère d'une plante située à sa proximité;
- L'eau de la source thermale d'Oued El Athmanya et le sol situé à sa proximité;
- La rhizosphère de la plante médicinale *Calendula officinalis*, cultivée en serre dans la région de Sétif.

3.2- Analyses physicochimiques des échantillons prélevés

Les analyses physicochimiques des échantillons du sol et d'eau prélevés dans cette étude, sont élaborées par le Laboratoire de Chimie des Sols, Agence Nationale des Ressources Hydrauliques, Antenne Régionale Est, Constantine (ANRH, Zone industrielle Palma, Constantine). Les analyses effectuées concernent les paramètres suivant: le pH, la conductivité électrique, le taux de la matière organique et la concentration de certains sels minéraux à savoir: le calcium, le magnésium, le sodium, le potassium, les sulfates et les chlorures.

3.3- Isolement des bactéries du genre *Bacillus*

Un gramme de chaque échantillon d'eau et du sol prélevé, est dilué dans 9 mL d'eau physiologique stérile. Ensuite, la solution obtenue subit un traitement thermique à 80°C pendant 12 minutes. Ce traitement à la chaleur sert à éliminer toutes les formes végétatives et à récupérer la flore sporulée. 100µL de chaque dilution traitée sont inoculés à la surface du milieu gélosé Luria-Bertani (LB: annexe 1.1). Les boîtes sont, ensuite, incubées à 30°C

pendant 24h et toute la flore bactérienne sporulée, aérobie anaérobies facultative, est obtenue (Seldin *et al.*, 1983). Celle-ci, correspond aux différentes bactéries formatrices d'endospores (endospore forming bacteria), y compris le genre *Bacillus*. Les souches bactériennes isolées sont, ultérieurement, conservées sur des billes à -80°C pour usage subséquent.

3.4- Sélection de souches antifongiques

La capacité des bactéries isolées à inhiber le développement de certaines moisissures phytopathogènes est testée, sur milieu Potato Dextrose Agar (PDA: annexe 1.2), en boîtes de Pétri. Les moisissures test sont: *Alternaria alternata*, *Aspergillus niger*, *Botrytis cinerea*, *Cladosporium cucumerinum* et *Fusarium oxysporum*. 5µL de suspension de chaque isolat (10^7 cellules/mL) est déposés sur la gélose et un morceau de PDA contenant la moisissure préalablement développée, coupé par un perforateur stérile et déposé à 3.5 cm de distance par rapport à l'isolat testé. Des boîtes inoculées seulement avec des moisissures ont servi comme témoin. Les boîtes inoculées sont incubées à température ambiante pendant 2 à 7 jours, selon la moisissure testée. L'antagonisme développé est estimé par le calcul du pourcentage d'inhibition de la croissance des moisissures par rapport aux boîtes témoin, selon la formule: $(C_t - C/C) \times 100$ où C_t : la croissance de la moisissure en absence de l'isolat bactérien; C: la croissance de la moisissure en présence de l'isolat bactérien (Toure *et al.*, 2004). Les moyennes \pm déviations standards des taux d'inhibition sont calculés à partir de trois répétitions pour chaque moisissure et isolat bactérien testé.

3.5- Identification des souches de *Bacillus* sélectionnées

L'appartenance des bactéries isolées par traitement thermique au genre *Bacillus* est confirmée par des tests préliminaires, en l'occurrence: l'aspect microscopique, la coloration de Gram, le test oxydase, le test catalase (Madigan et Martinko, 2007) et la coloration de spore au vert de Malachite (Prescott *et al.*, 2007). L'identification moléculaire des bactéries isolées est réalisée par des analyses d'*ADN-16S* et du gène de la *gyrase A* (*gyr-A*: topoisomérase type II).

3.5.1- Extraction de l'ADN

L'ADN génomique est extrait à partir des cultures liquides des isolats de *Bacillus*, par le kit «Wizard Genomic DNA Purification Kit (Promega)», selon le protocole suivant: un millilitre de chaque culture bactérienne est d'abord centrifugé à 13.000-16.000 x g pendant 2 minutes et le surnageant obtenu est éliminé. Ensuite, le culot cellulaire récupéré est suspendu dans

480µL d'acide éthylène diamine tétra-acétique (EDTA 50mM). Après, 120µl de l'enzyme lytique (lysozyme) sont rajoutés et le mélange obtenu est incubé à 37°C pendant 30 à 60 minutes. De plus, 600µL de «nuclei lysis solution» sont rajoutés et mélangés par pipetage et la préparation est incubée à 80°C pendant 5minutes, puis refroidi à température ambiante. Les protéines sont éliminées par précipitation en rajoutant 200 µL de «protein precipitation solution», le mélange obtenu est incubé dans la glace pendant 5 minutes puis centrifugé à 13.000-16.000 x g pendant 2 minutes et le surnageant obtenu est récupéré. Par ailleurs, la précipitation et la réhydratation de l'ADN sont effectuées par transférer ce surnageant dans des tubes propres contenant 600µL d'isopropanol et les mélanger par inversion jusqu'à l'apparition des filaments d'ADN. Le mélange obtenu est centrifugé à 13.000-16.000 x g pendant 2 minutes et le surnageant est éliminé. Ensuite, 600 µL d'éthanol 70% sont rajoutés et la préparation est centrifugée à 13.000-16.000 x g pendant 2 minutes et le surnageant est éliminé. Après, l'éthanol est aspiré et le culot est séché (tube ouvert). Enfin, l'ADN extrait est réhydraté dans 100 µL de «DNA rehydratation solution», pendant une heure, à 65°C ou à 4°C pendant toute la nuit.

3.5.2- Amplification des gens étudiés par PCR

L'amplification des gènes étudiés est réalisée par utilisation des amorces *16SP0* (GAA GAG TTT GAT CCT GGC TCAG) et *16SP6* (CTA CGG CTA CCT TGTTAC GA) pour amplifier l'*ADN-16S* (Ventura *et al.*, 2001), et *gyr-A.f* (CAG TCA GGA AAT GCG TAC GTC CTT) et *gyr-A.r* (CAA GGT AAT GCT CCA GGC ATT GCT), pour amplifier la *gyrase A* (Roberts *et al.*, 1994). Le mélange réactionnel de PCR utilisé pour amplifier les deux gènes étudiés contenait: 10X taq buffer (2.5µl), 25M-MgCl₂ (1.5µl), 10M-DNTP (0.4µl), amorce-f (1.25µl), amorce-r (1.25µl), taq polymérase (0.25µl) et l'eau (42.85µl). Le programme PCR, utilisé pour l'amplification de l'*ADN-16S* est le suivant: 94°C pendant 10 min, puis 32 cycles de «94°C pendant 1 min, 53°C pendant 1 min, 72°C pendant 2 min» et enfin 72°C pendant 10 min. Par ailleurs, le programme d'amplification de la *gyrase A* est le suivant : 94°C pendant 4min, puis 36 cycles de « 94°C pendant 1 min, 55°C pendant 1 min, 72°C pendant 2min », et enfin 72°C pendant 10 min.

3.5.3- Purification de l'ADN

Les produits de PCR sont purifiés par le kit «GFX PCR DNA and Gel Band Purification», suivant les instructions mentionnés. D'abord, 500 µl de «capture buffer type 2» sont rajoutés à

100 µl d'ADN extrait et mixer soigneusement. Ensuite, ce mélange est mis dans la petite colonne du kit, puis toute la préparation dans les grands épendorfs du kit, centrifugée à 16.000 x g pendant 30s et le surnageant obtenu est éliminé. 500 µl de «wash buffer type 1» sont rajoutés à la colonne, centrifugés à 16.000 x g pendant 30s et le liquide obtenu est jeté. Enfin, 50 µl de «elution buffer» sont rajoutés à la colonne, centrifugés à 16.000 x g pendant 30s et le surnageant contenant l'ADN purifié est récupéré dans des petits épendorfs.

3.5.4- Séquençage des gènes amplifiés et traitement des séquences

Le bon déroulement de l'extraction d'ADN et de l'amplification des deux gènes étudiés est vérifié par électrophorèse sur gel d'agarose (1%). Le séquençage des gènes étudiés est réalisé en utilisant les mêmes amorces décrites ci-dessus. Les séquences obtenues sont corrigées par le programme Bioedit (version 7.0.8.0). Les séquences corrigées sont déposées dans la banque de donnée «Genbank» et les numéros d'accès fournis, sont résumés dans le tableau 5 (partie résultats). L'identité de chaque souche bactérienne est déterminée par comparaison des séquences de gènes étudiés aux séquences précédemment publiées dans Genbank, en utilisant le programme BlastN.

3.6- Détermination du taux de sporulation

Pour la détermination du taux de sporulation, les isolats de *Bacillus* sont cultivés dans des fioles de 250 ml, contenant 50 ml du milieu optimum (milieu opt: annexe 1.3), comme décrit par Jacques *et al.* (1999). Les fioles sont incubées à 30°C, sous agitation de 180 rpm, pendant 72h. La suspension bactérienne obtenue est traitée par un choc thermique à 80°C pendant 12 minutes, puis refroidi immédiatement dans de l'eau froide. Ce traitement thermique sert à tuer toutes les formes végétatives et récupérer la flore sporulée. Des dilutions de la suspension bactérienne traitée sont réalisées dans de l'eau peptonée stérile (annexe 1.4) et leur concentration est estimée par la cellule de Burker. 100 µl des trois dilutions appropriées sont inoculés dans des boîtes, contenant du milieu (LB) gélosé et incubées à 30°C pendant 24h. Les boîtes sur lesquelles sont comptées 20 à 200 colonies sont prises en considération pour le calcul de la concentration de spores par millilitre de «milieu opt». Cette expérience est réalisée en trois répétitions.

3.7- Détection de l'activité enzymatique

Les activités enzymatiques sont évaluées qualitativement sur des milieux solides (annexe 1.5, 1.6 et 1.7), contenant le substrat à dégrader, en l'occurrence: la chitine colloïdale, le lait lyophilisé et le carboxyméthyl-cellulose (CMC), pour détecter la présence ou l'absence de la chitinase, la protéase et la cellulase, respectivement. La présence de l'activité enzymatique est apparue sous forme de halos clairs autour des colonies bactériennes des souches de *Bacillus* testées (Ariffin *et al.*, 2006).

3.8- Analyse des lipopeptides (LPs) par spectrométrie de masse couplée à l'HPLC

La production des lipopeptides (LPs) est réalisée par ensemencement des souches de *Bacillus* dans des fioles de 250 ml, contenant 50 ml de milieu opt (annexe 1.3). Les fioles sont incubées à 30°C sous agitation de 180 rpm pendant 72h. Les cultures sont, ensuite, centrifugées à 15.000 x g pendant 20 min. Les lipopeptides (LPs) sont extraits sur la colonne C18 «solid-phase extraction cartridges- 900 mg, Alltech» et récoltés dans de l'acétonitrile (100%). Les extraits obtenus sont analysés par chromatographie liquide (HPLC) couplée au spectromètre de masse (MS): «HPLC Waters Alliance 2695/diode array detector, coupled with Waters SQD mass analyzer» (Nihorimbere *et al.* 2012). Le gradient d'élution utilisé dans ce travail permet la détection des trois familles de LPs. L'eau acidifiée par de l'acide formique 0.1% et l'acétonitrile (ACN) acidifié avec ce même acide (0.1%) sont utilisés comme phase mobile. Le débit d'élution est maintenu à 0.5 mL.min⁻¹ et la température de la colonne à 40°C, avec un gradient de 35min, selon le programme suivant: (43%–80%), vol/vol ACN pendant 18 min; 100 %, vol/vol ACN pendant 9 min et 43 %, vol/vol ACN pendant 8 min. En premier temps, les composés sont déterminés sur base des temps de rétention des standards purifiés. Ensuite, l'identité de chaque homologue de LPs est confirmée sur base de la masse dans le «Single Quadrupole Mass Detection (SQD)», par des conditions d'electrospray ionisation, comme source de température (130°C); température de désolvation (250°C); flux de nitrogène (500 l/h) et voltage de cône (70 V). Le mode d'ion positif est utilisé pour l'analyse des trois familles parce qu'un signal élevé est obtenu par rapport au mode d'ion négatif.

3.9- Identification de nouvelles molécules de fengycines

Le surnageant de culture du *B. amyloliquefaciens* (ET) est obtenu dans le milieu «opt» (annexe1, 1.3), comme décrit ci-dessus dans la section 3.8. Ensuite, le pH a été ajusté à 2 par addition d'une solution HCl (6N), jusqu'à l'apparition d'un précipité blanc. Le mélange obtenu est centrifugé à 11.000×g pendant 10 min et le précipité est collecté, puis suspendu dans de l'acétonitrile (ACN 80%) pour obtenir les extraits de fengycines.

Les analyses de spectrométrie de masse couplée à l'HPLC (LC-MS), sont effectuées en utilisant le système HPLC «nanoHPLC Dionex Ultimate 3000», couplé à un «Amazon speed ETD mass spectrometer (Bruker Daltonics)». La colonne «Pepmap Acclaim 300 : C18, avec des particules de 3µm de diamètre, des pores de 300Å et des dimensions de 75 µm x 15 cm» est utilisée dans les analyses chromatographiques, à un débit d'injection de 0.3 µl/min. 20 µl d'extrait de fengycines sont injectés et la chromatographie est réalisée, en utilisant de l'acide formique (A: 0.1% v/v) et l'ACN (B: 20% et 80%), comme phase mobile, avec le gradient suivant: 00-05 min: 37.5% B; 05-27 min : 37.5-97.5% B (élution); 27-35 min: 97.5% B (élution); 35-44 min : 97.5-100% B (lavage); 44-45 min: 100-62.5% B (lavage); 45-55 min: 62.5-100% B (lavage); 55-65 min: 100-37.5% B (retour au conditions initiales); 65-85 min: 37.5% B. Une analyse complète MS est enregistrée dans le mode appelé «résolution améliorée», détectant les m/z qui varient entre 200 et 1.600. Les spectres MS.MS sont obtenus, en utilisant le mode dit «Xtreme scan» avec une méthode de fragmentation, type CID (collision induced dissociation, rampe de 0,6-0,8 v; temps de fragmentation équivalent de 40 ms). Les données sont traitées par le logiciel 4.0 (Data Analysis Bruker).

Le séquençage du cycle peptidique des fengycines est effectué après son ouverture par traitement à la base KOH. En fait, 50 µL d'extrait de fengycine sont concentrés par évaporation en un volume final de 10 µL et 10 µL de KOH (2 M) sont rajoutés. La préparation est incubée à 37°C sous agitation pendant une heure. Cette réaction est arrêtée par ajout de 2 µL de l'acide formique (pH 3.5). Les échantillons obtenus sont dilués 100 fois et 1 µL est injecté dans le spectromètre de masse. Les mêmes paramètres de LC-MS sont utilisés pour l'analyse des formes ouvertes de fengycines.

3.10- Détection de la phytohormone, acide indole 3 acétique (IAA)

Les isolats sont cultivés dans le milieu TGE (annexe 1.8), supplémenté de 5 mM de L-tryptophane, avec une agitation de 160 rpm, à 30°C pendant 4 jours. Les surnageants de culture sont obtenus par centrifugation des cultures bactériennes à 13.000×g pendant 5 min.

La détection colorimétrique de l'IAA est effectuée en utilisant le réactif de Salkowski (RS): 0.01 M FeCl₃ dans 36% H₂SO₄ (Glickmann et Dessau, 1995). 300µl du RS sont rajoutés à 100µl de surnageant mis dans des cuvettes de spectrophotomètre. Ces cuvettes sont incubées dans l'obscurité, à température ambiante pendant 15 min. L'intensité de la coloration obtenue est mesurée par absorbance à 535 nm dans le spectromètre. Le milieu TGE-Trp sans bactérie mélangé avec le RS est utilisé comme témoin. La concentration de l'IAA/ml dans chaque culture est déterminée par comparaison à la courbe d'étalonnage (Aris *et al.*, 2011; Pamela *et al.*, 2010). Ce test est réalisé dans deux expériences indépendantes.

3.11- Test de production des sidérophores

Les précultures des souches bactériennes sont obtenues après 24h d'incubation à 30°C et 140 rpm, dans du milieu LB (annexe 1.1). Ces précultures sont lavées trois fois avec une solution saline (NaCl 0.9%) et des suspensions bactériennes à 10⁷ cellules/ml sont préparées. 5µl de chaque suspension bactérienne et 5µl d'NaCl 0.9% pour les boîtes témoin sont déposés à la surface du milieu Chrome Azurol S (CAS : annexe 1.9) Agar. Les boîtes de CAS sont incubées 1 à 3 jours à température ambiante. La production des siderophores est indiquée par l'apparition d'un halo jaune-orange autour des colonies. Ce test est réalisé en trois répétitions (Husen, 2003).

3.12- Test d'antagonisme sur milieu gélosé à base d'exsudats racinaires

Comme les interactions les plus complexes et les plus importantes entre les plantes et les microorganismes se situent dans les racines et la rhizosphère, la capacité des souches de *Bacillus* à inhiber la croissance de certaines moisissures phytopathogènes sur milieu solide à base d'exsudats de racines est étudiée. Les exsudats racinaires (ER) de tomate, de courgette et d'haricot, sont obtenus par inoculation de 20 plantules de chaque légume dans 100 ml de solution de Hoagland's (annexe 1.10). Toutes les cultures sont incubées dans des serres à humidité (70%), 16h de lumière et à différentes températures, comme mentionné ci-dessous. Après 15 jours, les ER sont récupérés dans un volume final de 100ml, filtrés puis conservés à -20°C.

L'effet antifongique des *B. amyloliquefaciens* (ET), *B. atrophaeus* (6SEL) et *B. mojavensis* (9SEL) est testé vis à vis *Alternaria alternata*, sur des exsudats de tomate (*S. lycopersicum* cv. *Tondo rosso*), de courgette (*C. pepo* cv. *Xara*) et d'haricot (*P. vulgaris* cv. *Borlotto*), obtenus à 25°C. Par ailleurs, l'inhibition d'*Alternaria sp* et *F. oxysporium* par les souches *B.*

amyloliquefaciens (9SRTS), *B. subtilis subsp spizezenii* (23SRTS) et *B. velezensis* (26SRTS), est testée sur des exsudats de tomates (*S. lycopersicum* cv. *Tondo rosso*) obtenus à différentes températures (15°C, 20°C, 25°C, 28°C et 35°C). Le test d'antagonisme effectué dans cette expérience est réalisé comme décrit ci-dessus.

3.13- Production industrielle des spores de *Bacillus*

Les souches *B. amyloliquefaciens* (9SRTS); *B. atrophaeus* (6SEL) et *B. subtilis* subsp. *spizezenii* (23SRTS), sont produites à l'échelle industrielle dans un bioréacteur de 500 L (société Artechno, Liege-Belgium). Le milieu optimum (annexe 1.3), décrit par Jacques *et al.* (1999), est utilisé pour la production de spores de *Bacillus*. La fermentation est réalisée dans les conditions suivantes: T°=30°C, pH=7, vitesse d'agitation=140rpm et l'oxygène dissous (DO2=100%). La fermentation est arrêtée après 96h, durée de culture nécessaire pour que les souches bactériennes atteignent le taux de sporulation maximal.

3.14-Effet *in situ* des souches de *Bacillus*

3.14.1- Dans des conditions de pots

Les trois souches *B. amyloliquefaciens* (9SRTS), *B. subtilis* subsp. *spizezenii* (23SRTS) et *B. atrophaeus* (6SEL) sont utilisées dans le traitement des graines et/ou du sol. En effet, plusieurs lots sont préparés, à savoir: ST-GT (sol traité- graines traitées); ST-GNT (sol traité-graines non traitées); SNT-GT (sol non traité- graines traitées); SNT-GNT (sol non traité-graines non traitées= Contrôle). Deux variétés de pois chiches sont utilisées, en l'occurrence, *CV. Flipe 13 90* et *Mega grain tradind CO. (P): Kabuli*. Il est à noter que dans le cas de la deuxième variété, seulement le lot (ST-GNT) est testé, en utilisant le *B. amyloliquefaciens* (9SRTS) et le *B. subtilis* subsp. *spizezenii* (23SRTS).

Les graines sont lavées trois fois avec de l'eau distillée stérile et séchées sur du papier filtre stérile. Les graines sont, ensuite, traitées avec 10 ml de suspensions bactériennes à 10⁷ spores/mL et semées dans du sol naturellement infecté avec le pathogène *Sclerotinia sclerotium*. Le traitement du sol est réalisé en pulvérisant les mêmes suspensions bactériennes dans les puits formés à la surface. Dans chaque pot de 30 cm de diamètre, six graines sont semées et les traitements effectués sont répétés trois fois.

Les données concernant l'importance de la maladie et la taille des plantes sont mesurées après 30 jours de semis. Cette expérience est effectuée selon la méthode de Karimi *et al.* (2012), avec quelques modifications.

3.14.2- Etude au champ

Les tests en plein champ sont réalisés dans le terrain expérimental de Chaab-Elrassas, à Constantine (Algérie), dans la période de Juillet-Octobre 2013. Le champ est divisé en parcelles dont la surface est de 0.8 m² avec un espace de 0.60m entre elles. Le compost naturel est rajouté dans chaque parcelle et des puis sont formés (65 puis/parcelle) pour semer les graines de pois chiche. 1 ml de suspension bactérienne (10⁷ spores/mL) est pulvérisé dans chaque puis avant le semis des graines (cv. *Mega grain tradind CO. (P): Kabuli*), qui n'ont pas été traitées. Dans cette expérience, les souches *B.amyloliquefaciens* (9SRTS), *B. subtilis* subsp. *spizezenii* (23SRTS) et *B. atrophaeus* (6SEL) sont testées, en plus de la souche type *B. amyloliquefaciens* (S499), fournie par le Centre Wallon de Biologie Industrielle (CWBI). Toutes les pratiques agricoles sont appliquées (Abdel-Monaim, 2011).

3.14.3- Analyses statistiques

Le logiciel SAS (SAS Institute 2000) est utilisé pour toutes les analyses statistiques. L'effet du traitement du sol ou des graines avec les souches de *Bacillus* testées est évalué par le modèle générale linéaire (GLM). Les moyennes moindres carrées (LSM) et les erreurs standards sont calculées, selon la procédure de Duncan.

Résultats

4- Résultats

Ce travail porte sur la caractérisation des isolats du genre *Bacillus* isolés des environnements variés de l'Est d'Algérie, dans le but de les utiliser comme agents de biocontrôle et de phytostimulation en agriculture. Les échantillons utilisés pour cet objectif ont été prélevés de l'eau du lac salé d' Ain M'lila et de la rhizosphère d'une plante située à sa proximité; de l'eau de la source thermale d'Oued El Athmanya et du sol situé à sa proximité; et enfin de la rhizosphère de la plante *Calendula officinalis*, cultivée en serre dans la région de Setif (Est Algérien).

4.1- Analyses physicochimiques des échantillons explorés

4.1.1- Echantillons de l'eau

L'eau de la source thermale d'Oued El Athmanya a un pH neutre (6.97), cependant celui de l'eau du lac salé est légèrement alcalin (7.75). Par ailleurs, l'eau du lac salé a une conductivité électrique plus élevée que celle de l'eau de la source thermale (17.970 mS/cm vs. 2.400 mS/cm). Enfin, la contenance de l'eau du lac salé en sels minéraux (calcium, magnésium, sodium, potassium, sulfates et chlorures), est plus importante que celle de l'eau de la source thermale (tableau1).

Tableau1 Analyses physicochimiques des échantillons de l'eau explorés dans cette étude

Paramètres physicochimiques des eaux	Source thermale d'Oued El Athmanya	Lac salé de Ain M'lila
PH	6.97	7.75
conductivité mS/cm	2.400	17.970
Minéralisation globale		
calcium mg/L	210.40	889.14
Magnésium mg/L	44.19	291.96
Sodium mg/L	235.00	4500.00
potassium mg/L	9.00	31.00
carbonates mg/L	0.00	0.00
sulfates mg/L	560.00	3100.00
chlorures mg/L	270.00	4400.00

4.1.2- Echantillons du sol

La composition des échantillons du sol en matière organique (MO) varie en fonction du site d'échantillonnage. En effet, le sol prélevé de la rhizosphère d'une plante situé à proximité du

lac salé contient 0.912% de MO, celui prélevé à proximité de la source thermale contient 1.462 % de MO et le sol prélevé de la rhizosphère de *C. officinalis* contient 3.354% de MO. Par ailleurs, le pH de tous les sols analysés était légèrement alcalin. Enfin, la conductivité électrique des échantillons du sol du lac salé et de la source thermale est plus élevée par rapport à celle du sol prélevé de la rhizosphère de la plante *C. officinalis*, les valeurs obtenues sont, en l'occurrence, 8.93 mS/cm et 9.60 mS/cm, respectivement, vs. 0.67 mS/cm (tableau 2).

Tableau 2 Analyses physicochimiques des échantillons du sol explorés dans cette étude

Echantillons	Sol de la rhizosphère d'une plante située à proximité du lac salé	Sol situé à proximité de la source thermale	Sol rhizosphérique de <i>C. officinalis</i>
Matières Organiques			
Matières organiques %	0.912	1.462	3.354
Solution du sol			
pH	8.17	7.92	7.73
CE mS/cm	8.93	9.60	0.67

4. 2- Recherche et isolement des bactéries du genre *Bacillus* à activité antifongique

La recherche des isolats par l'exploration des échantillons a abouti à l'obtention de 39 isolats de *Bacillus* repartis sur les différents sites investis. Neuf souches ont été isolées du site d'Ain M'lila, quatre du site d'Oued El Athmánya et vingt six de la rhizosphère de *Calendula officinalis* (tableau3).

Le test de l'activité antifongique appliqué sur les bactéries obtenues a révélé que 28 % des isolats ont été sélectionnés pour leur capacité à inhiber la croissance de certaines moisissures phytopathogènes en l'occurrence : *Alternaria alternata*, *Aspergillus niger*, *Botrytis cinerea*, *Cladosporium cucumerinum*, *Fusarium oxysporium* et *Fusarium sp.* Etant un modèle de souches fongiques phytopathogènes les souches *Botrytis cinerea*, *Fusarium oxysporium* et *Fusarium sp.* ont fait l'objet de l'ensemble des tests répétés au long de ce travail et les résultats obtenus sont révélés par le tableau 3 et la figure1.

Tableau 3 Isolement et sélection des bactéries à activité antifongique, à partir des environnements divers de l’Est d’Algérie (lac salé d’ Ain M’lila, source thermale d’Oued El Athmanya et la rhizosphère de la plante *Calendula officinalis*).

Sites d’échantillonnage	Nombre total des bacilles isolés	Codes des isolats à activité antifongique
Rhizosphère d’une plante située à proximité du lac salé (Ain M’lila, Algérie)	8	Rh2. A’- Rh2. F (2 isolats)
Eau du lac salé (Ain M’lila, Algérie)	1	ET (1 isolat)
Sol situé à 1m de la source thermale (Oued El Athmanya, Algérie)	3	SEL / 6SEL/ 9SEL (3 isolats)
Eau de la source thermale (Oued El Athmanya, Algérie)	1	SI (1 isolat)
Rhizosphère de la plante <i>calendula officinalis</i> (serre-Setif, Algérie)	26	9SRTS / 18SRTS/ 23SRTS/ 26SRTS (4 isolats)

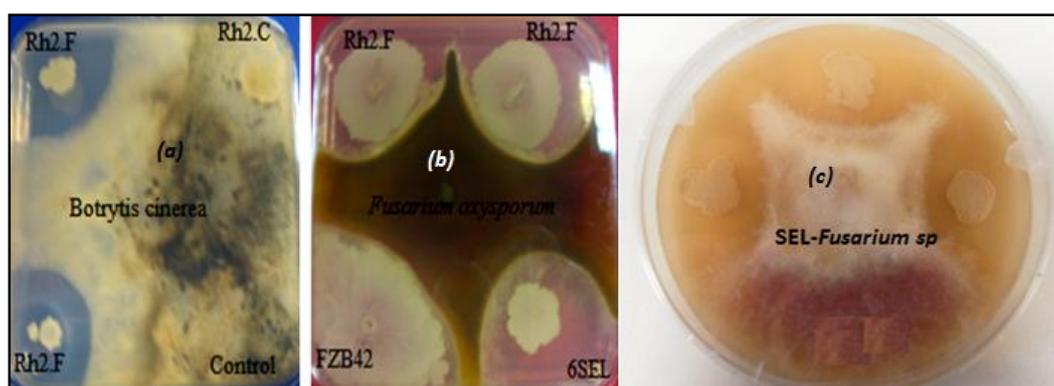


Figure 1 Inhibition *in vitro* de la croissance des moisissures phytopathogènes: *Botrytis cinerea* (a), *Fusarium oxysporum* (b) et *Fusarium sp* (c). Les isolats antagonistes, ici, sont Rh2.F, 6SEL, SEL et la souche commerciale *Bacillus amyloliquefaciens* (FZB42).

Les résultats de la figure 1 révèlent, en effet, que certains isolats sont plus actifs sur les souches test en comparaison avec d’autres dans les conditions du test.

4.3- Taux d’inhibition de la croissance fongique développé par les isolats de *Bacillus*

Pour rappel le test de calcul de taux d’inhibition de la croissance fongique par les isolats sélectionnés a été réalisé sur deux moisissures uniquement en l’occurrence *F. oxysporum* et *B. cinerea*, étant donné que *F. oxysporum* et *Fusarium sp.* étaient très proches dans leurs réponses aux isolats. Les résultats de ce test ont permis de constater que les valeurs varient

entre 39% et 84% suivant l'isolat. En effet, le meilleur effet inhibiteur a été développé par l'isolat Rh2. F et ce, sur les deux moisissures testées et par l'isolat 9SRTS sur *F. oxysporium*. Les isolats 6SEL, 9SEL, 18SRTS, 23SRTS et 26SRTS développent un effet antagoniste moins important sur les deux souches test, variant entre 39% et 69% (tableau 4).

Tableau 4 Taux d'inhibition de la croissance des moisissures phytopathogènes *F. oxysporium* et *B. cinerea* sous l'effet des isolats testés

Isolats	Taux d'inhibition de la croissance fongique (%) [*]	
	<i>F. oxysporium</i>	<i>B. cinerea</i>
<i>Rh2. A'</i>	72,5 ± 2,5	74,2±1,4
<i>Rh2. F</i>	84,2 ± 1,4	83,3 ±1,4
<i>ET</i>	70,8 ±2,9	74,2±1,4
<i>SEL</i>	65,8 ± 1,4	75,0 ±2,5
<i>SI</i>	71,7 ± 1,4	75,0 ±2,5
<i>6SEL</i>	66,7 ± 1,4	69,2 ±1,4
<i>9SEL</i>	65,8 ± 2,9	60,8 ±3,8
9SRTS	83 ± 2	65 ± 2
18SRTS	66 ± 3	66 ± 4
23SRTS	39 ± 2	48 ± 2
26SRTS	60 ± 2	61 ± 2

* Test d'antagonisme sur PDA. Les données sont exprimées comme des pourcentages de réduction d'expansion du mycélium en présence et en absence des bactéries à activité antifongique (étude comparative).

4.4- Identification des isolats bactériens à activité antifongique

Les tests d'identification préliminaires, reposés sur l'étude morphologique et physiologique des isolats, ont montré que tous les isolats appartiennent au genre *Bacillus*. En effet, ils apparaissent au microscope optique sous forme de bâtonnets caractérisés par la coloration Gram+, catalase positif, oxydase négatif et pigmentation de Malachite positive.

L'identification moléculaire des isolats par l'analyse d'ADN-16S a montré qu'un isolat n'appartient pas au genre *Bacillus* comme préconisé mais il représente *Paenibacillus polymyxa*. Cet isolat est obtenu de la rhizosphère de la plante de *C. officinalis*. Par ailleurs, l'ensemble des autres souches appartiennent au groupe *Bacillus subtilis* qui englobe plusieurs espèces. L'analyse des séquences de *gyrase-A* distingue ces espèces les unes des autres. De ce fait, les bacilles isolés d'Ain M'lila ont été identifiés comme étant *B. amyloliquefaciens*, ceux isolés d'Oued El Athmanya appartiennent aux espèces, *B. amyloliquefaciens*, *B. atrophaeus* et *B. mojavensis*. Enfin, les bactéries isolées de la rhizosphère de *C. officinalis*, sont des *B. velezensis*, *B. amyloliquefaciens* et *B. subtilis* subsp. *spizezenii*, en outre de l'espèce précédemment citée (tableau 5). Il est à signaler que cette dernière n'a été constatée en tant qu'elle, qu'après l'identification moléculaire.

Tableau 5 Identification des souches de *Bacillus* à activité antifongique par analyses d'ADN -16S et de *gyrase-A* et les numéros d'accèsion fournis par Genbank.

Isolats	Identification	Numéros d'accèsion de l'ADN-16S	Numéros d'accèsion de <i>gyrase-A</i>
Rh2. A'	<i>B. amyloliquefaciens</i>	KC341736	KC-204920
Rh2. F	<i>B. amyloliquefaciens</i>	KC341737	KC-204921
ET	<i>B. amyloliquefaciens</i>	KC341738	KC-204922
SEL	<i>B. amyloliquefaciens</i>	KC341739	KC-204923
6SEL	<i>B. atrophaeus</i>	KC341740	KC-204925
9SEL	<i>B. mojavensis</i>	KF156784	KF156786
SI	<i>B. amyloliquefaciens</i>	KF156785	KC-204924
9SRTS	<i>B. amyloliquefaciens</i>	KC341744	KC462185
18SRTS	<i>Paenibacillus polymyxa</i>	KC341745	
23SRTS	<i>B. subtilis</i> subsp. <i>spizezenii</i>	KC341746	KC312601
26SRTS	<i>B. velezensis</i>	KC341746	KC312602

4.5- Evaluation du taux de sporulation des souches sélectionnées

Les résultats du test de sporulation de l'ensemble des souches sélectionnées sur le milieu « opt » ont montré que la souche *B. mojavensis* produit à la fin de fermentation, une meilleure

concentration de spores atteignant 27×10^8 spores/ml, suivie par le *B. amyloliquefaciens* SEL (25×10^8 spores/ml), *B. atrophaeus* ($22,7 \times 10^8$ spores/ml) et enfin *B. velezensis* qui produit 20×10^8 spores/ml. En revanche, et dans les conditions testées, le taux de sporulation chez *P. polymyxa* n'a pas été satisfaisant (tableau 6).

Tableau 6 Taux de sporulation des souches de *Bacillus* sur le milieu opt.

Isolats	Taux de sporulation ($\times 10^8$ spores/ml)
<i>B. amyloliquefaciens</i> (Rh2. A')	22,7 \pm 0.6
<i>B. amyloliquefaciens</i> (Rh2. F)	24,7 \pm 0.6
<i>B. amyloliquefaciens</i> (ET)	24,3 \pm 0.6
<i>B. amyloliquefaciens</i> (SEL)	25,0 \pm 2.0
<i>B. amyloliquefaciens</i> (SI)	24,0 \pm 1.0
<i>B. atrophaeus</i> (6SEL)	22,0 \pm 3.0
<i>B. mojavenis</i> (9SEL)	27,0 \pm 1.0
<i>B. amyloliquefaciens</i> (9SRTS)	25 \pm 1
<i>P. polymyxa</i> (18SRTS)	ND
<i>B. subtilis</i> subsp. <i>spizezenii</i> (23SRTS)	8 \pm 2
<i>B. velezensis</i> (26SRTS)	20 \pm 1

4.6- Production des substances antifongiques

4.6.1- Enzymes dégradant la paroi des cellules fongiques

Les souches bactériennes étudiées développent des comportements différents par rapport à l'activité enzymatique ciblée. En effet, les résultats portés dans le tableau 7 montrent que seules les souches de *B. amyloliquefaciens* étudiées sont capables de produire de la protéase. Cependant, l'activité cellulasique est observée chez toutes les espèces de *Bacillus* étudiées exceptant le *B. atrophaeus* qui est le seul à produire de la chitinase.

Tableau 7 Production des enzymes dégradant la paroi des cellules fongiques (protéase, cellulase, chitinase) par les isolats sélectionnés

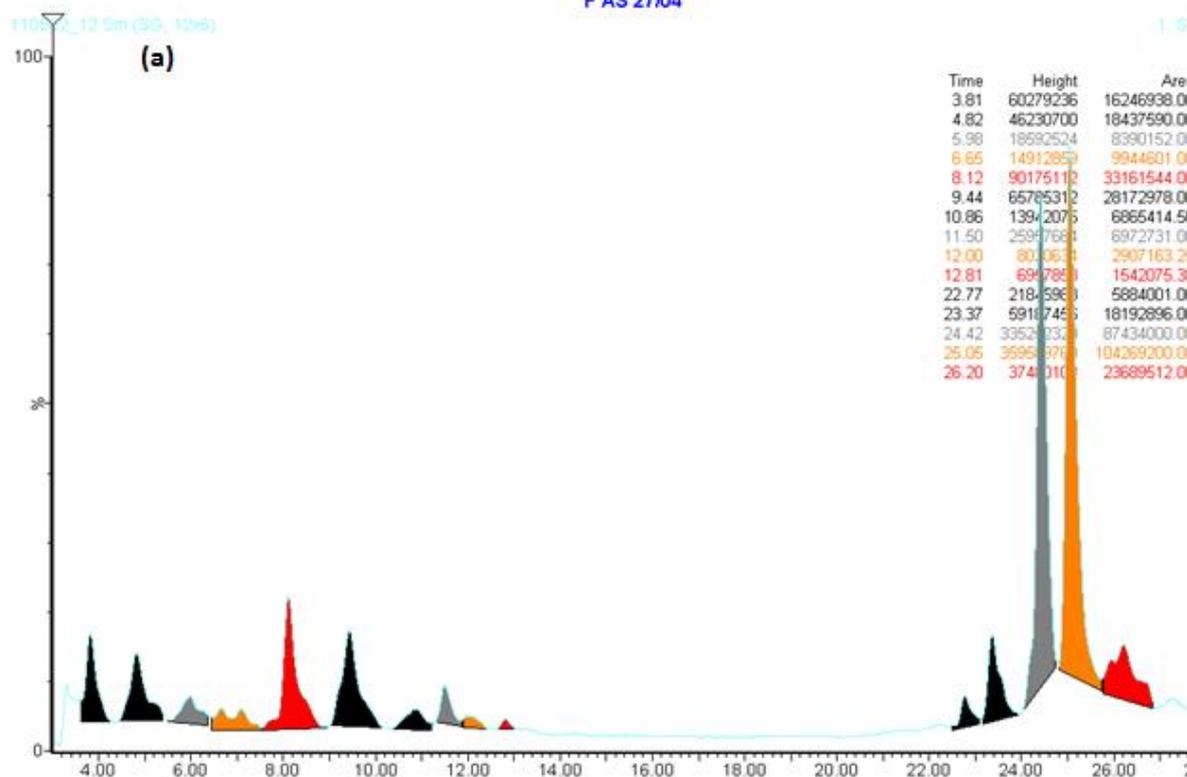
Isolats	Protease	Cellulase	Chitinase
<i>B. amyloliquefaciens</i> (Rh2. A')	+	+	-
<i>B. amyloliquefaciens</i> (Rh2. F)	+	++	-
<i>B. amyloliquefaciens</i> (ET)	+	++	-
<i>B. amyloliquefaciens</i> (SEL)	+	++	-
<i>B. amyloliquefaciens</i> (SI)	+	+	-
<i>B. atrophaeus</i> (6SEL)	-	-	+
<i>B. mojavensis</i> (9SEL)	-	+++	-
<i>B. amyloliquefaciens</i> (9SRTS)	+	++	-
<i>P. polymyxa</i> (18SRTS)	-	++	-
<i>B. subtilis</i> subsp. <i>spizezenii</i> (23SRTS)	-	+	-
<i>B. velezensis</i> (26SRTS)	-	++	-

* Activité enzymatique : (-) absence d'activité ; (+) activité modérée ; (++) activité importante ; (+++) activité forte.

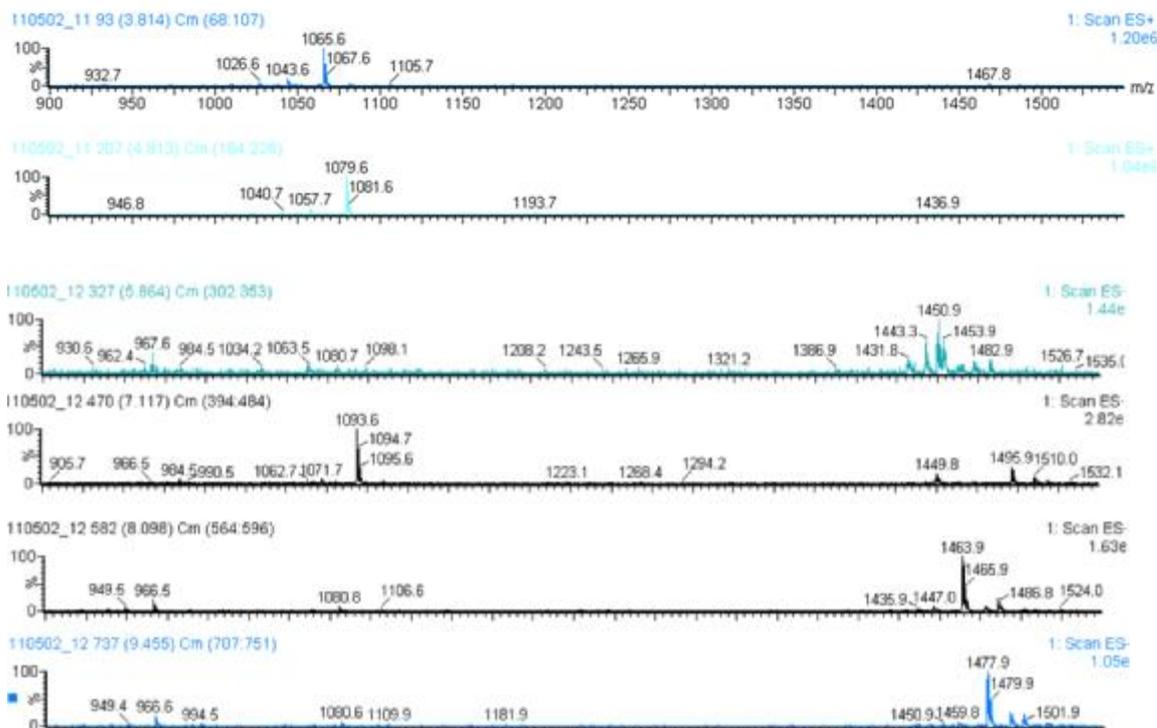
4.6.2- Les lipopeptides (LPs)

La capacité des souches de *Bacillus* à produire les lipopeptides (LPs) a été mise en évidence par des analyses de spectrométrie de masse couplée à l'HPLC (LC.MS), en utilisant le système HPLC «Waters Alliance 2695/diode array detector», couplé à «Waters SQD mass analyzer». La détermination de la nature des pics HPLC obtenus a été réalisée par comparaison des rapports masse/charge (M/Z) des différents ions moléculaires (MNa⁺ pour les iturines et les surfactines et MH⁺ pour les fengycines) aux rapports M/Z des ions lipopeptidiques précédemment décrits dans la littérature. La figure 2 illustre un exemple de profil des analyses LC.MS de la souche *B. amyloliquefaciens* (Rh₂.F), comprenant les pics chromatographiques (figure 2.a) et les spectres de masse qui leur sont correspondant (figure2.b).

F AS 2704



(b)



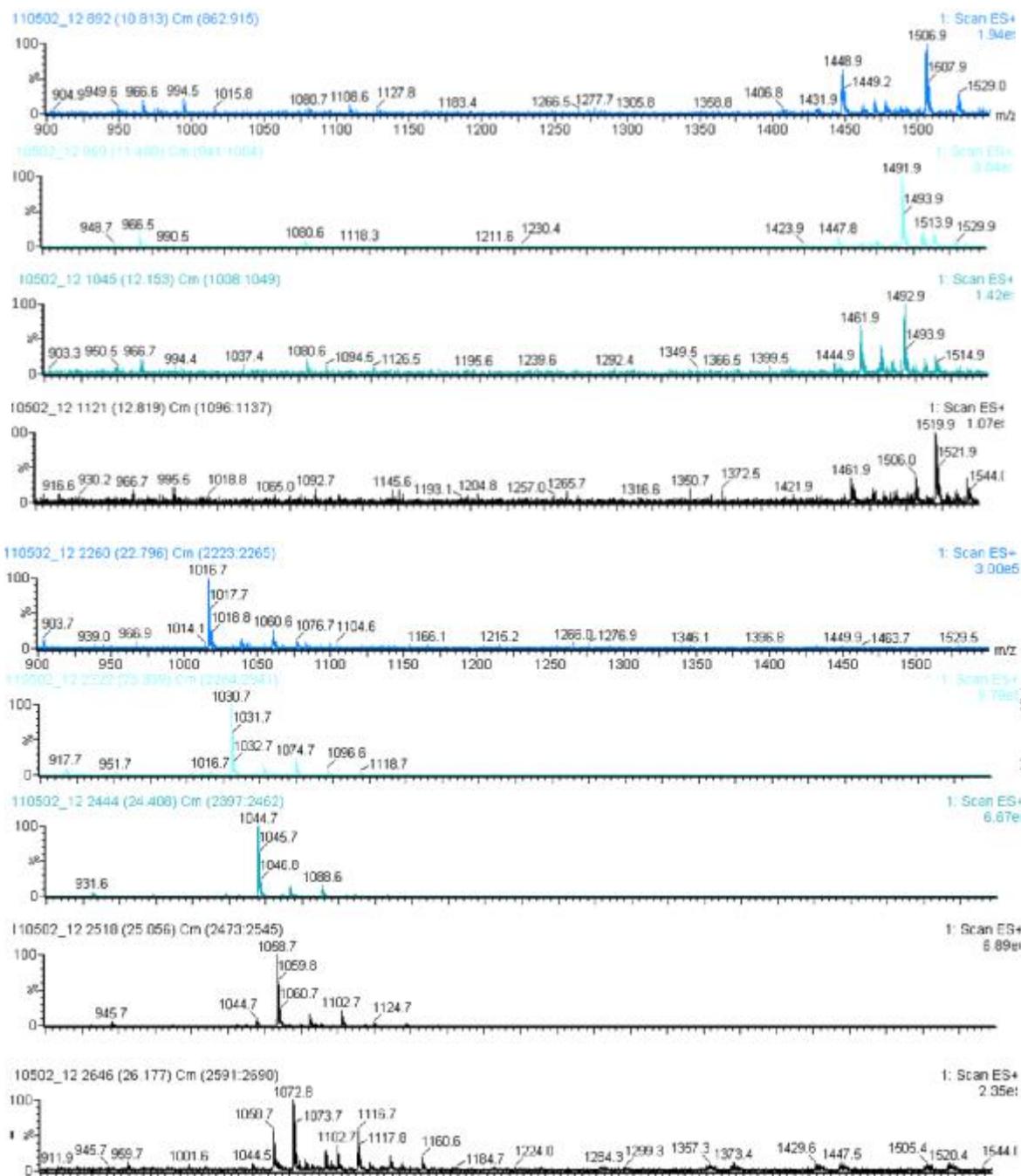


Figure 2 Analyse des lipopeptides produits par la souche *B. amyloliquefaciens* (Rh2.F), par LC.MS (a) Profil chromatographique de production des lipopeptides, iturines (4min, 5min et 7min), fengycines (8min à 13min), surfactines (23min à 26 min). (b) Spectres de masse montrant les M/Z des différentes molécules lipopeptidiques ionisées : iturines (MNa^+ =1065.6, 1079.6 et 1093.6) ; fengycines (MH^+ = 1463.9, 1477.9, 1448.9, 1491.9, 1461.9) et surfactines (1461.9, 1030.7, 1044.7, 1058.7, 1072.8). **Les ions MH^+ (1450.90, 1506. 9, 1492. 9, 1519.9) peuvent correspondre à des nouvelles variantes de fengycines**

Les résultats d'analyses LC-MS ont montré que les souches de *B. amyloliquefaciens* isolées d'Ain M'lila et Oued El Athmanya et la souche *B. velezensis* (26SRTS) isolée de la rhizosphere de *C. officinalis*, produisent les trois familles de lipopeptides, en l'occurrence, iturine A et bacillomycine D C₁₄-C₁₆ (variantes de la famille des iturines); surfactines C₁₂-C₁₆, fengycines A et/ou B C₁₄-C₁₉ (variantes de la famille des fengycines). En revanche, la production des fengycines est absente dans le cas des souches *B. subtilis* subsp. *spizezenii* (23SRTS), *B. amyloliquefaciens* (9SRTS) et *B. atrophaeus* (6SEL). Enfin, la production des surfactines est détectée chez la plupart des souches exceptant le *B. mojavensis* (9SEL) et le *P. polymyxa* (18SRTS) qui ne produit aucune famille des LPs (tableau 8).

Tableau 8 Production de lipopeptides (iturines, fengycines et surfactines) par les souches sélectionnées.

Souches	Iturine	Fengycine	Surfactine
<i>B. amyloliquefaciens</i> (Rh2. A')	It A +*	+	+
<i>B. amyloliquefaciens</i> (Rh2. F)	It A +	+	+
<i>B. amyloliquefaciens</i> (ET)	It A +	+	+
<i>B. amyloliquefaciens</i> (SEL)	-	+	+
<i>B. amyloliquefaciens</i> (SI)	It A +	+	+
<i>B. atrophaeus</i> (6SEL)	-	-	+
<i>B. mojavensis</i> (9SEL)	-	-	-
<i>B. amyloliquefaciens</i> (9SRTS)	It A	-	+
<i>P. polymyxa</i> (18SRTS)	-	-	-
<i>B. subtilis</i> subsp. <i>spizezenii</i> (23SRTS)	It A +	-	+
<i>B. velezensis</i> (26SRTS)	B.D +	+	+

* Variantes d'iturines produites par les souches étudiées. It A: Iturine A; B.D: Bacillomycine D.

Il est très intéressant de signaler que des pics additionnels ayant de nouvelles masses proches de celles des MH⁺ de fengycines conventionnelles sont détectés chez les *B. amyloliquefaciens* (Rh2.A', ET, Rh2.F et SI), isolés du lac salé et de la source thermique. Ces masses peuvent correspondre à des molécules de fengycines conventionnelles dont l'acide gras est insaturé ou carrément à **des nouvelles variantes de fengycines**, ce qui doit être confirmé par des analyses plus approfondies de spectrométrie de masse. La masse MH⁺ des

fengycines conventionnelles et celle de nouvelles variantes détectées dans ce travail sont résumées dans le tableau 9.

Tableau 9 Masse MH^+ des différents homologues de fengycines détectés chez les souches *B. amyloliquefaciens* (Rh2.A', ET, Rh2.F et SI), isolées des environnements divers de l'Est d'Algérie.

MH ⁺ des fengycines conventionnelles	MH ⁺ des fengycines dont l'acide gras est insaturé	MH ⁺ de nouvelles variantes de fengycines
1435,8/1449,8/1463,8/ 1477,8/ 1491,8/ 1505,8	1461,9/1490/1447,8/ 1461,8/ 1476/ 1489,9/ 1504/1489,9	1481,9/1495,9/1490,9/146 5/1479/1492, 9/1450,9/1506, 9/ 1519,9/1433/1461/ 1476,9/ 1447/ 1517,9

4.6.3- Détermination de la nature de nouvelles variantes de fengycines

La souche *B. amyloliquefaciens* (ET) a été choisie au hasard pour déterminer la nature des nouvelles variantes de fengycines qu'elle produit. Pour ce faire, le système HPLC «nanoHPLC Dionex Ultimate 3000», couplé à un «Amazon speed ETD mass spectrometer» a été utilisé pour effectuer des analyses de spectrométrie de masse couplée à l'HPLC (LC-MS). En complément, une deuxième analyse (LC-MS.MS) a été réalisée en utilisant la fragmentation de type CID (collision-induced dissociation). La première analyse détermine la masse entière des molécules de fengycine ionisées (MH^+ et MH^{++}), alors que la deuxième permet de les fragmenter en formant ce qu'on appelle des ions diagnostics. Ces derniers sont formés selon le schéma de fragmentation mentionné ci-dessous (schéma A). La masse des différents ions diagnostics précise ainsi **le type de fengycine et la longueur de la chaîne de l'acide gras.**

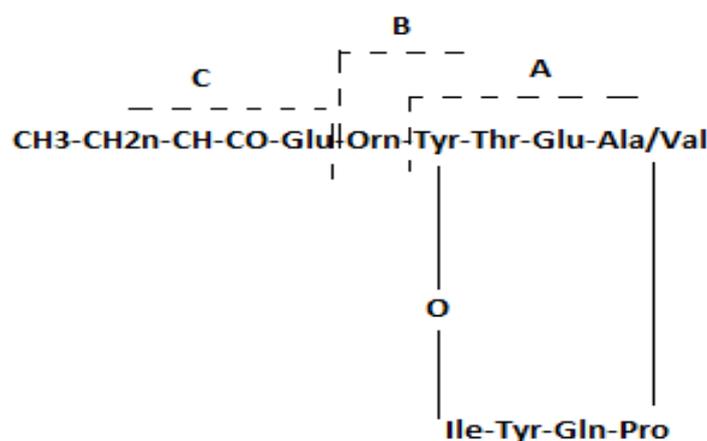


Schéma A Schéma de fragmentation des molécules de fengycine lors des analyses spectrométriques, de type LC-MS.MS (CID).

Les analyses LC-MS ont permis de déceler la présence des masses MH^+ et MH^{++} équivalentes et d'autres proches de celles des fengycines conventionnelle, confirmant ainsi la capacité de la souche *B. amyloliquefaciens* (ET) de produire une large diversité d'homologues de fengycines **comprenant de nouvelles variantes, comme mentionné précédemment.**

L'interprétation des spectres de masse de la souche *B. amyloliquefaciens* (ET) obtenus par LC-MS.MS(CID), décele la présence de cinq couples d'ions diagnostics (A/B) qui correspondent à cinq types de fengycines, en l'occurrence, fengycine A (921.56/1080.69); fengycine B (949.62/1108.71); fengycine S (980. 9/1094. 9); **fengycine X (923.65/1065.72)** et **fengycine Y (979.76/1093.76)** (tableau 10). Les trois premiers types de fengycines ont été déjà décrits dans la littérature alors que, **les deux derniers sont cités pour la première fois dans ce travail** (figure 3, 4).

Il est à signaler que la majorité des homologues de fengycines produits sont à chaîne d'acide gras insaturé, comme mentionné dans le tableau 10 qui rassemble tous les résultats obtenus par LC-MS (masses MH^+ et MH^{++} des fengycines détectées) et par MS.MS (CID) (masses des ions diagnostics). Par ailleurs, **des nouveaux homologues de fengycines A et B, ayant des chaînes d'acides gras à 20 et à 18 atomes de carbone, respectivement, sont décrits pour la première fois dans le présent travail** (tableau 10).

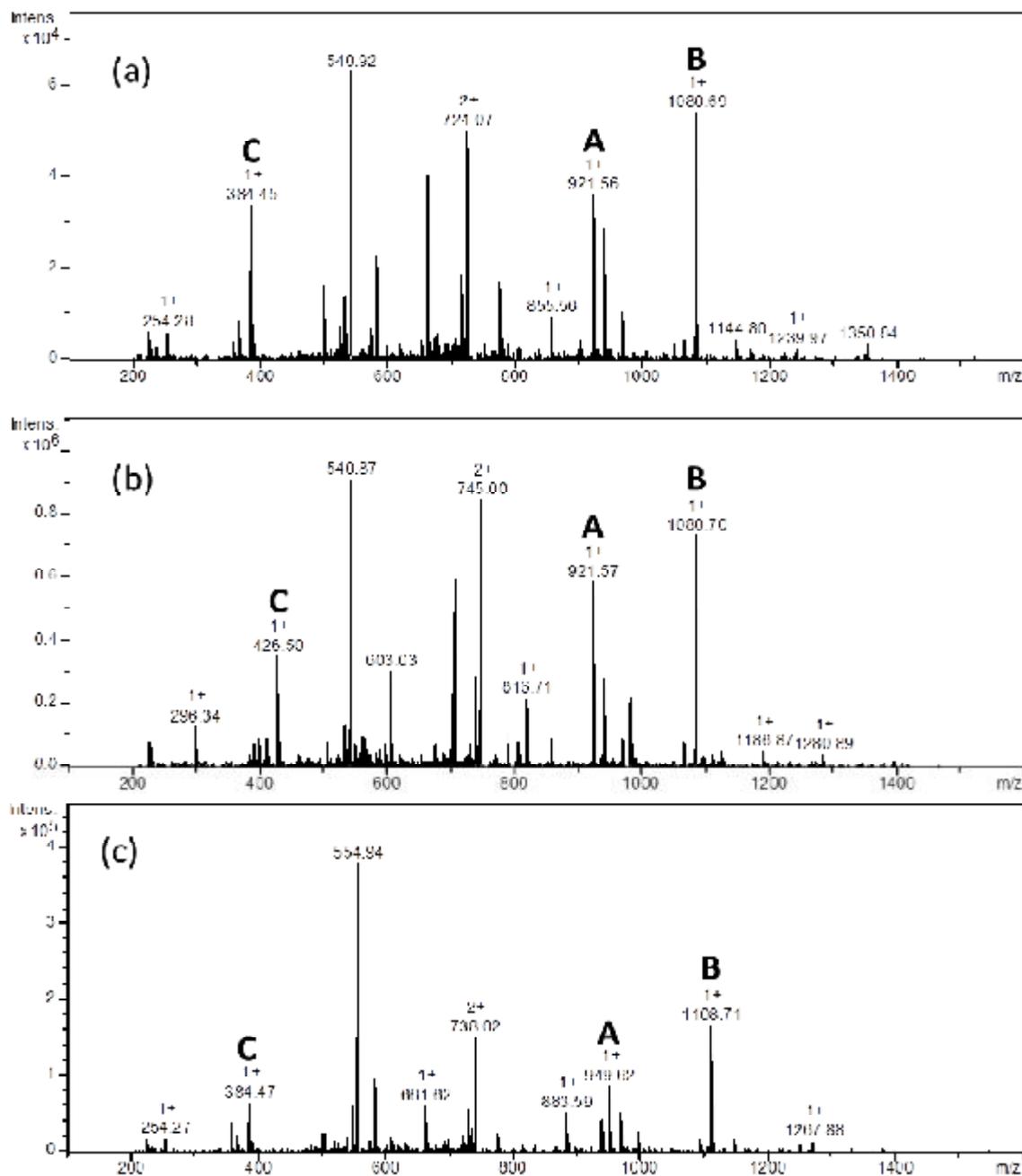


Figure 3 Spectres MS/MS (CID) des fengycines conventionnelles, montrant les ions diagnostics A, B et C: (a) fengycin A-C16; (b) fengycin A-C19 et (c) fengycin B-C16.

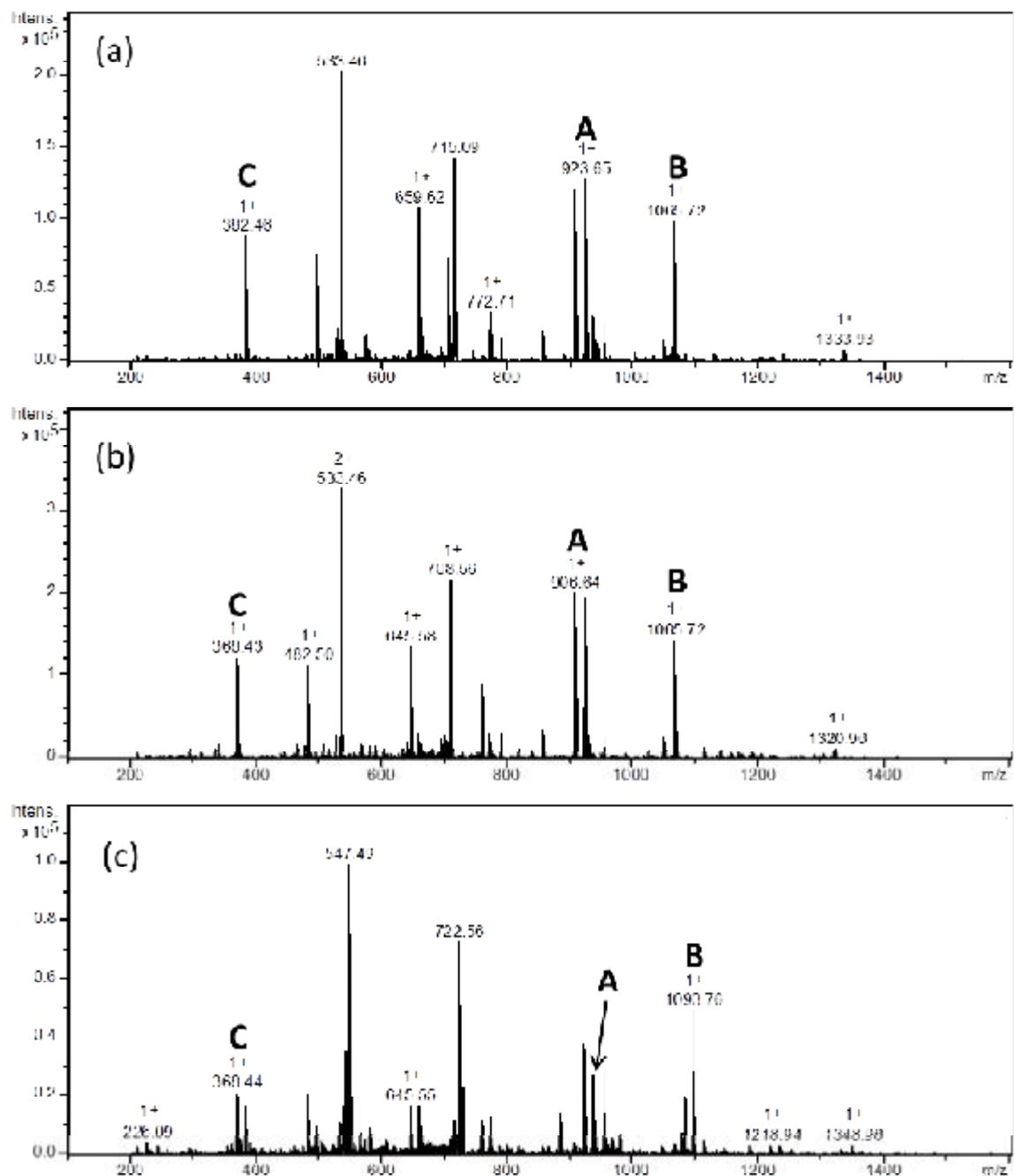
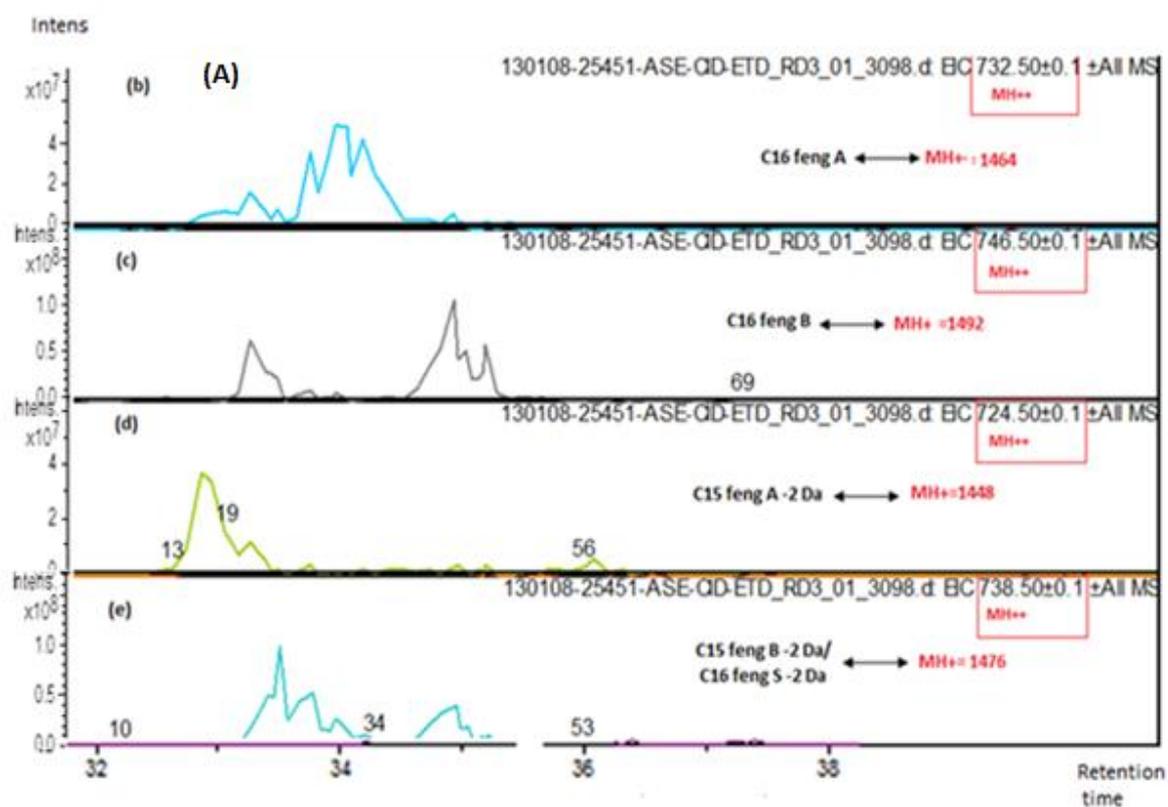


Figure 4 Spectres de masse MS.MS (CID) de nouvelles variantes de fengycines, montrant les ions diagnostics A, B et C: (a) **fengycin X- C16-2D**; (b) **fengycin X -C15-2D** et (c) **fengycin Y-C15-2D**.

Tableau 10 Variantes de fengycines produites par le *B. amyloliquefaciens* (ET), isolé du lac salé d'Ain M'lila.

Temps de rétention	MH ⁺⁺	MH ⁺	Ion diagnostic (C)	Ion diagnostic (B)	Homologues de fengycines
31,5 min	732,46	1463,9	384,4	1080, 9	C16 feng A
32,5 min	746,48	1491,9	384,4	1108, 9	C16 feng B
33,7 min	724,5	1447,8	368,4	1080, 9	C15 feng A insaturée
34,6 min	731,5	1461,8	382,5	1080, 9	C16 feng A insaturée
35,3 min	738,5	1476	368,4/382,4	1108, 9 /1094, 9	C15 feng B insaturée / C16 feng S insaturée
35,4 min	745,5	1489,9	382,4	1080, 9/1108, 9	C18 feng A insaturée / C16 feng B insaturée
35,4 min	717,03	1433	368,4	1065, 9	C15 feng X insaturée
35,8 min	753,5	1506	426,5	1080, 9	C19 feng A
36,6 min	731	1461	368,4	1093, 9	C16 feng Y insaturée
36,9 min	739	1477	368 / 382 /396	1065, 9/1093, 9	C15, C16 et C17 Feng X/ Feng Y insaturée
36,9 min	752,5	1504	396	1080, 9/ 1108, 9	C19 feng A / C17feng B insaturée
37 min	724	1447	382,4	1065, 9	C16 feng X insaturée
38,2 min	745,5	1489,9	410,5	1080, 9/1108, 9/	C18 feng A insaturée / C16feng B insaturée
38,3 min	759,5	1518	410,5	1080, 9/1108, 9	C20 feng A insaturée / C18feng B insaturée

Les chromatogrammes obtenus par les analyses LC-MS montrent que les nouvelles variantes de fengycines sont minoritaires, représentant ainsi une intensité de 10^6 versus 10^{7a8} pour les fengycines conventionnelles (figure 5).



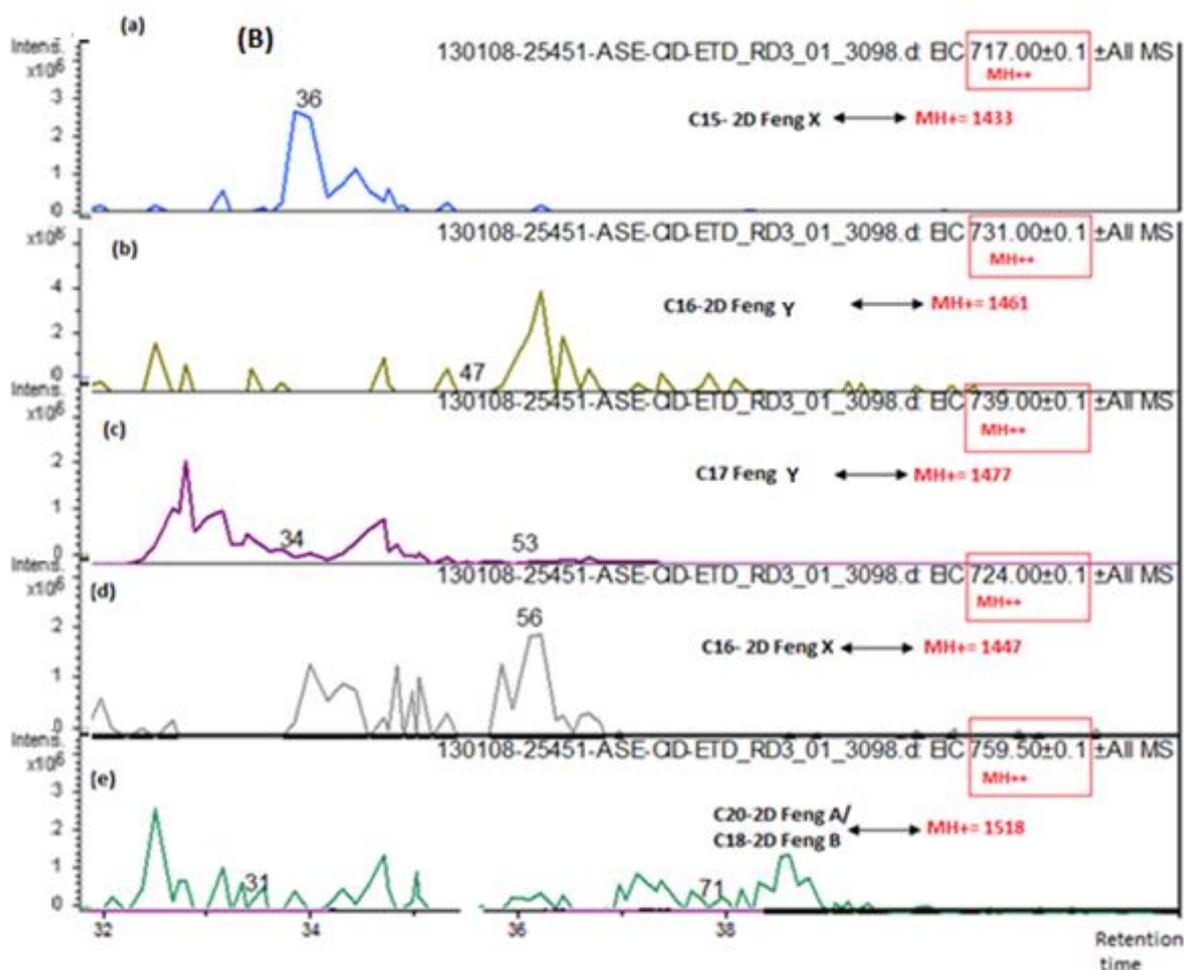


Figure 5 Exemples de chromatogrammes obtenus par les analyses LC.MS des extraits lipopeptidiques de la souche ET (*B. amyloliquefaciens*). (A) fengycines conventionnelles ($MH^+ = 1464, 1492, 1448$ et 1476). (B) Nouvelles variantes de fengycines, les ions moléculaires mentionnés ici sont ($MH^+ = 1433, 1447$ et 1518).

Les analyses MS.MS (CID) des formes fermées de fengycines donnent une faible information sur la constitution du cycle peptidique. En effet, cette analyse est appliquée sur des formes ouvertes, pour préciser le changement qui a eu lieu dans la chaîne peptidique. L'ouverture du cycle peptidique par traitement des extraits de fengycines avec du KOH (2 M) n'est efficace que sur la C16-2D fengycine A et C16-2D fengycine X.

La figure 6 montre que la séquence ouverte de la C16-2D fengycine X est pratiquement la même que celle de C16-2D fengycine A, sauf que sa partie C-terminale présente une différence de 210.25 Da entre b6 et b8 ou y2 et y4 au lieu de 225.18 Da, comme il est le cas dans la fengycine A. Ceci peut être expliqué par la substitution de l'acide aminé glutamine

(Q) en isoleucine (I) ou leucine (L). Cette mutation doit être la même pour fengycine Y mais par rapport à la fengycine B.

La structure primaire des fengycines conventionnelles et celle de nouvelles variantes, décrite pour la première fois dans ce travail est résumée dans le schéma B.

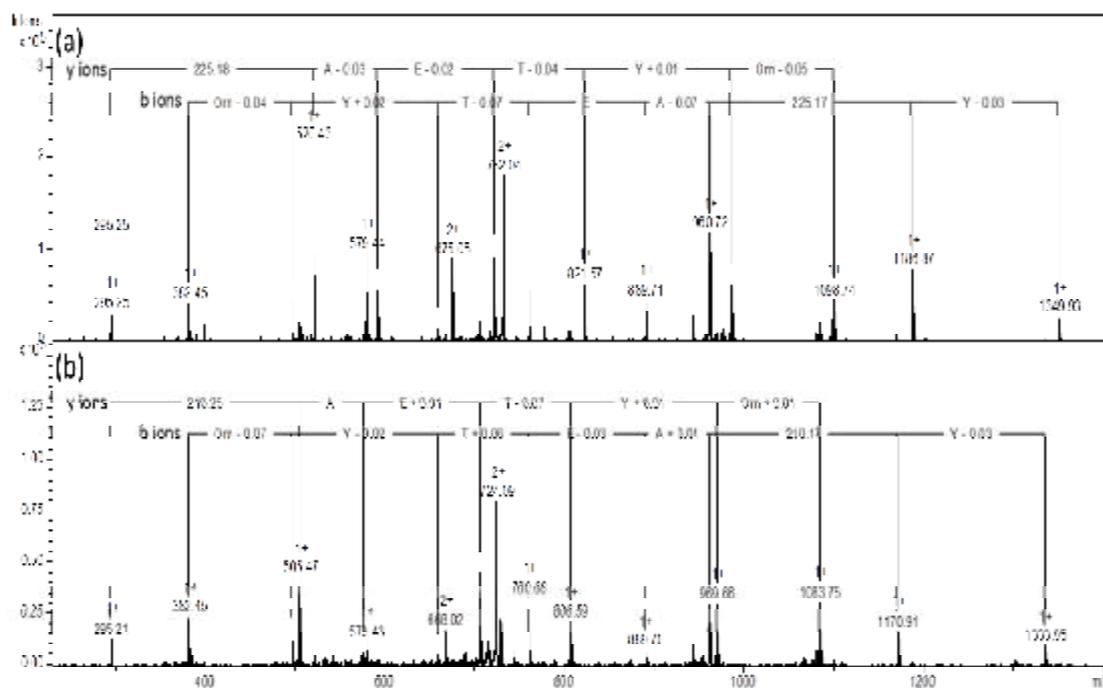


Figure 6 Spectres LC-MS.MS (CID) de la forme ouverte de C16-2 Da fengycine A (a) et C16-2 Da fengycine X (b).

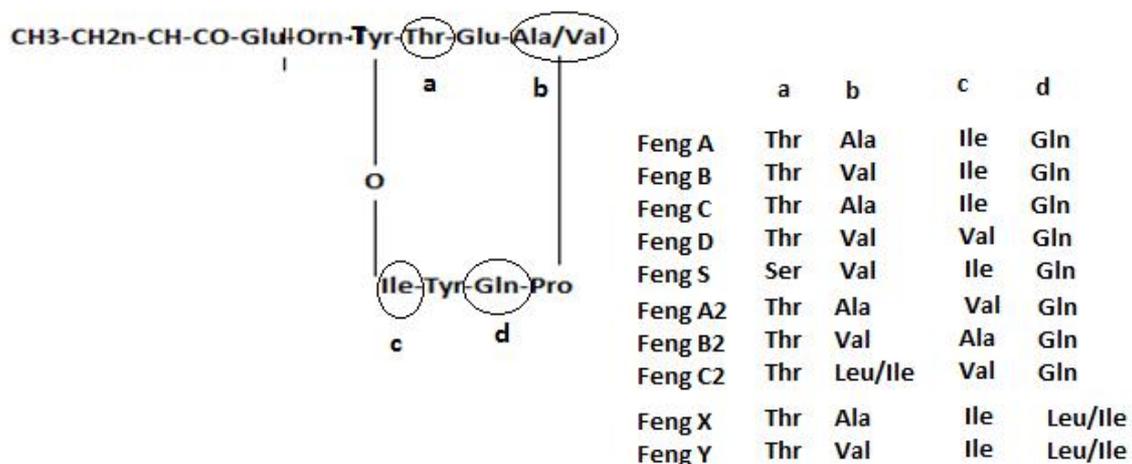


Schéma B Structure primaire des fengycines conventionnelles (A, B, C, D, S, A2, B2, C2) et de nouvelles variantes(X et Y), décrites pour la première fois dans ce travail.

4.7-Tests de production de l'IAA et des siderophores

Toutes les souches de *Bacillus* produisent de petites quantités d'indole 3 acide acétique (IAA) qui varient entre 6 et 14 µg/ml, en outre, ces souches montrent une activité importante de production de siderophores en développant sur milieu CAS des zones jaunes-oranges allant de 7 à 10 mm de diamètre. Par ailleurs, il est constaté que le *P. polymyxa* (18SRTS) produit une concentration largement plus importante d'IAA atteignant 53 µg/ml en comparaison avec les premières souches, en revanche, cet isolat ne produit aucune trace de siderophores (tableau 11).

Tableau 11 Production de l'indole 3 acide acétique (IAA) et des siderophores par les bactéries sélectionnées.

<i>Souches Bacillus</i>	IAA (µg/ml) ^a	Production des siderophores (diamètre de la zone jaune orange, mm) ^b
<i>B. amyloliquefaciens</i> (Rh2. A')	6,5 ± 0,7	+++
<i>B. amyloliquefaciens</i> (Rh2. F)	6,5 ± 0,7	+++
<i>B. amyloliquefaciens</i> (ET)	7,5 ± 0,7	+++
<i>B. amyloliquefaciens</i> (SEL)	9,8 ± 1,8	+++
<i>B. amyloliquefaciens</i> (SI)	6,5 ± 2,8	++
<i>B. atrophaeus</i> (6SEL)	9,5 ± 0,7	++
<i>B. mojavenensis</i> (9SEL)	11,5 ± 0,7	++
<i>B. amyloliquefaciens</i> (9SRTS)	7 ± 2	+++
<i>P. polymyxa</i> (18SRTS)	53 ± 2	-
<i>B. subtilis</i> subsp. <i>spizezenii</i> (23SRTS)	14 ± 1	+++
<i>B. velezensis</i> (26SRTS)	6 ± 1	+++

^a Echelle colorimétrique de production de l'IAA, les données représentent des moyennes ± des erreurs standards. ^b Production des siderophores sur milieu chrom azurol S (- absence de production, + présence de production avec 1-5 mm de diamètre de zone jaune orange, ++ 6-10 mm et +++ > 10 mm).

4.8- L'activité antifongique développée par les bactéries sélectionnées sur les exsudats racinaires

Les interactions les plus complexes et les plus importantes entre les plantes et les microorganismes se situent dans les racines et la partie du sol adjacentes en l'occurrence la rhizosphère. La capacité de certaines souches de *Bacillus* à inhiber la croissance de certaines moisissures phytopathogènes sur milieu solide à base d'exsudats racinaires de diverses plantes, obtenus à différentes températures, est étudiée dans le présent travail.

Les souches *B. amyloliquefaciens* (ET), *B. atrophaeus* (6SEL) et *B. mojavensis* (9SEL) s'avèrent capables de développer un effet antagoniste vis-à-vis d'*Alternaria alternata* sur divers milieux solides, dont la seule source de carbone et d'azote est, principalement, des exsudats racinaires de tomate (*S. lycopersicum*), de courgette (*C. pepo* cv. Xara) et d'haricot (*P. vulgaris* cv. Borlotto), obtenus à 25°C. Le meilleur antagonisme est observé chez les souches *B. amyloliquefaciens* (ET) et *B. atrophaeus* (6SEL) sur les exsudats de tomate. En effet, les taux d'inhibition atteignent 56% et 54%, respectivement. En revanche, le *B. atrophaeus* (6SEL), ne manifeste aucun effet inhibiteur contre *A. alternata*, sur les exsudats d'haricot (figure 7).

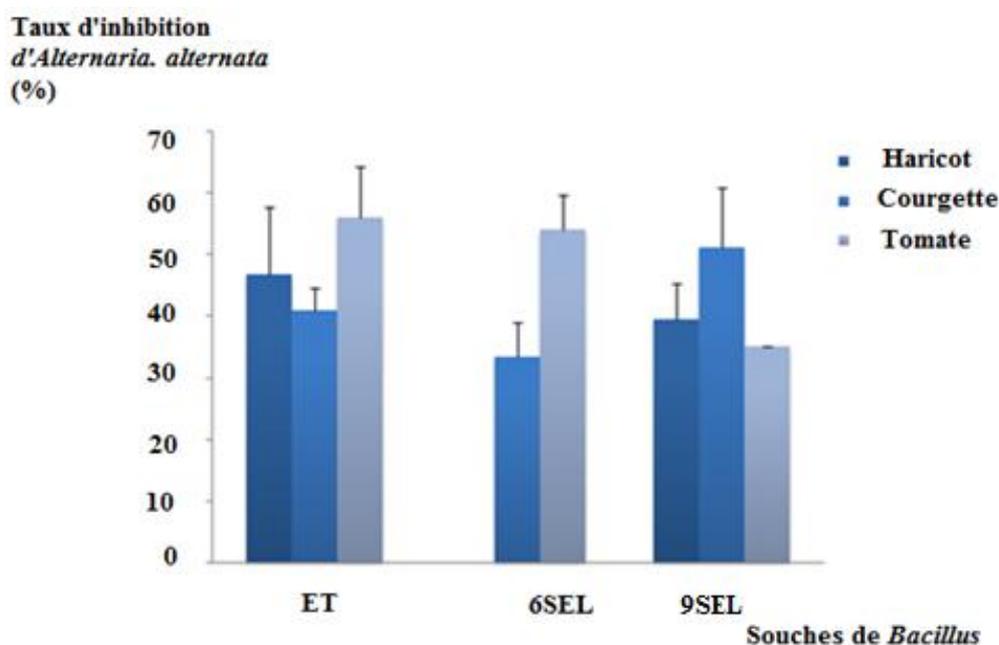


Figure 7 Antagonisme développé par les souches *B. amyloliquefaciens* (ET), *B. atrophaeus* (6SEL) et *B. mojavensis* (9SEL) contre *A. alternata*, sur les exsudats racinaires de tomate, de courgette et d'haricot, obtenus à 20°C.

Par ailleurs, les souches *B. amyloliquefaciens* (9SRTS), *B. subtilis* subsp. *spizizenii* (23SRTS) et *B. velezensis* (26SRTS), développent un effet inhibiteur vis-à-vis de *F. oxysporium* et de *A. alternata*, sur des exsudats de tomates (*S. lycopersicum* cv. Tondo rosso), obtenus à 15°C, 20°C, 28°C et 35°C. Le meilleur taux d'inhibition contre *A. alternata* est observé dans les exsudats de tomate développée à 15°C. En revanche, les exsudats de tomate développée à 35°C représentent les meilleures conditions pour inhiber la croissance de *F. oxysporium* par les souches étudiées. Enfin, le *P. polymyxa* (18SRTS) et le *B. subtilis* subsp. *spizezenii* (23SRTS) n'ont pas d'effet inhibiteur contre *F. oxysporium*, sur les exsudats de tomate développée à 20°C et à 28°C (figure 8).

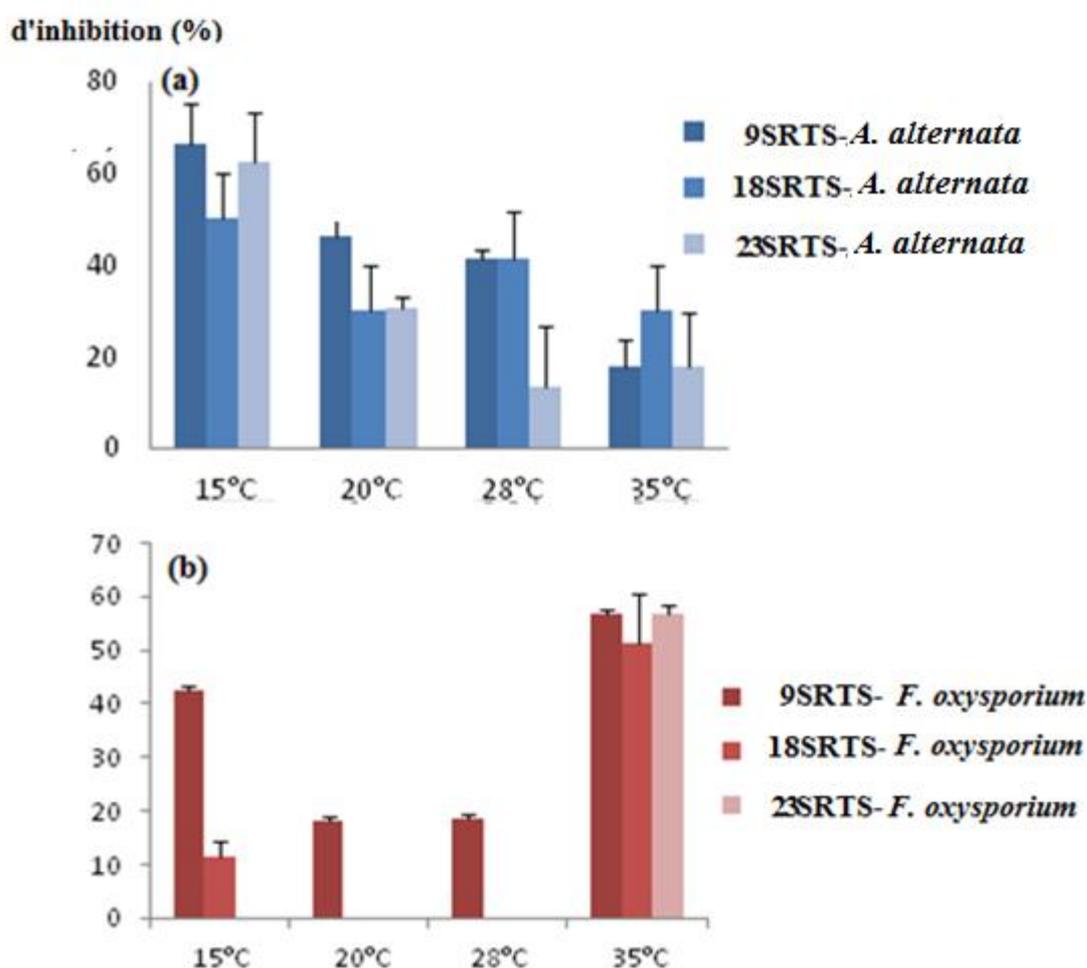


Figure 8 Effet inhibiteur des souches *B. amyloliquefaciens* (9SRTS), *B. subtilis* subsp. *spizizenii* (23SRTS) et *B. velezensis* (26SRTS) vis à vis (a) *A. alternata* et (b) *F. oxysporium*, sur les exsudats de tomate cultivée à différentes températures (15°, 20°C, 28°C et 35°C)

4.9- Production des souches de *Bacillus* à l'échelle industrielle

Dans le but de tester l'éventuelle commercialisation des souches sélectionnées. Certaines bactéries sélectionnées ont fait l'objet de production en fermenteur. En effet, les souches *B.amyloliquefaciens* (9SRTS); *B. atrophaeus* (6SEL) et *B. subtilis* subsp. *spizezenii* (23SRTS), sont produites à l'échelle industrielle dans un bioréacteur de 500 L (Société Artechno, Liège-Belgique). Ces souches produisent à la fin de la durée de fermentation des concentrations importantes de spores variant entre 8×10^9 et 1×10^{10} spores/ml. En outre, l'importance des ces souches réside dans le fait qu'elles résistent à la reformulation des spores en une poudre par lyophilisation. En effet, la concentration de cellules vivantes par gramme de produit lyophilisé est jugée très satisfaisante, et varie de 6×10^9 à $1,2 \times 10^{11}$ cellules/g (tableau 12).

Tableau 12 Evaluation de la DO, de la matière sèche et de la flore totale et sporulée, à la fin de la durée de fermentation des souches de *Bacillus* dans le bioréacteur de 500 L, et estimation de la concentration de cellules vivantes après lyophilisation.

Souches bactériennes	DO/ml	Matière sèche (g/l)	Flore totale (Cellules/ml)	Flore sporulée (spores/ml)	Cellules/g de poudre
<i>B. amyloliquefaciens</i> (9SRTS)	22	4	$1,5 \times 10^{10}$	1×10^{10}	$1,2 \times 10^{11}$
<i>B. subtilis</i> subsp. <i>spizezenii</i> (23SRTS)	24	3,5	9×10^9	$8,5 \times 10^9$	7×10^{10}
<i>B. atrophaeus</i> (6SEL)	20	4	9×10^9	8×10^9	6×10^9

4.10- Tests *in situ* sur le pois chiche

4.10.1- Dans les conditions de pots

4.10.1.1-Variété: CV. Flipe 13 90

En général, le traitement du sol, naturellement infecté par *Sclerotonia sclerotiorum* (données fournies par la station INRA Algérie) et/ou des graines de pois chiches, avec les suspensions de souches ; *B. amyloliquefaciens* (9SRTS), *B. subtilis* subsp. *spizezenii* (23SRTS) et *B.*

atrophaeus (6SEL), à concentration de 10^7 spores/ml, a permis la promotion et la protection des plantes utilisées dans l'expérience (figure 9).



Figure 9 Effet du traitement du sol naturellement infecté par *Sclerotonia sclerotiorum*, avec les suspensions (10^7 spores/ml) de souches *B. amyloliquefaciens* (9SRTS) et *B. subtilis* subsp. *spizezenii* (23SRTS) sur la taille et le taux de maladie des plantes de pois chiche (variété: *CV. Flipe 13 90*), après un mois de semis.

La meilleure protection des plantes de pois chiches (variété : *CV. Flipe 13 90*) est observée dans le lot «sol traité-graines non traitées: ST-GNT». En effet, le pourcentage de feuilles décolorées par plante dans ce lots traités par les souches (9SRTS) et (23SRTS), est significativement ($P < 0.01$) plus bas par rapport au lot témoin (9% et 8%, respectivement, versus 63%). En revanche, la bonne croissance des plantes, est observée dans le lot «sol non traité- graines traitées: SNT-GT» où la taille des plantes atteint 16 et 15cm versus 10cm dans le lot témoin (tableau 13). Enfin, aucune différence significative n'est observée dans le taux de germination des graines de pois chiches, entre les lots traités et le lot témoin.

Tableau 13 Effet des souches *B. amyloliquefaciens* (9SRSTS), *B. subtilis* subsp. *spizezenii* (23SRSTS) et *B. atrophaeus* (6SEL), sur la taille et le taux de maladie des plantes de pois chiche (variété : *CV. Flipe 13 90*), estimés après un moi de semis.

Souches de <i>Bacillus</i>	Taux de maladie			Tailles des plantes (cm)		
	ST-GT	SNT-GT	ST-GNT	ST-GT	SNT-GT	ST-GNT
9SRSTS	40± 5 ^{a*}	36± 5 ^a	9± 4 ^b	14± 1 ^{ab}	16± 1 ^a	13± 0.5 ^b
23SRSTS	61± 6 ^a	42± 10 ^a	8 ±4 ^b	14 ±1 ^a	15± 1 ^a	11±1 ^b
6SEL	14± 6 ^a	46± 5 ^b	18± 4 ^a	14 ±1 ^{ab}	14 ±1 ^a	12± 1 ^b
Témoin	63± 4 ^c	63 ±4 ^c	63 ±4 ^c	10± 0.5 ^c	10 ±0.5 ^c	10± 0.5 ^c

* Différentes lettres dans la même colonne montrent l'effet significatif (P<0.05) des traitements des *Bacillus* par rapport au témoin, alors que les différentes lettres dans la même ligne montre la différence d'effets entre les différents types de traitements réalisés. Plusieurs lots de traitement avec les souches de *Bacillus* ont été effectués sur les graines et/ou sur le sol. **ST-GT** : sol traité-graines traitées/**SNT-GT** : sol non traité- graines traitées/**ST-GNT** : sol traité-graines non traitées/ **Témoin** : sol non traité graines non traitées.

4.10.1.2- Variété : *Mega grain tradind CO. (P) : Kabuli*

Du fait que, la meilleure protection de plantes de pois chiche variété: *CV. Flipe 13 90* est observée dans le lot «sol traité-graines non traitées : ST-GNT », le test *in situ* sur le pois chiche (variété : *Mega grain tradind CO. (P) : Kabuli*) est effectué par le traitement du sol, naturellement infecté par *S. sclerotiorum*, avec des suspensions (10⁷ spores/ml) de souches *B. amyloliquefaciens* (9SRSTS), *B. subtilis* subsp. *spizezenii* (23SRSTS) et *B. atrophaeus* (6SEL). Les résultats obtenus montrent qu'après un mois de semis, seulement, le traitement avec la souche *B. amyloliquefaciens* (9SRSTS) a un effet significatif sur le poids des racines et le taux de protection (figure 10). Du coup, le poids des racines et le taux protection versus le témoin sont 0,31g vs. 0,066g et 41% vs. 74%, respectivement. En revanche, aucun effet significatif (P>0.05) n'est observé sur la taille des plantes. Il est à signaler que l'étude du paramètre «poids des racines», dans cette partie, est effectué grâce à la facilité de manipulation des racines de la variété de pois chiche *Mega grain tradind CO. (P): Kabuli*. Enfin, les traitements effectués n'ont pas d'influence sur le taux de germination des graines du pois chiche, par rapport au lot témoin.

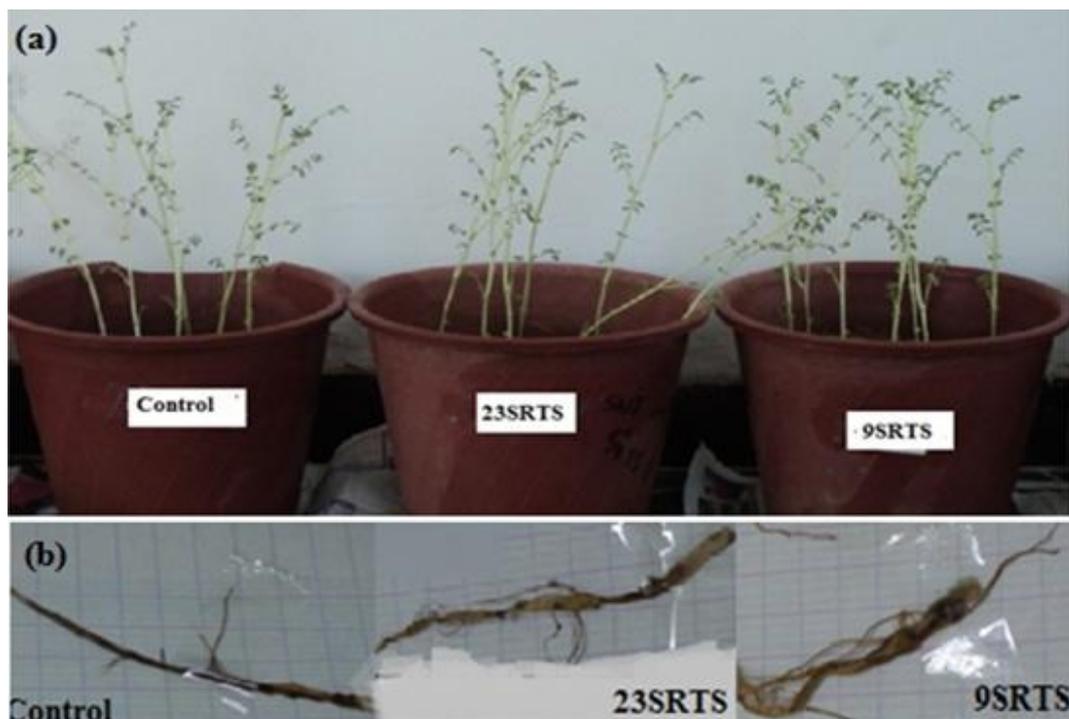


Figure 10 Effet du traitement du sol naturellement infecté par *S. sclerotiorum*, par des suspensions de (10^7 spores/ml) des souches *B. amyloliquefaciens* (9SRTS) et *B. subtilis* subsp. *spizezenii* (23SRTS), sur la croissance et la protection des plantes de pois chiches, variété : *Mega grain tradind CO. (P) : Kabuli* (a) et le développement de leurs racines (b).

4.10.2- En plein champ

Le test *in situ* des souches *B. amyloliquefaciens* (9SRTS), *B. subtilis* subsp. *spizezenii* (23SRTS), *B. atrophaeus* (6SEL) et la souche de référence *B. amyloliquefaciens* (S499), en plein champ est réalisé à Constantine (Algérie) pendant la période de Juillet- Octobre 2013. Pour rappel, les traitements sont effectués par pulvérisation d'un millilitre des suspensions bactériennes (10^7 spores/ml) dans le sol avant le semis des graines de pois chiche (variété : *Mega grain tradind CO. (P) : Kabuli*). Les souches bactériennes testées ont un effet significatif sur la taille des plantes, après 4 semaines de semis. En effet, les plantes atteignent 21.59 ; 23.11 et 20.80 cm dans les lots traité par *B. amyloliquefaciens* (S499), *B. amyloliquefaciens* (9SRTS) et *B. atrophaeus* (6SEL), respectivement, versus 17,63 cm dans le lot témoin. En revanche, après 10 semaines de culture, seulement les plantes du lot traité avec le *B. amyloliquefaciens* (9SRTS) atteignent des tailles significativement importantes par rapport au témoin (tableau 14). Par ailleurs, le taux de germination des graines est meilleur dans les lots traités, par rapport au lot témoin, sauf dans le lot traité par le *B. subtilis* subsp. *spizezenii* (23SRTS) qui ne manifesté aucun effet. En effet, le nombre de plantes dans les lots

traités par *B. amyloliquefaciens* (S499), *B. amyloliquefaciens* (9SRTS) et *B. atrophaeus* (6SEL) atteignent 45, 41 et 37 plantes, respectivement, versus. 27 plantes dans le lot témoin, après 10 semaines de semis (figure 11).

Tableau 14 Moyennes moindres carrée de la taille des plantes ± Erreurs Standards, calculés après 4 semaines et 6 semaines de semis, en plein champ à Constantine (Algérie).

Période	Taille des plantes (cm)				
	S499	9SRTS	6SEL	23SRTS	Témoin
Semaine 4	21,59±0,93 ^{b*}	23,11±0,93 ^b	20,80±1,03 ^b	16,96 ±1,16 ^a	17,63±1,14 ^a
Semaine 10	31,42±0,92 ^{ab}	35,43±0,93 ^c	32,15±0,93 ^b	28,72±1,19 ^a	32,13±1,14 ^b

* Différentes lettres sur la même ligne indiquent une différence significative au seuil de p<0,05



Figure 11 Effet du traitement du sol avec les suspensions des souches *B. amyloliquefaciens* (S499), *B. amyloliquefaciens* (9SRTS) et *B. atrophaeus* (6SEL) sur le taux de germination des graines et la taille des plantes de pois chiches (variété : *Mega grain tradind CO. (P) : Kabuli*), après un moi de semis.

En général, les plantes de pois chiches dans tous les lots ne montrent aucun symptôme maladif pendant toute la période de culture (du semis à la récolte). Cependant, quelques feuilles d'un nombre limité de plantes uniquement jaunissent (figure 12).



Figure 12 Symptômes de maladie qui a apparu dans quelques plantes dans le champ de pois chiche (*variété : Mega grain tradind CO. (P) : Kabuli*).

Les traitements *Bacillus* n'ont pas d'effet significatif ($P > 0.05$) sur la masse des racines et le nombre de fruits par plante, estimé le jour de la récolte. La masse racinaire varie entre 0,87g et 1,36g (tableau 15) et le nombre de fruits par plante est entre 6,47 et 7,04 (tableau 16).

Tableau 15 Moyennes moindres carrés du poids des racines \pm Erreur Standard, estimé après 10 semaines de semis du pois chiche (*variété : Mega grain tradind CO. (P) : Kabuli*).

Souches	Poids des racines (g)				
	S499	9SRTS	6SEL	23SRTS	Témoin
Poids	1,02 \pm 0,16 ^{ab*}	1,08 \pm 0,16 ^{ab}	0,87 \pm 0,16 ^b	1,36 \pm 0,16 ^a	1,09 \pm 0,16 ^{ab}

* Lettres différentes sur la même ligne indiquent une différence significative au seuil de $p < 0,05$

Tableau 16 Nombre moyen de graines de pois chiche par plantes à la récolte.

Lots	Nombre moyen de fruits par plante
Témoin	7,04 ^a \pm 0,66
S499	4,75 ^b \pm 0,50
9SRTS	6,74 ^a \pm 0,56
6SEL	6,47 ^a \pm 0,60
23SRTS	6,96 ^a \pm 0,67

* Lettres différentes sur la même colonne indiquent une différence significative au seuil de $p < 0,05$, les données représentent des moyennes moindres carrés \pm erreurs standards.

Comme les souches de *Bacillus* testées ont un effet positif sur la germination des graines, le rendement de la récolte est meilleur dans les lots traités. Le meilleur rendement est observé dans le lot traité par le *B.amyloliquefaciens* (9SRTS) qui assure une productivité de 153 g

versus 114 g de graines de pois chiches comptées dans le lot témoin. Ces résultats sont équivalents de .6.5 qt versus 5.7qt par hectare (tableau 17).

Tableau 17 Nombre et poids de l'ensemble de graines de pois chiche récoltées

Traitements	S499	9SRTS	6SEL	23SRTS	Témoin
Nombre de graines récoltées	209	236	194	167	176
Poids du pois chiche récolté (g)	136	153	126	108	114

Discussion

5- Discussion

L'expansion rapide de la population mondiale que la terre a connue pendant le XXe siècle a conduit à l'apparition de la révolution agricole qui a fait appel à l'utilisation intensive des organismes génétiquement modifiés (OGM), des engrais et des pesticides chimiques (Cartillier, 1977). Ceci a provoqué beaucoup de nuisances et d'effets négatifs, sur l'environnement et par conséquent sur la santé de l'homme. (Bruinsma, 2009 ; Tilman *et al.*, 2002).

L'agriculture biologique a été adoptée comme solution alternative à l'agriculture intensive, dans le but de diminuer les risques liés à l'usage des pesticides. Il s'agit d'une politique agraire qui exclut l'utilisation des produits phytosanitaires chimiques et utilise des traitements naturels dits « Biopesticides » (COLEACP, 2011). Le genre *Bacillus* appartient au groupe de rhizobactéries promotrices de la croissance des plantes (PGPRs : plant growth promoting rhizobacteria), largement utilisées en agriculture comme agents naturels de biocontrôle (McSpadden- Gardener, 2004).

La caractérisation des bactéries du genre *Bacillus*, pour leur capacités de promotion et de protection des plantes, *in vitro* et *in situ*, a été réalisée sur des souches isolées de la rhizosphère de diverses cultures agricoles (Beneduzi *et al.*, 2008; Pamela *et al.*, 2010 ; Aris *et al.*, 2011). En revanche, les souches de *Bacillus* étudiées dans le présent travail, sont isolées des environnements divers de l'Est d'Algérie, à savoir : l'eau du lac salé d'Ain M'lila et la rhizosphère d'une plante située à sa proximité ; l'eau de la source thermale d'Oued El Athmanya et le sol situé à sa proximité et la rhizosphère de la plante médicinale *Calendula officinalis*, cultivée en serre dans la région de Setif. Les sites d'échantillonnage sont choisis par rapport à leur importance. En effet, les milieux particuliers explorés dans cette étude constituent une source écologique importante d'isolement des microorganismes résistants, ayant des caractéristiques phénotypiques et génotypiques particulières comme il a été préconisé par De Carvalho et Pedro, (2010); Dib *et al.*, (2009) qu'ont exploré des milieux similaires. Par ailleurs, la plante *C. officinalis* est une herbe médicinale importante, menacée par des pertes significatives causées par diverses moisissures phytopathogènes (Muley *et al.*, 2009 ; Pieta,1991).

Il est intéressant de noter que, l'ensemble des échantillons du lac salé et de la source thermale, prélevés dans ce travail, appartiennent à des écosystèmes extrêmes. En effet, L'interprétation des valeurs de la conductivité électrique (CE), a permis de montrer que l'eau du lac salé possède 17.970 mS/ cm, le sol environnant du lac salé englobe 8. 93 mS/ cm et le sol environnant de la source thermale renferme 9.60 mS/ cm, ce qui prouve qu'ils sont extrêmement salés, selon la classification de Richard. (1969). Par ailleurs, la température de l'eau de la source thermale d'Oued El Alathmanya est très élevée, atteignant ainsi 80°C (Leghlimi, 2013). En complément, les échantillons du sol prélevés de ces milieux extrême contiennent un taux négligeable de matières organique en comparaison avec le sol prélevé de la rhizosphere de la plante *C. officinalis*.

Le genre *Bacillus* représente un large nombre de microorganismes communément isolés du sol et du sol rhizosphériques (Liu *et al.*, 2010 ; McSpadden- Gardener, 2004). En effet, l'exploration des échantillons, récoltés dans le présent travail, a abouti à l'isolement de 39 isolats de *Bacillus* repartis sur les différents sites investis. Neuf souches sont isolées du site d'Ain M'lila, quatre du site d'Oued El Athmanya et vingt six de la rhizosphère de *C. officinalis*. La présence des bactéries formatrices d'endospores (endospores forming bacteria) dont le genre *Bacillus* fait partie, dans les lacs salés, les sources thermales et la rhizosphère de certaines plantes médicinales, a été précédemment citée par quelques auteurs. Ainsi, Ebrahiminezhad *et al.* (2011) ont isolé à partir du lac salé de Maharloo des souches appartenant à *Bacillus endophyticus*, *Bacillus thuringiensis*, *Bacillus pumilus*, *Bacillus simplex*, *Bacillus amyloliquefaciens*, *Bacillus vallismortis*, *Bacillus aquimaris* et *Paenibacillus sp.* En outre, les souches bactériennes, *Anoxybacillus flavithermus*, *Geobacillus stearothermophilus* et *Bacillus licheniformis* ont été isolées à partir de la source thermale Savusa de Fiji (Vinay, 2008). Enfin, Köberl *et al.* (2012) ont révélé la présence des souches de *Bacillus sp.* et *Paenibacillus sp.* dans la rhizosphere d'un ensemble de plantes médicinales, incluant *Matricaria chamomilla*, *Calendula officinalis* et *Solanum distichum*.

Le test d'antagonisme effectué dans le présent travail, sur PDA, a permis de sélectionner onze isolats développant une activité antifongique vis-à-vis de certaines moisissures phytopathogènes en l'occurrence : *Alternaria alternata*, *Aspergillus niger*, *Botrytis cinerea*, *Cladosporium cucumerinum*, *Fusarium oxysporium* et *Fusarium sp.* Plusieurs études ont décrit les effets antifongiques, *in vitro*, des souches de *Bacillus sp.* vis à vis d'une panoplie de

moisissures phytopathogènes (Schippers *et al.*, 1992, Jongsik et Kyung, 2000 ; Gong *et al.*, 2006 ; Ongena *et al.*, 2007).

Le calcul de taux d'inhibition de la croissance fongique par les isolats sélectionnés réalisé à titre d'exemple, sur *F. oxysporium* et *B. cinerea*, a permis de constater que sa valeur varie entre 39% et 84% suivant l'isolat. Sur la même idée Toure *et al.* (2004) ont trouvé que le taux d'inhibition de la croissance de *F. oxysporium* et *B. cinerea* par la souche *B. amyloliquefaciens* (GA1) était 58% et 70%, respectivement, et ceci révèle **l'importance de certaines des souches sélectionnées dans ce travail.**

Les tests d'identification préliminaires, morphologique et physiologique des isolats sélectionnés, ont confirmé que tous les isolats appartiennent au genre *Bacillus*. Néanmoins, l'identification moléculaire des isolats par l'analyse d'ADN *16S* a montré qu'un des isolats n'appartient pas au genre *Bacillus* comme préconisé mais, il représente *Paenibacillus polymyxa*. Les autres isolats représentant le genre *Bacillus* appartiennent en réalité au groupe *Bacillus subtilis* qui englobe plusieurs espèces. En complément, l'analyse des séquences de *gyrase A* distingue ces espèces les unes des autres. De ce fait, les bacilles isolés d'Ain M'lila sont identifiés comme étant *B. amyloliquefaciens*, ceux isolés d'Oued El Athmanya appartiennent aux espèces, *B. amyloliquefaciens*, *B. atrophaeus* et *B. mojavensis*. Enfin, les bactéries isolées de la rhizosphère de *C. officinalis*, sont des *B. velezensis*, *B. amyloliquefaciens* et *B. subtilis subsp. spizizenii*, en outre de l'espèce précédemment citée.

Sous des conditions de limitation de nutriments, le groupe "*Bacillus subtilis*" entame un processus de différenciation qui convertit la forme végétative des cellules en spores. Cette forme résiste aux différents types de stress physicochimique, ce qui facilite leur production et leur formulation industrielle en un produit stable (Errington, 2003). Le genre *Bacillus* et les membres du groupe *B. subtilis* en particulier, constituent de bons candidats pour diverses applications biotechnologiques, pharmaceutiques, agricoles et agroalimentaires (Senesi *et al.*, 2004). Dans cette étude, la production des spores de souches de *Bacillus* en fiole dans des conditions non optimisées de sporulation, ont permis de constater que les taux de sporulation varient entre 2.2×10^9 et 2.7×10^9 spores/ml. Dans des conditions optimales de production de spores, en fiole, Bing-Lan et Yew-Min. (1998), ont enregistré un taux de sporulation atteignant 8.35×10^8 spores/ml chez *B. thuringiensis* (YMB 96-1988). Par ailleurs, et dans un autre travail *B. subtilis* (WHK-Z12) produit en fin de culture $1,52 \times 10^{10}$ spores/ml (Chen *et al.*, 2010).

Le phénomène d'antibiose a été observé *in vitro*, chez toutes les souches de *Bacillus* sélectionnées dans ce travail. Siddiqui. (2005) ont lié ce phénomène à plusieurs mécanismes, en l'occurrence, la sécrétion des enzymes dégradant la paroi des cellules microbiennes (cell-wall degrading enzymes) et des substances antimicrobiennes; la compétition pour les nutriments et la combinaison de tous ces mécanismes.

Dans le présent travail, seules les souches de *B. amyloliquefaciens* étudiées sont capables de produire de la protéase. Cependant, l'activité cellulolytique est observée chez toutes les espèces de *Bacillus* étudiées exceptant le *B. atrophaeus* qui est le seul à produire de la chitinase. Ces enzymes agissent par le mécanisme de mycoparasitisme, grâce à leur rôle intégral dans l'altération physique directe des parois cellulaires (Praveen Kumar *et al.*, 2012; Cho *et al.*, 2011).

Les trois familles de lipopeptides (LPs), y compris les iturines, les fengycines et les surfactines sont des substances antimicrobiennes connues pour leurs propriétés surfactants et antifongiques (Sandrin *et al.*, 1990; Ongena *et al.*, 2007; Malfanova *et al.*, 2012). Par ailleurs, les LPs incitent les souches de *Bacillus* à coloniser les racines des plantes, à former des biofilms (Bonmatin *et al.*, 2003; Raaijmakers *et al.*, 2006; Leclere *et al.*, 2006) et ils stimulent le système immunitaire des plantes (Induced systemic resistance:ISR), comme démontré par Ongena *et al.* (2007) et Jourdan *et al.* (2009). Dans cette étude, les souches de *B. amyloliquefaciens* isolées d'Ain M'lila et de Oued El Athmánya et la souche *B. velezensis* (26SRTS) isolée de la rhizosphère de *C. officinalis*, produisent les trois familles de lipopeptides, en l'occurrence, iturine A et bacillomycine D C₁₄-C₁₆ (variantes de la famille des iturines); surfactines C₁₂-C₁₆, et fengycines A et/ou B C₁₄-C₁₉ (variantes de la famille des fengycines). En revanche, la production des fengycines est absente dans le cas des souches *B. subtilis subsp. spizizenii* (23SRTS), *B. amyloliquefaciens* (9SRTS) et *B. atrophaeus* (6SEL). Enfin, la production des surfactines a été détectée chez la plupart des souches exceptant le *B. mojavensis* (9SEL) et le *P. polymyxa* (18SRTS) qui ne produit aucune famille des LPs. Dans la littérature fouillée, la production des iturines semble être limitée aux espèces *B. subtilis* (Bonmatin *et al.*, 2003) et *B. amyloliquefaciens* (Koumoutsi *et al.*, 2004), tandis que, les surfactines ont été détectées chez *B. coagulans* (Huszcza et Burczyk, 2006), chez *B. pumilus* et chez *B. licheniformis* (Peypoux *et al.*, 1999). Enfin, la production des fengycines a été identifiée chez *B. cereus* (Tsuge *et al.*, 1999) et *B. thuringiensis* (Kim *et al.*, 2004) en plus de *B. subtilis* (Jacques *et al.*, 1999) et *B. amyloliquefaciens* (Koumoutsi *et al.*, 2004).

Diverses variantes de fengycines sont décrites dans la littérature, en l'occurrence, fengycine A et B (Esumi *et al.*, 2003; Ongena et Jacques, 2008; Stein, 2005; Vater *et al.*, 2002), fengycine C, D et S (Yu Li *et al.*, 2012) et fengycin A2, B2 et C (Pathak *et al.*, 2012). **Il est très intéressant de signaler que dans le présent travail, des pics additionnels ont de nouvelles masses proches de celles des MH⁺ de fengycines conventionnelles sont détectés chez les *B. amyloliquefaciens* (Rh2.A', ET, Rh2.F et SI), isolés du lac salé et de la source thermale.**

Les analyses de spectrométrie de masse couplée à l'HPLC (LC-MS.MS), avec une méthode de fragmentation, type CID (collision-induced dissociation), appliquées sur l'extrait des fengycines produites par *B. amyloliquefaciens* (ET) ont permis de déceler que **la majorité des homologues de fengycines produits par cette souche sont à chaîne d'acide gras insaturé, en plus des nouveaux homologues de fengycines A et B, ayant des chaînes d'acides gras à 20 et à 18 atomes de carbone, respectivement, chose qui est rare chez les membres du groupe *B. subtilis*. Par ailleurs, deux nouvelles variantes de fengycines (fengycine X et Y) ont été décrites pour la première fois dans ce travail.** Il a été, en effet, abouti que le cycle peptidique de la fengycine X (nouvelle) diffère de celui de la fengycine A (conventionnelle) dans l'acide aminé glutamine (Q) qui a été substitué par l'isoleucine (I) ou leucine (L). Cette mutation doit être la même pour fengycine Y (nouvelle) mais, par rapport à la fengycine B (conventionnelle). **Ces nouvelles substances n'ont pas été comparées, faut d'absence de similaires dans la littérature, ce qui permettra de proposer une élaboration d'un brevet.**

Sur un autre volet, les siderophores sont utilisés comme des molécules clés dans le phénomène de compétition développé par les microorganismes producteurs vis-à-vis de la flore de l'écosystème qu'ils occupent (Beneduzi *et al.*, 2008). Les siderophores sont des molécules à faible poids moléculaires, ayant une forte affinité à l'ion Fe⁺³. Elles sont secrétées sous des conditions de déficit en fer. Une fois le complexe siderophore- Fe⁺³ est formé, la membrane externe de la cellule microbienne productrice de siderophores catalyse l'internalisation de ces complexes (Neilands, 1995). Dans ce travail, toutes les souches de *Bacillus* sélectionnées montrent une activité importante de production de siderophores en développant sur milieu CAS des zones jaune-orange allant de 7 à 10 mm de diamètre alors que le *P. polymyxa* (18SRTS) ne produit aucune trace de siderophores.

Les PGPRs (pour *Plant Growth Promoting Rhizobacteria*) peuvent promouvoir la croissance des plantes d'une façon directe via la production des phytohormones comme l'indole 3 acide acétique (IAA), les cytokines et les gibbérellines (Bloemberg et Lugtenberg 2001; Bottini *et*

al., 2004). L'IAA a été détectée chez 80% des bactéries isolées de la rhizosphère des plantes. En revanche, peu d'études ont fait le point sur la capacité des bacilles du sol, à produire d'IAA (Vandeputte *et al.*, 2005). Toutes les souches de *Bacillus*, dans le présent travail, produisent de petites quantités d'indole 3 acide acétique (IAA) qui varient entre 6,5 et 14 µg/ml. Par ailleurs, il a été constaté que, le *P. polymyxa* (18SRTS) produit une concentration largement plus importante d'IAA atteignant 53 µg/ml, ce qui procure à ces souches un intérêt grandissant.

Les interactions les plus complexes et les plus importantes entre les plantes et les microorganismes se situent dans les racines des plantes et la partie du sol adjacente, appelée rhizosphère (Hirsch *et al.*, 2003). En outre, le rôle des exsudats racinaires dans les interactions plante-microorganismes a été mis en évidence récemment par plusieurs chercheurs (Somers *et al.*, 2004; Badriet Vivanco, 2009; Cawoy *et al.*, 2011). En effet, il a été démontré que les rhizobactéries s'attirent vers les racines des plantes sous l'effet des exsudats racinaires, via le phénomène de chimiotaxie (Chet et Mitchell, 1976). Cette réponse chimotaxique et la division cellulaire des bactéries dans des exsudats racinaires peut être un fait important, impliqué dans l'établissement de la colonisation des racines, comme décrit par Weller (1988) et De Weert *et al.* (2002). Dans ce travail, les souches *B. amyloliquefaciens* (ET), *B. atrophaeus* (6SEL) et *B. mojavensis* (9SEL) s'avèrent capables de développer un effet antagoniste vis-à-vis d'*Alternaria alternata* sur divers milieux solides, où la seule source de carbone et d'azote était principalement des exsudats racinaires de tomate (*S. lycopersicum* cv. *Tondo rosso*), de courgette (*C. pepo* cv. *Xara*) et d'haricot (*P. vulgaris* cv. *Borlotto*), obtenus à 25°C. Par ailleurs, les souches *B. amyloliquefaciens* (9SRTS), *B. subtilis* subsp. *spizizenii* (23SRTS) et *B. velezensis* (26SRTS), développent un effet inhibiteur vis-à-vis de *Fusarium oxysporium* et *A. alternata*, sur des exsudats de tomates (*S. lycopersicum* cv. *Tondo rosso*), obtenus à 15°C, 20°C, 28°C et 35°C. Ces résultats montrent l'effet de la nature de la plante hôte et de la température de culture sur l'efficacité des souches de *Bacillus* testées d'un côté et prouve la possibilité que ces souches soient efficaces dans le biocontrol des cultures de tomate, de courgette et d'haricot, dans des conditions de températures diverses, d'un autre côté.

La majorité des biopesticides microbiens utilisés à travers le monde sont d'origine bactérienne (Shoresh *et al.*, 2010) et le *Bacillus subtilis* constitue le groupe bactérien le plus étudié dans la recherche scientifique et le plus exploité industriellement, et vendus sur le marché comme agents de biocontrôle. Dans ce travail, la production des *B. amyloliquefaciens* (9SRTS); *B. atrophaeus* (6SEL) et *B. subtilis* subsp. *spizezenii* (23SRT), dans le bioréacteur de 500 L

(Société Artechno S.A- Belgique), a permis de constater l'importance économique de ces souches. En effet, la concentration de spores produites, en fin de fermentation, varie entre 8×10^9 et 1×10^{10} spores/ml. En plus, la concentration de cellules vivante par gramme de produit lyophilisé est entre 6×10^9 et $1,2 \times 10^{11}$ cellules/g. Les taux de sporulation obtenus sont plus importants que ceux obtenus dans les études réalisées par Monteiro *et al.* (2005) et Chen *et al.* (2010). Par ailleurs, Korsten et Cook. (1996) ont pu obtenir un produit lyophilisé stable de la souche *Bacillus subtilis* (isolate B246) dont la concentration de cellules vivantes était (1×10^9 cellules/g).

Plusieurs espèces de *Bacillus* sont utilisées pour protéger les terrains agricoles contre les moisissures phytopathogènes. Il s'agit de *B. amyloliquefaciens*, *B. licheniformis*, *B. pumilus* et *B. subtilis* (Fravel, 2005). Ces bactéries sont homologuées et commercialisées dans plusieurs pays du monde, comme l'Afrique du Sud, le Chili, les USA, la Thaïlande, le Brésil, le Japon, l'Allemagne et le Canada. Elles sont en fait utilisées comme agents de biocontrôle de plusieurs cultures agricoles, en champs, en serre et en post récolte. Parmi les cultures traitées, on note l'avocat, les céréales, la betterave sucrière, le pois chiche, le soja, le haricot, le coton, les petits pois, les arachides, la pomme de terre, le piment, la tomate, la pomme, la poire et autres (Cawoy, 2012; Perez-García *et al.*, 2011). Dans le présent travail, *B. amyloliquefaciens* (9SRTS), *B. atrophaeus* (6SEL) et *B. subtilis* subsp. *spizezenii* (23SRTS), en plus de la souche de référence *B. amyloliquefaciens* (S499) sont testées *in situ* sur deux variétés de pois chiches (CV. *Flipe 1390* et *Mega grain tradind CO. (P): Kabuli*). Ce légume sec a été choisi car sa production en Algérie connaît un manque accru. En effet, l'Algérie recourt au marché extérieur pour combler le déficit en matière de besoins en consommation, avec l'importation de plus de 150 000 tonnes par an, soit 200 millions de dollars, déboursés à cet effet (Bahri, 2011).

Les souches bactériennes testées, ici, ont une influence positive sur la promotion et la protection des plantes de pois chiche, dans des conditions de pots et en plein champs. En effet, la souche *B. amyloliquefaciens* (9SRTS) appliquée dans le lot ST-GNT (sol traité-graines non traitées) assure un meilleur effet sur l'augmentation la taille des plantes et la diminution de la gravité de la maladie causée par *Sclerotonia sclerotium*, dans le cas de la variété CV. *Flipe 1390*. Ces paramètres versus le témoin, estimés après un moi de semis, étaient (13 cm vs 10 cm) et (9% vs 63%). Par ailleurs, la souche (9SRTS) diminue significativement la gravité de la maladie de la variété : *Mega grain tradind CO. (P) : Kabuli* (41% vs. 74% : témoin), et

augmente le poids des racines (0,31g vs 0,06g). Ces résultats corroborent ceux trouvés par Karimi *et al.* (2012), où plusieurs souches de *B. subtilis* (B1, B6, B28, B40, B99 et B108), avait un effet positif sur la taille des plantes de pois chiche, le poids des racines et leur protection contre *Fusarium oxysporum* f.sp. *ciceri*, estimé après un mois de semis et l'isolat B28 présentait les meilleurs effets. Par ailleurs, l'inoculation du sol infecté avec du *Fusarium oxysporum* f.sp. *ciceri*, avec cet isolat, avait un effet supérieur, par rapport au lot de graines traitées et semis dans le même type de sol. En effet, le pourcentage de réduction de la maladie était 44% et 39%, respectivement dans ces deux lots (Karimi *et al.*, 2012). En revanche, Moradi *et al.* (2012) ont montré l'absence de différence significative entre l'effet d'inoculation du sol et celui du traitement des graines sur le développement des plantes de pois chiche (variété Pirooz et variété Hashem).

L'inoculation du champ expérimental de Chaab Errsas (Université Metouri 1-Algérie), avec les souches *B. amyloliquefaciens* (9SRTS), *B. subtilis* subsp. *spizezenii* (23SRTS), *B. atrophaeus* (6SEL) et la souche type *B. amyloliquefaciens* (S499), a des effets positifs sur le taux de germination des graines de pois chiche (variété *Mega grain tradind CO. (P): Kabuli*), la taille des plantes et le rendement de la récolte. Le meilleur isolat est le *B. amyloliquefaciens* (9SRTS), qui assure un taux de germination des graines important (63% vs 41% pour le lot témoin). En plus la taille des plantes est significativement ($p < 0,05$) élevée, atteignant 23cm et 35cm, après 4 et 6 semaines de semis. Par opposition, dans le lot témoin, la taille des plantes est à 18 cm et 32 cm. Les différents traitements effectués n'ont pas d'effets significatifs ($P > 0,05$) sur le nombre de fruits par plantes ni sur le poids sec des racines et des graines récoltées. En revanche, comme ces traitements influence significativement le taux de germination, le poids total du pois chiche récolté dans le lot traité avec la souche (9SRTS) est plus élevé par rapport au témoin (153 g vs 114 g). Ces données estimées par hectare, se retrouve à (7,65 qt vs 5,7qt), la souche (9SRTS) a permis donc une augmentation du rendement de 2qt/hectare. Des résultats approximatifs ont été trouvés par Abdel-Monaim. (2011) qui a mis en évidence que le traitement des graines de pois chiche (variété : cv. 'Giza 3') avec le *B. megaterium* a permis la diminution de la gravité de la fonte des semis et l'augmentation du rendement de la production. Cet auteurs a trouvé que le semis dans le mois de Novembre a donné les meilleurs effets, à savoir : (9% vs. 16%) pour le pourcentage de fonte de semis et (664 vs. 525 kg/champs) pour le rendement de la production.

Conclusion et
perspectives

8- Conclusion et perspectives

Dans cette étude, une caractérisation *in vitro* et *in situ* des souches de *Bacillus* et de *Paenibacillus*, isolées à partir de divers environnements de l'Est d'Algérie a été effectuée, dans le but sélectionner des souches qui pourront être efficaces dans la gestion des productions agricoles. Les résultats d'identification moléculaire des souches à activité antifongique sélectionnées, ont montré que ces dernières, sont étroitement liées au *Bacillus amyloliquefaciens*, *B. subtilis* subsp. *spizezenii*, *B. atrophaeus*, *B. mojavensis*, *B. velezensis* et *Paenibacillus polymyxa*. La plupart des souches bactériennes sélectionnées ont la capacité de produire des enzymes dégradant les parois cellulaires (Cellulase et Protéase), des lipopeptides (surfactines, iturines et fengycines conventionnelles), des siderophores et de l'indole 3 acide acétique (IAA). Néanmoins, quelques particularités sont observées. En effet, le *B. mojavensis* (9SEL) et le *P. polymyxa* (18SRTS) ne produit aucune famille des LPs et le *B. atrophaeus* (6SEL) est le seul isolat de produire de la chitinase. Par ailleurs, **les souches de *B. amyloliquefaciens* isolées à partir du lac salé et de la source thermale ont la propriété de produire une large gamme de fengycines, comprenant de nouveaux types qui n'ont jamais été décrits dans la littérature. En effet, le *B. amyloliquefaciens* (ET) isolé du lac salé, produisait de nouveaux homologues de fengycine A et B, ayant des chaînes d'acides gras à 20 et à 18 atomes de carbones, respectivement, en plus des deux nouvelles variantes de fengycines (fengycine X et Y) à cycles peptidiques dont la composition diffère de ceux des fengycines conventionnelles.** Il est à noter que le genre influence la capacité des souches bactériennes à se sporuler dans les conditions de fiole non optimisée. En effet, les taux de sporulation chez les membres du groupe *Bacillus subtilis* varient entre 2.2×10^9 et 2.7×10^9 spores/ml alors que, la sporulation chez *P. polymyxa* n'est pas satisfaisante. Les tests réalisés *in situ* dans des conditions de pots et en plein champs sur le pois chiche montrent que l'efficacité des souches de *Bacillus* testées, dépend du type de traitement, de la variété de pois chiche et de l'identité de la souche bactérienne. En fait, les meilleurs effets sur le taux de germination, la taille des plantes, la diminution de la gravité de la maladie causée par *Sclerotonia sclerotium* et le rendement de la production, sont constatés dans le lot où les graines de pois chiche «variété : cv. *Mega grain tradind CO. (P): Kabuli*» sont semées dans du sol inoculé par le *B. amyloliquefaciens* (9SRTS).

Que ce soit au niveau fondamental ou appliqué, de la compréhension du phénomène d'interaction plantes-microorganismes, de nombreuses perspectives découlent de cette recherche. En fait, des études plus approfondies sur les mécanismes biochimiques, moléculaires et physiologiques qu'exercent les bactéries sélectionnées (genres : *Bacillus* et *Paenibacillus*) sur les plantes, sont nécessaires pour améliorer nos connaissances dans ce domaine qui reste toujours sous-évalué. Par ailleurs, d'un point de vue appliqué, nous ne disposons pas encore d'informations suffisantes pour concevoir une utilisation efficace et rationnée de ces bactéries, en tant que biopesticides. De ce fait, plusieurs expériences complémentaires doivent être réalisées, en l'occurrence, élargir le spectre des plantes hôtes et des pathogènes ; déterminer la dose minimale effectrice du produit et de suivre sa viabilité à longs termes lors du stockage et au niveau du sol inoculé ; tester les souches bactériennes dans des phénomènes inductibles autres que ceux liés aux maladies biotiques, comme la résistance à des stress hydriques, salins ou des blessures et leurs interactions avec les autres techniques culturales de l'agriculture intégrée.

Références
bibliographiques

Références bibliographiques

1. AAC. (2013). Production biologique. Source : <http://www4.agr.gc.ca/AAFC AAC/displayafficher.do?id=1183748510661&lang=fra>.
2. Abdellaoui, H.H. (2012). Présentation de l'approche Algérienne en matière d'agriculture biologique : potentiel, conditions de leur développement et perspectives pour la valorisation de la production Algérienne. Source : eeas.europa.eu/.../algeria/.../20121221_approche_algerienne_agriculture...
3. Abdel-Monaim, M.F. (2011). Integrated management of dampingoff, root and/or stem rot diseases of chickpea and efficacy of the suggested formula. *Not Sci Biol.* 3:80–88.
4. Adam, A. (2008). Elicitation de la résistance systémique induite chez la tomate et le concombre et activation de la voie de la lipoxigénase par des rhizobactéries non-pathogènes. Thèse disponible sur : <http://bictel.ulg.ac.be/ETD-db/collection/available/ULgetd-02202008-162241/unrestricted/doctoratakramadam.pdf>
5. Ahimou, F. Jacques, P., Deleu, M. (2000). Surfactin and iturin A effects on *Bacillus subtilis* surface hydrophobicity. *Enzyme Microb. Technol.* 27 : 749– 754.
6. Alfano, J.R., Collmer, A. (2004). Type III secretion system effector proteins: double agents in bacterial disease and plant defense. *Annu. Rev. Phytopathol.* 42:358-414.
7. Anonyme 1. (2012). Bulletin trimestriel d'information sur les sciences exactes et naturelles Vol. 10, 3pp.
8. Anonyme 2. Source : <http://www.pic.int/>
9. Anonyme 3. Source : <http://www.pops.int/>
10. Anonyme 4. (2011). Souce: http://sustainabledevelopment.un.org/dsd_aofw_ni/ni_pdfs/NationalReports/algeria/full_report.pdf.
11. Anonyme 5. Source: www.wwf.fr/.../l-agriculture-durable-une-voie-d-avenir fncivam-ww...).
12. Anonyme 6. Source : <http://ec.europa.eu>.
13. Anonyme 7. Marché de biopesticides d'une valeur de 3,2 milliards \$ d'ici 2017 – nouveau rapport par Marketsandm. Source: <http://www.interestblog.org/russel/article-detail-76920>
14. Anonyme 8. L'agriculture biologique. Premiers éléments d'information et de réflexion. Source : http://www.centrediversification.fr/client/20026/prod/P_0_20026_184_1386153973.pdf.

15. Anonyme 9. Production biologique Production canadienne. Source : <http://www.agr.gc.ca/fra/industrie-marches-et-commerce/statistiques-et-information-sur-les-marches>.
16. Antoun, H., Prevost, D. (2006). Ecology of plant growth promoting rhizobacteria. *PGPR: Biocontrol and Biofertilization*. Siddiqui, Z.A. (eds). pp. 1-38.
17. Arbach, G. (2012). Library Briefing. Pesticide Legislation in the EU. Toward sustainable use of plant protection products. European Parliament. Source: [http://www.europarl.europa.eu/RegData/bibliotheque/briefing/2012/120291/LDM_BRI\(2012\)120291_REV1_EN.pdf](http://www.europarl.europa.eu/RegData/bibliotheque/briefing/2012/120291/LDM_BRI(2012)120291_REV1_EN.pdf)
18. Ariffin, H., Abdullah, N., Umi Kalsom, M.S., Shirai, Y., Hassan, M.A. (2006). Production and characterisation of cellulase produced by *Bacillus pumilus* EB3. *Int J Eng Technol*. 3:47–53.
19. Aris, T.W., Rina, P.A., Asri, W., Anja, M., Abdjad, A.N. (2011). Characterization of *Bacillus* sp. Strains isolated from rhizosphere of soybean plants for their use as potential plant growth for promoting Rhizobacteria. *J. Microbio. Antimicrobials*. 3: 34-40.
20. Aris, T.W., Rina, P.A., Asri, W., Anja, M., Abdjad, A.N. (2011). Characterization of *Bacillus* sp. Strains isolated from rhizosphere of soybean plants for their use as potential plant growth for promoting Rhizobacteria. *J. Microbio. Antimicrobials*. 3: 34-40.
21. Asaka, O., Shoda, M. (1996). Biocontrol of *Rhizoctonia solani* damping-off of tomato with *B. subtilis* Rb14. *Appl Environ Microbiol*. 62 : 4081–4085.
22. Ausubel, F.M. (2005). Are innate immune signaling pathways in plants and animals conserved. *Nature Immunol*. 6 : 973–79.
23. Badri, D.V ., Vivanco, J.M. (2009). Regulation and function of root exudates. *Plant Cell Environ*. 32:666–681.
24. Bahri, R. (2011). Les pois chiches occupent le haut du tableau : Production record de légumes secs à Aïn Témouchent. Source : <http://www.adnsolution.net/invest/index.php?news=282>.
25. Bais, H.P., Fall, R., Vivanco, J.M. (2004). Biocontrol of *Bacillus subtilis* against infection of *Arabidopsis* roots by *Pseudomonas syringae* is facilitated by biofilm formation and surfactin production. *Plant Physiol*. 134: 307–319.
26. Bari, R., Jones, J.D.G. (2009). Role of plants hormones in plant defence responses. *Plant Mol. Biol*. 69:473-88.
27. Beckers, G.J.M., Conrath, U. (2007). Priming for stress resistance: from the lab to the field. *Curr. Opin. Plant Biol*. 10:425-431.

28. Bell, M., Hertz-Piccioto, L., Beaumont, J.J. (2001). A case control study of pesticides and fetal death due to congenital anomalies. *Epidemiology*. 12: 148-156.
29. Beneduzi, A., Peres, D., Da Costa, P.B., Zanettini, M.H.B. (2008). Genetic and phenotypic diversity of plant growth- promoting bacilli isolated from wheat fields in southern Brazil. *Res. Microbiol.* 159: 244–250.
30. Beneduzi, A., Peres, D., Da Costa, P.B., Zanettini, M.H.B. (2008). Genetic and phenotypic diversity of plant growth- promoting bacilli isolated from wheat fields in southern Brazil. *Res. Microbiol.* 159: 244–250.
31. Berny, P.J., Buronfosse, T., Buronfosse, F., Lamarque, F., Lorgue, G. (1997). Field evidence of secondary poisoning of foxes (*Vulpes vulpes*) and buzzards (*Buteo buteo*) by bromadiolone, a 4-year survey. *Chemosphere*. 35:1817- 1829.
32. Bing-Lan, L., Yew-Min, T. (1998). Optimization of growth medium for the production of spores from *Bacillus thuringiensis* using response surface methodology. *Bioprocess Engineering*. 18:413-418.
33. Bloemberg, G., Vanderleyden, J., De Mot R., Lugtenberg, J.J. (2002). Flagella-Driven Chemotaxis towards Exudate Components Is an Important Trait for Tomato Root Colonization by *Pseudomonas fluorescens*. *MPMI*. 15:1173–1180.
34. Boldt, T.S, Jacobsen, C.S. (2006). Different toxic effects of the sulfonylurea herbicides metsulfuron methyl, chlorsulfuron and thifensulfuron methyl on fluorescent *Pseudomonads* isolated from an agricultural soil. *FEMS Microbiology Letters*. 161:29-35.
35. Bonmatin, J.M., Laprévotte, O., Peypoux, F. (2003). Diversity among microbial cyclic lipopeptides: iturins and surfactins. Activity-structure relationships to design new bioactive agents. *Comb. Chem. High Throughput Screen*. 6, 541–556.
36. Bottini, R., Cassán, F., Piccoli, P. (2004). Gibberellin production by bacteria and its involvement in plant growth promotion and yield increase. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 65: 497-503.
37. Brakes, C.R., Smith, R.H. (2005). Exposure of non-target small mammals to rodenticides: short-term effects, recovery and implications for secondary poisoning. *Journal of Applied Ecology*. 42: 118-128.
38. Bruinsma, J. (2009). The resource outlook to 2050: By how much do land, water and crop yields need to increase by 2050. Rome, FAO.
39. Cartillier, M. (1977). La révolution verte en Inde et le rôle des petites industries : le cas des pompes d'irrigation. *Tiers-Monde*. 70 : 397-412.

40. Catanzariti, A.M., Dodds, P.N., Ellis, J.G. (2007). Avirulence proteins from haustoria-forming pathogens. *FEMS Microbiol. Lett.* 269:181-88.
41. Cawoy, H., Bettiol, W., Fickers, P., Ongena, M. (2012). *Bacillus*-Based Biological Control of Plant. Thèse disponible sur: www.intechopen.com/download/pdf/219891.
42. Cawoy, H., Mariutto, M., Henry, G., Fisher, C., Vasilyeva, N., Thonart, P., Dommes, J., Ongena, M. (2014). Plant defense stimulation by natural isolates of *Bacillus* depends on efficient surfactin production. *Mol Plant Microbe Interact.* 27:87-100.
43. CE, 2012. Source : http://ec.europa.eu/agriculture/organic/eu-policy/legislation_fr.
44. Chang, J.H., Goel, A.K., Grant, S.R., Dangl, J.L. (2004). Wake of the flood: ascribing functions to the wave of type III effector proteins of phytopathogenic bacteria. *Curr. Opin. Microbiol.* 7:11-8.
45. Chen, X.H., Vater, J., Piel, J., Franke, P., Scholz, R., Schneider, K., Koumoutsis, A., Hitzeroth, G., Grammel, N., Strittmatter, A. W., Gottschalk, G., Süßmuth, R., Borriss, R. (2006). Structural and functional characterization of three polyketide synthase gene clusters in *Bacillus amyloliquefaciens* FZB 42. *J. Bacteriol.* 188: 4024-4036.
46. Chet, I., Mitchell, M. (1976). Ecological aspects of microbial chemotactic behavior. *Annual Review of Microbiology.* 30: 221-239.
47. Chisholm, S.T., Coaker, G., Day, B., Staskawicz, B.J. (2006). Host-microbe interactions: shaping the evolution of the plant immune response. *Cell.* 124:803–14.
48. Cho, E.K, Choi, I.S, Choi, Y.J. (2011). Overexpression and characterization of thermostable chitinase from *Bacillus atrophaeus* SC081 in *Escherichia coli*. *BMB Rep.* 44: 193-8.
49. COLEACP. (2011). Lutte biologique et protection intégrée. Source : pip.coleacp.org/files/documents/COLEACP_Manuel_10_FR.pdf.
50. CTB. (2009). L’agriculture bio dans les pays du Sud : une opportunité de développement durable . Source : http://www.befair.be/sites/default/files/allfiles/brochure/Brochure_bio%5B1%5D.pdf.
51. Daniels, R. Vanderleyden, J., Michiels, J. (2004). Quorum sensing and swarming migration in bacteria. *FEMS Microbiol. Rev.* 28: 261–289.
52. De Carvalho, C.C.C.R., Pedro, F.M. (2010). Production of metabolites as bacterial responses to the marine environment. *Drugs.* 8: 705-27.
53. De Weert, S., Vermeiren, H., Mulders H.M., Kuiper, I., Hendrickx, N., Bloemberg, G., Vanderleyden, J., De Mot R., Lugtenberg, J.J. (2002). Flagella-Driven Chemotaxis

- towards Exudate Components Is an Important Trait for Tomato Root Colonization by *Pseudomonas fluorescens*. *MPMI*. 15:1173–1180.
54. Declert, C. (1990). Manuel de phytopathologie maraichère tropicale. Cultures de Côte-d'Ivoire. Source : http://horizon.documentation.ird.fr/exldoc/pleins_textes/divers1102/36393.pdf.
55. Delaggi, A. (2009). Reaction de défense des plantes. Source : vegetal.snv.jussieu.fr/documents/M2%20defense-plantes%20Dellagi.pdf.
56. Dib, J.R., Weiss, A., Neumann, A., Ordoñez, O., Estévez, M.C., Farías, M.E. (2009). Isolation of bacteria from remote high altitude Andean lake able to grow in the presence of antibiotics. *Recent Patents on Anti-Infective Drug Discovery*. 4: 66–76.
57. Duitman, E. H, Hamoen, L. W., Rembold, M. et al. (1999). The mycosubtilin synthetase of *Bacillus subtilis* ATCC6633: a multifunctional hybrid between a peptide synthetase, an amino transferase, and a fatty acid synthase. *P Natl Acad Sci USA*. 96: 13294–13299.
58. Ebrahiminezhad, A., Rasoul-Amini, S., Ghasemi, Y. (2011). L-Asparaginase Production by Moderate Halophilic Bacteria Isolated from Maharloo Salt Lake. *Indian J Microbiol*. 51: 307–311.
59. Eisenhauer, N Klier, M., Partsch, S., Sabais, A.C.W, Scherber, C. Weisser, W.W.S., Scheu, S. (2009). Interactive effects of pesticides and plant diversity on soil microbial biomass and respiration. *Applied Soil Ecology*. 42: 31-36.
60. Errington, J. (2003). Regulation of endospore formation in *Bacillus subtilis*. *Nat. Rev. Microbiol*. 1:117-126.
61. Esumi, Y., Suzuki Y., Itoh, Y., Chijimatsu, M., Uramoto, M., Kimura, K.I., Nakayama, S., Yoshihama, M., Ichikawa, T., Haramo, T., Fujishige, J. (2003). SNA-60-367 components, new peptide enzyme inhibitors of aromatase: structure of the fatty acid side chain and amino acid sequence by mass spectrometry. *J Antibiot*. 56: 716–720.
62. FAO. (2002). International Code of Conduct on the Distribution and Use of Pesticides. Source: <http://www.fao.org/WAICENT/FAOINFO/AGRICULT/AGP/AGPP/Pesticid/Code/Download/code.pdf>.
63. FAO. (2013). AGP-Approche stratégique de la gestion internationale des produits chimiques SAICM. Source : <http://www.fao.org/agriculture/crops/themesprincipaux/the-me/pests/code/saicm/fr/>
64. Filotas, M. (2010). Les biopesticides en agriculture biologique. Source: <http://www.omafra.gov.on.ca/french/crops/organic/news/2010-04a6.htm>.

-
65. Flor, H.H. (1971). Current status of gene-for-gene concept. *Annu. Rev. Phytopathol.* 9:275-296.
66. Francis, I., Holsters, M., Vereecke, D. (2010). The Gram-positive side of plant-microbe interactions. *Environmental Microbiology.* 12: 1-12.
67. Fravel, D.R (2005). Commercialization and implementation of biocontrol. *Ann Rev Phytopathol.* 43: 337-359.
68. Georges, S. (1959). Les disparités régionales. *Économie rurale. L'économie agricole française 1938 – 1958.* 161-168 pp .
69. Goldenman, G., PozoVera, E. (2008). Outils internationaux de prévention des problèmes locaux liés aux pesticides: guide unifié des codes et conventions chimiques. Source : <http://www.panuk.org/archive/PDFs/Consolidated%20Guide%20French.pdf>
70. Gong, W., Ren, Y., Xu, Q., Wang, Y., Lin, D., Zhou, H., Li, T. (2006). Integrated siRNA design based on surveying of features associated with high RNAi effectiveness. *BMC Bioinformatics.* 7: 516 pp.
71. Greenlee, A.R., Arbuckle, T.E., Chyou, P.H. (2003). Risk Factors for Female Infertility in an Agricultural Region. *Epidemiology.* 14:429-436.
72. Grifon, M. (2006). Nourrir la planète. Pour une révolution doublement verte. Éditions Odile Jacob. 456 pp.
73. Hansen, D.B., Bumpus, S.B., Aron, Z.D., Kelleher, N.L., Walsh, C.T. (2007). The loading module of mycosubtilin: an adenylation domain with fatty acid selectivity. *J Am Chem Soc.* 129: 6366–6367.
74. Harwood, C.R., Wipat, A. (1996). Sequencing and functional analysis of the genome of *Bacillus subtilis* strain 168. *FEBS Letters.* 389:84-87.
75. Heath, M. C. (1998). Apoptosis, programmed cell death and the hypersensitive response. *Eur. J. Plant Path.* 104:117-124.
76. Heath, M.C. (2000). Hypersensitive response-related death. *Plant Mol. Biol.* 44:321–34.
77. Heath, M.C. (2000). Nonhost resistance and nonspecific plant defenses. *Current Opinion in Plant Biology.* 3: 315–319.
78. Hirsch, A. M., Bauer, W.D., Bird, D.M., Cullimore, J., Tyler, B., Yoder, J.I. (2003). Molecular signals and receptors: controlling rhizosphere interactions between plants and other organisms. *Ecology.* 84 : 858–868.
79. Husen, E., (2003). Screening of soil bacteria for plant growth promoting activities *in vitro*. *Indones. J. Agric. Sci.* 4: 27-31.

-
80. IFOAM. (2012). Source : <http://www.agencebio.org/>.
81. Jack Weinberg. (2009). Un guide pour les ONG sur les pesticides dangereux et la SAICM. Source: http://www.ipen.org/ipenweb/documents/book/hazpesticides_guide_french.pdf.
82. Jacques, P., Hbid, C., Destain, j., Razafindralambo, H., Paquot, M., De Pauw, E., Thonart, P. (1999). Optimization of biosurfactant lipopeptides production from *Bacillus subtilis* S499 by Plackett–Burman design. *Appl Biochem Biotechno.* 177: 223–233.
83. Jeyaratnam, J. (1990). Acute Pesticide Poisoning: A Major Global Health Problem. *World Health Statistics Quarterly.* 43:139-144.
84. Jones, J.D.G, Dangl, J.L. The plant immune system. *Nature.* 444:323–29.
85. Jongsik, C., Kyung, S.B. (2000). Phylogenetic analysis of *Bacillus subtilis* and related taxa based on partial *gyrA* gene sequences. *Antonie Van Leeuwenhoek.* 78:123–127.
86. Jourdan, E., Henry, G., Duby, F., Dommes, J., Barthelemy, J.P., Thonart P., Ongena, M. (2009). Insights into the defense-related events occurring in plant cells following perception of surfactin-type lipopeptide from *Bacillus subtilis*. *Mol. Plant Microbe Interact.* 22: 456–468.
87. Jwa, N.S, Agrawal, G.K, Tamogami, S, Yonekura, M., Han, O., Iwahashi, H., Rakwal, R. (2006). Role of defense/stress-related marker genes, proteins and secondary metabolites in defining rice self-defense mechanisms. *Plant Physiol. Biochem.* 44: 261–73.
88. Karimi, K., Amini, J., Harighi B., Bahramnejad, B. (2012). Evaluation of biocontrol potential of *Pseudomonas* and *Bacillus* spp. against *Fusarium* wilt of chickpea. *AJCS.* 6: 695-703.
89. Kim, P.I., Bai, H., Bai, D., Chae, H., Chung, S., Kim, Y., Park, R., Chi, Y.T. (2004) Purification and characterization of a lipopeptides produced by *Bacillus thuringiensis* CMB26. *J. Appl. Microbiol.* 97, 942– 949.
90. Kinsinger R.F., Shirk M.C., Fall R. (2003). Rapid surface motility in *Bacillus subtilis* is dependent on extracellular surfactin and potassium ion. *J. Bacteriol.* 185: 5627–5631
91. Koberl, M., Zachow, C., Muller, H., Ramadan, E.M., Bauer, R., Berg, G. (2013). Biological control agents for combating soil-borne pathogens in Egypt. Source: <http://ebookbrowse.com/bi/biological-control-agents>.
92. Korsten, L., Cook, N. (1996). South African Avocado Growers' Association Yearbook. 19:54-58.

-
93. Koumoutsis, A., Chen, X.H., Henne, A., Liesegang, H., Hitzeroth, G., Franke, P., Vater, J., Borriss, R. (2004) Structural and functional characterization of gene clusters directing nonribosomal synthesis of bioactive cyclic lipopeptides in *Bacillus amyloliquefaciens* strain FZB42. *J. Bacteriol.* 186: 1084–1096.
94. Leclère, V., Bechet, M., Adam, A., Guez, J. S., Wathelet, B., Ongena, M., Thonart, P., Gancel, F., Chollet-Imbert M., Jacques, P. (2005). Mycosubtilin overproduction by *Bacillus subtilis* BBG100 enhances the organism's antagonistic and biocontrol activities. *Appl. Environ. Microbiol.* 71: 4577-4584.
95. Leclere, V., Marti, R., Béchet, M., Fickers, P., Jacques, P. (2006). The lipopeptides mycosubtilin and surfactin enhance spreading of *Bacillus subtilis* strains by their surface-active properties. *Arch. Microbiol.* 186 : 475–483.
96. Liu, X., Ren, B., Gao, H., Liu, M., Dai, H., Song, F., Yu, Z., Wang, S., Hu, J., Kokare, C.R. and Zhang, L. (2012). Optimisation for the production of surfactin with a new synergistic antifungal activity. *PLOS one* 7(5). doi:10.1371/journal.pone.0034430.
97. Lolloo, R., Maharaih, D., Görgens, J., Gardiner, N. (2010). A downstream process for production of a viable and stable *Bacillus cereus* aquaculture biological agent. *Applied Microbiology and Biotechnology.* 86: 499-508.
98. Lugtenberg, B., Kamilova, F. (2009). Plant-growth-promoting-rhizobacteria. *Annual Review of Microbiology.* 63: 541-556.
99. Mäder, P., Fliebbach, A., Dubois, D. Gunst, L., Fried, P., Niggli, U. (2002). Soil fertility and biodiversity in organic farming. *Science.* 296: 1694-1697.
100. Madigan, M., Martinko, J. (2007). *Biologie des microorganismes*, (11th edition) Pearson education. France.
101. Malfanova, N., Franzil, L., Lugtenberg, B., Chebotar, V., Ongena, M. (2012). Cyclic lipopeptide profile of the plant-beneficial endophytic bacterium *Bacillus subtilis* HC8. *Arch Microbiol.* 194: 893–899.
102. Mazoyer, M. (2011). Une brève histoire des agricultures du monde. Source : <http://terrethique.org/petits-dejeuners/marcel-mazoyer-une-breve-histoire-des-agricultures-du-monde/>
103. McSpadden-Gardener, B.B. (2004) Ecology of *Bacillus* and *Paenibacillus* spp. in agricultural systems. *Phytopathology.* 94: 1252-1258.

-
104. Milz, M. (2010). La révolution verte au Rwanda : Un programme d'intensification autoritaire au service de l'agrobusiness. Source : www.grain.org/.../La%révolution% verte%20auRwanda.
105. Monteiro, S.M., Clemente, J.J., Henriques, A.O, Gomes, R.J, Carrondo, M.J, Cunha, A.E. (2005). A procedure for high-yield spore production by *Bacillus subtilis*. *Biotechnol Prog.* 21:1026–1031.
106. Moradi, H., Bahramnejad, B., Amini, J., Siosemardeh, A., Allahverdipoor, K.H. (2012). Suppression of chickpea (*Cicer arietinum* L.) *Fusarium* wilt by *Bacillus subtilis* and *Trichoderma harzianum*. *POJ.* 5:68-74.
107. Muley BP, Khadabadi SS, Banarase NB (2009) Phytochemical constituents and pharmacological activities of *Calendula officinalis* Linn (Asteraceae): a review. *Trop J Pharm Res.* 5: 455–465.
108. Neilands, J. B. (1995). Siderophores: Structure and function of microbial iron transport compounds. *J. Biol. Chem.* 270: 26723– 26726.
109. Nihorimbere, V., Cawoy, H., Seyer ,A., Brunelle, A., Thonart, P., Ongena, M. (2012). Impact of rhizosphere factors on cyclic lipopeptides signature from the plant beneficial strain *Bacillus amyloliquefaciens* S499. *FEMS Microbiol Ecol.* 79:176–191.
110. Nurnberger, T., Kemmerling, B. (2006). Receptors protein kinases – Pattern recognition receptors in plant immunity. *Trends Plant Sci.* 11:519-22.
111. Oerke, E.C, Dehne, H.W., Schonbeck, F., Weber, A. (1995). Crop production and crop protection: estimated losses in major food and cash crops Amsterdam. *Elsevier.* 808 pp.
112. Ongena, M., Jacques, P. (2008). *Bacillus* lipopeptides: versatile weapons for plant disease biocontrol. *Trends Microbiol.* 16: 115–125.
113. Ongena, M., Jacques, P. (2008). *Bacillus* lipopeptides: versatile weapons for plant disease biocontrol. *Trends Microbiol.* 16: 115–125.
114. Ongena, M., Jourdan, E., Adam, A., Paquot, M., Brans, A., Joris, B., Arpigny, J. L., Thonart, P. (2007). Surfactin and fengycin lipopeptides of *Bacillus subtilis* as elicitors of induced systemic resistance in plants. *Environ. Microbiol.* 9: 1084–1090.
115. Pamela, C., Ernesto, O.O., Esperanza, M.R., Doris, Z. (2010). Characterization of *Bacillus* isolates of potato rhizosphere from Andean soils of Peru and their potential PGPR characteristic. *Brazilian Journal of Microbiology.* 41: 899-906.

116. Park, S.W., Kaimoyo, E., Kumar, D., Mosher, S., Klessig, D.F. (2007). Methyl salicylate is a critical mobile signal for plant systemic acquired resistance. *Science*. 318:113-16.
117. Pathak, K.V., Keharia, H., Gupta, K., Thakur, S.S., Balaram, P. (2012). Lipopeptides from the Banyan Endophyte, *Bacillus subtilis* K1: Mass Spectrometric Characterization of a Library of Fengycins. *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* 10: 1716-1728.
118. Perez-Garcia, A., Romero, D., De Vicent, A. (2011). Plant protection and growth stimulation by microorganisms: biotechnological applications of *Bacilli* in agriculture. *Current Opinion in Biotechnology*. 22:187–193.
119. Peypoux, F. Bonmatin, J. M., Wallach, J. (1999). Recent trends in the biochemistry of surfactin. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 51 :553–563.
120. Pieta, D. (1991). Mycoflora of *Calendula officinalis* L. seeds. *Acta Agrobot.* 44:1–2
121. Pieterse, C.M.J., Pelt, J.A.V., Wees, A.C.M. V., Ton, J., Léon-Kloosterziel, K.M., *et al.* (2001). Rhizobacteria-mediated induced systemic resistance: triggering, signaling and expression. *Eur. J. Plant Pathol.* 107:51-61.
122. Pluygers, E., Sadowska, A. (1994). Pesticides et cancer humain. *Revue, Ed Aves, liège*. 43pp.
123. Praveen Kumar, D., Anupama, P., Rajesh Kumar Singh, D., Thenmozhi, R., Nagasathya, A., Thajuddin, A., Paneerselvam, A. (2012). Evaluation of extracellular lytic enzymes from indigenous *Bacillus* isolates. *J. Microbiol. Biotech. Res.* 2: 129-137.
124. Preecha, C., Michael, Sadowsky J., Prathuangwong, S. (2010). Lipopeptide Surfactin Produced by *Bacillus amyloliquefaciens* KPS46 is Required for Biocontrol Efficacy Against *Xanthomonas axonopodis* pv. *Glycines*. *Kasetsart J. (Nat. Sci.)*. 44 : 84 – 99.
125. Raaijmakers, J.M, De Bruijn, I., De Kock, M.J. (2006). Cyclic lipopeptide production by plant-associated *Pseudomonas* spp.: diversity, activity, biosynthesis, and regulation. *Mol. Plant Microbe Interact.* 19: 699–710.
126. Rachel, C. (1962). Printemps silencieux (Boston :Houghton Mifflin, 1962), Paris: Plon.
127. Ramey, B.E., Koutsoudis, M., von Bodman, S.B., Fuqua, C. (2004). Biofilm formation in plant-microbe associations. *Curr. Opin. Microbiol.* 7: 602–609.
128. Ramiro, D. (2009). Caractérisation des mécanismes de résistance dans les réponses du caffier (*Coffea arabica*) à l'agent de la rouille orangée (*Hemileia vastatrix*). De la formation des haustoria à l'expression quantitative des gènes. Source : thèses disponible

- sur le site : http://horizon.documentation.ird.fr/exl-doc/pleins_textes/divers11-03/010047537.pdf.
129. Reinecke, A.J., Albertus R.M.C., Reinecke S.A., Larink O. (2008). The effects of organic and conventional management practices on feeding activity of soil organisms in vineyards. *African Zoology*. 43: 66-74.
130. Roberts, M. S., Nakamura, L. K., Cohan, F. M. (1994). *International Journal of Systematic Bacteriology*. 44: 256–264.
131. Rochefort, S., Lalancette, R., Labbe, R., Brodeur, J. (2006). Recherche et développement de biopesticides et pesticides naturels à faible toxicité pour les organismes non ciblés et respectueux de l'environnement. Rapport final, Projet PARDE, Volet Entomologie, Université Laval. 10- 28 pp.
132. Romero, D., de Vicente, A., Rakotoaly, R.H., Dufour, S.E., Veening, J.W., Arrebola, E., Cazorla, F.M., Kuipers, O.P., Paquot, M., Pérez-García, A. (2007). The iturin and fengycin families of lipopeptides are key factors in antagonism of *Bacillus subtilis* toward *Podosphaera fusca*. *Mol. Plant Microbe Interact.* 20: 430-440.
133. Sandrin, C., Peypoux, F., Michel, G. (1990). Coproduction of surfactin and iturin A lipopeptides with surfactant and antifungal properties by *Bacillus subtilis*. *Biotechnol. Appl. Biochem.* 12: 370–375.
134. Sarah, D., Ellis, S.D, Boehm, M.J. (2008). Plants Get Sick Too. An introduction to plant disease. *Ohio state university extension*. 401-405 pp.
135. Schippers, B. (1992). Prospects for management of natural suppressiveness to control soilborne pathogens. *Biological control of plant diseases, Progress and Challenges for the future*. Plenum Press, New York.
136. Seldin, L., van Elsas, J.D., Penido, E.G.C. (1983). *Bacillus* nitrogens fixers from Brazilian soils. *Plant Soil*.70: 243-255.
137. Sels, J., Mathys, J., De Coninck, B. M. A., Cammue, B. P. A. et De Bolle, M. F. C. (2008). Plant pathogenesis-related (PR) proteins: A focus on PR peptides. *Plant Physiology and Biochemistry*. 46: 941-950.
138. Senesi, S., Ricca, E., Henriques, A. O., Cutting, S. M. (2004). *Bacillus* spores as probiotics products for human use. In *Bacterial Spores: Probiotics and Emerging Applications*. Eds. *Horizon Scientific Press: London*. 132-141 pp.

139. Shore, R.F., Briksé, J.D.S., Freeston, P. (1999). Exposure of non-target vertebrates to second-generation rodenticides in Britain, with particular reference to the polecat *Mustela putorius*. *New zeland journal of Ecology*. 23: 199-206.
140. Shores, M., Harman, G., Mastouri, F. (2010). Induced systemic resistance and plant responses to fungal biocontrol agents. *Annual Review of Phytopathology*. 48:21-43.
141. Shulaev, V., Silverman, P., Raskin, I. (1997). Airborne signalling by methyl salicylate in plant pathogen resistance. *Nature*. 385: 718-21.
142. Siddiqui, Z.A. (2005) PGPR: Prospective biocontrol agents of plant pathogens. In: PGPR: Biocontrol and Biofertilization 111e142 pp.. Netherlands: Springer.
143. Somers, E., Vanderleyden, J., Srinivasan, M. (2004). Rhizosphere bacterial signalling: a love parade beneath our feet. *Crit Rev Microbiol*. 30: 205–240.
144. Stein, T. (2005) Bacillus subtilis antibiotics: structures, syntheses and specific functions. *Mol. Microbiol*. 56: 845–857.
145. Strange, R.N., Scott, P.R. (2005). Plant disease: A threat to global food security. *Annual Review of Phytopathology*. 43: 83-116.
146. Sylvie, S. (2010). Source : <http://www.sylviesimonrevelations.com/article-revolution-verte-ogm-pesticides-et-l-appauvrissement-des-sols-61559533.html>.
147. Thakore, Y. (2006). The biopesticide market for global agricultural use. *Industrial Biotechnology*. 2: 194-208.
148. Thomas, P.T., Busse, W.W., Kerkvliet, N.I., Luster, M.I., Munson, A.E., Murray, M., Roberts, D., Robinson, M., Silkworth, J., Sjoblad, R. (1990). Immunologic effects of pesticides. *Advances in modern environmental toxicology*. 8: 261-295.
149. Thordal-Christensen, H. (2003). Fresh insights into processes of nonhost resistance. *Curr. Opin. Plant Biol*. 6:351-357.
150. Tilman, D., Cassman, K.G., Matson, P.A., Naylor, R., Polasky, S. (2002). Agricultural sustainability and intensive production practices. *Nature*. 418:671–677.
151. Toure, Y., Ongena, M., Jacques, P., Guiro, A., Thonart, P. (2004). Role of lipopeptides produced by Bacillus subtilis GA1 in the reduction of grey mould disease caused by Botrytis cinerea on apple. *J Appl Microbiol*. 96: 1151–1160.
152. Tsuge, K., Akiyama, T., Shoda, M. (2001). Cloning, sequencing, and characterization of the iturin A operon. *J Bacteriol*. 183: 6265–6273.
153. Uma, B., Rani, T. S., Podile, A. R. (2011). Warriors at the gate that never sleep: Non-host resistance in plants. *Journal of Plant Physiology*. 168: 2141-2152.

154. UNEP, 2013. Rio Declaration on Environment and Development. Source : <http://www.unep.org/Documents/Multilingual/Default.asp?DocumentID=78&ArticleID=1163>
155. Van Lenteren, J. C. 2000. Measures of success in biological control of arthropods by augmentation of natural enemies. S. Wratten and G. Gurr (eds). 77-103 pp.
156. Van Loon, L.C., Bakker, P., Pieterse, C. M. J. (1998). Systemic resistance induced by rhizosphere bacteria. *Annu. Rev. Phytopathol.* 36: 453-483.
157. Vandeputte, O., Öden, S., Mol, A., Vereecke, D., Goethals, K., El Jaziri, M., Prinsen, E. (2005). Biosynthesis of auxin by the gram-positive phytopathogen *Rhodococcus fascians* is controlled by compounds specific to infect plant tissues. *Appl. Environ. Microbiol.* 71:1169-1177.
158. Vanderplank, J.E. (1984). Disease resistance in plants. *Orlando: Academic Press*, 194p.
159. Vater, J. Kablitz, B., Wilde, C., Franke, P., Mehta, N., Cameotra, S.S. (2002). Matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry of lipopeptide biosurfactants in whole cells and culture filtrates of *Bacillus subtilis* C-1 isolated from petroleum sludge. *Appl. Environ. Microbiol.* 68: 6210–6219.
160. Ventura, M., Elli, M., Reniero, R., Zink, R. (2001). Molecular microbial analysis of *Bifidobacterium* isolates from different environments by the species-specific amplified ribosomal DNA restriction analysis (ARDRA). *FEMS Microbiology Ecology.* 36: 113-121.
161. Vinay V. (2008). Isolation and characterization of Aerobic thermophilic Bacteria from Savusavu Hot springs Fiji. *Microbe Environ.* 23: 350-352.
162. WB, 2008. World Development Report Agriculture for Development. Source: http://siteresources.worldbank.org/INTWDR2008/Resources/WDR_00_book.pdf.
163. Weller, D.M. (1988). Biological control of soilborne plant pathogens in the rhizosphere with bacteria. *Annual Review of Phytopathology.* 26: 379-407.
164. Widenfalk, A., Bertilsson, S., Sundh, I., Goedkoop, W., 2008. Effects of pesticides on community composition and activity of sediment microbes – responses at various levels of microbial community organization. *Environmental Pollution.* 152: 576-584.
165. Yu Li, X., Chao Mao, Z., Hu Wang, Y., Xing Wu, Y., Qiu He, Y., Lin Long, C. (2012). ESI LC-MS and MS/MS Characterization of Antifungal Cyclic Lipopeptides Produced by *Bacillus subtilis* XF-1. *Mol Microbiol Biotechnol.* 22:83–93.

166. Yu, Y., Streubel, J., Balzergue, S., Champion, A., Boch, J., Koebnik, R., Feng, J., Verdier, V., Szurek, B. (2011). Colonization of Rice Leaf Blades by an African Strain of *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* Depends on a New TAL Effector That Induces the Rice Nodulin-3 *Os11N3* Gene. *Molecular plant-microbe-interaction*. 24 : 1102-1113.

Annexes

Annexe : Milieux de cultures

1.1- Milieu LB (g/l)

-Extrait de levure	5
- Tryptone	10
- NaCl	5
- Agar	15

1.2- Milieu PDA (g/l)

39g du potato dextrose agar (PDA) séché dans un litre d'eau distillée.

1.3- Milieu optimal (opt)

- Saccharose	20
- Peptone	30
- Extrait de levure	7
- KH ₂ PO ₄	1,9
Solution d'oligo-éléments	(mg.l ⁻¹)
- CuSO ₄	0,001
-FeCl ₃ .6H ₂ O	0,005
-Na ₂ MoO ₄	0,004
-KI	0,002
-ZnSO ₄ .7H ₂ O	0,014
-H ₃ BO ₃	0,01
-Acide citrique	10
Solution de Mn/Mg	(mg.l ⁻¹)
-MnSO ₄ .H ₂ O	3,6
-MgSO ₄	450

1.4- Eau peptonée (g/l)

- Peptone de caséine	1
- Extrait de levure	5
- NaCl	5
- Tween 80	1ml

1.5- Milieu chitinase

1g de chitine colloïdale+ 20 ml HCL 37%, incubation à T° ambiante environ 45-60min. Rajouter 100 ml d'éthanol pure, incubation à 4°C pendant une nuit. Filtrer la solution obtenue plusieurs fois par avec papier filtre à travers un entonnoir.

1.6- Milieu protéase (g/l)

- Poudre du lait	28 g
- Peptone de caséine	5
-Extrait de levure	2.5
-Dextrose	1
-Agar	15

1.7- Milieu cellulase (g/l)

-KH ₂ PO ₄	1.0
-MgSO ₄ .7H ₂ O	0.5
-FeSO ₄ .7H ₂ O	0.01
-NaCl	0.5
-MnSO ₄ .H ₂ O	0.01
-NH ₄ NO ₃	0.3
-Carboxymethylcellulose (CMC)	10.0
-Agar	12.0.

1.8- TGE (g/l)

-Tryptone	5
-Glucose	10
-Beef extract	3

1.9- Chromazurol S (CAS)

900ml de solution de base+1ml de SL7, pH ajusté à 6,8. La préparation est autoclavée à 121°C pendant 20min. La solution bleue est enfin rajoutée après refroidissement du milieu.

Solution de base	(g/l)
-Tris (trishydroxymethylamino méthane)	6,06
-NaCl	4,68
-KCl	1,49
-NH ₄ Cl	1,07
-Na ₂ SO ₄	0,43
-MgCl ₂ .6H ₂ O	0,20
-CaCl ₂ .2H ₂ O	0,03
-Na ₂ HPO ₄ .12H ₂ O	0,23
-gluconate	2
-Pipes (piperazine-N, N'- bis2-ethanesulfonic acid)	30,24
-Agar	20

Solution d'oligoéléments (SL7)	(g/l)
-HCl (25%)	1,3 ml
-ZnCl ₂	0,07
-MnCl ₂ .4H ₂ O	0,1
-H ₃ BO ₃	0,062
-CaCl ₂ .2H ₂ O	0,19
-CuCl ₂ .2H ₂ O	0,017
-NiCl ₂ .6H ₂ O	0,024
-Na ₂ MoO ₄	0,036

Solution bleue 0,065g de CAS +50 ml Eau distillée+10 ml
(1Mm FeCl₃.6H₂O+10mM HCl+40 ml
d'eau contenant 72,9 mg
HDTMA :hexadecyltrimethylammonium.

1.10- Solution Hoagland's

Dissoudre les composants de la solution A dans 998.75 ml de l'eau distillée, puis y rajouter 1 ml solution B et 0.25 ml de solution C

Solution A	(ml/L)
-1.00 M $\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$	1 ml/L
-1.00 M KNO_3	6 ml/L
-1.00 M $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$	4 ml/L
-1.00 M MgSO_4	2 ml/L

Solution B	(g/L)
- H_3BO_3	2.86
- $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$	1.81
- $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0.22
- $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$	0.08
- $\text{H}_2\text{MoO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$	0.02

Solution C

26.1 g EDTA dissous dans 286 d'eau distillée +24.9 $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ dissous dans 714ml d'eau distillée.

Nom : Ait Kaki	Date de soutenance :
Prénom : Asma	
Thème : Recherche de nouvelles potentialités des bactéries du genre Bacillus pour l'agriculture et l'agroalimentaire	
Résumé :	
<p>L'exploration des échantillons en provenance de divers environnements de l'Est Algérien (du lac salé de Ain M'lila et de la rhizosphère d'une plante adjacente ; de l'eau de la source thermique d'Oued El-Athmanya et du sol environnant ; de la rhizosphère de la plante <i>Calendula officinalis</i>, cultivée en serre à Setif) a abouti à l'obtention de 39 isolats de <i>Bacillus</i> et de <i>Paenibacillus</i>, dont 28 % sont sélectionnés pour leur capacité à inhiber la croissance de certaines moisissures phytopathogènes comme : <i>Alternaria alternata</i>, <i>Aspergillus niger</i>, <i>Botrytis cinerea</i>, <i>Cladosporium cucumerinum</i>, <i>Fusarium oxysporium</i> et <i>Fusarium sp.</i> Le calcul du taux d'inhibition de la croissance fongique par les isolats sélectionnés, réalisé, à titre d'exemple, sur <i>F. oxysporium</i> et <i>B. cinerea</i>, a permis d'obtenir des valeurs variant entre 39% et 84% suivant l'isolat. L'identification moléculaire des isolats sélectionnés par l'analyse d'ADN-16S et du gène « <i>gyrase-A</i> » a montré que les isolats de Ain M'lila appartiennent à <i>Bacillus amyloliquefaciens</i>, ceux isolés d'Oued El Athmanya sont : <i>B. amyloliquefaciens</i>, <i>B. atrophaeus</i> et <i>B. mojavensis</i>, enfin, les bactéries isolées de la rhizosphère de <i>C. officinalis</i>, sont : <i>Paenibacillus polymyxa</i>, <i>B. velezensis</i>, <i>B. amyloliquefaciens</i> et <i>B. subtilis subsp. spizezenii</i>. Les souches de <i>Bacillus</i> sélectionnées développent, dans les conditions de culture en fioles, des taux de sporulation importants variant entre $8 \cdot 10^8$ et $27 \cdot 10^8$ spores/ml., alors que, le taux de sporulation chez <i>P. polymyxa</i> est insignifiant. Seuls les isolats de <i>B. amyloliquefaciens</i> sont capables de produire de la protéase. Cependant, l'activité cellulase est observée chez toutes les espèces de <i>Bacillus</i> étudiées exceptant le <i>B. atrophaeus</i> qui a été le seul à produire de la chitinase. Toutes les espèces étudiées ont les mêmes capacités à produire les trois familles de lipopeptides (iturines, fengycines et surfactine), les siderophores et l'indole 3 acide acétique (IAA). Toutefois, le <i>P. polymyxa</i> (18SRTS) produit, dans les conditions expérimentales, une meilleure concentration d'IAA (54µg/ml). Par ailleurs, il est à mettre en exergue que, les <i>B. amyloliquefaciens</i> isolés du lac salé et de la source thermique produisent de nouvelles variantes de fengycines. En effet, il a été mis en évidence que le <i>B. amyloliquefaciens</i> (ET), produit de nouveaux homologues de fengycines A et B, ayant des chaînes d'acides gras à 20 et à 18 atomes de carbone, respectivement, et deux nouvelles variantes de fengycines (fengycine X et Y) à cycles peptidiques dont la structure diffère de celle des fengycines conventionnelles. L'activité antifongique de certains isolats (<i>B. amyloliquefaciens</i> (ET), <i>B. atrophaeus</i> (6SEL), <i>B. mojavensis</i> (9SEL), <i>B. amyloliquefaciens</i> (9SRTS) et <i>B. subtilis subsp. spizezenii</i> (23SRTS)) sur milieux gélosés à base d'exsudats racinaires de tomate, de courgette et d'haricot, obtenus à différentes températures a été observée, vis-à-vis d'<i>Alternaria alternata</i> et de <i>F. oxysporium</i>. En complément, les souches <i>B. atrophaeus</i> (6SEL), <i>B. amyloliquefaciens</i> (9SRTS) et <i>B. subtilis sub sp spizezenii</i> (23SRTS), ont fait l'objet d'une production industrielle avec un taux de survie, après lyophilisation, très appréciable et leurs test in situ en serre et en champs sur le pois chiche a révélé une capacité intéressante de biofertilisation, de phytostimulation et de biocontrôle, ce qui justifie largement l'objectif assigné à cette recherche.</p>	
Mots clés : <i>Bacillus</i>, <i>Paenibacillus</i>, lipopeptides, fengycines, phytostimulation, biocontrôle, siderophores, IAA.	
Directeurs de thèse : Pr. Philippe Thonart (Belgique) et Pr. Noredine Kacem Chaouche (Algérie)	
Laboratoires de recherche :	
Laboratoire de Mycologie, Biotechnologie et de l'Activité Antimicrobienne (LAMYBAM), université Mentouri 1 (Algerie).	
Centre Wallon de Biologie Industrielle (CWBI), Université de Liège- Belgique.	
Président : Pr. A. Boulahrouf	Université Constantine 1 (Algérie)
Codirecteurs de thèse :	
Pr. N. Kacem Chaouche	Université Constantine 1 (Algérie)
Pr. Ph. Thonart	Université de Liège (Belgique)
Examineurs :	
Pr. A. Guechi	Université Setif (Algérie)
Pr. A. Zitouni	E.N.S (Kouba-Algérie)
Pr. F. Delvigne	Université de Liège (Belgique)