



Université Sidi Mohammed Ben Abdellah
Faculté des Sciences et Techniques de Fès
www.fst-usmba.ac.ma

Année Universitaire : 2017-2018

Master Sciences et Techniques : Biotechnologie microbienne
MEMOIRE DE FIN D'ETUDES

Isolement et caractérisation de bactéries antagonistes contre *Fusarium oxysporum* et *Sclerotium rolfsii* : Agents causaux des pourritures racinaires chez la betterave sucrière

Présenté par :
ADADI Asmae

Encadré par:

- Pr. LAHLALI Rachid (ENA-Meknès)
- Pr. HAGGOUD Abdellatif (FST-Fès)

Soutenu le 13 juin 2018

Devant le jury composé de :

Pr. LAHLALI Rachid	ENA-Meknès
Pr. HAGGOUD Abdellatif	FST-Fès
Pr. AARAB Lotfi	FST-Fès

Stage effectué au laboratoire de Phytopathologie au sein de l'école nationale de l'agriculture de Meknès

FACULTE DES SCIENCES ET TECHNIQUES DE FES

B.P. 2202 – Route d'Imouzza – FES

Téléphone : 212 (35) 60 80 14 – 212 (35) 60 96 35 – 212 (35) 60 29 53 – Fax : 212 (35) 60 82 14

Dédicaces

Je dédie ce modeste travail

A l'âme de mes parents :

Ma mère Khadija Zentar, celle qui m'a donné la vie, le symbole de tendresse, qui a souhaité vivre pour longtemps juste pour nous voir. Qu'est ce que nous allons devenir, qui n'a espéré pour nous que du bonheur et de la réussite.

Mon père Ahmed Adadi, école de mon enfance. J'aurais aimé qu'il soit présent. Que dieu ait son âme dans sa sainte miséricorde.

A mes Très chères sœurs, Loubna , Hasnae et Nouha pour leur soutien à tous égards, et leurs indéfectibles encouragements tout au long de la réalisation de ce travail

A tous mes amis : Mary, Imad, Hamza, Chaimae, Fouzia , Yassir, Loubna, Hajar, Khadija, Khaoula, Sahar

Remerciements

Tout d'abord, je remercie Mon Dieu de m'avoir donné la force, la volonté et le courage afin d'accomplir ce modeste travail.

J'adresse le grand remerciement à mon encadrant: Monsieur LAHLALI Rachid, enseignant chercheur au département de protection des plantes à l'école nationale de l'agriculture de Meknès, qui m'a inspiré le thème de ce mémoire, et qui m'a accompagné de près durant tout ce travail, pour sa disponibilité, pour la confiance qu'il a su m'accorder et les conseils précieux qu'il m'a prodigués tout au long de la réalisation de ce projet.

Je souhaite exprimer ma gratitude à mon encadrant: Monsieur HAGGOURD Abdellatif, enseignant chercheur au Département de Biologie à la Faculté des Sciences et Techniques de Fès, pour ses directives durant ce travail. Je ne trouverai jamais les mots les plus appropriés pour exprimer la reconnaissance que je lui porte pour tous ses conseils, et pour toutes les fois qu'il a trouvé le temps nécessaire pour m'écouter.

J'exprime mes grands remerciements à Monsieur AARAB Lotfi, professeur chercheur au département de Biologie à la FST de Fès, de m'avoir fait l'honneur de faire partie de jury.

Mes sincères remerciements vont aussi aux doctorants du laboratoire de phytopathologie à l'ENA de Meknès.

RÉSUMÉ

Fusarium oxysporum et *Sclerotium rolfii*, entraînent des dégâts majeurs au niveau des cultures de la betterave à sucre. Cette étude a pour objectif principal, la contribution à l'élaboration d'une alternative de lutte, pour contrôler les pourritures racinaires provoquées par ces deux champignons.

Des essais de confrontation directe entre les deux champignons (*S. rolfii* et *F. oxysporum*) et des bactéries isolées à partir de différents sols rhizosphériques de la région de ELGHARB, et des ateliers pratiques de l'école nationale de l'agriculture de Meknès ont été effectués. Par ailleurs, l'observation microscopique du mycélium en co-culture avec les bactéries antagonistes, ainsi que l'étude de l'effet antifongique du surnageant bactérien des isolats utilisés ont été également réalisées.

Parmi 29 isolats obtenus à partir des différents biotopes étudiés, seulement 10 ont montré une activité antifongique contre *Sclerotium rolfii*, alors que seulement 8 étaient capables de réduire la croissance de *Fusarium oxysporum*. Les taux d'inhibition varient d'une bactérie à une autre ; le plus grand taux d'inhibition est celui obtenu chez l'isolat AP 3 avec 70% pour *S. rolfii* et 60% pour *F. oxysporum*. De plus, l'observation microscopique du mycélium des deux champignons (*Fusarium oxysporum* et *Sclerotium rolfii*), en présence des bactéries antagonistes montre un changement morphologique de ce dernier. Cependant, l'antibiose via le surnageant bactérien a permis d'obtenir des résultats moins efficaces que ceux obtenus en confrontation directe.

Un test de confrontation *in vivo* des isolats qui étaient capables de réduire la croissance du mycélium de *Sclerotium rolfii* *in vitro*, a été réalisé. Ainsi, tous les isolats testés ont entraîné des taux d'inhibition supérieurs à 50%

Enfin, une étude macroscopique, microscopique, moléculaire et biochimique (production d'amylase, cellulase et protéases, production de HCN, de AIA, ainsi que la solubilisation du phosphore) a été réalisée afin de caractériser les différents isolats obtenus.

Mots clés : Betterave à sucre, *Fusarium oxysporum*, *Sclerotium rolfii*, activité antifongique

TABLE DES MATIÈRES

Liste des Figures	i
Liste des tableaux	iii
Liste des annexes	iv
Liste des abréviations	v
Introduction	1

REVUE BIBLIOGRAPHIQUE

CHAPITRE 1 : Généralités sur la betterave sucrière	3
1- Importance au niveau mondial	3
2- Importance au niveau national	4
3- Taxonomie de la betterave à sucre	5
4- Description morphologique	5
5- Cycle de développement	6
6- Reproduction	7
7- Domaines d'utilisations	7
7.1- Extraction de sucre et valorisation des déchets	7
7.2- Production du bioethanol	7
CHAPITRE 2 : Vue générale sur les pourritures racinaires de la betterave sucrière	9
CHAPITRE 3 : Pourriture à <i>Sclerotium rolfsii</i>	10
1- Taxonomie de l'agent phytopathogène	10
2- Distribution géographique de l'agent pathogène	10
3- Description de l'agent pathogène	10
4- Physiologie	11
5- Cycle de vie	11
6- Facteurs de virulence	12
7- symptômes et dégâts	12
8- Moyens de lutte	13
8.1- Pratiques culturales	13
8.2- Amendements organiques	13
8.3- Lutte chimique	13
8.4- Solarisation	14
8.5- Lutte biologique et mécanismes d'action	14
CHAPITRE 4 : Pourriture à <i>Fusarium oxysporum</i>	16
1- Gammes d'hôtes	16
2- Description de l'agent pathogène	16
3- Cycle de vie	17
4- Facteurs de virulence	17
5- symptômes et dégâts	18
6- Moyens de lutte	18
6.1- Lutte culturale	18
6.2- Lutte chimique	19
6.3- Lutte biologique et mécanismes d'action	19

Matériel et méthodes

1- Matériel biologique	21
2-Méthodes.....	21
2.1. Confirmation de l'identité de <i>Fusarium oxysporum</i> par PCR conventionnelle	21
2.1.1- Extraction d'ADN	21
2.1.2- Amplification	21
2.1.3- Révélation de l'ADN amplifié	23
2.2- Isolement des bactéries à partir du sol	23
2.2.1- Prélèvement des échantillons	23
2.2.2- Mise en suspension du sol	24
2.2.3- Ensemencement et dénombrement	24
2.2.4- Purification des isolats	24
2.3- Recherche de l'antagonisme bactérien	24
2.4- Observation microscopique du mycélium en co-culture avec les bactéries antagonistes	25
2.5- Antagonisme via le surnageant bactérien	26
2.6- Test de confrontation <i>in vivo</i>	26
2.6.1- Préparation des pots	26
2.6.2- Test <i>in vivo</i>	26
2.7- Conservation des isolats antagonistes	28
2.8- Identification des bactéries antagonistes	28
2.8.1- Identification morphologique	28
a- Etude macroscopique	28
a- Etude microscopique	28
2.8.2- Caractérisation biochimique	28
2.8.2.1- Production des enzymes hydrolytiques	29
a- Amylase	29
b- Protéases	29
c- Cellulase	29
2.8.2.2- solubilisation du phosphore	30
2.8.2.3 Production d'HCN	30
2.8.2.4- Production de l'acide indole acétique	30
2.8.3- Identification moléculaire	30
a- Extraction d'ADN	30
b- Amplification par PCR	31
c- Révélation de l'ADN amplifié	32
2.9- Analyse statistique	32

RESULTATS

1- Confirmation moléculaire de l'identité de <i>Fusarium oxysporum</i> par la PCR conventionnelle	34
2- Résultats d'isolement des bactéries à partir du sol	35
3- Activité antifongique des bactéries isolées (<i>in vitro</i>).....	35
3.1- Cas de <i>Fusarium oxysporum</i>	35
3.2- Cas de <i>Sclerotium rolfsii</i>	37
4- Observation microscopique du mycélium	38
5- Antagonisme via le surnageant bactérien	39
5.1- Cas de <i>Fusarium oxysporum</i>	39
5.2- Cas de <i>Sclerotium rolfsii</i>	40
6- Confrontation <i>in vivo</i>	41
7- Identification des bactéries antagonistes	43
7.1- Identification morphologique	44
7.2- Caractérisation biochimique	44
7.2.1- Production des enzymes extracellulaire	44
a- Amylase	44

b- Protéases	45
c- Cellulase	46
7.2.2- Production de HCN et de l'AIA	46
7.2.3-Solubilisation du Phosphore	46
7.3- Identification moléculaire	47
Discussion	50
Conclusions et perspectives	54
Références bibliographiques	56
Annexes	I

LISTE DES FIGURES

Figure 1 : Pourcentage de production de la betterave sucrière par région	3
Figure 2 : Carte des zones sucrières au Maroc	4
Figure 3 : A ; Betterave sucrière montée sur le champ B Racine de la betterave sucrière	6
Figure 4 : Aspect de <i>Sclerotium rolfsii</i> sur milieu PDA.	11
Figure 5 : Pourriture à <i>sclerotium rolfsii</i> sur la betterave à sucre	12
Figure 6 : Aspect morphologique de <i>Fusarium oxysporum</i>	17
Figure 7 : symptômes de la pourriture à <i>Fusarium oxysporum</i>	18
Figure 8 : Méthode utilisée pour le test de confrontation <i>in vitro</i>	25
Figure 9 : Profil d'amplification de produits PCR des 5 isolats de <i>Fusarium oxysporum</i> ..	34
Figure 10 : Criblage <i>in vitro</i> des bactéries telluriques ayant un effet antagoniste contre <i>Fusarium oxysporum</i>	36
Figure 11 : Test <i>in vitro</i> d'antagonisme contre <i>Fusarium oxysporum</i>	36
Figure 12 : Criblage <i>in vitro</i> des bactéries ayant un effet antagoniste contre <i>Sclerotium rolfsii</i>	37
Figure 13 : Test de confrontation <i>in vitro</i> de <i>Sclerotium</i>	38
Figure 14 : Observation microscopique de <i>S rolfsii</i>	38
Figure 15 : Observation microscopique de <i>F. oxysporum</i>	39
Figure 16 : Résultats d'antibiose via le surnageant bactérien des 8 isolats contre <i>Fusarium oxysporum</i>	39
Figure 17 : Test d'antibiose via le surnageant bactérien contre <i>F.oxysporum</i>	40
Figure 18 : Résultats d'antibiose via le surnageant bactérien des 10 isolats contre <i>Sclerotium rolfsii</i>	40
Figure 19 : Test d'antibiose via le surnageant bactérien des 8 isolats contre <i>Sclerotium rolfsii</i> ; A : Témoin, B : <i>S rolfsii</i> en présence du filtrat de l'isolat AP10	41
Figure 20 : criblage <i>in vivo</i> des bactéries ayant un effet antagoniste contre <i>Sclerotium rolfsii in vitro</i>	42
Figure 21 : effet des isolats sur la croissance de la plante	42
Figure 22 : Test de confrontation <i>in vivo</i> de <i>Sclerotium rolfsii</i>	43
Figure 23 : Indice amylolytique chez les isolats bactériens antagonistes	45
Figure 24 : Indice protéolytique chez les isolats bactériens antagonistes	45
Figure 25 : Indice Cellulosique chez les isolats bactériens antagonistes	46
Figure 26 : Profil d'amplification de l'ADN des isolats	48

LISTE DES TABLEAUX

Tableau 1 : Classement des dix premiers pays producteurs de la betterave sucrière dans le monde	3
Tableau 2 : Composition du mix réactionnel de la PCR conventionnelle	22
Tableau 3 : composition du mix réactionnel	32
Tableau 4 : Nombre et codes d'isolats obtenus à partir de différents sols rhizosphériques ...	35
Tableau 5 : Caractéristiques macroscopique et microscopique des isolats	43
Tableau 6 : Production d'H ₂ CN et de l'AIA par les bactéries antagonistes	47
Tableau 7 : Récapitulation des résultats obtenus	49

LISTE DES ANNEXES

Annexe A : Tampon d'extraction Doyle-Doyle	I
Annexe B : Tampon d'extraction Llop et <i>al</i>	I
Annexe C : Gel d'agarose 1%	I
Annexe D : Tampon TBE	II
Annexe E : Tampon de charge 6X	II
Annexe F : Milieu PDA	II
Annexe G : Milieu à base de l'amidon	II
Annexe H : Milieu de culture à base de lait écrémé (protéases)	III
Annexe I : Milieu LB (Lauria Broth)	III
Annexe J : Milieu de culture PVK (Solubilisation du phosphore).....	III
Annexe K : Milieu LPGA	III
Annexe L : Solution picrate	IV
Annexe M : Préparation de graines de sorgho pour le test <i>in vivo</i>	IV
Annexe N : Analyses statistiques du test d'antagonisme (<i>Fusarium oxysporum</i>)	IV
Annexe O : Analyses statistiques du test d'antagonisme <i>S rolfsii</i>	VI
Annexe P : Analyses statistiques d'antibiose via le surnageant bactérien <i>F oxysporum vivo</i>	VII
Annexe Q : Analyses statistique d'antibiose via le surnageant bactérien <i>Sclerotium rolfsii</i>	IX
Annexe R : Analyses statistiques d'essai de Confrontation <i>in vivo S. rolfsii</i>	X
Annexe S : Analyses statistique du test Amylase	XI
Annexe T : Analyses statistiques du test protéase <i>rolfsii</i>	XII
Annexe U : Analyses statistiques du test cellulase	XIV

LISTE DES ABRÉVIATIONS

%	:	Pourcentage
ha	:	Hectare
FAO	:	Food and Agriculture Organization
Cm	:	Centimètre
°C	:	Degré Celsius
mm	:	Millimètre
PCNB	:	Pentachloronitrobenzène
CLP	:	Antibiotique lipopeptidique cyclique
µm	:	Micromètre
ppm	:	<i>Partie par million</i>
g	:	Gramme
g L-1	:	Gramme par litre
ENAM	:	<i>Ecole Nationale d'Agriculture de Meknès</i>
PCR	:	Polymerase chain reaction
ADN	:	Acide DésoxyriboNucléique
cm ²	:	Centimètre carré
ml	:	Millilitre
µl	:	Microlitre
min	:	Minute
rpm	:	Rotations par minute
l	:	Litre
Pb	:	Paire de base
ITS	:	Internal transcribed spacer
MgCl ₂	:	Chlorure de magnésium
BET	:	Bromure d'éthidium
T.B.E	:	Tris. Borate. EDTA
UV	:	Ultraviolet
PDA	:	Potato dextrose agar
UFC	:	Unité formant colonie
UFC/ml	:	Unité formant colonie par millilitre
UFC/g	:	Unité formant colonie par gramme
Fd	:	Facteur de dilution
Ve	:	Volumeensemencé
LB	:	Lauria Broth
tr / min	:	Tour par minute
DO	:	Densité optique
λ	:	Longueur d'onde
CMC	:	Carboxymehylcellulose
mg	:	Milligramme
NaCl	:	Chlorure de sodium
PVK	:	Pikovskaya
Ca ₃ (PO ₄) ₂	:	Phosphate tricalcique
HCN	:	Acide cyanhydrique
LPGA	:	Levure Peptone Glucose Agar
ARNr	:	<u>Acide ribonucléique ribosomique</u>
AIA	:	Acide indole acétique
FeCl ₃	:	Le chlorure de fer(III)
H ₂ SO ₄	:	Acide sulfurique
EDTA	:	Éthylène diamine tétra acétique

INTRODUCTION

La filière sucrière bénéficie d'un grand appui financier et technique, visant à renforcer sa chaîne de valeur. D'ailleurs ce secteur occupe une place importante dans l'agriculture marocaine, puisqu'il permet la couverture de la sécurité alimentaire du pays en matière de sucre, en atteignant 50% des besoins nationaux (Cosumar, 2016).

Cependant la culture de la betterave sucrière s'expose à plusieurs problèmes phytosanitaires, notamment les pourritures racinaires, qui constituent des contraintes majeures à la production de cette dernière, engendrant une baisse du rendement en sucre. Ces maladies sont causées par une carence en bore au niveau des racines, ou bien induites par des bactéries, champignons, et nématodes (Hermann et Wauters, 2002).

Actuellement, les pourritures racinaires causées par *Sclerotium rolfsii* et *Fusarium oxysporum* sont considérées parmi les maladies les plus dommageables au niveau des cultures betteravières, à cause des pertes économiques produites suite à leurs attaques. En effet la pourriture due à *S. rolfsii* entraîne la perte de plus de 50% de la récolte d'une exploitation (Khattabi et al., 2004), alors que les pertes causées suite à l'infection par *F. oxysporum* sont estimées aux alentours de 30% (Cramer et al., 2003).

Face à ces obstacles, et pour lutter contre ces pourritures chez la betterave sucrière, plusieurs approches ont été mises en œuvre ; comme la solarisation du sol, la lutte culturale (labour profond, rotation des cultures, ...) (khattabi et al., 2004), d'un autre côté ces maladies sont contrôlées par l'utilisation de pesticides chimiques. Cependant, l'utilisation intensive de ces composés peut conduire à un développement de résistance chez les agents pathogènes et provoquer de graves impacts environnementaux négatifs (Gerhardson, 2002), d'où la nécessité de développer de stratégies alternatives pour le contrôle de ces maladies. La lutte biologique contre les pourritures racinaire en utilisant des microorganismes antagonistes s'est déjà appliquée comme une alternative aux fongicides de synthèse.(Gajbhiye et al., 2010)

Alors, cette étude a été effectuée afin de contribuer à la recherche des approches alternatives pour la lutte contre les pourritures racinaires de la betterave sucrière causées par *Sclerotium rolfsii* et *Fusarium oxysporum*. Ainsi l'objectif de ce travail consiste à étudier l'effet antifongique de la microflore bactérienne tellurique.

La première partie de ce travail est consacrée à l'analyse et la synthèse des données bibliographiques relatives à la culture de la betterave sucrière et les pourritures racinaires qui peuvent l'attaquer. La deuxième partie, s'est focalisée sur les différentes techniques qui ont été mises en œuvre pour étudier l'effet des isolats bactériens sur la croissance des agents

pathogènes, et pour caractériser les souches les plus performantes sélectionnées et tenter de les identifier par une approche moléculaire ainsi que par des tests biochimiques. Dans la troisième partie les résultats des différentes analyses et tests sont analysés et discutés. Enfin, la dernière partie va présenter la conclusion générale et les perspectives de cette recherche.

REVUE BIBLIOGRAPHIQUE

CHAPITRE 1 : GÉNÉRALITÉ SUR LA BETTERAVE SUCRIÈRE

1- Importance au niveau mondial

En 2016, la production mondiale de la betterave sucrière était de 277230790 tonnes, récoltés sur 4564868 ha. Toutefois, l'Union Européenne fournit 66,8% de la production mondiale totale (FAO, 2016). En effet, la Fédération de Russie demeure comme le premier producteur mondial de la betterave sucrière, avec une production annuelle estimée à 51 millions de tonnes, suivi par la France avec une production de 33794906 tonnes, les États-Unis d'Amérique, l'Allemagne, la Turquie et l'Ukraine occupent respectivement, la troisième, la quatrième, la cinquième, et la sixième place mondiale en volume de production (FAO, 2016).

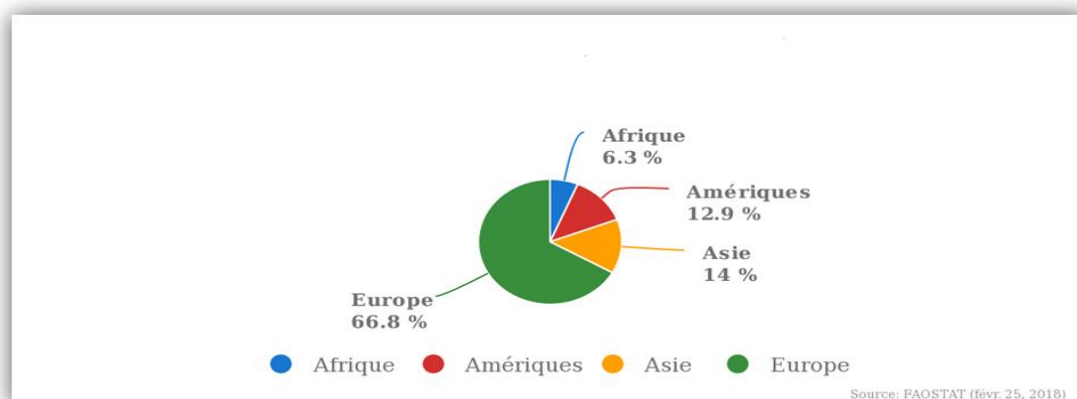


Figure 1 : Pourcentage de production de la betterave sucrière par région (FAO, 2016)

Tableau 1: Classement des dix premiers pays producteurs de la betterave sucrière dans le monde (FAO, 2016)

Pays	Classe	Production en tonnes	Part de la production mondiale
Fédération de Russie	1	51366830	18,52%
France	2	33794906	12,19%
les États Unis d'Amérique	3	33457880	12,06%
Allemagne	4	25497200	9,19%
Turquie	5	19465452	7,02%
Ukraine	6	14011450	5,05%
Pologne	7	13523781	4,87%
Egypte	8	13323369	4,80%
Chine	9	8095759	2,92%
Royaume unie	10	5687000	2,05%

2- Importance au niveau national

Au Maroc le secteur sucrier joue un rôle économique et social indéniable, ainsi la superficie consacrée à la culture de la betterave sucrière au Maroc, a été estimée selon la FAO en 2016 à 60978 ha, cette superficie permet la production de 4218923 tonnes de racines, ce qui permet une couverture de 50% des besoins nationaux en sucre (Cosumar, 2016).

En effet, les cultures industrielles sont situées au niveau des périmètres irrigués à Doukkala, Tadla, le Gharb, le Loukkos et la Malouya , dont doukkala présente la région qui offre la grande partie de la production sucrière (figure 2).

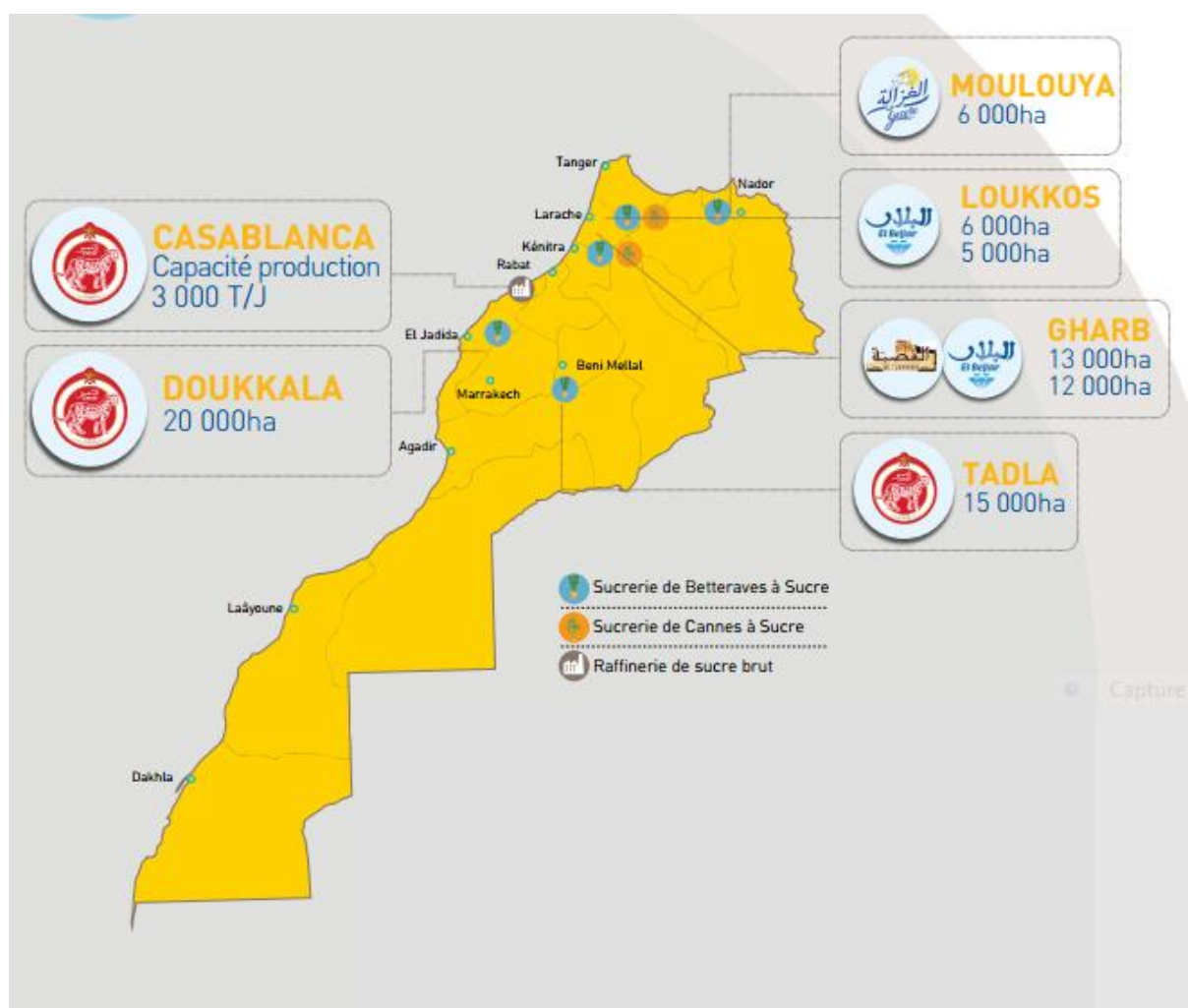


Figure 2 : Carte des zones sucrières au Maroc (Cosumar, 2016)

3- Taxonomie de la betterave à sucre

La betterave sucrière (*Beta vulgaris*) est une plante herbacée dicotylédone, appartient à la classe des Caryophyllidées, de l'ordre des Caryophyllales et la famille des chénopodiacées, Cette famille comprend environ 1400 espèces réparties en 105 genres , dont le genre Beta dans lequel est intégrée la betterave sucrière, cette dernière fait partie de l'espèce *Beta vulgaris* (Elliott et Weston, 1993).

4- Description morphologique

La betterave sucrière est une plante herbacée, semée à la fin de l'hiver de Mars à Avril et récoltée de septembre à novembre lorsque la racine atteint sa teneur maximale en saccharose. Cependant cet état ne correspond pas à l'état de maturité puisqu'il s'agit d'une plante bisannuelle (Didier, 2013).

Pendant la première année la betterave sucrière développe uniquement le système foliaire, ainsi que son appareil racinaire qui grossit et accumule ses réserves en saccharose (Hebrard, 2012). Les feuilles sont glabres et ovales, avec une couleur verte foncée formant un bouquet inséré sur le collet, mesurants presque cinquante cm de hauteur. La racine prend la forme d'un cône, avec une couleur blanchâtre à grisâtre, et mesurant entre 15 et 35 cm de long (Hebrard, 2012), avec une teneur en saccharose variant entre 13% et 22% (Belghiti Alaoui, 1993).

La deuxième année est caractrisée par le développement des fleurs et des graines, d'ailleurs la plante utilise ses réserves en saccharose pour se faire. La morphologie de la betterave sucrière se change, et on note une élongation de la tige florifère qui peut atteindre 1,5 mètre de hauteur (Elliott et Weston, 1993). À l'aisselle des feuilles, part une inflorescence en épi portant de nombreuses fleurs (Smith, 1987). Ce sont des fleurs hermaphrodites (Didier, 2013) comprennent un pistil à trois carpelles, entouré de cinq étamines et à cinq sépales étroits (Smith, 1987).

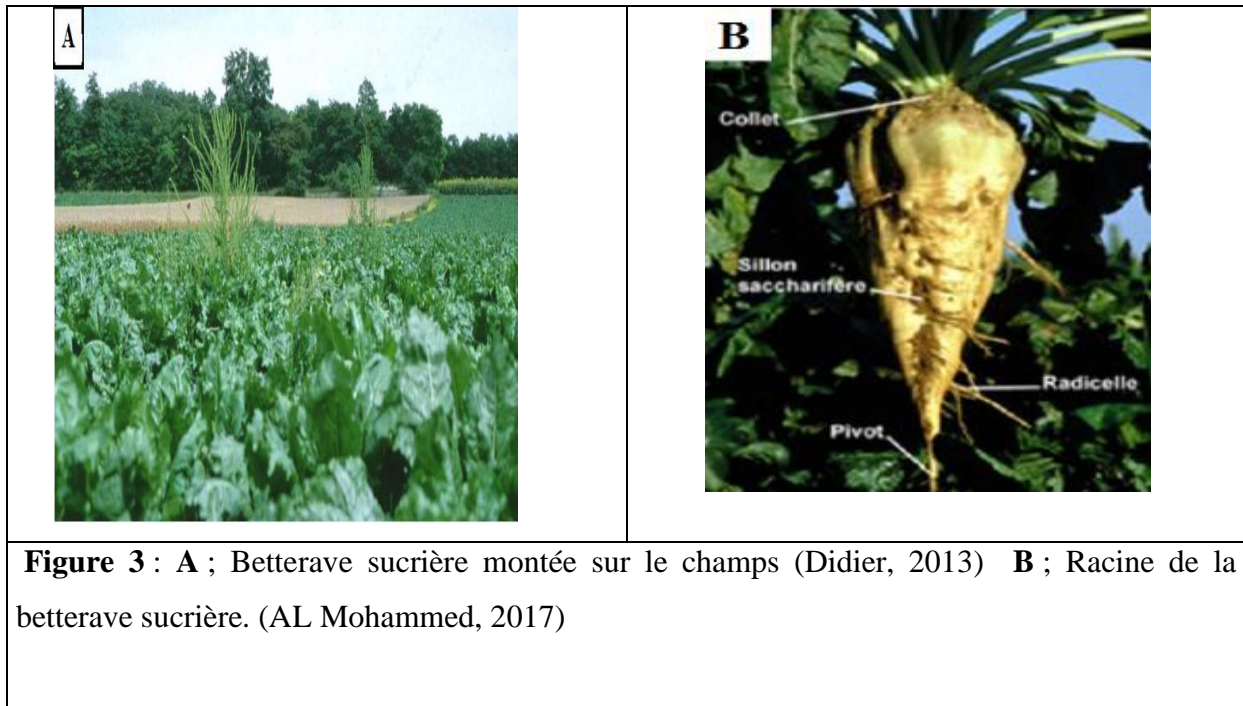


Figure 3 : **A** ; Betterave sucrière montée sur le champs (Didier, 2013) **B** ; Racine de la betterave sucrière. (AL Mohammed, 2017)

5- Cycle de développement

En ce qui concerne son développement, la betterave sucrière passe par plusieurs périodes définies par Fleury et Caneill (1984) , commençant premierment par la germination des graines, qui nécessite un sol humide, avec une température favorable, ainsi qu'un apport en oxygène (Coumans, 2008). Durant cette phase la plante vie sur les réserves de la semance. La deuxième phase (Décortication), s'étale de l'apparition de la deuxième paire de feuilles jusqu'au stage 16 feuilles, elle est caractérisée par le développement du pivot et la formation du cambium surnuméraire. Après la décortication, la tubérisation et la formation du bouquet auront lieu. Cette phase est caractérisée par le développement des feuilles pour atteindre 40 feuilles, en parallèle la racine grossit et présente une forme conique. Ensuite, les racines se maturent et emagazinent le maximum de sucre, à ce stade, la croissance des feuilles ainsi que la photosynthèse sont achevées. La dernière période de cycle de vie de la betterave sucrière est consacrée pour la production de la montée à graine, et cela se passe au niveau de la deuxième année, après exposition au froid hivernal (Bendahmane, 2004).

6- Reproduction

La betterave sucrière est une plante auto-incompatible, en d'autres termes l'auto-fécondation va aboutir à des graines anormales, d'où la nécessité d'une fécondation croisée pour la production des graines qui ont l'aptitude de donner des semences normales (Herbard, 2013).

Par la suite le pollen produit est déssiminé par le vent sur des grandes distance et parfois par les insectes.

7- Domaines d'utilisations

7.1- Extraction de sucre et valorisation des déchets

Les racines de la betterave sucrière sont transformées en sucre blanc, d'ailleurs la racine de la betterave sucrière contient presque 20% du saccharose (Al Mohammed, 2017). Le procédé d'extraction engendre à part le sucre pur des sous produits à savoir ; la pulpe et la mélasse.

La première est utilisée comme aliment pour les bovins et les ovins, ainsi elle peut être introduite dans la fabrication du papier (Champon, 2004). ou bien pour l'extraction des pectines (Huang et *al.*, 2017), alors que la deuxième est utilisée pour la production de la levure de boulangerie.

7.2- Production du bioethanol

Le monde fait actuellement face à une diminution des ressources énergétiques, notamment celles non renouvelables, ainsi leur utilisation massive aboutit à l'augmentation de la concentration du dioxyde de carbone dans l'atmosphère, favorisant par la suite l'effet de serre, et engendrant un changement climatique (Sanchez et Cardona, 2008). De ce fait des alternatives d'énergies renouvelables sont mises en place, dont le bioéthanol issu de la betterave sucrière fait partie.

La production industrielle de bioéthanol est réalisée par voie fermentaire par *Saccharomyces cerevisiae* (Ranković et *al.*, 2009), Le procédé de fermentation permet d'obtenir un vin contenant 12 à 17% d'éthanol, et comme l'utilisation de ce dernier comme carburant exige qu'il soit pur, il est donc nécessaire de séparer l'éthanol de l'eau contenue dans le vin par une distillation (Zhou et *al.*, 2011).

L'utilisation du bioéthanol a plusieurs avantages, en fait l'oxygène contenu dans ce dernier favorise la combustion du carburant en diminuant la quantité du monoxyde de carbone émise, ainsi que la quantité d'oxyde de soufre émise par rapport au carburant fossile (Riess, 2012).

CHAPITRE2 : VUE GÉNÉRALE SUR LES POURRITURES RACINAIRES DE LA BETTERAVE SUCRIÈRE

La culture de la betterave sucrière s'expose à plusieurs problèmes phytosanitaires, notamment les pourritures racinaires qui constituent des contraintes majeures à la production de cette dernière. Parmi ces pourritures on cite :

Le Rhisoctone brun constitue l'un des problèmes phytosanitaires racinaires des betteraves à sucre les plus dommageables au niveau des cultures de cette dernière (El-Tarabily, 2003). La maladie est causée par le champignon tellurique *Rhizoctonia solani*, et dont les symptômes se manifestent par un flétrissement des feuilles, et au niveau de la racine, des lésions de couleur brune foncée à noire ont été produites (Jacobsen, 2006). A côté du rhisoctone brun, s'ajoute la pourriture au pythium dont l'agent causal est *Pythium aphanidermatum*, cette dernière est caractérisée par un flétrissement des feuilles et une pourriture molle brune foncée. D'ailleurs sur l'extérieur de la racine les lésions sont de couleur sombre et de formes irrégulières et ressemblent à ceux causés par *Rhizoctonia* (Brantner et al., 1998). Une autre espèce appartenant au genre *Phytium* cause la pourriture au niveau racinaire chez la betterave à sucre c'est *P. deliense* dont la pourriture est brune à noir et progresse vers le haut dans la racine pivotante (Bardin et al., 2004).

En plus de ces problèmes phytosanitaires racinaires, il y a les pourritures à *Rhizopus* spp, qui sont causées généralement par l'intermédiaire de deux espèces : *Rhizopus stolonifer* et *Rhizopus arrhizus*. De même, on note un flétrissement au niveau du système foliaire, et au niveau racinaire ; une croissance mycélienne blanche a lieu, et qui devient plus tard sombre. Dans les stades avancés de la maladie, il y a formation de cavités au niveau des racines contenant un fluide avec l'odeur du vinaigre (Jacobsen, 2006). Sans oublier la pourriture à *Phytophthora drechsleri* dont les symptômes se manifestent par un flétrissement, et une pourriture molle à la base de la racine pivotante qui s'étend finalement vers le haut. Cette pourriture a lieu lorsque les sols sont bien humides, et lorsque les températures sont aux alentours de 30°C (Cothier, 1975).

D'autres agents phytopathogènes peuvent contribuer à la pourriture racinaire chez la betterave sucrière, à savoir : *Aphanomyces cochlioides*, *Phoma beta*, et *Macrophomina phaseolina* (Jacobsen, 2006), *Fusarium oxysporum* et *sclerotium rolfsii* ; les deux derniers champignons seront traités par la suite. (Pages : 10-20)

CHAPITRE 3 : POURRITURE À SCLEROTIUM ROLFSII

La pourriture racinaire causée par *Sclerotium rolfsii* Sacc est une maladie sévère qui engendre des pertes importantes au niveau des cultures de la betterave sucrière (Khattabi et *al.*, 2001).

1- Taxonomie de l'agent phytopathogène

Sclerotium rolfsii est un champignon pathogène appartenant à la famille des basidiomycètes (Remesal et *al.*, 2012), il représente la phase asexuée de *Athelia rolfsii*. Il a été découvert en premier temps en Floride au Etats Unis sur tomate par Rolfs. Le champignon est très polyphage, en effet sa gamme d'hôtes comprend plus de 500 espèces végétales, principalement des dicotylédones, mais aussi quelques monocotylédones (Cilliers et *al.*, 2002) à savoir : l'arachide, la tomate, et la betterave à sucre.

2- Distribution géographique de l'agent pathogène

Sclerotium rolfsii est réponde dans les régions tropicales et subtropicales, et autres régions tempérées chaudes, dont les températures sont suffisamment élevées pour permettre la croissance et la survie du champignon, et par conséquent le déclenchement de la maladie (Khattabi et *al.*, 2001). En particulier il se retrouve au États-Unis, Amérique centrale et du Sud, Antilles, pays du sud de l'Europe limitrophes, Méditerranée, Afrique, Inde, Japon, Philippines et Hawaï (Punja, 1985).

3- Description de l'agent pathogène

Le mycélium de *Sclerotium rolfsii* se caractérise par une couleur blanchâtre au cours des premiers stades de croissance, et il devient terne dans les stades ultérieurs.

Les sclérotés se forment après une semaine de culture, ils représentent la forme de conservation. Ils sont lisses, sphériques leur diamètre varie entre 1 et 3 mm, leur couleur et d'abord blanche, puis fauve à brun rouge. Ils sont très résistants, puisqu'ils sont protégés par une solide couche corticale. La partie centrale de ces sclérotés se compose de plusieurs alvéoles (Georgiou, 1997).

Les basides constituent la structure sexuée du champignon; ces dernières sont rarement rencontrées dans la nature, ainsi leur rôle dans le cycle de vie du champignon n'est pas encore connue (Remesal et *al.*, 2012).

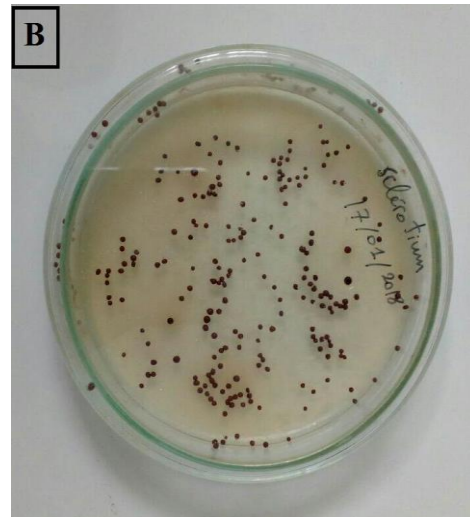


Figure 4 : Aspect de *Sclerotium rolfii* sur milieu PDA. (A) Mycélium ;(B) Sclérotés

4- Physiologie

S. rolfii est un champignon aérobi, qui se retrouve dans les sols legers qui sont plus aérés. Il est capable de survivre dans un large éventail de conditions environnementales. D'ailleurs sa croissance est possible dans une large gamme de pH, mais mieux sur les sols acides. Le pH optimale pour la croissance des mycéliums est de 3 à 5 (Ferreira et Boley, 2006). Ainsi la croissance maximale de mycélium s'effectue entre 25 et 35°C (Patterson et *al.*, 1951). De même, la lumière favorise de plus le développement du champignon, donc la croissance des mycéliums et la germination des sclérotés se produisent rapidement lorsqu'ils sont y exposés à cette dernière (Punja, 1985).

5- Cycle de vie

Pendant l'hiver, le champignon se conserve sous forme de sclérotés, ces derniers sont résistants au grandes températures, ainsi qu'à la séchresse, d'ailleurs ils restent viables pendant plusieurs années. Après une exposition à la chaleur ainsi que l'humidité la germination des sclérotés aura lieu, et le mécylium prouduit s'attaque au racines de la plante, d'où la manifestation de la maladie (Purdy, 1979).

6- Facteurs de virulence

La virulence de *Sclerotium rolfsii* est liée à la production de substances toxiques à savoir l'acide oxalique, dont le rôle dans la pathogénicité a été étudié par Kritzman et *al* (1977), qui ont découvert que les filtrats de *S. rolfsii*, causent au niveau des plantes hôtes, des blessures similaires à celles causées par l'acide oxalique. D'ailleurs des quantités considérables d'acide ont été trouvées dans les cellules hôtes tuées par ce champignon. Par ailleurs Bateman et Beer (1965) ont suggéré que l'acide oxalique, les enzymes pectiques et la cellulase agissent en synergie dans la destruction du tissu de l'hôte par *S. rolfsii*.

7- Symptômes et dégâts

L'infection de la betterave à sucre par *Sclerotium rolfsii* se manifeste par un flétrissement des feuilles, en d'autres termes les feuilles perdent leur turgescence. Ce symptôme se communique plus tard aux feuilles du cœur lorsque les feuilles externes commencent à se dessécher. Les racines sont entourées d'un manchon mycélien, sur lequel se trouvent les sclérotés (Kaeding, 1963).

Les attaques de la betterave sucrière par ce champignon surviennent en fin de cycle et entraînent des dégâts pouvant causer la perte de 50% de la récolte d'une exploitation (Khatabi et *al.*, 2004).



Figure 5 : Pourriture à *sclerotium rolfsii* sur la betterave à sucre (Don Ferrin)

8- Moyens de lutte

Un certain nombre de méthodes de lutte préconisées pour combattre *Sclerotium rolfsii* peuvent être utilisées, dans le but d'éviter, ou minimiser les pertes qui en résultent de sa prolifération, D'ailleurs cette lutte s'appuie essentiellement sur la prévention en réduisant la source primaire de l'inoculum autrement dit, en limitant les facteurs favorisant la germination des spores et le développement de la maladie.

8.1- Pratiques culturales

La lutte culturale contre *S. rolfsii* comprend des labours profonds, afin d'enfouir les sclérotés dans les couches profondes du sol (Liamngee et *al.*, 2015). En plus il faut adapter plus étroitement les dates de semis et de récolte à la saison fraîche de l'année, et de récolter les betteraves vers la fin de la période végétative. Aussi il faudrait éviter les irrigations trop abondantes, puisque un sol humide favorise la diffusion de l'agent causal (Kaeding, 1963).

8.2- Amendements organiques

Les composts ont été reconnus depuis longtemps pour faciliter le contrôle biologique des pathogènes végétaux transmis par le sol, puisqu'ils peuvent introduire des agents de lutte biologique dans les milieux de croissance, et servir en même temps de base alimentaire pour leur établissement et leur activité (Danon et *al.*, 2007). D'ailleurs l'ajout du compost, ou de la paille au sol limitent l'incidence de la maladie.

8.3- Lutte chimique

La lutte chimique s'appuie sur l'utilisation des fongicides capables de limiter l'incidence de la maladie, en réduisant la concentration de l'agent phytopathogène dans le sol. Dans ce cadre plusieurs produits ont été utilisés à savoir : la chloropicrine, le pentachloronitrobenzène (PCNB), et le bromure de méthyle (Jenkins et Averde, 1986).

Ainsi l'insecticide chlorpyrifos est également utilisé pour le traitement du sol afin de lutter contre *S. rolfsii*. Cependant la toxicité et le coût des fumigants limitent leur utilité, à titre d'exemple: le bromure de méthyle qui a été utilisé pendant de nombreuses années pour lutter contre la maladie, maintenant il n'est plus disponible, en raison de ses effets néfastes sur la couche d'ozone de l'atmosphère (Liamngee et *al.*, 2015).

8.4- Solarisation

Parmi les contrôles préconisés pour lutter contre *S. rolfsii* ; l'utilisation de la solarisation du sol en couvrant le sol avec un film de polyéthylène pendant la saison chaude, ce qui engendre l'augmentation de la température de ce dernier, et par conséquent tuer les sclérotés lorsque la température sous le film devient suffisamment élevée (Flores-Moctezuma et al., 2006). D'ailleurs des essais sur le terrain ont permis d'obtenir une dégradation des sclérotés à 1 cm, mais l'éradication à de plus grandes profondeurs n'a généralement pas eu lieu. Cependant la solarisation du sol combinée avec l'ajout de *Trichoderma harzianum* diminue l'incidence de la maladie plus que le traitement au polyéthylène seul (Ferreira et al., 2006).

8.5- Lutte biologique et mécanismes d'action

Le control biologique est devenu plus important au cours des dernières années, il est maintenant considéré comme le plus bénéfique pour l'environnement, car il minimise l'utilisation des pesticides chimiques dans la gestion des maladies (Lewis et Papavizas, 1991). Alors la lutte biologique contre *Sclerotium rolfsii* repose sur l'utilisation des antagonistes biologiques naturels ;

Plusieurs microorganismes ont été révélés ayant un effet antagoniste contre ce champignon dont certains espèces de Trichoderma à savoir : *Trichoderma viridie*, et *Trichoderma harzianum* qui excrètent de la β -1, 3-glucanase et de la chitinase qui sont deux enzymes hydrolytique utilisées pour attaquer le champignon (Elad et al., 1982). A coté des espèces de Trichoderma, *Serratia marcescens* attaque *Sclerotium rolfsii* en excrétant ces deux enzymes, d' ailleurs *S marcescenc* cause une dégradation des hyphes du champignon (Ordentlich et al., 1987).

Des espèces de Streptomyces sont également considérées comme des antagonistes du champignon, et cela est due grâce à la production des antibiotiques qui sont des métabolites secondaires appliqués par ces microorganismes dans la lutte contre les agents pathogènes (Errakhi et al., 2007).

De plus, plusieurs études menées pour tester l'activité de *Pseudomonas fluorescens* contre *Sclerotium rolfsii*, ont conduit à des résultats positifs, puisque cette bactérie a restreint la croissance mycélienne de *S. rolfsii* dans des les essais *in vitro* (Ganesan et Gnanamanickam, 1987) et cela est due grâce à la production des composés actifs ayant la capacité de réduire l'incidence de la maladie parmi ces composés : le Massetolide A (le et al., 2011). Ce dernier est un antibiotique lipopeptidique cyclique (CLP), produit par cette bactérie et qui lui confère

sa capacité de lutter contre plusieurs agents pathogènes à savoir *Sclerotium rolfsii*. Une autre espèce appartenant au genre *Pseudomonas* c'est *Pseudomonas aerogenosa* ; a son tour elle réduit la croissance de *Sclerotium rolfsii* jusqu'à 74% (Chanutsa et al., 2014). D'un autre côté *Bacillus subtilis* a également la capacité d'inhiber ce champignon, d'ailleurs elle produit une substance antifongique qui a un effet inhibiteur sur une large gamme de champignons, y compris *S. rolfsii* (Nalisha et al., 2006).

CHAPITRE 4 : POURRITURE À FUSARIUM OXYSPORUM

Le champignon *Fusarium oxysporum* peut causer à la fois la jaunisse fusarienne et la pourriture des racines au niveau des cultures de la betterave sucrière. La première est causé par *Fusarium oxysporum* fsp *betae*, cependant la deuxième est causée par *Fusarium oxysporum* f. sp. *radicis-betae* (Hanson et al., 2017).

1- Gammes d'hôtes

Fusarium oxysporum est l'une des espèces les plus importantes du point de vue économique, compte tenu de ses nombreux hôtes et du niveau des dégâts qu'elle peut entraîner. D'ailleurs ce champignon attaque une large gamme de plantes à savoir : la betterave à sucre , la patate douce, les choux , la tomate... (Nelson, 1981)

2- Description de l'agent pathogène

Le mycélium de l'agent phytopathogène est constitué d'hyphes qui croissent au-dessus de la surface du milieu gélosé, il est floconneux, il a une couleur blanche cassée, et il devient violet dans les plus anciennes parties de la colonie (Janati Idrissi, 2015).

Ainsi le champignon produit trois types de spores asexués ; Macroconidies, Microconidies , et chlamydospores ;

Les macroconidies sont falciformes à droites, avec un à trois cloisons par conidie, elles sont allongées, plus ou moins arquées, amincies au deux extrémités, et dont la largeur varie entre 3 et 5 μm , et la longueur varie entre 20 et 35 μm . Ces conidies sont produites par des conidiophores ramifiés en sporodochies, ou par le mycélium aérien.(Karkachi, 2013). Au niveau des sporodochies, les macroconidies ont une forme typique et une taille uniforme, alors que celles produites par le mycélium, sont de forme et de taille variables (Karkachi, 2013).

Les microconidies sont d'habitude non cloisonnées, ayant une forme rénale ou bien ovale. La largeur varie entre 3 et 5 μm et la longueur varie entre 3 et 15 μm . Ces dernières sont produites par les microphialides (karkachi, 2013 ; Nelson,1981). Et Les chlamydospores sont différenciées par les hyphes.

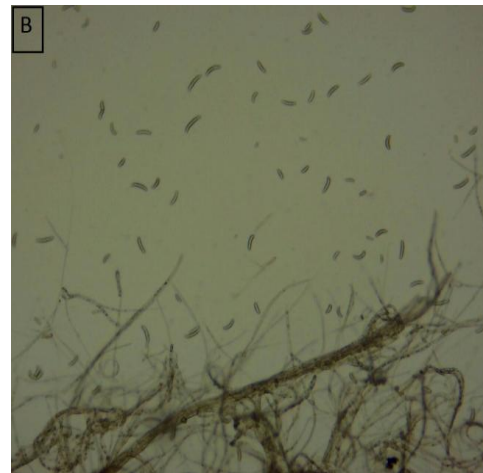
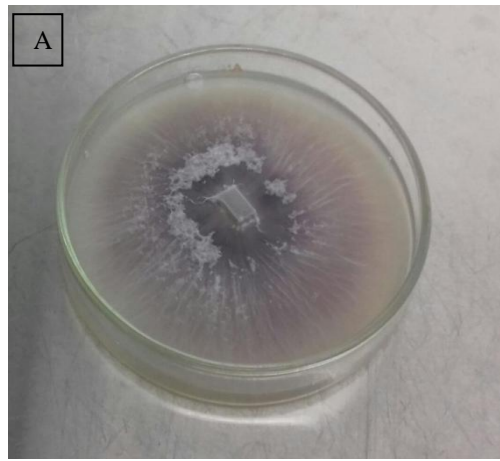


Figure 6 : Aspect morphologique de *Fusarium oxysporum*. A : Mycélium sur milieu PDA , B : *Fusarium oxysporum* sous microscope x40

3- Cycle de vie

Fusarium oxysporum persiste dans le sol en état de dormance sous forme de chlamydospores jusqu'à ce qu'elles soient stimulées pour germer (Harveson, 2008). D'ailleurs en contact de l'hôte et une fois les conditions deviennent favorables, plus spécifiquement lorsque le sol commence à se réchauffer, les chlamydospores germent et la production des conidies et de nouvelles chlamydospores a lieu. Et par conséquent le champignon envahit la racine et peut se finir par résider dans le système vasculaire en provoquant une transpiration de l'eau (Harveson, 2008) .

4- Facteurs de virulence

Le mécanisme d'infection par *Fusarium oxysporum* est accompagné par la production des métabolites toxiques à savoir : les mycotoxines comme la trichothécène (Mirocha et *al.*, 1989). Ainsi la production des enzymes cellulolytiques et xylanolytiques semble contribuer au champignon son caractère pytopathogène (Panagiotou et *al.*, 2003).

5- symptômes et dégats

la pourriture racinaire due à *F. oxysporum* f. sp. *radicis-betae*, apparaît sous forme de pourriture noire visible sur la surface de la racine (Hanson et al., 2017).

À côté des attaques au niveau de la racine, le système foliaire présente aussi des symptômes qui se manifestent par une jaunisse des feuilles, ces dernières deviennent par la suite sèches et cassantes (Hanson et al., 2017).

Les attaques de la betterave sucrière par *Fusarium oxysporum* entraînent des pertes en rendement pouvant atteindre 30% dans des conditions environnementales appropriées (Cramer et al., 2003).

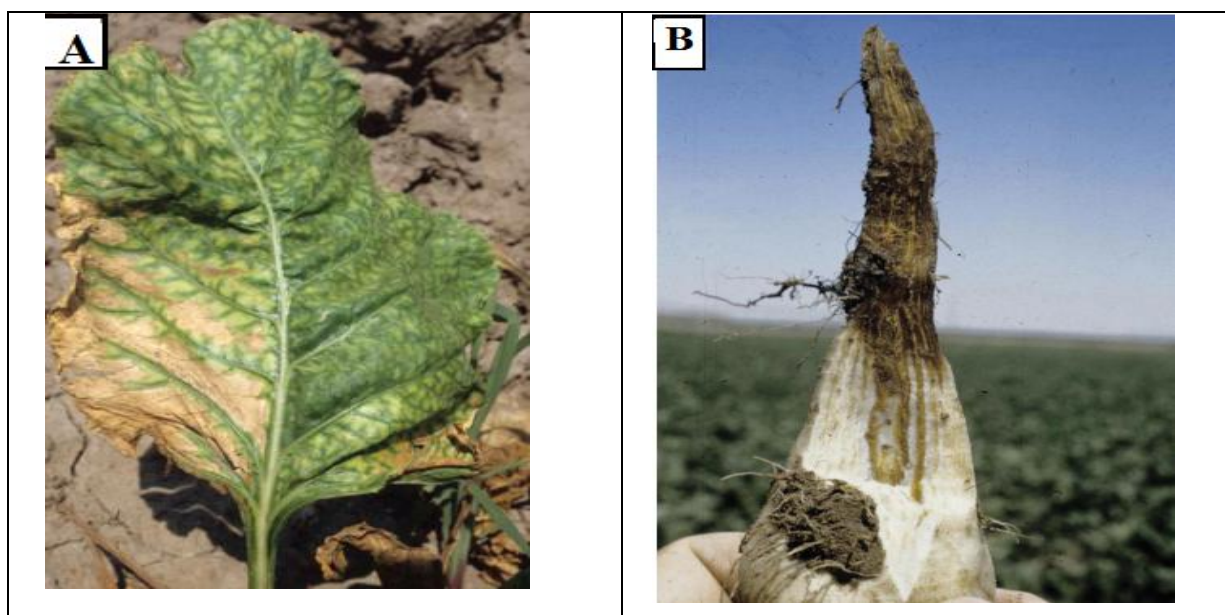


Figure 7 : Symptômes de la pourriture à *Fusarium oxysporum*. (A) Au niveau des feuilles, (B) Au niveau de la racine (Harveson, 2008).

6- Moyens de lutte

6.1- Lutte culturale

La maladie est mieux contrôlée en procédant à une plantation précoce, qui permet le développement des plantes avant que les conditions ne favorisent l'infection, aussi l'élimination des mauvaises herbes et l'utilisation de la rotation des cultures avec les cultures non hôtes, et en évitant la succession des cultures sensibles au champignon est l'une des méthodes recommandées pour le contrôle de *Fusarium oxysporum* (Abdesselem, 2017).

6.2- Lutte chimique

Plusieurs fongicides de synthèse sont envisagés pour lutter contre *Fusarium oxysporum*, d'ailleurs Hibar et al (2007) ont testé l'activité de L'hymexazol, et le benomyl, qui ont été avérés efficaces puisqu'ils entraînent un niveau d'inhibition de la croissance mycélienne de l'ordre de 80% *in vitro*. Toutefois, les essais de lutte *in vivo* avec ces deux fongicides ont montré que seul l'hymexazol s'avère efficace pouvant entraîner une réduction de l'incidence de la maladie de l'ordre de 76%.

En effet, une étude menée par Ifard (2017), a été révélée que l'Hymexazol et le Thiophanate méthyle peuvent stopper totalement la croissance mycélienne, en les utilisant à une concentration de 1 ppm. De plus un autre fongicide à base de Tébuconazole et Trifloxystrobine a été utilisé, il permet une inhibition complète de la croissance mycélienne à une concentration de 10 ppm (Ifard, 2017).

De même, la croissance du *Fusarium oxysporum* était totalement supprimée *in vitro*, en utilisant une concentration de 80 ppm du fongicide Vitavax (Shalaby et al., 2015).

6.3- Lutte biologique et mécanismes d'action

La lutte biologique consiste à utiliser contre un organisme pathogène, d'autres organismes présentant un effet antagoniste contre ce dernier afin de diminuer sa concentration au dessous d'un seuil critique (Mendgen et al., 1991).

La lutte biologique contre *Fusarium oxysporum* met en œuvre plusieurs antagonistes ; en effet l'introduction de *Fusarium oxysporum* ainsi que des espèces de *Fusarium solani* non pathogènes dans le sol, bloque l'accès de l'agent pathogène ; D'ailleurs, au niveau de la rhizosphère, se déroule des phénomènes de compétition qui délimitent l'activité de l'agent pathogène (Abdsselem, 2017). De même, L'utilisation de *Trichoderma harzianum* permet une réduction de la croissance de l'agent pathogène, et cela est due grâce à la production, de certains métabolites actifs, tels que les chitinases, les cellulases, les β -galactosidases, ainsi que certains antibiotiques, à savoir la trichodermine, la gliotoxine et la gliovirine (Mohamedi et Haggag, 2006).

Toutefois, l'application de levures comme agents de lutte biologique demeure une nouvelle tendance contre différents pathogènes (El-Tarabily et Sivasithamparam, 2006), en effet des recherches ont révélés que l'utilisation de *Saccharomyces cerevesiae* à une concentration de 6,35 g L⁻¹ permet une inhibition qui dépasse 50% de la croissance de *Fusarium oxysporum*

(El-Sayed Shalaby et El-Nady, 2008). Cette inhibition est réalisé par la synthèse d'une large gamme de protéases par cette levure entraînant la dégradation de mycélium de l'agent pathogène (Achstetter et Wolf, 1985).

Les bactéries aussi tiennent à leur tour une place indéniable dans la lutte biologique contre ce champignon ; à savoir *Bacillus cereus* qui présente un effet antagoniste contre *Fusarium oxysporum* en produisant des enzymes hydrolytiques, y compris la chitinase, la chitosanase et la protéase (Chang et al., 2006). Une autre espèce appartenant au genre Bacillus, (*Bacillus subtilis*) ; elle permet une diminution de la croissance qui dépasse 50%. Cette inhibition est due grâce aux antibiotiques synthétisés par la bactérie (Gajbhiye et al., 2010). Aussi, *Bacillus amyloliquefaciens* NJN-6 a un effet antagoniste contre ce champignon, puisqu'elle produit des composés volatils qui inhibent la croissance et la germination des spores de *Fusarium oxysporum* (Yuan et al., 2012). Ainsi des études ont montré que *Pseudomonas fluorescens* est capable de réduire l'incidence de la maladie par *Fusarium oxysporum* (Lemanceau et Alabouvette, 1991) en produisant des enzymes extracellulaires ayant un effet antifongique comme la chitinase, ainsi que d'autres composés actifs qui confèrent à la bactérie son effet antagoniste (Singh et al., 2006).

La présente étude s'est fixé les objectifs suivants :

- ❖ Isoler les bactéries à partir de deux sols différents (rhizosphère de la betterave sucrière, sol des ateliers pratiques d'agronomie de l'ENA de Meknès)
- ❖ Etudier le comportement *in vitro* de *Sclerotium rolfsii* et de *Fusarium oxysporum* en présence de différents isolats.
- ❖ Tester le potentiel des isolats ayant un effet *in vitro* à contrôler la maladie *in vivo* pour *Sclerotium rolfsii*
- ❖ Caractérisation morphologique, biochimique, moléculaire des isolats antagonistes.

MATÉRIEL ET METHODES

1- Matériel biologique

Deux champignons phytopathogènes (*Fusarium oxysporum* et *Sclerotium rolfsii*), ont été isolés au laboratoire de phytopathologie de l'ENAM à partir des racines de la betterave sucrière infectée.

2- Méthodes

2.1. Confirmation de l'identité de *Fusarium oxysporum* par PCR conventionnelle.

2.1.1- Extraction d'ADN

L'extraction d'ADN a été effectuée à partir du mycélium du champignon. Le protocole que nous avons adopté est celui proposé par Doyle et Doyle (1990). C'est une extraction d'ADN standard qui permet d'obtenir un culot conservable à -20 °C. Cette extraction a été réalisée comme suit :

Des morceaux de 1 cm² du mycélium ont été enlevés et mis dans des tubes eppendorf de 1,5 ml, ensuite 500µl du tampon d'extraction (Annexe A) a été ajouté. Le mélange a été broyé à l'aide d'un pilon puis, vortexé. Les eppendorfs ont été incubés au bain marie à 65°C pendant 30 min, et durant l'incubation les tubes sont mélangés en les basculant. Les tubes par la suite ont été centrifugés à 13.000 rpm pendant 5 min à température ambiante, et 400 µl du surnageant a été récupérée et mélangé avec une quantité équivalente (400 µl) de chloroforme / isoamylalcool (24/1), les tubes ont été agités pendant 5 min à température ambiante et centrifugés à 14000 rpm pendant 5 min. Le surnageant (350 µl) est repris dans un nouveau tube eppendorf, auquel un volume équivalent en isopropanol est ajouté. Les tubes sont basculés, centrifugés encore une fois à 14000 rpm pendant 10 min. Le surnageant est jeté et le culot est suspendue dans 500µl d'éthanol 70°C et vortexé, puis centrifugé 5 min à 14000rpm pendant 5 min. Le surnageant est jeté et le culot est séché à 60°C pendant 40 min, et repris dans 50µl d'Eau Distillée Stérile. En fin L'ADN obtenu est conservé à 20°C.

2.1.2- Amplification

Les amorces qui sont utilisées pour l'amplification de l'ADN sont celles décrites par Prashant et al (2003), Ces amorces permettent l'amplification d'un fragment de 400 Pb à partir des régions ITS.

FOF 1: 5' ACATACCACTTGTTGCCTCG 3'

FOR1: 5' CGCCAATCAATTTGAGGAACG 3'

La réaction de polymérisation en chaîne a été réalisée dans un mélange réactionnel qui comprend l'ADN bactérien, la Taq polymérase, les amorces, MgCl₂, l'eau distillée stérile et les quatre désoxyribonucléotides triphosphates (dNTP) dans une solution tampon (Table 2).

Tableau 2 : Composition du mix réactionnel de la PCR conventionnelle

Réactif	Volume x1(μl)	Concentration initiale	Concentration finale
ADN	1	_____	_____
<i>FOF 1</i>	1,25	10 μM	0,5 μM
<i>FOR 1</i>	1,25	10 μM	0,5 μM
Tampon 10 x	2,5	10 X	10 X
MgCl ₂	0,75	50 mM	1,5 mM
Taq polymérase	0,25	5 U/ul	0,5 U/μl
dNTP	0,25	10 mM	0,1 mM
H ₂ O	17,75	_____	_____
Voulume à distribuer	24	_____	_____
Volume réactionnel	25	_____	_____

Les tubes contenant le mélange réactionnel ont été soumis à 35 cycles successive chaque cycle comprend 3 périodes :

Dénaturation à 94°C pendant 30 secondes : A cette température, les liaisons qui assuraient la cohésion de la double hélice d'ADN sont rompues pour donner deux brins d'ADN monocaténares.

Hybridation des amorces à 55°C pendant 30 secondes : cette étape est caractérisée par l'appariement spécifique des amorces sur leurs brins complémentaires.

Elongation à 72°C pendant 1 min. A cette température, les amorces hybridées à l'ADN servent de point de départ à la polymérisation du brin d'ADN complémentaire de l'ADN matrice. La polymérisation se fait par ajout successif des désoxyribonucléotides En fait, chaque base ajoutée est complémentaire de la base correspondante du brin matrice.

Le programme d'amplification est précédé par une dénaturation initiale de 5min à 94°C, et se termine par une élongation finale de 5 min à 72°C.

2.1.3- Révélation de l'ADN amplifié

L'ADN amplifié par les amorces utilisées a été visualisé par la technique d'électrophorèse et coloration au BET.

Après l'étape de l'amplification, les amplicons obtenus ont été déposés sur un gel d'agarose à 1% (Annexe B). En effet 10 µl des produits PCR a été mélangée avec 3 µl du tampon de charge 6x (Annexe E). Pour estimer la taille des fragments amplifiés ; un puit a été réservé au marqueur de poids moléculaire. La migration de l'ADN s'effectue dans le tampon T.B.E (0.5x) (Annexe D)

Après migration de 40 à 45 min à 100 volts, les bandes d'ADN ont été visualisées sur un transilluminateur UV après coloration du gel dans une solution de bromure d'éthidium (BET) (1µl/ml) pendant 25 min, et rinçage dans l'eau distillée stérile pendant 15 min.

2.2- Isolement des bactéries à partir du sol

2.2.1- Prélèvement des échantillons

Deux échantillons du sol ont été prélevés à partir des zones betteravières et non betteravières :

- Un sol est prélevé à partir des ateliers pratiques d'agronomie de l'école nationale de l'agriculture ;
- Un sol est prélevé à partir des champs de la betterave sucrière de la région d'ELGHARB.

2.2.2- Mise en suspension du sol

25 g de chaque échantillon est mise en suspension dans 100 ml de l'eau distillée stérile, et agité pendant 30 min pour libérer le maximum de charge microbienne. A partir de cette solution une série de dilution décimale jusqu'à 10^{-4} est préparée.

2.2.3 Ensemencement et dénombrement

100 µl de chaque dilution à été étalée sur milieu PDA (trois répétitions pour chaque dilution), puis les boîtes sont incubées à 28°C pendant 48 heures.

Le dénombrement est effectué à partir de la dilution 10^{-4} pour les deux échantillons et le nombre de bactéries est exprimé en UFC/ml, ramené par la suite à UFC/g de sol. ce dénombrement est calculé utilisant la formule suivante :

$$\text{Charge bactérienne} = (\text{Nombre moyen de colonies} \times \text{Fd}) / \text{Ve}$$

Avec N est le nombre des colonies bactériennes, Fd est le facteur de dilution et Ve correspond au volume ensemencé.

2.2.4- Purification des isolats

Après 48 heures d'incubation, les colonies bactériennes de chaque aspect morphologique ont été ensemencées par épuisement sur milieu PDA.

2.3- recherche de l'antagonisme bactérien *in vitro*

La confrontation est réalisée *in vitro* pour savoir si les bactéries isolées sont capables de produire des substances antifongiques inhibant ou réduisant la croissance des agents phytopathogènes sur milieu PDA. Le test de confrontation est réalisé comme suit :

Chaque isolat bactérien a été ensemencé à l'aide d'un ensemencement stérile, en fait, quatre lignes de bactéries ont été striées à des distances égales par rapport au centre de la boîte de pétri. Par la suite un disque de 5mm de diamètre d'une culture active de *Fusarium oxysporum* ou *Sclerotium rolfsii* âgée de sept jours a été prélevé à l'aide d'un emporte-pièce et placé au centre des boîtes de pétri préensemencées par les isolats bactériens. En parallèle un témoin a été utilisé pour la comparaison des résultats en plaçant le disque de la culture fongique au centre d'une boîte de pétri en absence des bactéries. Ces boîtes par la suite ont été incubées à 25°C (Lahlali et al., 2007).

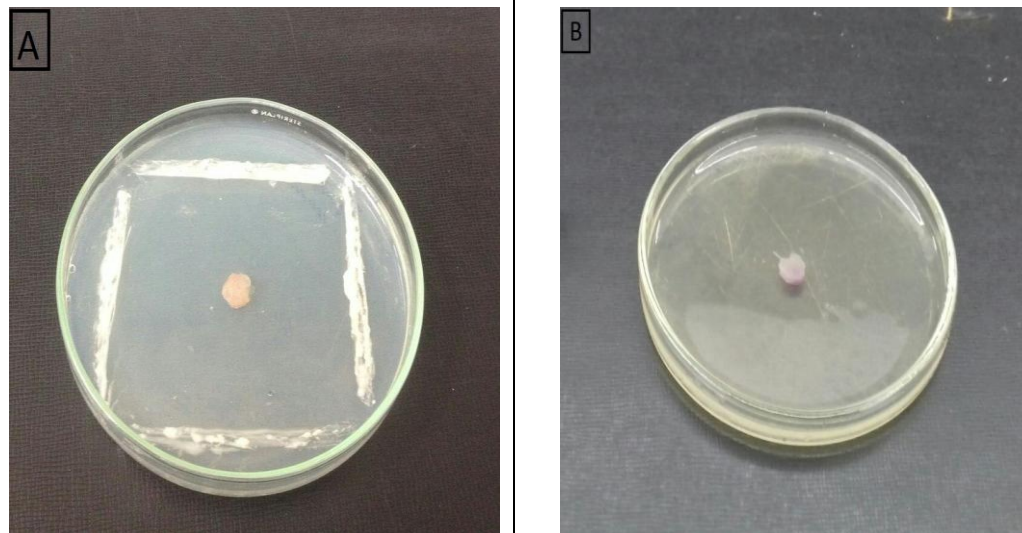


Figure 8 : Méthode utilisée pour le test de confrontation *in vitro* : A : Champignon en présence de bactérie, B : Témoin

Après l'incubation, le diamètre de la croissance du mycélium a été mesuré pour les boîtes contenant les bactéries et aussi pour les témoins, après 5 jours (4 jours pour *S. rolfssii*), et après que le témoin envahit toute la boîte.

Le taux d'inhibition est calculé à l'aide de la formule suivante :

$$TI = [(Ct - Ci) / Ct] \times 100$$

Avec TI : est le taux d'inhibition, Ct : est le diamètre de croissance du mycélium sans bactéries (témoin), et Ci : est le diamètre de croissance du mycélium en présence des bactéries.

2.4- Observation microscopique du mycélium en co-culture avec les bactéries antagonistes

Dans le but de savoir l'effet des bactéries sur le mycélium des champignons, l'observation microscopique de ces derniers a été réalisée selon le protocole suivant :

Une partie du mycélium en Co-culture est raclée à l'aide d'une aiguille stérile et déposée sur une goutte d'eau au niveau d'une lame ; la partie du mycélium est bien étalée sur la lame et couverte avec une lamelle. En fin, l'observation est réalisée sous le microscope.

2.5- Antagonisme via le surnageant bactérien

Dans le but d'étudier l'effet antifongique du surnageant des bactéries ayant un effet antagoniste, le test a été réalisé selon le protocole adopté par Balouiri et *al* (2016) et Karimi et *al* (2016) avec une légère modification. En fait, des tubes contenant 6ml du LB ont été inoculés avec une anse d'isolats bactériens et incubés sous agitation à 25 ° C pendant 3 jours.

Ensuite, les cellules bactériennes ont été récoltées par centrifugation à 12 000 tr / min pendant 28 minutes à la température ambiante et ont été filtrées à l'aide d'un filtre millipore de 0,22 µm. L'extrait est incorporé dans l'agar fondu à une concentration finale de 10% et bien mélangé. Ensuite, le milieu est versé dans des boîtes de Pétri. Par la suite un disque de 5mm de diamètre d'une culture active de *Fusarium oxysporum* ou *Sclerotium rolfsii* âgée de sept jours a été déposé au centre de ces boîtes de pétri. En parallèle un témoin a été utilisé pour la comparaison des résultats en plaçant le disque de la culture fongique au centre d'une boîte de pétri dont le filtrat est remplacé par le milieu LB.

Les boîtes sont incubées à 25°C, et le diamètre de la croissance du mycélium a été mesuré pour les boîtes contenant les bactéries et aussi pour les témoins, après 5 jours (3jours pour *S. rolfsii*), et après que le témoin envahit toute la boîte.

2.6- Test de confrontation *in vivo*

2.6.1- Préparation des pots

Dans le but de réaliser le test de confrontation *in vivo*, le sol a été stérilisé deux fois à 121°C pendant 99 min, afin d'éliminer les microorganismes qu'il contient. Par la suite chaque 1200 g de sol est inoculé et mélangé avec 24g de grains de sorgho infectés par le champignon phytopathogène et ensuite transféré dans les pots.

2.6.2- Test *in vivo*

Les isolats bactériens qui ont été révélés capables de réduire la croissance du mycélium *in vitro*, ont été testés pour leur potentiel à contrôler la maladie *in vivo*.

Alors, pour se faire, une suspension de chaque bactérie, avec une concentration de 10^9 UFC/ml ($DO=1$, $\lambda=620$) a été préparée dans une solution stérile de carboxyméthylcellulose (CMC) à 1%. Ainsi les graines de betterave ont été initialement stérilisées, en les trempant dans une solution d'hypochlorite de sodium (1%) pendant 2 minutes, et ont été lavées par la suite plusieurs fois avec de l'eau distillée stérile. Les graines ont été placées sur un papier filtre stérile et ont été séchées dans une hotte à flux laminaire pendant 4 heures. Après séchage, ces graines ont été trempées dans les bactéries suspendues dans la solution de CMC à 1%, agitées à la température ambiante pendant trois heures. Et enfin les graines traitées ont été séchées sous une hotte laminaire pendant une nuit, et quinze graines ont été semées dans chaque pot.

Les pots utilisés ont été infectés à l'avance avec l'inoculum de *Sclerotium rolfsii* comme décrit au niveau d'annexe M.

Les graines ont été traitées avec un fongicide à base de Tébuconazole+Trifloxistrobine ajusté à une concentration de 2,5 g/L, qui a servi de témoin positif. Et pour vérifier si les bactéries ont un effet sur la croissance des plantes, les graines ont été traitées avec les bactéries suspendues et semées dans des pots sans inoculation de pathogènes. Les pots ont été incubés dans une chambre de culture à 25 ° C, dont l'humidité est de 50%. Après 14 jours de semis, nous avons enregistré le nombre de semis sains (Karimi et *al.*, 2016). Le pourcentage de contrôle de la maladie a été calculé en utilisant l'équation suivante :

$$CM\% = (SS\% - SM\% / SS\%)$$

Avec CM% : Pourcentage de control de la maladie ;

SS% : Pourcentage des semis sains dans le traitement

SM% : Pourcentage de semis sains dans le témoin négatif

Le bloque expérimental complet comprend 88 pots

❖ 8 pots pour chaque bactérie : (10x8)

4 pots : les graines sont semées au niveau du sol infecté par l'agent pathogène

4pots : les graines sont semées au niveau du sol stérile

❖ 4 pots : Témoin positif

❖ 4pots : Témoin négatif

2.7- Conservation des isolats antagonistes

Les isolats ayant un effet antagoniste doivent rester non contaminés, fidèles à leur caractéristiques. En fait, les isolats sont conservés à -20°C, dans un bouillon de LB avec 20% de glycérol.

2.8- Caractérisation des bactéries antagonistes

2.8.1- Caractérisation morphologique

a- Etude macroscopique

L'étude macroscopique nous a permis de relever la pigmentation, la taille, le contour, et la consistance des colonies.

b- Etude microscopique

L'étude microscopique permet de déterminer la morphologie des bactéries, leur mode de groupement, ainsi que le type de gram. Alors, afin d'effectuer une étude microscopique des bactéries qui ont un effet antagoniste contre *F oxysporum* et *S rolfsii*, on procède d'abord à la préparation du frottis bactérien, ce dernier est fixé à la flamme. Ainsi la coloration de gram est effectuée selon les étapes suivantes : le frottis est coloré avec du cristal violet pendant 1 min, après il est lavé à un filet d'eau, le frottis est traité par la suite avec une solution de lugol pendant 1 min et encore une fois, il est lavé doucement avec de l'eau, ensuite l'alcool est ajouté, et le frottis est maintenu sous l'influence de cette solution pendant 30 s, la lame est lavé par l'eau. Et finalement la fuschine est utilisé pendant 1 min, par la suite la lame rincée avec de l'eau, et enfin séché entre deux papiers absorbants.

A ce stade on passe à l'observation microscopique. Pour se faire on observe par l'objectif ×100, en immersion avec l'huile. Les bactéries non décolorées par l'alcool sont des bactéries Gram positif, elles apparaissent en violet, tandis que celles apparaissent en rose sont des bactéries à Gram négatif ; elles sont décolorées par l'alcool et recolorées par la fuschine.

2.8.2- Caractérisation biochimique

2.8.2.1- Production des enzymes hydrolytiques

a- Amylase

Ce test a été réalisé sur milieu gélosé nutritive contenant 1% d'amidon soluble. En fait 10 µl de chaque culture bactérienne de 48 h a été inoculée par spot sur ce milieu, et les boîtes sont incubées pendant 72 heures à 28°C. Après incubation, la gélose a été recouverte de 3 ml d'une solution de lugol. L'hydrolyse a été mise en évidence par l'absence de coloration autour des colonies. À l'inverse, les zones contenant de l'amidon restent inchangées et uniformément opalescentes (Sodhi *et al.*, 2005).

b- Protéases

La détermination de la production des protéases par les bactéries antagonistes a été effectuée sur milieu solide au lait écrémé (Mohammadi *et al.*, 2017).

Les boîtes de pétri ont été inoculées par spot (5 µl) avec les bactéries âgées de 24h, et incubées à 28°C pendant 24 h. La formation d'un halo clair autour des colonies indique que les bactéries produisent des protéases.

c- Cellulase

L'activité cellulase a été mise en évidence en utilisant un milieu contenant de la carboxyméthyl cellulose (CMC) comme seule source de carbone. Ce milieu a étéensemencé par les isolats testés et leur croissance met en évidence la présence de l'enzyme cellulase.

À partir d'une suspension bactérienne fraîche préalablement préparée, un volume de 10µl de chaque isolat a été déposé de la même manière que celle appliquée pour l'activité amylase et protéolytique sur des boîtes contenant du CMC gélosé. La lecture des résultats est effectuée après incubation à 28°C pendant 72h. La mise en évidence de l'activité cellulolytique a été faite par l'ajout d'une solution de rouge Congo à une concentration de 1mg/ml pendant 15 minutes, suivie de trois rinçages avec une solution de NaCl (1M).

Les colonies développant une auréole jaunâtre montrent que les souches en question possèdent une activité cellulase (Azhar *et al.*, 2017).

2.8.2.2- solubilisation du phosphore

La capacité des isolats à solubiliser le phosphate a été testée sur un milieu Pikovskaya (PVK) contenant 0,5% de phosphate tricalcique ($\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$) comme source de phosphate insoluble (Pradhan et Sukla, 2005).

Un volume de 10 μl de suspensions bactériennes issues de pré-cultures fraîches, a été déposé à la surface du milieu PVK solide. Les boîtes sont incubées à 30°C pendant 7 jours, En effet les bactéries ayant la capacité de solubiliser les précipités de phosphates seront entourées d'un halo clair.

2.8.2.3- Production d'HCN

La capacité des isolats testés à produire l'acide cyanhydrique (HCN) a été réalisée selon le protocole adopté par Trivedi et *al* (2008). En effet, 100 μl de chaque suspension bactérienne à 10^8 UFC/ml a été inoculée sur milieu LPGA solide additionné de 4,4 g /l de glycine. Ensuite des disques de papier filtre ont été trempés dans une solution picrate carbonate, et ont été placés sur le couvercle de chaque boîte de Pétri. Les boîtes ont été fermées avec du parafilm et incubées à 27°C pendant 4 jours. Le résultat positif se traduit par le virage de la couleur du papier Whatman du jaune vers une couleur orange à marron indiquant la production de HCN.

2.8.2.3- Production de l'acide indole acétique

La production d'AIA dans la culture liquide a été déterminée par la technique colorimétrique. En effet, des tubes contenant le milieu LB liquide additionné de tryptophane 1g/l ont été inoculés avec 100 μl de la culture bactérienne à tester. Ensuite les tubes ont été incubés pendant 72 à 28°C (Leveau et *al.*, 2005). Après incubation, les cultures ont été centrifugées à 5000 rpm pendant 20 min. Le surnageant (1ml) a été mélangé avec 2ml du réactif Salkowski (12 g de FeCl_3 par litre de 7,9 M H_2SO_4). Le développement d'une coloration rose-rouge indique la production de l'acide indole acétique.

2.8.3- Identification moléculaire

L'identification moléculaire des bactéries antagonistes est basée sur l'amplification par PCR du gène codant pour l'ARN ribosomal 16 S (Renvoisé, 2012).

a- Extraction d'ADN

L'extraction de l'ADN a été effectuée à partir des suspensions bactériennes pour une éventuelle confirmation de l'identité des colonies isolées par PCR. Le protocole suivi est celui adopté par Llop *et al.*, (2000).

Le protocole d'extraction d'ADN, est comme suivant : Des aliquotes de 1 ml de la suspension bactérienne ont été préparées dans l'eau distillée stérile à partir des cultures pures des isolats obtenus, ensuite les tubes ont été centrifugés à 13.000 rpm pendant 5 min. Le surnageant a été éliminé, le culot est suspendu dans 500 µl du tampon d'extraction (Annexe B), les tubes ont été agités pendant 1h à température ambiante et centrifugés à 6500 rpm pendant 10 min. 450µl du surnageant est reprise dans un nouveau tube eppendorf auquel un volume équivalent en isopropanol est ajouté. Le contenu des tubes a été mélangé en les inversant et les laisser à la température ambiante pendant une heure, le surnageant a été retiré après une nouvelle centrifugation à 13.000 rpm pendant 5 min, et le culot a été suspendu dans 900µL d'éthanol 70°. Cette étape vise l'élimination des impuretés qui peuvent inhiber la réaction PCR, notamment, la présence de traces de l'iso-propanol utilisé pour la précipitation de l'ADN. Après les tube ont été centrifugés à 13.000 rpm pendant 3 min, le surnageant est retiré et le culot est séché à 60 °C pendant 10 à 20 min. Enfin, l'ADN est repris dans 200µl d'eau distillée stérile.

b- Amplification par PCR

La réaction PCR (Polymerase Chain Reaction) s'appuie sur l'amplification sélective d'une séquence d'ADN double brin, effectuée *in vitro* par extension itérative de deux amorces, situées de part et d'autre de la région considérée, grâce à la taq polymérase. Dans le but d'obtenir une quantité suffisante pour le détecter et l'étudier.

Alors le mélange réactionnel utilisé pour la polymérisation en chaîne comprend l'ADN bactérien, la Taq polymérase, les amorces universelles (fD 1, rP 2), le tampon 5X, l'eau distillée stérile (Tableau3). Ainsi le couple d'amorce utilisé permet l'amplification du gène codant pour l'ARNr 16 S mesurant 1500 Pb (Weisburg *et al.*, 1991).

fD1 (5'AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3')

rP2 (3'ACGGCTACCTTGTTACGACTT-5')

Tableau 3 : composition du mix réactionnel

Réactif	Volume	Concentration
Tampon 5X	5 µl	5X
fD 1	1µl	10µM
rP 2	1µl	10µM
Taq polymérase	0,25µl	--
H ₂ O	15,25µl	--
ADN	2,5µl	--
Volume à distribuer	22,5µl	--
Volume réactionnel	25µl	--

Les tubes ont été placés ensuite dans le thermocycleur, qui a été préalablement programmé comme suit : Un premier cycle consiste à dénaturer l'ADN: 94°C pendant 5 min Puis une série de 35 cycles, chaque cycle se déroule comme suit :

- Dénaturation : 94°C, pendant 30s
- Hybridation : 60°C, pendant 45 s
- Elongation : 72°C, pendant 1min

Enfin, un dernier cycle de 72°C pendant 10 minutes pour achever la réaction

c- Révélation de l'ADN amplifié

L'ADN amplifié a été visualisé sur un gel d'agarose 1 % par électrophorèse dans le tampon Tris-Borate EDTA (TBE). Les puits du gel ont été chargés avec 10 µl de l'amplicon mélangé avec 2 µl du tampon de charge 6x. Le dernier puits a été réservé pour le marqueur de poids moléculaire (2 µl de 6x mélangé avec 3 µl du marqueur) pour estimer la taille des fragments amplifiés. L'électrophorèse s'effectue par application d'une différence de potentiel de 100V pendant 45 min. Le gel a été coloré par la suite à l'aide du Bromure d'Ethidium 0.02 µg/ml (BET) pendant 25 min et rincé à l'eau distillée stérile pendant 15 min, puis observé sur un transilluminateur UV.

2.9- Analyse statistique

Pour chaque test de confrontation, chaque test biochimique, trois répétitions ont été réalisées (quatre pour le test *in vivo*). Nos résultats ont été conçus et traités à l'aide du logiciel Microsoft Excel 2016. Le traitement statistique des résultats obtenus a été effectué, grâce au logiciel statgraphics, selon une analyse de la variance (ANOVA I, ANOVA II) au seuil de $\alpha=5\%$.

RÉSULTATS

1- Confirmation moléculaire de l'identité de *Fusarium oxysporum* par la PCR conventionnelle.

La détection de *Fusarium oxysporum* a été réalisée en utilisant la technique moléculaire PCR conventionnelle ou "Polymerase Chain Reaction". Cet outil se base sur la reconnaissance d'un fragment de l'ADN du champignon cible, pour ensuite l'amplifier à l'aide des amorces spécifiques. En effet, un échantillon est considéré positif, s'il produit un fragment d'ADN ayant un poids moléculaire de 400 pb.

Les résultats du test PCR confirment que le champignon manipulé correspond bien à l'espèce *Fusarium oxysporum*.

Les profils d'amplification des extraits d'ADN sont illustrés dans la figure 9

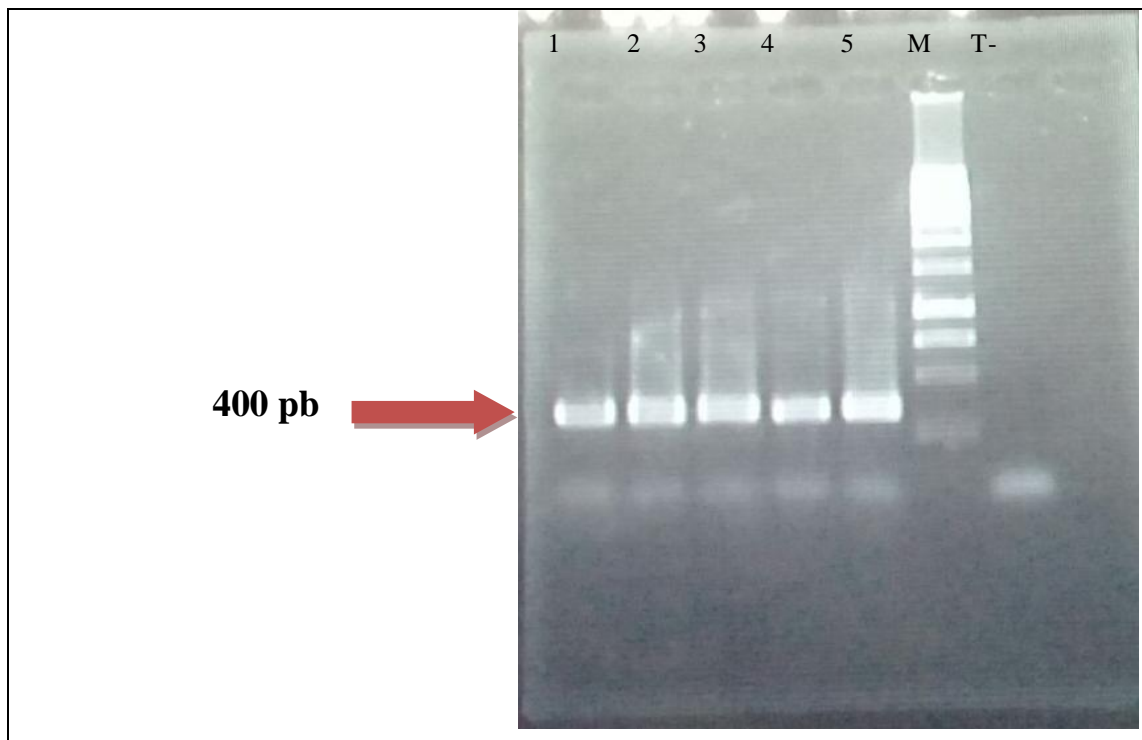


Figure 9 : Profil d'amplification de produits PCR des 5 isolats de *Fusarium oxysporum* ; 1, 2, 3, 4, et 5 : échantillons amplifiés, M: Marqueur du poids moléculaire (1 KB DNA Ladder), T-: témoin négatif (EDS)

2- Résultats d'isolement des bactéries à partir du sol

Le tableau 4 représente les isolats obtenus à partir de différents échantillons correspondants aux différents sols rhizosphériques. Un total de 29 bactéries ont été isolées, dont 16 appartiennent à la rhizosphère de la betterave sucrière à la région de ELGHARB, et 13 sont isolées à partir des ateliers pratique de l'école nationale d'agriculture de Meknès.

Tableau 4 : Nombre et codes d'isolats obtenus à partir de différents sols rhizosphériques.

Provenance	Code des isolats	Nombre des isolats
Rhizosphère de la betterave sucrière	ELG1, ELG2, ELG3, ELG4, ELG5, ELG6, ELG7, ELG8, ELG9, ELG10, ELG11, ELG12, ELG13, ELG14, ELG 15, ELG16.	16
Sol des Ateliers Pratiques	AP1, AP2, AP3, AP4, AP5, AP6, AP7, AP8, AP9, AP10, AP11, AP12, AP13.	13

Par ailleurs, le comptage des colonies sur boîtes de pétri a permis d'estimer la charge bactérienne au niveau des deux sols rhisosphériques, cette concentration est de $3,1 \times 10^7$ UFC/g pour le sol de la région ELGHARB , alors qu'elle est de $7,4 \times 10^6$ UFC/g pour le sol des ateliers pratiques.

3- Activité antifongique des bactéries isolées (*in vitro*)

3.1- Cas de *Fusarium oxysporum*

Les analyses statistiques des résultats obtenus ont montré une différence hautement significative entre les 29 isolats testés, en ce qui concerne leur pouvoir antagoniste vis-à-vis à *F oxysporum* à $\alpha=5\%$ (Annexe N). D'ailleurs, Les tests de confrontation *in vitro* pour le criblage de l'activité antifongique de nos isolats ont révélé que sur 29 bactéries, 8 bactéries (28%) avaient la capacité de réduire la croissance mycélienne de *Fusarium oxysporum* avec un taux qui dépasse 50%.

En effet, les isolats AP1, AP3, AP5, AP6, AP10, ELG1, ELG5, ELG6, sont ceux qui avaient un effet antagoniste contre ce champignon. Les cinq premières appartiennent au sol des ateliers pratiques, alors que les trois dernières appartiennent au sol des champs de la betterave à sucre à la région d'EL GHARB. Ainsi les isolats AP3, ELG5, et ELG6 avaient un effet inhibiteur qui dépasse 50%, dès les premiers 5 jours, alors que pour les autres isolats, les taux d'inhibition étaient inférieurs à 50% au cinquième 5jour.

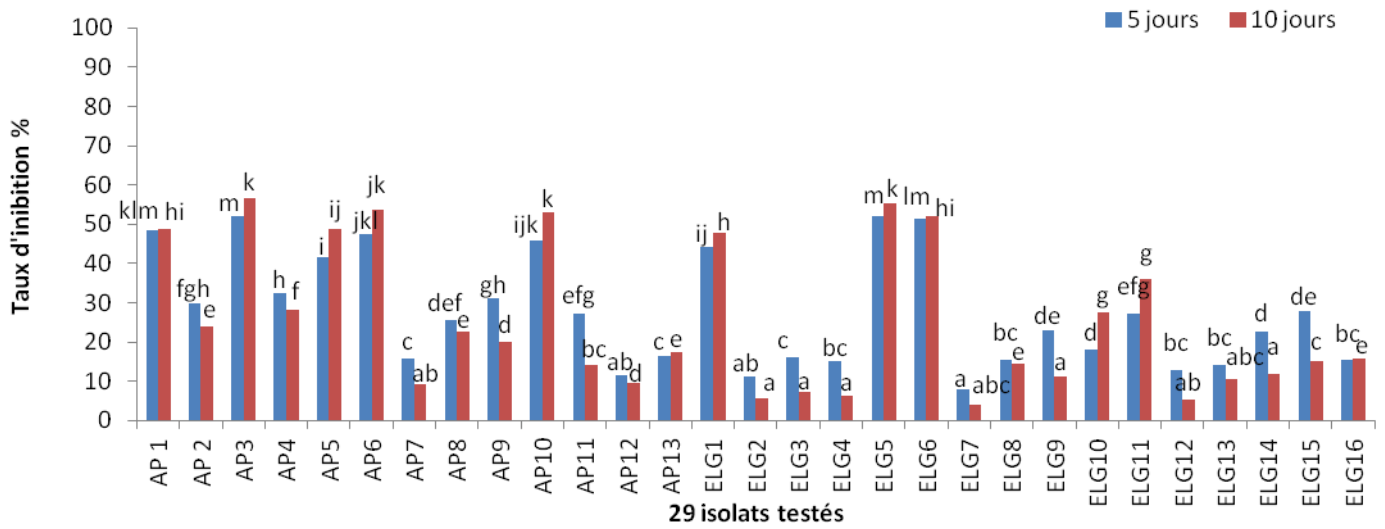


Figure10 : Criblage *in vitro* des bactéries telluriques ayant un effet antagoniste contre *Fusarium oxysporum*

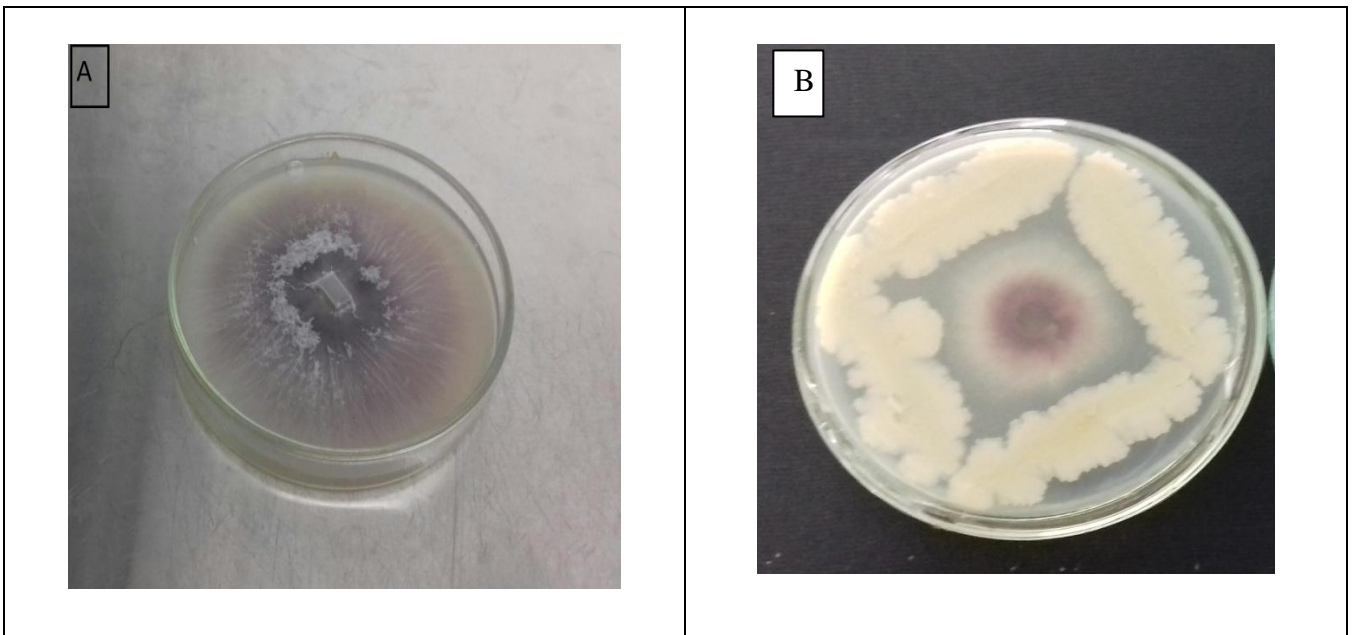


Figure11 : Test *in vitro* d'antagonisme contre *Fusarium oxysporum*; A : Témoin après 10 jours d'incubation, B : *F. oxysporum* en présence de la bactérie AP3 après 10 jours d'incubation

3.2- Cas de *Sclerotium rolfii*

De même, les analyses statistiques des résultats obtenus ont montré une différence hautement significative entre les 29 isolats testés, en ce qui concerne leur pouvoir antagoniste vis-à-vis à *Sclerotium rolfii* à $\alpha=5\%$ (Annexe O). Les tests *in vitro* de confrontation entre les 29 isolats et *S. rolfii* ont révélé que sur ces 29 bactéries testées, 10 bactéries (35%) ont la capacité de réduire la croissance mycélienne de ce champignon sur milieu PDA. En effet, les isolats AP1, AP3, AP5, AP6, AP10, ELG5, ELG6, ont entraîné une inhibition qui dépasse 50% dès les premiers quatre jours, alors que les autres isolats (AP8, AP9, ELG 1) ont entraîné des effets inhibiteurs aux alentours des 45% pendant 4 jours, et ce taux a augmenté au sixième jour. 70% (AP1, AP3, AP5, AP6, AP8, AP9, AP10) de ces bactéries antagonistes appartiennent aux ateliers pratiques de l'ENAM alors que 30% (ELG1, ELG5, ELG6) appartiennent au sol rhisosphérique de la betterave sucrière à la région d'EL GHARB.

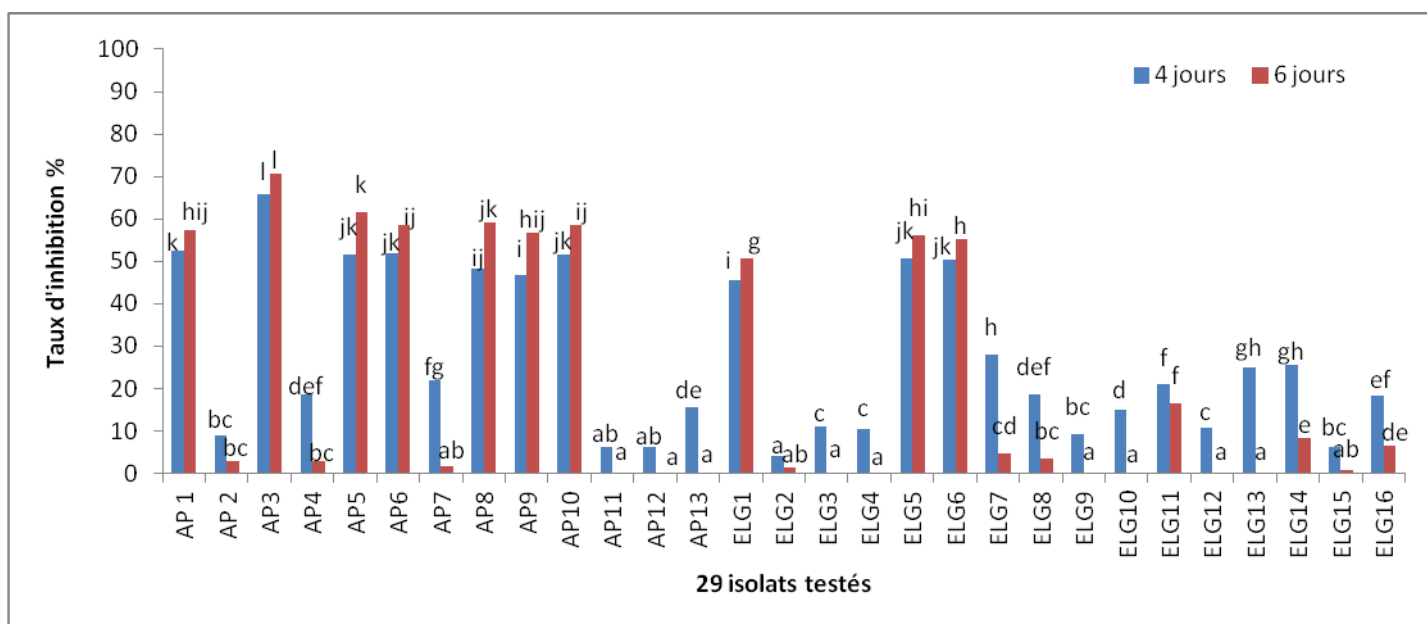


Figure 12 : Criblage *in vitro* des bactéries ayant un effet antagoniste contre *Sclerotium rolfii*

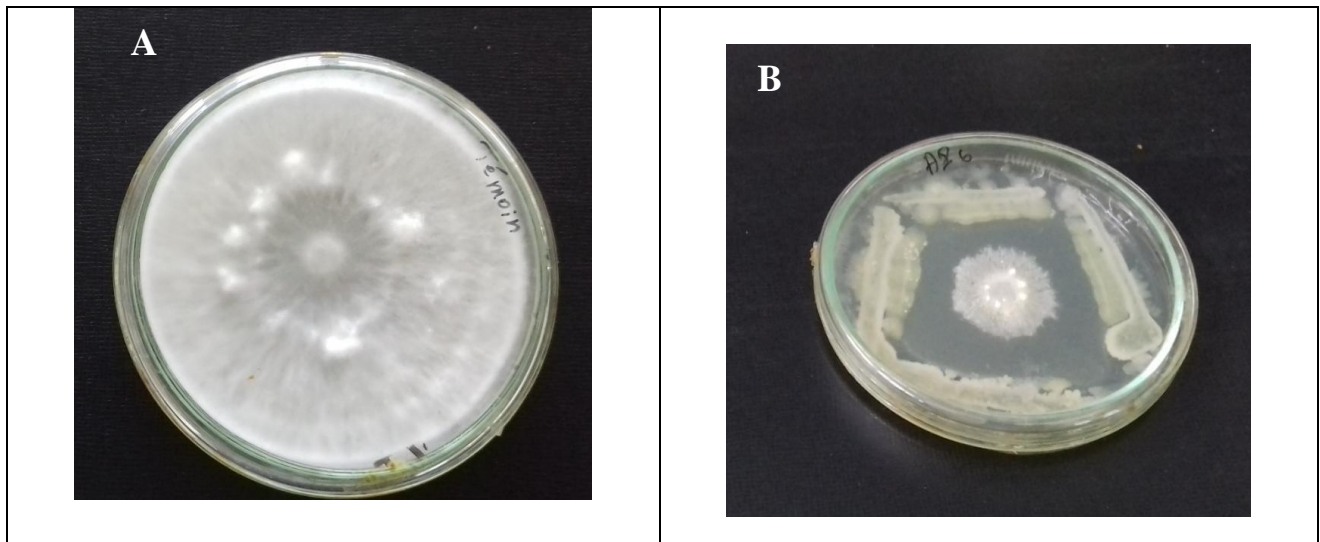


Figure 13 : Test de confrontation in vitro de *Sclerotium rolfsii* ; A : témoin après 6 jours d'incubation, B : *Sclerotium rolfsii* en présence de la bactérie AP6 après 6 jours d'incubation

4- Observation microscopique du mycélium

L'observation microscopique du mycélium de deux champignons (*Fusarium oxysporum* et *Sclerotium rolfsii*), en présence des bactéries antagonistes montre un changement morphologique de ce dernier, en comparaison avec les témoins, Ainsi, on note un gonflement, une dégradation ou la formation des vacuoles au niveau des mycéliums.

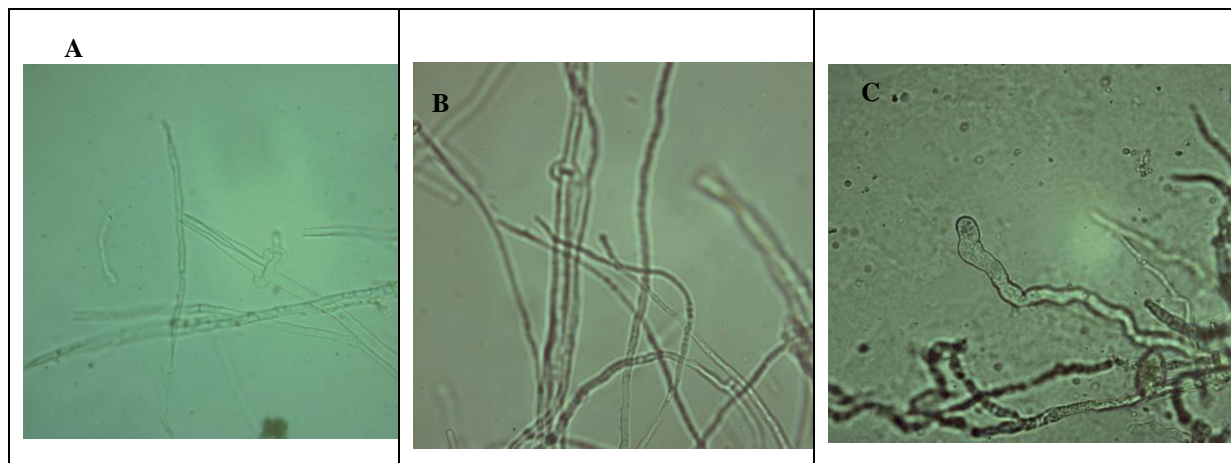


Figure 14 : Observation microscopique de *S. rolfsii* (x100) ; A : Témoin ; B: *S rolfsii* en co-culture avec AP3 (x100), C: *S. rolfsii* en présence de ELG6 (x100)

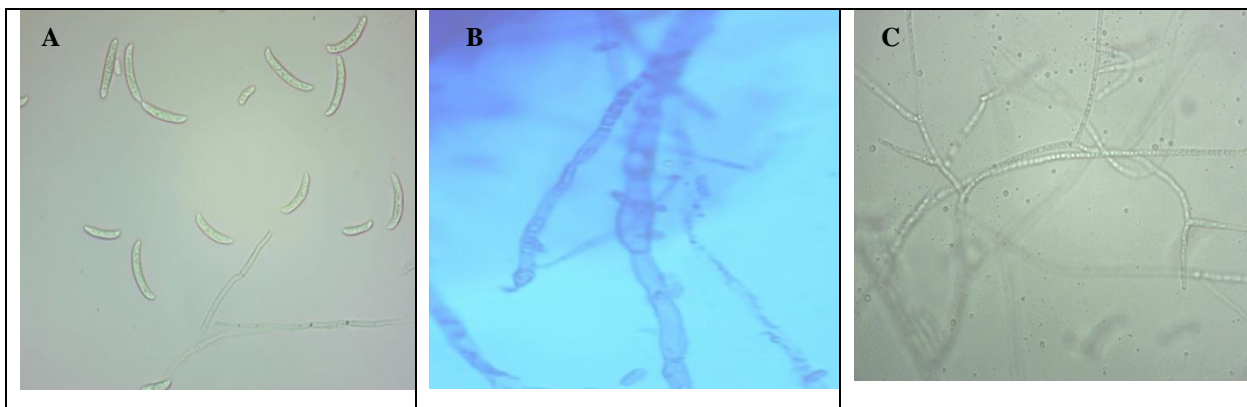


Figure 15 : Observation microscopique de *F. oxysporum* ; A : Témoin (x100), B: *F. oxysporum* en présence de AP8 (x100), C : *F. oxysporum* en présence de ELG1(x100)

5- Antagonisme via le surnageant bactérien

5.1- Cas de *Fusarium oxysporum*

Les filtrats des cultures obtenues à partir des isolats bactériens, se sont révélés capables de réduire la croissance du mycélium du champignon. Toutefois, cette inhibition est devenue plus faible, en la comparant avec celle obtenue en confrontation directe (Bactérie contre champignon). Cependant, l'analyse statistique nous a montré qu'il y'a une différence hautement significative entre les différents isolats quant au pouvoir inhibiteur de leurs filtrats vis-à-vis *Fusarium oxysporum* à $\alpha=5\%$ (Annexe P). En effet, seuls les filtrats des deux bactéries AP3, AP10 présentaient un taux d'inhibition qui dépasse 50% après 10 jours d'incubation. Cependant l'effet inhibiteur des filtrats des autres bactéries (AP1, AP5, AP6, AP8, AP9, ELG1, ELG5, ELG6), ne dépassait pas un taux de 50% après 10 jours d'incubation. Aucun isolat n'a montré un effet supérieur à 50% pendant 5 jours.

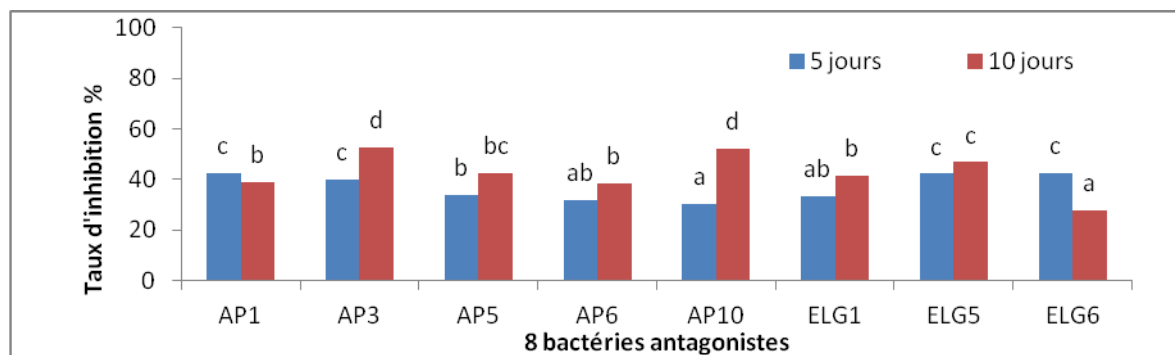
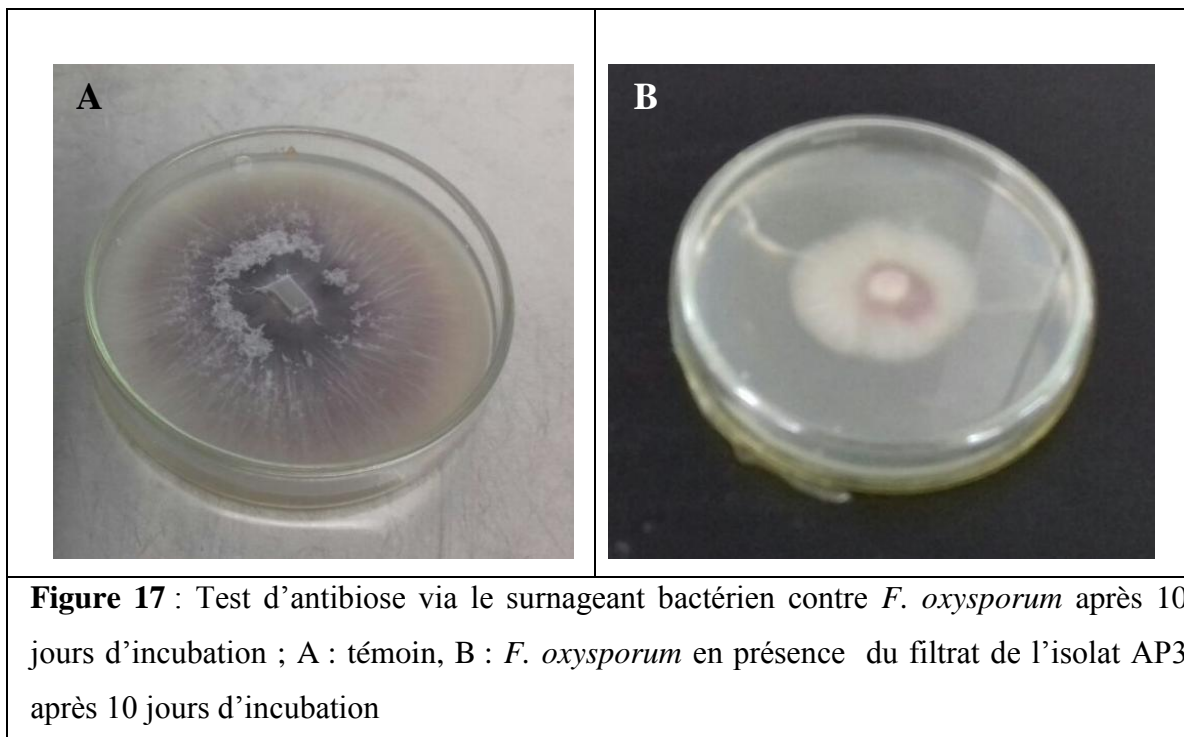


Figure 16 : Résultats d'antibiose via le surnageant bactérien des 8 isolats contre *Fusarium oxysporum*



5.2- Cas de *Sclerotium rolfii*

Les résultats de l'antibiose via le surnageant des 10 isolats testés contre *S. rolfii* ont montré que les filtrats bactériens ont un effet antagoniste moins efficace que la confrontation directe. Les analyses statistiques des données obtenues en utilisant statgraphics ont montré une différence hautement significative entre les isolats au seuil 5% en ce qui concerne la capacité de leurs filtrats à réduire la croissance du champignon (Annexe Q). En effet, seuls les filtrats des 2 isolats AP 3 et AP 10 ont permis de réduire la croissance du mycélium du champignon à un taux dépassant 50%. Alors que les neuf autres filtrats bactériens avaient des effets plus faibles puisqu'ils réduisaient la croissance du champignon qu'avec des taux inférieurs à 50%.

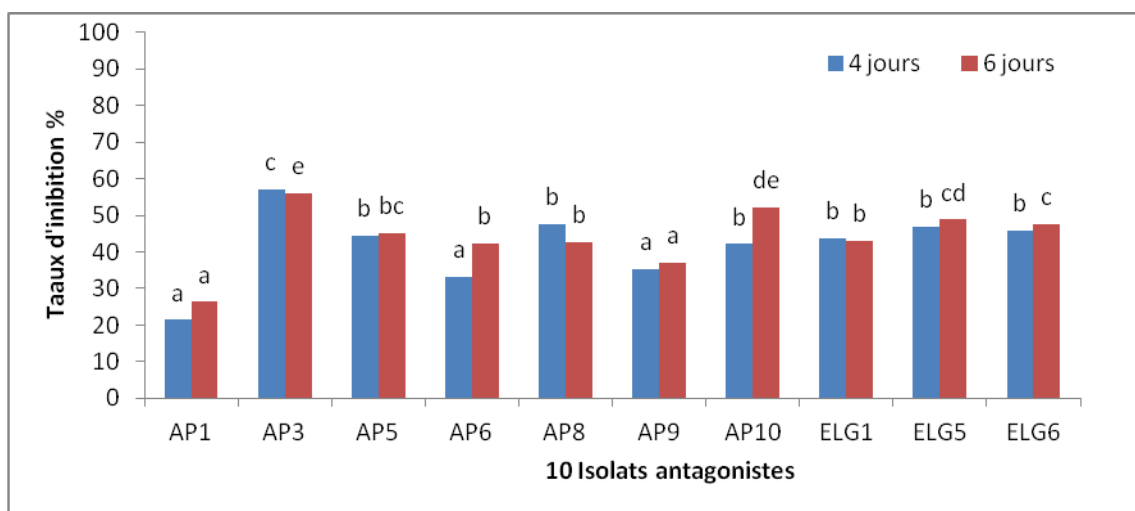


Figure 18 : Résultats d'antibiose via le surnageant bactérien des 10 isolats contre *Sclerotium rolfii*

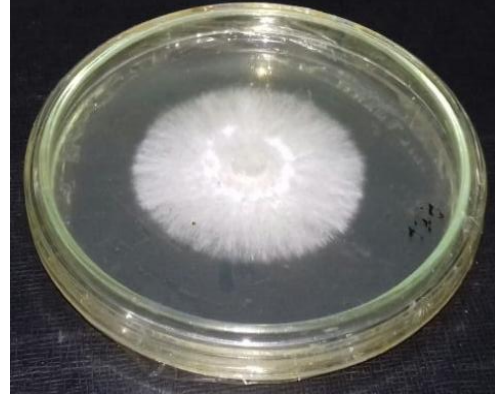
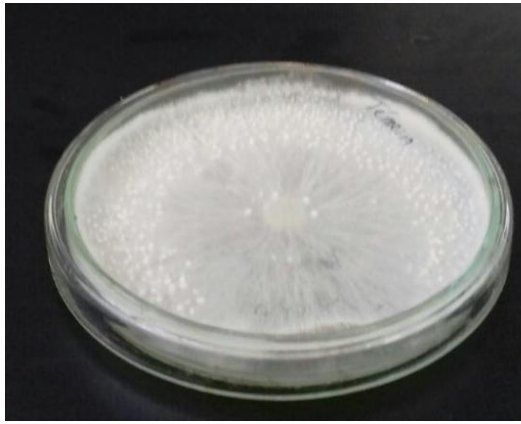


Figure 19 : Test d'antibiose via le surnagent bactérien des 8 isolats contre *Sclerotium rolfsii* ; A : Témoin après 6 jours d'incubation, B : *S rolfsii* en présence du filtrat de l'isolat AP10 après 6 jours d'incubation

6- Confrontation *in vivo*

Le comptage des graines saines après 14 jours de semis dans le test de confrontation, permet de donner une idée en ce qui concerne le potentiel de contrôle de la maladie *in vivo* par les isolats avec lesquels les graines ont été traitées.

En effet, le fongicide utilisé pour le traitement a permis de contrôler la maladie avec un taux dépassant 71%, d'ailleurs au niveau des pots on note une absence du mycélium du champignon avec la formation des sclérotés. Par contre au niveau des pots où on n'a pas réalisé un traitement (Témoin négatif) il y a présence du mycélium et une germination des graines semées à un taux de 40 % seulement, autrement dit on a la mort de 60% des plantes.

Les isolats bactériens utilisés pour le traitement biologique de la maladie *in vivo*, ont donné des résultats divers. Ainsi 4 isolats (AP1, AP3, AP5, AP8) étaient capables de contrôler la maladie avec un taux supérieur à 50% avec une diminution de la croissance mycélienne du champignon à la surface du sol par rapport au témoin négatif. Alors que les six autres isolats n'ont entraîné qu'un contrôle avec un taux inférieur à 50%. Ainsi, puisqu'on avait la croissance d'au moins 75% des graines semées au niveau des pots, on peut dire que ces isolats ne sont pas pathogènes.

Les analyses statistiques ont montré qu'il y a une différence hautement significative entre les différents isolats en ce qui concerne leur potentiel à contrôler la maladie *in vivo* au seuil 5% (Annexe R).

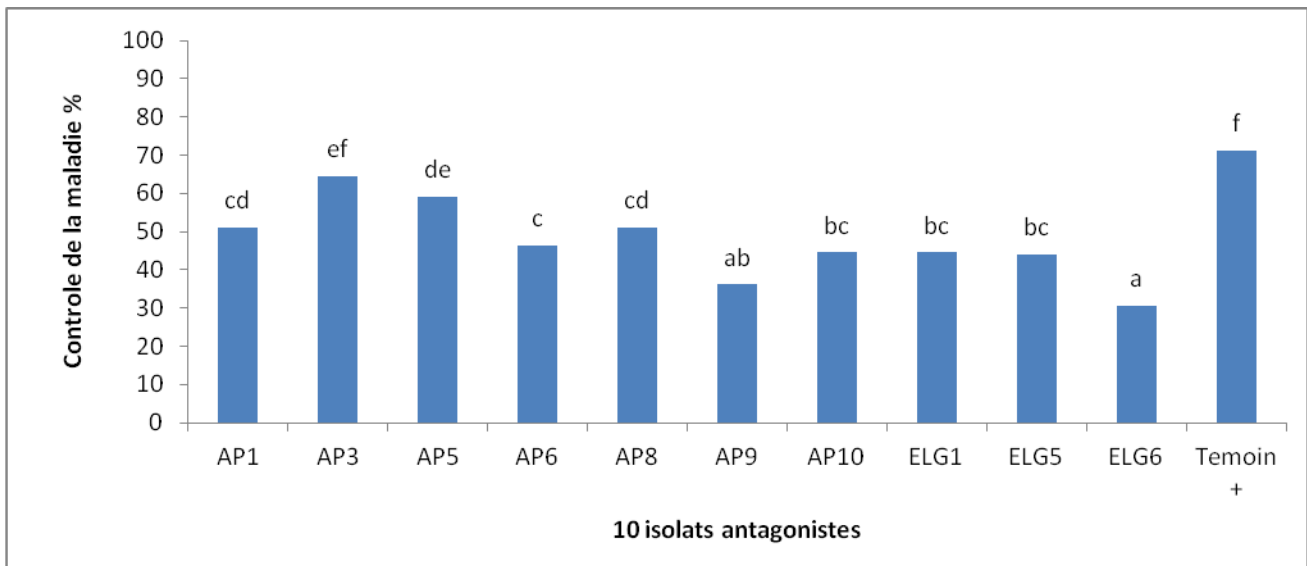


Figure 20 : Criblage *in vivo* des bactéries ayant un effet antagoniste contre *Sclerotium rolfii in vitro*

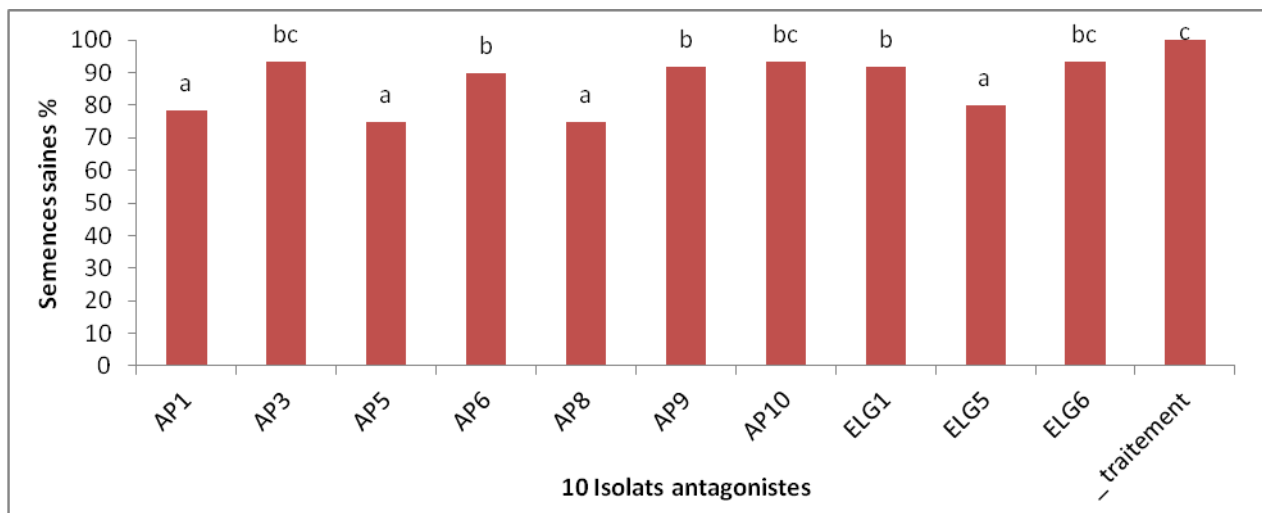


Figure 21 : Effet des isolats sur la croissance de la plante



Figure 22 : Test de confrontation *in vivo* de *Sclerotium rolfsii* .A ; témoin+ , B : témoin- ; C : ELG5

7- Identification des bactéries antagonistes

7.1- Identification morphologique

L'aspect macroscopique des isolats est très diversifié. Certaines colonies ont des formes différentes: colonies plates, circulaires...etc. De plus l'étude microscopique a permis de différencier entre deux grands groupes : Gram- et Gram+.

Le tableau ci-dessous représente l'aspect morphologique des différents isolats sur le milieu PDA.

Tableau 5 : Caractéristiques macroscopiques et microscopiques des isolats.

Code d'isolat	Forme	Couleur	Surface	opacité	Consistance	Forme microscopique et arrangement	Type de gram
AP1	Circulaire	Brune	Convexe	Opaque	Visqueuse	Bacilles en amas tétrades et diplobacilles	Positif
AP3	Irrégulière	Brune	Lisse	Opaque	Visqueuse	Cocci en amas	Négatif
AP5	Irrégulière	Blanche	Mate	Opaque	Granuleuse	Cocci en amas	Négatif
AP6	Circulaire	Brune	Plane	Opaque	Visqueuse	Bacilles en amas, diplobacilles	Positif
AP8	Circulaire	Jaune	Plane	Opaque	Visqueuse	Cocci en amas diplocoques	Positif
AP9	Irrégulière	Jaune	Lisse et brillante	Opaque	Visqueuse	Bacilles en amas, chainettes	Négatif
AP10	Irrégulière	Brune	Plane	Opaque	Granulaire	Cocci en amas chainettes, diplocoques	Positif
ELG1	Circulaire	Blanche	Concave	Opaque	Visqueuse	Cocci en chainettes, amas	Positif

ELG5	Circulaire	Blanche	Convexe	Opaque	Visqueuse	Bacilles en chainettes, diplobacilles	Négatif
ELG6	irrégulière	Brune	convexe	Opaque	granulaire	Bacilles en amas	Positif

7.2- Caractérisation biochimique

7.2.1- Production des enzymes extracellulaire

Chacun des 10 isolats a été placé sur des milieux contenant différents substrats, afin de mettre en évidence l'activité amylolytique, protéolytique, ainsi que la production de la cellulase. D'ailleurs 70% de ces bactéries produisent l'amylase, alors que les 30% qui restent sont incapables de sécréter cette enzyme. Ainsi 40% produisent de la cellulase, cependant la production des protéases a été révélé positive pour tous les isolats.

a- Amylase

L'estimation de la production de l'amylase par les isolats testés a été évaluée après incubation des bactéries sur un milieu à base d'amidon, et révélation à l'aide d'une solution de lugol. La production d'amylase se traduit par l'absence de coloration bleue autour des colonies. Les résultats obtenus concernant l'indice amylolytique montrent que 70% de ces bactéries produisent de l'amylase. Ainsi, l'analyse statistique nous a montré qu'il y'a une différence hautement significative pour la production de l'amylase entre les différents isolats au seuil 5% (Annexe S).

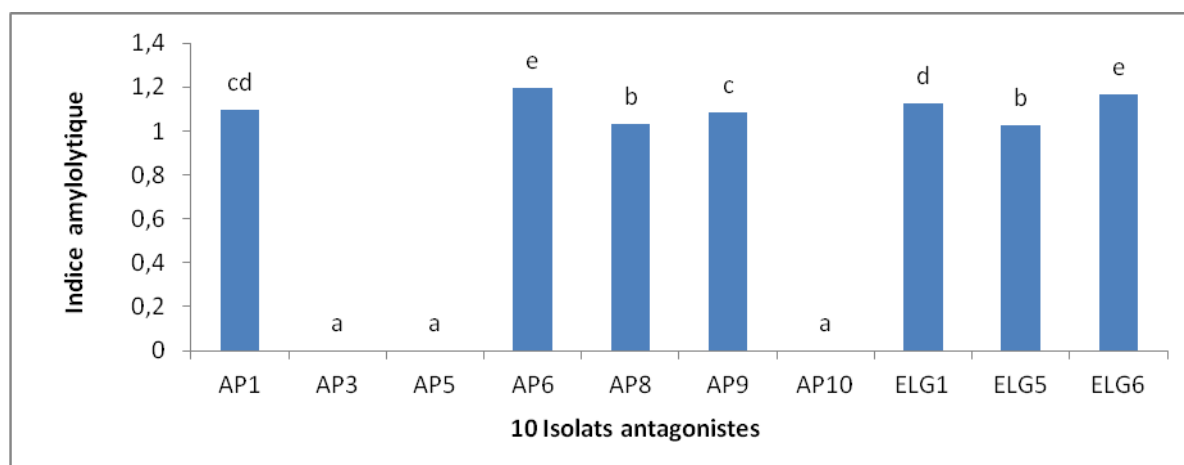


Figure 23 : Indice amylolytique chez les isolats bactériens antagonistes

b- Protéases

Ce test nous a permis de sélectionner les isolats capables de produire des protéases, soit un pourcentage de 100%. Cette production de la protéase est traduite par un halo clair autour des bactéries productrices.

En se basant sur les résultats de l'analyse statistique, la différence entre les isolats est hautement significative au seuil 5% (Annexe T). D'ailleurs l'isolat ELG1 et AP 9 montrent une meilleure production de protéase par rapport aux autres isolats.

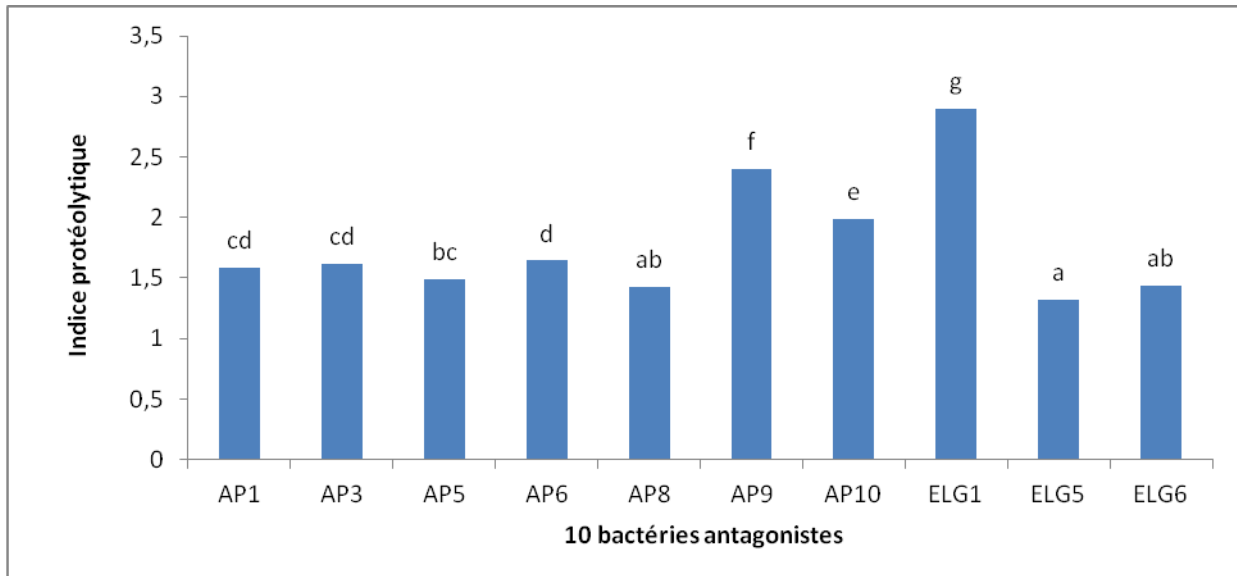


Figure 24 : Indice protéolytique chez les isolats bactériens antagonistes

c- Cellulase

L'évaluation de la capacité de l'ensemble des isolats à hydrolyser la cellulose, a permis de mettre en évidence 4 isolats possédant cette activité, ce qui représente un pourcentage de 40%. Cette activité a été déterminée en mesurant l'indice cellulósique permettant ainsi de comparer l'activité des différents isolats. En effet, l'analyse statistique a montré qu'il y'a une différence hautement significative entre les isolats au seuil 5% (Annexe U)

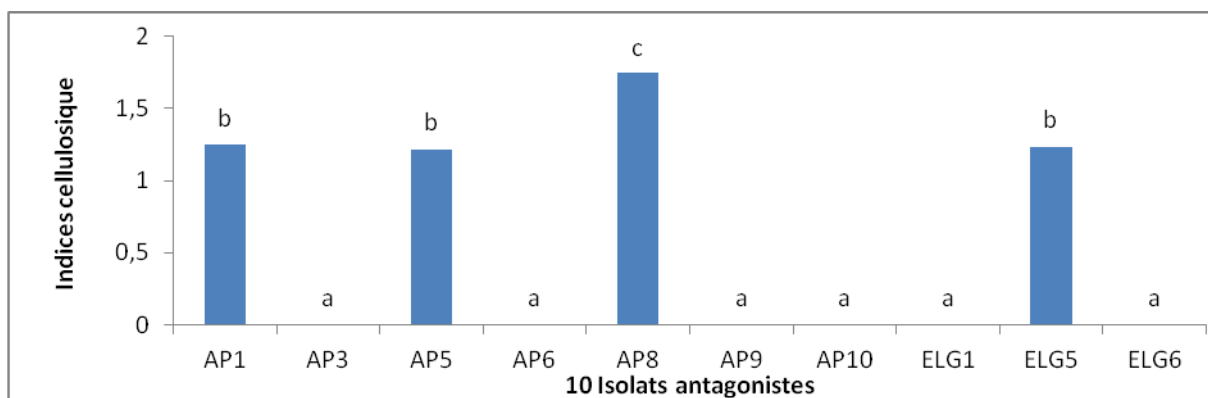


Figure 25 : Indice Cellulosique chez les isolats bactériens antagonistes

7.2.2- Production de HCN et de l'AIA

La production de l'acide cyanhydrique a été réalisée sur milieu LPGA supplémenté par la glycine, le test est considéré positif lorsqu'on a un virage de la coloration du papier whatman du jaune vers l'orange au marron. Dans notre étude, sur 10 isolats testés, 4 (AP1, AP5, AP10, ELG6) ont montré une production faible à modérée de HCN soit un pourcentage de 40%. Cependant aucun isolat n'a présenté une forte production. Alors que les résultats du test de l'acide indole acétique ont révélé que sur les 10 isolats testés, seulement deux qui sont capables de synthétiser ce métabolite en dégradant le tryptophane (AP3, ELG5) ce qui présente 20%.

Tableau 6 : Production d'HCN et de l'AIA par les bactéries antagonistes

Code d'isolats	Production d'HCN	Production d'AIA
AP 1	+	--
AP3	--	+
AP5	+	--
AP6	--	--
AP8	--	--
AP9	--	--
AP10	+	--
ELG1	--	+
ELG5	--	--
ELG6	+	--

7.2.3-Solubilisation du Phosphore

Ce test a été réalisé sur milieu PVK afin de savoir si les isolats testés sont capables de solubiliser le phosphore et le rendre bio-disponible. Alors les résultats obtenues ont montré que sur 10 isolats, 5 étaient capables d'utiliser le phosphore tricalcique (AP1, AP3, AP6, ELG1, ELG6), soit un pourcentage de 50%.

7.3- Identification moléculaire

L'amplification par PCR des extraits d'ADN des 10 isolats qui ont été capables de réduire la croissance mycélienne des deux champignons, en utilisant les amorces universelles a permis d'amplifier le gène codant pour l'ARNr 16s de 1500 pb. La figure 26 illustre les résultats de cette amplification.

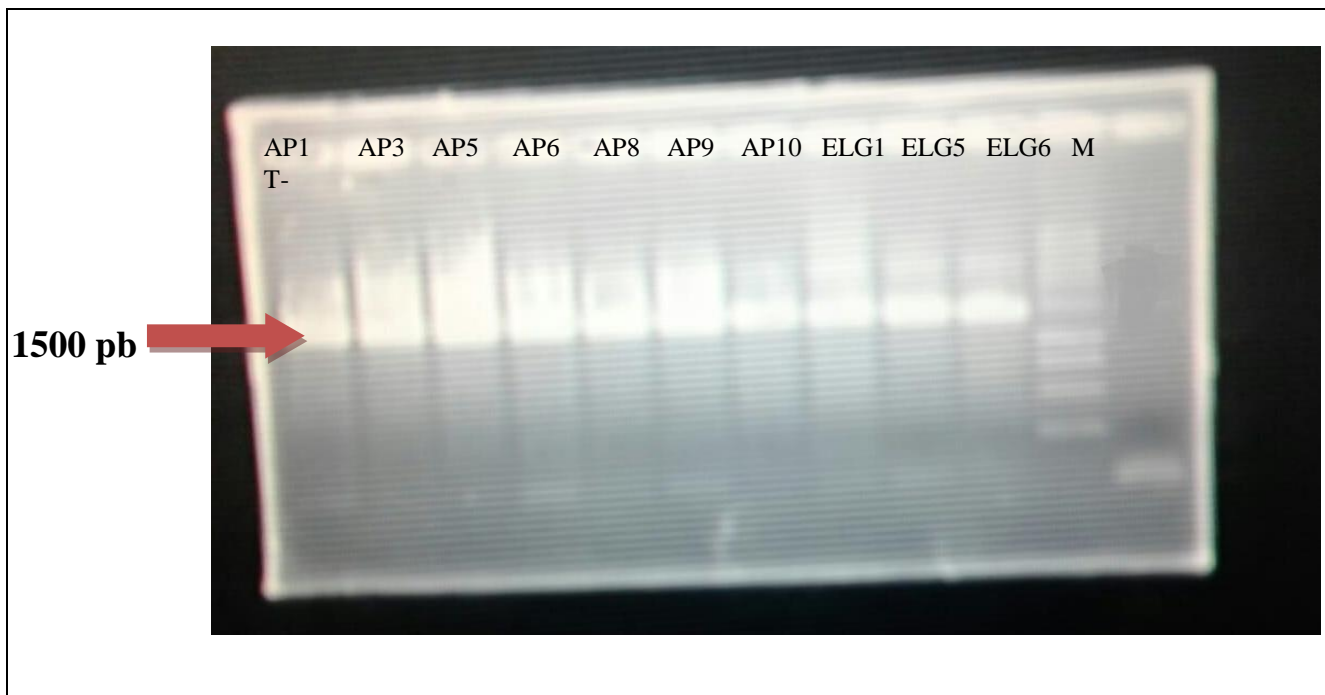


Figure 26 : Profil d'amplification de l'ADN des isolats ; AP1, AP3, AP5, AP6, AP8, AP9, AP10, ELG1, ELG5, ELG6: échantillons amplifiés; M: Marqueur du poids moléculaire (1KB DNA Ladder), T-: témoin négatif

Tableau 7 : récapitulation des résultats obtenus

Isolats Antagonistes	Provenance	Confrontation directe contre <i>F. oxysporum</i>	Confrontation via le filtrat contre <i>F. oxysporum</i>	Confrontation directe contre <i>S. rolfsii</i>	Confrontation via le filtrat contre <i>S. rolfsii</i>	Confrontation in vivo contre <i>S. rolfsii</i>	Semences saine en présence des bactéries	Amylase	Protéase	Celulase	HCN	AIA	Solubilisation des phosphates
AP 1	Sol des Ateliers pratiques	53,48 %	38,97 %	57,18 %	26,30 %	51,00 %	78,33 %	+	+	+	+	-	+
AP 3	Sol des Ateliers pratiques	60,95 %	52,73 %	70,74 %	55,90 %	64,45 %	93,33 %	-	+	-	-	+	+
AP 5	Sol des Ateliers pratiques	55,70 %	42,65 %	61,51 %	45,03 %	59,05 %	74,99 %	-	+	+	+	-	-
AP 6	Sol des Ateliers pratiques	59,17 %	38,48 %	58,63 %	42,31 %	46,45 %	89,99 %	+	+	-	-	-	+
AP 8	Sol des Ateliers pratiques	16,77 %	---	58,62 %	42,74 %	51,00 %	74,99 %	+	+	+	-	-	-
AP 9	Sol des Ateliers pratiques	9,5 %	---	59,07 %	36,91 %	36,12 %	91,66 %	+	+	-	-	-	-
AP 10	Sol des Ateliers pratiques	60,02 %	52,39 %	58,62 %	52,14 %	44,55 %	93,33 %	-	+	-	+	-	-
ELG 1	Rhizosphère de la betterave sucrière	51,41 %	41,60 %	50,81 %	43,10 %	44,55 %	91,66 %	+	+	-	-	+	+
ELG 5	Rhizosphère de la betterave sucrière	59,95 %	46,88 %	56,10 %	48,81 %	43,92 %	79,99 %	+	+	+	-	-	-
ELG 6	Rhizosphère de la betterave sucrière	52,23 %	27,90 %	55,27 %	47,46 %	30,68 %	93,33 %	+	+	-	+	-	+

DISCUSSION

Dans le but de cribler des bactéries ayant un effet antagoniste contre *Fusarium oxysporum* et *Sclerotium rolfsii* : agents causaux des pourritures racinaires chez la betterave sucrière, deux échantillons du sol ont été utilisés pour en isoler ces bactéries. En effet, la littérature rapporte de nombreux travaux sur l'isolement des bactéries antagonistes contre les champignons à partir du sol (Gagné et al., 1985). La charge bactérienne du sol des champs de la betterave sucrière ($3,1 \times 10^7$ UFC/g) était plus grande que celle du sol des ateliers pratique de L'ENAM ($7,4 \times 10^6$ UFC/g), et cela peut être dû aux résidus végétaux de la betterave sucrière qui font l'objet de la colonisation d'une flore saprophyte plus concentrée que celle au niveau du sol des ateliers pratiques. Par ailleurs les tests d'activité antagoniste directe (champignon / bactérie) ont montré que 70% des isolats qui ont présenté un effet antagonistes contre ces deux champignons phytopathogènes, appartiennent au sol des ateliers pratiques ; cela suggère que la flore bénéfique au niveau des régions betteravières peut être altérée par les pesticides utilisés, ou bien vue que les isolats au niveau de ces régions sont en exposition avec les champignons phytopathogènes, cela a créé une résistance chez ces dernier vis-à-vis de ces isolats. Dans le même contexte, plusieurs études ont montré la capacité des bactéries à réduire la croissance de *Fusarium oxysporum* *in vitro* (Chang et al., 2006, Laslo et al., 2010). De même Yuan et al., (2012) ont montré la capacité de *Bacillus amyloquifasciens* NJN-6 à réduire la croissance de ce champignon en produisant des composés volatils. D'un autre coté pas mal de travaux (Gholami et al., 2014, Darma et al., 2016) ont traité l'effet antagoniste des bactérie sur la croissance de *S. rolfsii*. Ainsi, les recherches de Chanutsa et al.,(2014) ont monté que *Pseudomonas aerogenosa* réduit la croissance de *Sclerotium rolfsii* jusqu'à 74%. L'effet inhibiteur de ces bactéries est assuré par des mécanismes d'action générés par ces dernières. En effet, cette inhibition peut être due soit à une sécrétion de substances antifongiques (Lavermicocca et al., 2000), ou bien à un dégagement de composés volatiles comme le HCN (Paramageetham et Prasada Babu, 2012). A coté de ces mécanisme il y a la production des enzymes lytiques extracellulaires, par les bactéries qui interviennent dans le parasitisme, parmi ces enzymes : la glucanase, la chitinase, les protéases, la pectinase (Elad et al., 1982 ; Siddiqui et al., 2005 ; Olubukola 2007, et Kim, 2015). Sinon ces bactéries peuvent inhiber les champignons en question par compétition concernant les nutriments et l'espace, en colonisant de la rhizosphère permettant ainsi de réduire la bio-disponibilité des éléments nutritifs pour le champignon au niveau de celle-ci (Abdsselem, 2017).

Vu que les bactéries testées n'ont pas entraîné une inhibition totale de la croissance des deux champignons phytopathogènes, on peut donc faire l'appel à une application combinée entre celles **compatibles**, afin d'améliorer l'efficacité du traitement. On aura donc un effet **synergique** entre ces isolats en ce qui concerne leur action sur la croissance de ces deux champignons (Manjula et al., 2004).

L'observation microscopique du mycélium du champignon en co-culture avec les isolats antagonistes a montré un changement de sa structure. Ce changement est manifesté sous forme des gonflements, de déformations et de vacuolisations du mycélium qui peuvent être, probablement, liées à la dégradation du mycélium à cause des enzymes lytiques qui seraient sécrétées par les isolats antagonistes, et à une libération du contenu cytoplasmique. Ces enzymes correspondent fort probablement à la chitinase et la β -glucanase (Gajbhiye et *al.*, 2010). En effet l'enzyme chitinolytique pourrait être considérée ayant un rôle important dans la gestion des maladies fongiques puisqu'elle est capable d'hydrolyser les molécules de chitine (N-acétylglucosamine); un composant des hyphes des champignons. Ainsi la glucanase assure la dégradation des différents polymères de glucose existant au niveau des parois cellulaires fongiques (Garcidueñas et *al.*, 1981).

A coté de la confrontation directe (bactéries contre champignons), un test d'antibiose via le surnageant bactérien des isolats ayant un effet antagoniste a été réalisé ; ce test a montré que les filtrats bactériens à leurs tours, entraînent une réduction de la croissance du mycélium des deux champignons phytopathogènes. Cette capacité inhibitrice peut être expliquée par la sécrétion par les isolats antagonistes de métabolites antifongiques capables de réduire la croissance des deux champignons en question, dans le milieu utilisé (LB) durant les trois jours d'incubation, Parmi les métabolites intervenant dans cette capacité inhibitrice ; les enzymes lytiques, la surfactine, et la fengycine (Young et *al.*, 2016), ou bien via la production de bactériocines (Roslycky, 1967). Notre expérience est comparable avec celle menée par Karimi et *al.*, (2016), qui ont montré que les filtrats bactériens de tous les isolats testés inhibaient considérablement la croissance du mycélium de *Rhizoctonia solani* ; 2 isolats ont donné les plus grands effets avec des taux dépassant 60%. Toutefois, les taux d'inhibition de la croissance mycélienne pour les deux champignons (*F. oxysporum* et *S. rolfsii*) étaient inférieurs par rapport à ceux obtenus pendant la confrontation directe (Champignons contre bactérie) et cela peut être expliqué par la durée d'exposition du champignon à la bactérie. En effet, pour le test d'antibiose via le surnageant bactérien, les bactéries ont été incubées pendant 3 jours, puis la culture filtrée. Par contre, au niveau de la confrontation directe les bactéries étaient présentes pendant toute la période d'incubation (10 jours pour *F. oxysporum*, et 6 jours pour *S. rolfsii*)

Le test *in vivo* a été réalisé juste pour *Sclerotium rolfsii*, en utilisant les 10 bactéries qui ont présenté des taux d'inhibition supérieurs à 50%. Les résultats de ce test confirme considérablement les résultats du test *in vitro*, puisque l'isolat AP 3 représente le taux d'inhibition le plus élevé pour les deux tests, En revanche, 60% des isolats ont contrôlé la

maladie *in vivo* avec des taux inférieurs à 50%, malgré leur effet important pendant la confrontation *in vitro*. Cela peut être expliqué par la concentration du champignon utilisé qui était un peu élevée, Notre étude est comparée avec celle réalisée par Karimi et al., (2016) qui a été révélée que sur 8 bactéries utilisées, quatre avaient un effet plus efficace que les autres.

Les isolats qui ont entraîné un effet antagoniste ont fait l'objet d'une caractérisation biochimique en testant leurs pouvoirs à sécréter des enzymes lytiques extracellulaires, à savoir : l'amylase, la cellulase et la protéase. Ainsi 70% de ces isolats produisent de l'amylase, les bactéries qui sont capables de produire cette enzyme sont considérées capables de favoriser la croissance de la plante (Sousa et al., 2008), et augmenter la mycorhization au niveau des racines. En effet, cette enzyme hydrolyse l'amidon en sucres métabolisables qui fournissent l'énergie pour la croissance des racines. Cependant l'évaluation de la capacité des isolats à hydrolyser la cellulose nous a permis de mettre en évidence 40% des isolats présentant une activité cellulolytique positive. Les résultats obtenus dans cette étude sont concordants avec ceux obtenus par d'autres études précédentes, qui ont montré la capacité des rhizobactéries à produire la cellulase (Irfan et al., 2012, Sethi et al., 2013). Par ailleurs, la production des protéases par les bactéries a un rôle indéniable dans le biocontrôle des maladies fongiques, et cela est traité dans plusieurs travaux. Dans ce contexte Elad et Kapat (1999) ont prouvé que l'activité antifongique de *Trichoderma harzianum* contre *Botrytis cinerea* est due principalement à l'activité protéolytique. De même Rakh et al., (2011) ont montré que *Pseudomonas cf. monteilii* 9 entraîne un effet inhibiteur contre *Sclerotium rolfsii* en produisant de la protéase. De plus Thomas et al.,(1998) ont montré aussi que la production des protéases par *Pseudomonas chlororaphis* induit une inhibition de *Fusarium oxysporum*.

A côté de la production des enzymes lytiques, la production de l'acide indole acétique, l'acide cyanhydrique, et la capacité des isolats à solubiliser le phosphore ont été réalisées. Ainsi, seulement 2 isolats étaient capables de produire l'AIA ; ce composé joue un rôle primordial dans le développement des plantes, puisqu'il stimule la croissance de ces derniers lorsqu'il est appliqué directement sur les racines (Chaiarn, et Lumyong, 2011). Cependant la solubilisation du phosphore a été révélée positive pour 50% des isolats antagonistes. D'ailleurs, le phosphore sous ses formes organiques qui ne seront pas prélevés par la plantes, semble avoir des qualités substantielles. Pour être absorbé, le phosphore organique doit tout d'abord être converti en phosphore inorganique sous l'action des bactéries capables de le solubiliser. Alors les bactéries qui étaient capables de solubiliser ce dernier vont donc jouer un rôle dans la stimulation de la croissance de la plante (Chabot et al., 1993), et comme la solubilisation des phosphates est associée à une baisse de pH (Hinsinger, 2001), on peut dire que les acides qui seront synthétisés par ces bactéries, peuvent intervenir dans le biocontrôle contre ces deux champignons.

En outre, 40% des bactéries antagonistes, étaient capables de produire HCN, ce dernier est un composé antimicrobien à large spectre impliqué dans le contrôle biologique des maladies des racines, et cela a été démontrée par plusieurs études (Rezzonico et *al.*, 2007, Nandia et *al.*, 2017).

Ce métabolite est synthétisé à partir de la glycine grâce à l'action de l' HCN synthase qui est codée par trois gènes (*hcnA*, *hcnB* et *hcnC*) (Ramette et *al.*, 2003). Dans ce contexte Blumer et Haas (2000) ont suggéré que ce composé agit sur les cellules de l'agent pathogène en bloquant le cytochrome oxydase dans la chaîne respiratoire.

CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES

Les exploitations de la betterave sucrière enregistrent des taux élevés des pourritures racinaires causées par *Fusarium oxysporum* et *Sclerotium rolfsii*. En effet, la lutte traditionnelle contre ces mycoses a montré son échec. Pour cela, les recherches ont été orientées vers d'autres stratégies de lutte notamment la lutte biologique via l'utilisation des microorganismes qui a donné des bons résultats dans la protection de plusieurs cultures.

Cette étude nous a permis de cribler *in vitro* des bactéries isolées à partir de la rhizosphère de la betterave à sucre, et des ateliers pratiques de l'ENAM ayant des effets antagonistes impliqués dans la lutte contre ces champignons. Ainsi nous avons orienté les études vers l'application *in vivo* de ces bactéries afin d'évaluer leur potentiel à gérer la maladie causée par *Sclerotium rolfsii*.

Les résultats que nous avons obtenus dans ces volets sont importants. En effet, 35% des isolats avaient un effet antagoniste *in vitro* contre *Sclerotium rolfsii* (AP1, AP3, AP5, AP6, AP8, AP9, AP10, ELG1, ELG5, ELG6), et 28% avaient un effet antagoniste *in vitro* contre *Fusarium oxysporum* (AP1, AP3, AP5, AP6, AP10, ELG1, ELG5, ELG6). Généralement, l'inhibition des champignons par les bactéries peut être due à une production de substances volatiles, d'enzymes lytiques et de métabolites secondaires (Antibiotiques ...) à effet antifongique. Dans ce contexte, nous avons réalisé des tests correspondant à ces mécanismes et les résultats obtenus ont montré que tous les isolats testés ont la capacité de produire des enzymes lytiques (cellulase, protéase, amylase), dont les pourcentages sont respectivement 40%, 100%, 70%, des isolats. De même, la production de l'acide indole acétique, HCN, et la capacité des isolats à solubiliser le phosphore étaient positives respectivement chez 20%, 40%, 50% des isolats.

Par ailleurs, la confrontation *in vivo* pour *Sclerotium rolfsii* a permis de confirmer considérablement les résultats du test de confrontation *in vitro* concernant la capacité de nos isolats à inhiber le champignon.

Au terme de ce travail, nous nous proposons de :

- ❖ Poursuivre régulièrement l'essai en serre pour évaluer l'efficacité des isolats bactériens utilisés (En cours)
- ❖ Etudier l'effet des substances volatiles produites par les bactéries sur le champignon (confrontation par voie volatile)

- ❖ Séquencer les produits PCR obtenue et les analyser
- ❖ Etudier l'effet de ces bactéries sur la germination des spores
- ❖ Sélectionner les isolats compatibles
- ❖ Tester la production des antibiotiques par ces bactéries
- ❖ Etudier le potentiel du control de la maladie pour le champignon *Fusarium oxysporum*

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Abdsselem S.M, (2017).** Caractérisation et lutte biologique vis à vis de *Fusarium oxysporum*. Thèse de doctorat. Spécialité : Microbiologie. Université d'Oran. 124. Algérie
- ACHSTETTER T, WOLF D.H. (1985).** Proteinases, Proteolysis and Biological Control in the Yeast *Saccharomyces cerevisiae*. YEAST. Vol. 1, pp 139-157
- AL Mohammed F. (2017).** Application des électrotechnologies pour une valorisation optimisée de la betterave à sucre dans un concept de bioraffinerie . Thèse de doctorat. Spécialité : Génie des procédés industriels et développement durable. Sorbonne Universités. 213.
- Azhar A.H, Abdel-Salam M.S, Abo-Ghaila A.H, Hegazy W.K, Hafez S S.(2017).** Optimization and molecular identification of novel cellulose degrading bacteria isolated from Egyptian environment. Journal of Genetic Engineering and Biotechnology. Vol. 15, pp 77-85
- Balouiri M, Sadiki M, Ibsouda K.S. (2016).** Methods for *in vitro* evaluating antimicrobial activity: A review. Journal of Pharmaceutical Analysis. Vol.6, pp 71-79
- Bardin S, Huang H.C, Pinto J, Amundsen E.J, Erickson R.S. (2004).** Biological control of *Pythium* damping-off of pea and sugar beet by *Rhizobium leguminosarum* bv. *Viceae*. National Research Council Canada. Vol. 82, pp 291-296.
- Bateman D, Beer S. (1965).** Simultaneous production and synergistic action of oxalic acid and polygalacturonase during pathogenesis by *Sclerotium rolfsii*. Phytopathology. Vol. 55, pp 204-211.
- Belghiti Alaoui A. (1993).** Nature des polysaccharides issus du processus d'extraction du saccharose à partir de la betterave. Thèse de doctorat. Spécialité : Biotechnologie et Industries Alimentaires. Ecole nationale supérieure d'agronomie et des industries alimentaires. 237. Maroc
- Bendahmane A (2004).** Réalisation d'un guide informatique pour le pilotage de la protection de la betterave à sucre au Maroc. Mémoire de fin d'études. Spécialité : Protection des plantes. Institut agronomique et vétérinaire Hassan II. 129. Maroc
- Blumer, C, Haas D. (2000).** Mechanism, regulation, and ecological role of bacterial cyanide biosynthesis. Archives of Microbiology, Vol. 173, pp 170-177
- Brantner J.R, Windels C. (1998).** Variability in Sensitivity to Metalaxyl in vitro, Pathogenicity, and Control of *Pythium* spp. on Sugar Beet. American Phytopathological Society. Vol. 82, pp 896-899.
- Chabot C, Antoun H, Cescas M P. (1993).** Stimulation de la croissance du maïs et de la laitue romaine par des microorganismes dissolvant le phosphore inorganique. Revue canadienne de microbiologie. Vol. 39, pp 941-947

- Chaiharn M, Lumyong S. (2011).** Screening and optimization of indole-3-acetic acid production and phosphate solubilization from rhizobacteria aimed at improving plant growth. *Curr Microbiol.* Vol. 62, pp 173-81
- Champon G. (2004).** Effet de l'addition de charges végétales issues de déchets cellulosiques (pulpe de betterave sucrière) – Amélioration des caractéristiques mécaniques et optiques des papiers. Vol. 59, pp 2-7.
- Chang W.T, Chen Y.C, Jao C.L.(2006).** Antifungal activity and enhancement of plant growth by *Bacillus cereus* grown on shellfish chitin wastes. *Bioresource Technology.* Vol. 98, pp 1224-1230.
- Chanutsa N, Phonkerd N, Bunyatratthata W. (2014).** Potential of *Pseudomonas Aeruginosa* to Control *Sclerotium rolfsii* Causing Stem Rot and Collar Rot Disease of Tomato. *Journal of Advanced Agricultural Technologies.* Vol. 1, pp 132-135
- Cilliers A.J, Pertorius Z.A, Van Wyk P.S, Van Staden.J. (2002).** Mycelial compatibility groups of *Sclerotium rolfsii* in South Africa. *South African Journal of Botany.* Vol. 68, pp 389-392.
- Cosumar. Rapport annuelle 2016.** (<http://www.cosumar.co.ma/wp-content/uploads/2017/09/Rapport-annuel-Cosumar-2016-WEB.pdf>). Consulté le 14-04-2018
- Cothier E.J. (1975).** *Phytophthora drechsleri*: Pathogenicity Testing and Determination of Effective Host Range. *Plant diseases.* Vol. 23, pp 87-94.
- Coumans M. (2008).** Function of the basal pore in the germination of sugar-beet seed balls. *Biologia Plantarum.* Vol. 20, pp 114-118.
- Cramer R.A, Byrne P.F, Brick M.A, Panella L, Wickliffe E, Schwartz H.F. (2003).** Characterization of *Fusarium oxysporum* Isolates from Common Bean and Sugar Beet Using Pathogenicity Assays and Random-amplified Polymorphic DNA Markers *Journal of Phytopathology.* Vol. 151, pp 352–360.
- Danon M, Zmora-Nahum S, Chen Y, Hader Y. (2007).** Prolonged compost curing reduces suppression of *Sclerotium rolfsii*. *Soil Biology and Biochemistry.* Vol. 39, pp 1936-1946.
- Darma R, Purnamasari I.M, Agustina D, Pramudito T.E, Sugiharti M, Suwanto A.(2016).** A Strong Antifungal-producing Bacteria from Bamboo Powder for Biocontrol of *Sclerotium rolfsii* in Melon (*Cucumis melo* var. *amanta*). *Journal of Plant Pathology & Microbiology.* Vol.7

Didier A. (2013). Modélisation de la croissance, des relations sources-puits et du rendement en sucre de la betterave sucrière (*Beta vulgaris* L.) sous des régimes contrastés de nutrition azotée. Thèse de doctorat. Spécialité : Sciences agronomiques et écologiques. Institut des Sciences et Industries du Vivant et de l'Environnement (AgroParisTech). 205. France

Doyle, J.J., Doyle J.L. (1990). Isolation of plant DNA from fresh tissue. *Focus*. Vol.12, pp.13-15

Don Ferrin, Louisiana State University Agricultural Center, Bugwood.org. Mycelium and sclerotia of *Sclerotium rolfsii* on an infected sugarbeet. Image Number: 5423959.

Elad Y, Chet I, Henis Y. (1982). Degradation of plant pathogenic fungi by *Trichoderma harzianum*. *Canadian Journal of Microbiology*. Vol. 28, pp 719-725.

Elad Y, Kapa A. (1999). The Role of *Trichoderma harzianum* Protease in the Biocontrol of *Botrytis cinerea*. *European Journal of Plant Pathology*. Vol. 105, pp 177–189

Elliott M.C, Weston G. D. (1993). Biology and physiology of the sugar-beet plant. In: Cooke A, Scoot RK. *The sugar beet crop*. London : Chapman & Hall pp.37-66.

El-Sayed Shalaby M, El-Nady M.F.(2008). Application of *Saccharomyces cerevisiae* as a biocontrol agent against *Fusarium* infection of sugar beet plants. *Acta Biologica Szegediensis*. Vol. 52, pp 271-275.

El-Tarabily K.A. (2003). Suppression of *Rhizoctonia solani* diseases of sugar beet by antagonistic and plant growth-promoting yeasts. *Journal of applied microbiology*. Vol.107, pp 69–75.

El-Tarabily K.A, Sivasithamparam K (2006). Potential of yeasts as biocontrol agents of soil-borne fungal plant pathogens and as plant growth promoters. *Mycoscience*. Vol. 47, pp 25-35.

Errakhi R, Bouteau F, Lebrihi A, Barakate M. (2007). Evidences of biological control capacities of *Streptomyces* spp. against *Sclerotium rolfsii* responsible for damping-off disease in sugar beet (*Beta vulgaris* L.). *World journal of microbiology and biotechnology*. Vol. 23, pp 1503-1509.

Ferreira S.A, Boley R A. (2006). *Sclerotium rolfsii* Southern blight,southern wilt (Plant disease pathogen). University of Hawaii.Department of plant pathology. Pp 1-6.

Fleury A, Caneill J. (1984). Croissance et développement de la betterave sucrière. Analyse de l'hétérogénéité de peuplement. In: Physiologie de la plante entière, INRA, Département d'Agronomie. pp 201-212.

Flores-Moctezuma H.E, Montes-Belmont R, Jimé'nez-Pe' rez A, Nava-Jua' rez A.(2006). Pathogenic diversity of *Sclerotium rolfsii* isolates from Mexico, and potential control of southern blight through solarization and organic amendments. Crop Protection. Vol. 25, pp 195–201.

Gajbhiye A, Rai A.R, MeshramS.U, Dongre A. B.(2010). Isolation, evaluation and characterization of *Bacillus subtilis* from cotton rhizospheric soil with biocontrol activity against *Fusarium oxysporum*.World Journal of Microbiology and Biotechnology. Vol. 26, pp 1187–1194.

Gagné H, Antoun H, Richard C. (1985). Inhibition de champignons phytopathogènes par des bactéries isolées du sol et de la rhizosphère de légumineuses. Revue canadienne de microbiologie. Vol. 31, pp 856-860

Ganesan P, Gnanamanickam S. (1987). Biological control of *Sclerotium rolfsii* sacc. in peanut by inoculation with *Pseudomonas fluorescens*. Soil Biology and Biochemistry. Vol. 19, pp 35-38.

Garcidueñas S.V, Leal-Morales C A,Estrella A.H. (1998). Analysis of the β -1,3-Glucanolytic System of the Biocontrol Agent *Trichoderma harzianum*.Appl Environ Microbiol. Vol. 64, pp 1442–1446.

Georgiou Christos D. (1997). Lipid peroxidation in *Sclerotium rolfsii*: a new look into the mechanism of sclerotial biogenesis in fungi. Mycological Research. Vol. 101, pp 460–464

Gerhardson B. (2002). Biological substitutes for pesticides. Trends Biotechnol. Vol. 20, pp 338-43.

Gholami M, Khakvar R, AliasgarZad N.(2014). Introduction of some new endophytic bacteria from *Bacillus* and *Streptomyces* genera as successful biocontrol agents against *Sclerotium rolfsii*.Archives of Phytopathology and Plant Protection. Vol. 47

Hanson L, Lucchi C, Stevanato P, McGrath M, Panella L, Sella L, Biaggi M, Concheri G. (2017). Root rot symptoms in sugar beet lines caused by *Fusarium oxysporum* f. sp. Betae. European journal of plant pathology. Vol. 150, pp 589-593.

Harveson R.M. (2008). *Fusarium* yellows and Fusarium root rot. University of Nebraska. Nebraska extention publications. Institute of agriculture and natural ressources.

Hebrard C. (2012). Contrôle épigénétique de l'induction et de la tolérance à la montaison chez la betterave sucrière.Thèse de doctorat. Spécialité : Physiologie et biologie des Organismes - Populations – Interactions. Université d'Orléans. 285. France

- Hermann O, Wauters A. (2002).** Ravageurs et maladies en culture de betterave sucrière belge. Les Guides Techniques de l'IRBAB
- Hibar.k, DaamiRemadi.M, EL Majdoub.M. (2007).** Effets de certains fongicides de synthèse et biologiques sur la croissance mycélienne et l'agressivité de *Fusarium oxysporum* f.sp. radialis-lycopersici. TROPICULTURA. Vol. 25, pp 146-152.
- Hinsinger P. (2001).** Bioavailability of soil inorganic P in the rhizosphere as affected by root-induced chemical changes: a review. Plant and Soil. Vol. 237, pp 173–195
- Huang X, Dong L, Wang L J. (2017).** Characterization of pectin extracted from sugar beet pulp under different drying conditions. Journal of Food Engineering. Vol. 211, pp 1-6.
- Ifard I. (2017).** Contribution à l'étude des pourritures racinaires chez la betterave sucrière dans la région de Tadla : cas de la pourriture à *Sclerotium rolfsii* et *Fusarium* sp. Mémoire de fin d'étude. Spécialité : Protection des Plantes et de l'Environnement (PPE) Ecole Nationale d'Agriculture de Meknès. 89. Maroc
- Irfan M, Safdar A, Syed Q, Nadeem M. (2012).** Isolation and screening of cellulolytic bacteria from soil and optimization of cellulase production and activity. Turkish Journal of Biochemistry. Vol. 37, pp 287-293
- Jacobsen B . (2006).** Root rot diseases of sugar beet. Montana State University, Bozeman (USA). Department of Plant Sciences and Plant Pathology. pp 9-19.
- Janati Idrissi F.E. (2015).** Caractérisation chimique, activités biologiques de Substances naturelles issues de plantes médicinales et de métabolites secondaires isolés de champignons Endophytes. Thèse de doctorat. Spécialité : chimie, analyse et environnement. Université mohammed V. 257.
- Jenkins S, Averre C. (1986).** Problems and progress in integrated control of southern blight of vegetables. American phytopathological society. Vol. 70, pp 614-619.
- Kaeding D. (1963).** Note sur l'apparition de *sclerotium rolfsii* (sacc.) Curzi et les moyens de le combattre. Vol.9, pp 127-13.
- Karimi E, Naser S, Masoud S.B, Bagher M.(2016).** *Bacillus amyloliquefaciens* SB14 from rhizosphere alleviates Rhizoctonia damping-off disease on sugar beet. Microbiological Research. Vol. 192, pp 221-230
- Karkachi N. (2013).** Evaluation de l'effet de triazoles vis à vis de *Fusarium oxysporum* F sp albidinis. Thèse de doctorat. Spécialité : Phytopathologie. Université d'Oran. 167. Algérie
- Khatabi N, Oihabi A, Louali L, Ezzahiri B. (2001).** Effect of fungicides and *Trichoderma harzianum* on sclerotia of *Sclerotium rolfsii*. Phytopathologia Mediterranea. Vol.40, pp 1-6.

Khattabi N, Oihabi A, Louali L, Ezzahiri B. (2004). Antagonistic Activity of *Trichoderma* isolates against *Sclerotium rolfsii* : Screening of Efficient Isolates from Morocco Soils for Biological Control. *Phytopathologia Mediterranea*. Vol. 43, pp 332-340.

Kritzman G, Chet I, Henis Y. (1977). The role of oxalic acid in the pathogenic behavior of *Sclerotium rolfsii* Sacc. *Experimental Mycology*. Vol. 1, pp 280-285.

Lahlali R, Bajii M, Jijakli MH.(2007). Isolation and evaluation of bacteria and fungi as biological control agents against *Rhizoctonia solani*. *Communications in agricultural and applied biological sciences*. Vol.72, pp 73-82.

Laslo, É, György, É, Mara G, Tamás É, Ábrahám B, Lányi, S. (2012). Screening of plant growth promoting rhizobacteria as potential microbial inoculants. *Crop Protection*. Vol. 40, pp 43-48

Lavermicocca P , Valerio F, Evidente A, Lazzaroni S , Corsetti A, Gobbetti M. (2000). Purification and Characterization of Novel Antifungal Compounds from the Sourdough *Lactobacillus plantarum* Strain 21B. *Applied and Environmental Microbiology*. Vol. 66, pp 4084–4090

Lee C.N, Kruijt M, Raaijmakers J.M.(2011). Involvement of phenazines and lipopeptides in interactions between *Pseudomonas* species and *Sclerotium rolfsii*, causal agent of stem rot disease on groundnut. *Journal of Applied Microbiology*. Vol.112, pp 390–403

Lemanceau P, Alabouvette C (1991). Biological control of fusarium diseases by fluorescent *Pseudomonas* and non-pathogenic *Fusarium*. *Crop Protection*. Vol. 10, pp 279-286.

Leveau J. H.J, Lindow S.E. (2005). Utilization of the Plant Hormone Indole-3-Acetic Acid for Growth by *Pseudomonas putida* Strain 1290. *Applied and Environmental Microbiology*. Vol.71, pp 2365–2371

Lewis J.A, Papavizas G.C. (1991). Biocontrol of plant diseases: the approach for tomorrow. *Corp Protection*. Vol. 10, pp 95-105.

Liamngee K, Zakki Y, Onah D. (2015). *Sclerotium rolfsii*; Causative organism of southern blight, stem rot, white mold and sclerotia rot disease. *Scholars Research Library*. Vol. 6, pp 78-89.

Llop P, Bonaterra A, Penalver J, Lopez M, (2000). Development of a highly sensitive nested-PCR procedure using a single closed tube for detection of *Erwinia amylovora* in asymptomatic plant material. *Appl. Environ. Microbiol.* Vol. 66, pp2071-2078

Manjula K, Kishore G.C, Girish A.G, Singh S.D. (2004). Combined Application of *Pseudomonas fluorescens* and *Trichoderma viride* has an Improved Biocontrol Activity Against Stem Rot in Groundnut. *Plant Pathology*. Vol. 20, pp 75-80

Mendgen K, Schiewe A, Falconi C. (1991). Biological control of plant diseases. Konstanger Online-Publikation-System. pp 1-16.

Mirocha C.J, Abbas H.K, Kommedahl T, Jarvis BB (1989). Mycotoxin production by *Fusarium oxysporum* and *Fusarium sporotrichioides* isolated from *Baccharis* spp. from Brazil. *Applied and Environmental Microbiology*. Vol. 55, pp 254-264.

Mohamedi H.AL.A, Haggag W.M (2006). Biocontrol potential of salinity tolerant mutants of *Trichoderma harzianum* against *Fusarium oxysporum*. *Brazilian Journal of Microbiology*. Vol. 37, pp 1678-4405

Mohammadi P, Tozlu E, Kotan R, Kotan M.S. (2017). Potential of Some Bacteria for Biological Control of Postharvest Citrus Green Mould Caused by *Penicillium digitatum*. *Plant Protect. Sci*. Vol. 53, pp 134–143

Nalisha I, Muskhazli M, Nor Farizan T.(2006). Production of Bioactive Compounds by *Bacillus subtilis* against *Sclerotium rolfsii*. *Malaysian Journal of Microbiology*. Vol. 2, pp.19-23.

Nandia M, Selin C, Brawermanc G, Fernando W G D, Kievit T.(2017). Hydrogen cyanide, which contributes to *Pseudomonas chlororaphis* strain PA23 biocontrol, is upregulated in the presence of glycine. *Biological Control*. Vol. 108, pp 47-54

Nelson Paul. (1981). Fungal wilt diseases of plants, Life cycle and epidemiology of *Fusarium oxysporum*. Academic press. Mace M E, Alois A,B, Beckman.

Olubukola B O.(2007). Pectinase and cellulase enhance the control of *Abutilon theophrasti* by *Colletotrichum coccodes*. *Biocontrol Science and Technology*. Vol. 17

Ortenlich A, Elad Y, Chet I. (1987). The role of chitinase of *Serratia marcescens* in biocontrol of *Sclerotium rolfsii*. *American Phytopathological society*. Vol. 78, pp 84-88

Panagiotou G, Kekos D, Macris B.J, Christakopoulos P. (2003). Production of cellulolytic and xylanolytic enzymes by *Fusarium oxysporum* grown on corn stover in solid state fermentation. *Industrial Crops and Products*. Vol. 18, pp 37-45.

Paramageetham C.H, Prasada Babu G. (2012). Antagonistic Activity of *Fluorescent Pseudomonads* against a Polyphagous Soil Born Plant Pathogen–*Sclerotium rolfsii*. *Journal of AIDS & Clinical Research*. Vol.1

Patterson J.C, Epps W.M, Freeman I.E. (1951). Physiology and parasitism of *Sclerotium rolfsii*. *Journal of Phytopathology*. Vol. 41, pp 245-256.

- Pradhan N, Sukl L.B. (2005).** Solubilization of inorganic phosphates by fungi isolated from agriculture soil. African Journal of Biotechnology. Vol. 5, pp. 850-854
- Prashant, K., Mishra, Roland, T.V. Fox., Alastair, C., 2003.** Development of a PCR-based assay for rapid and reliable identification of pathogenic Fusaria. FEMS Microbiology Letters Vol.218, pp 329-332
- Punja Zamir K. (1985).** The biology, ecology, and control of *sclerotium rolfii*. Annual Review of Phytopathology. Vol. 23, pp 97-127.
- Purdy L. H. (1979).** *Sclerotinia sclerotiorum*: History, Diseases and Symptomatology, Host Range, Geographic Distribution, and Impact. Plant Pathology Department, University of Florida, Gainesville. Vol. 69, pp 1-6.
- Ranković J, Dodić J, Dodić S, Popov S. (2009).** Bioethanol production from intermediate products of sugar beet processing with different types of *Saccharomyces cerevisiae*. Chemical Industry and Chemical Engineering Quarterly. Vol. 15, pp 13-16.
- Rakh R R, Raut L S, Dalvi S M, Manwar S M. (2011).** Biological control of *Sclerotium rolfii*, causing stem rot of groundnut by *Pseudomonas cf. monteilii* 9. Vol.3, pp 26-34
- Ramette A, Frapolli M, Défago G, Moëgne-Loccoz Y. (2003).** Phylogeny of HCN Synthase-Encoding hcnBC Genes in Biocontrol *Fluorescent Pseudomonads* and Its Relationship with Host Plant Species and HCN Synthesis Ability. Molecular Plant-Microbe Interactions. Vol. 16, pp 525-535
- Remesal E, Jordan Ramírez R, JiménezDíaz R M, Navas Cortés J A. (2012).** Mycelial compatibility groups and pathogenic diversity in *Sclerotium rolfii* populations from sugar beet crops in Mediterranean-type climate regions. Plant pathology. Vol. 61, pp 739–753.
- Renvoisé A. (2012).** Applicabilité de la PCR « universelle » 16S comme outil d'identification et de détection bactérienne en laboratoire hospitalier de bactériologie. Thèse de doctorat. Spécialité: Maladies Infectieuses. Faculté De Médecine De Marseille. 109. France
- Rezzonico F, Zala M Keel C, Duffy B, Moëgne-Loccoz M, Défago G.(2007).** Is the ability of biocontrol *fluorescent pseudomonads* to produce the antifungal metabolite 2,4-diacetylphloroglucinol really synonymous with higher plant protection?. New Phytologist. Vol.173, pp 861-72
- Riess J. (2012).** Intensification de la brique « fermentation alcoolique » de substrats betteraviers (et autres substrats) pour la production d'éthanol. Thèse de doctorat. Spécialité : Génie des procédés et de l'environnement. Université de Toulouse. 178. France
- Roslycky E B. (1967).** Bacteriocin production in the rhizobia bacteria. Revue canadienne de microbiologie. Vol. 13, pp 431-432

- Sánchez OJ, Cardona CA. (2008).** Trends in biotechnological production of fuel ethanol from different feedstocks. *Bioresource Technology*, Vol 99, pp 5270–5295.
- Shalaby.M, El-Gremi S.M, El-Kady E.M, El-Emary S.A. (2015).** Microbial and fungicidal antagonism of *Fusarium oxysporum* f. Sp. Beta for controlling wilting disease of sugar beet plants. *Egyptian journal of plant protection*. Vol 3, pp 29-52 .
- Sethi S, Datta A, Lal Gupta B, Gupta S.(2013).** Optimization of Cellulase Production from Bacteria Isolated from Soil. *ISRN Biotechnology*. Vol. 3, pp 245-252
- Siddiqui I A, Haas D, Heeb S. (2005).** Extracellular Protease of *Pseudomonas fluorescens* CHA0, a Biocontrol Factor with Activity against the Root-Knot Nematode *Meloidogyne incognita*. *Applied and Environmental Microbiology*. Vol. 3
- Singh A. N, Verma R, Shanmugam V (2006).** Extracellular Chitinases of *Fluorescent Pseudomonads* Antifungal to *Fusarium oxysporum* f. sp. dianthi Causing Carnation Wilt. *Current Microbiology*. Vol.52, pp 310-316.
- Smith, Gary A. (1987).** Sugar beet: Principles of Cultivar Development. Fehr, W.R. (ed.) MacMillan Publishing Company, pp.577-625.
- Sodhi, H.K., Sharma K, Gupta J.K., Soni S.K., (2005).** Production of a thermostable α -amylase from *Bacillus* sp. PS-7 by solid state fermentation and its synergistic use in the hydrolysis of malt starch for alcohol production. *Process Biochem*. Vol. 40, pp 525–534.
- Sousa C.S, Soares A.C.F, Garrido M.S (2008)** Characterization of *streptomycetes* with potential to promote plant growth and biocontrol. *Sci Agric*.Vol. 65, pp 50–55
- Thomas F.C, Woeng C.A, Guido V.B, Van der Bij A.J, Koen M G M, et al.(1998).** Biocontrol by Phenazine-1-carboxamide-Producing *Pseudomonas chlororaphis* PCL1391 of Tomato Root Rot Caused by *Fusarium oxysporum* f. sp. radicis-lycopersici. *Molecular Plant-Microbe Interactions*. Vol.11, pp 1069-1077
- Trivedi P, Pandey A, Palni L M S.(2008).** In vitro evaluation of antagonistic properties of *Pseudomonas corrugata*. *Microbiological Research*. Vol. 163, pp329-336
- Velusamy P, Kim K Y.(2015).** Chitinolytic activity of *Enterobacter* sp. KB3 antagonistic to *Rhizoctonia solani* and its role in the degradation of living fungal hyphae. *International Research Journal of Microbiology*.Vol. 2, pp. 206-214
- Weisburg W.G, Barns S.M, Pelletier D.A, Lane D.J. (1991).**16S ribosomal DNA amplification for phylogenetic study. *J Bacteriol*. Vol. 173, pp 697-703.
- Young S O, Lee E Y, Woong K, Yoon D H. (2016).** Antifungal Activity of *Bacillus Subtilis* HK2 against *Trichothecium Roseum* Causing Pink Rot of Melon and White Stain Symptom on Grape. *Korean Journal of Plant Research*. Vol. 29, pp39-45

Yuan J, Raza W, Shen Q, Huang Q.(2012).Antifungal activity of *Bacillus amyloliquefaciens* NJN-6 volatile compounds against *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense*.American Society for Microbiology.Vol. 78, pp 5942–5944

Zhou G.Q , Zhang G.F, Qi D.M.(2011). A New Method of Producing Bio-Energy by Using SugarBeets. Energy Procedia, Vol. 12, pp 873 – 877.

ANNEXES

Annexe A : Tampon d'extraction Doyle-Doyle:

Pour préparer 50 ml du tampon d'extraction, il faut suivre les étapes suivantes :

5 ml de Tris-HCL (1 M, Ph 8) est versée dans 35 ml d'eau distillée stérile, puis 4,09 g de NaCl est ajoutée, ensuite, le mélange est transféré au bain marie à 65 °C. Encore une fois après l'ajout d' 1 g de CTAB, le mélange est transféré a nouveau au bain marie. 0,5 g de Polyvinilpyrrolidone PVP40 est ajouté au mélange précédent et dissoute au bain marie ; à ce stade 0,372 g de l'EDTA a été additionnée. Ce volume est ajusté à 50 ml en ajoutant de l'EDS. D'ailleurs avant l'utilisation finale du tampon, 0,4 g de Na₂SO₃ sera ajouté.

Annexe B : Tampon d'extraction Llop et al

Composition	Concentration (g/l d'eau distillée)
Tris Hcl, (pH 7, 5)	24,2 g
Polyvinilpyrrolidone PVP-10	20 g
NaCl	14,6 g
EDTA	9,3 g
Eau distillée	<u>11</u>

Annexe C :Gel d'agarose 1%

1g d'agarose a été solubilisée dans 100 ml de TBE 1X, puis chauffé au micro-onde pendant 30s, Le gel après son refroidissement a été coulé dans un moule pourvue d'un peigne. Ce peigne sera éliminé après gélification de l'agarose, et le gel est placé au niveau de la cuve de la migration.

Annexe D : Tampon TBE

Composition	Concentration (g/l d'eau distillée)
(89 mM) Tris base	10,78 g
(2 mM) Na ₂ EDTA	5,50 g
(89 mM) Acide borique	0,58 g

Annexe E : Tampon de charge 6X

Bleu de bromophénol 50 mg

Sucre 4g

H₂O 10ml

Annexe F : Milieu PDA

❖ Préparé

Composition	Concentration (g/l d'eau distillée)
Pomme de terre	250g
Glucose	15 g
Agar	20 g

❖ Commercial

Composition	Concentration (g/l d'eau distillée)
PDA poudre	39g

Annexe G : Milieu à base de l'amidon

Composition	Concentration (g/l d'eau distillée)
Peptone	5
Amidon	10
Agar	15g

Annexe H : Milieu de culture à base de lait écrémé (protéase)

Composition	Concentration (g/l d'eau distillée)
Lait écrémé	15
Agar	20
Extrait de levure	0,5

Annexe I : Milieu LB (Lauria Broth)

Composition	Concentration (g/l d'eau distillée)
Peptone	10
Extrait de levure	5
NaCl	10
Agar	20

Annexe J : Milieu de culture PVK (Solubilisation du phosphore)

Composition	Concentration (g/l d'eau distillée)
Extrait de levure	0.5
Glucose	10
Calcium phosphate	5
Chlorure de potassium	0.2
Manganese sulphate	0.001
Magnesium sulphate	0.1
Ammonium sulphate	0.5
Sulfate de fer	0.001
Agar	15

Annexe K : Milieu LPGA

Composition	Concentration (g/l d'eau distillée)
Peptone	7 g
Extrait de levure	7 g
Glucose	7 g
Agar	15 g

Annexe L : Solution picrate

Solution picrate	
Acide picrique (jaune)	2,5%
carbonate de sodium (Na ₂ CO ₃)	15%

Annexe M : Préparation de graines de sorgho pour le test *in vivo*

Les graines sont trempées dans l'eau distillée pendant 2 jours à température ambiante, ensuite, l'eau est éliminée, et les graines sont stérilisées pendant 45min à 121°C. Par la suite ces graines sont inoculées par *Sclerotium rolfsii* en plaçant des disques à partir d'une culture jeune du champignon dans des boîtes en verre contenant les graines de sorgho, les boîtes sont incubées pendant 15 jours.



Figure 28 : Graines de sorgho infecté par *Sclerotium rolfsii*

Annexe N : Analyses statistiques du test d'antagonisme(*Fusarium oxysporum*)

❖ 5 Jours

ANOVA à 2 facteurs

Source	Sum of Squares	Df	Mean Square	F-Ratio	P-Value
Model	34259,4	57	601,041	42,23	0,0000
Residual	1651,17	116	14,2342		
Total (Corr.)	35910,5	173			

Multiple Comparisons for taux d'inhibition by traitement

Method: 95,0 percent LSD

traitement	Count	LS Mean	Homogeneous Groups
20	6	7,78469	X
15	6	11,159	XX
12	6	11,431	XX
25	6	12,8618	XX
26	6	14,139	XX
17	6	15,0444	XX
21	6	15,3631	XX
29	4	15,3825	XX
7	6	15,7998	X
16	6	16,2098	X
13	6	16,4886	X
23	6	21,8646	X
27	6	22,5614	X
22	6	23,0772	XX
28	8	24,7464	XX
8	6	25,6659	XXX
11	6	27,115	XXX
24	6	27,1532	XXX
2	6	29,9398	XXX
9	6	31,1468	XX
4	6	32,4478	X
5	6	41,6328	X
14	6	44,2121	XX
10	6	45,6972	XXX
6	6	47,4605	XXX
1	6	48,5801	XXX
19	6	51,4074	XX
18	6	51,8856	X
3	6	51,9154	X

❖ 10 Jours

ANOVA à 2 facteur

Source	Sum of Squares	Df	Mean Square	F-Ratio	P-Value
Model	91750,8	57	1609,66	143,80	0,0000
Residual	1298,48	116	11,1938		
Total (Corr.)	93049,3	173			

Multiple Comparisons for taux d'inhibition by traitement

traitement	Count	LS Mean	Homogeneous Groups
27	6	-2,70894E-14	X
16	6	-3,10862E-15	X
15	6	9,99201E-16	X
17	6	4,44089E-15	X
22	6	0,455556	X
7	6	0,788889	XX
25	6	1,84074	XX
26	6	2,60185	XXX
20	6	2,72037	XXX
11	6	4,37222	XX
28	8	5,45556	X
9	6	9,5	X
12	6	9,91481	X
21	6	14,4907	X
8	6	16,7759	X
2	6	17,0815	X
13	6	17,1426	X
29	4	17,8861	X
4	6	24,6519	X
23	6	34,2185	X
24	6	36,8889	X
14	6	51,4185	X
19	6	52,2352	XX
1	6	53,4852	XX
5	6	55,7056	XX
6	6	59,1722	XX
18	6	59,95	X
10	6	60,0204	X
3	6	60,9556	X

Annexe O : Analyses statistiques du test d'antagonisme *S rolfsii*

❖ 4 jours

ANOVA à 2 facteurs

Source	Sum of Squares	Df	Mean Square	F-Ratio	P-Value
Model	60803,2	57	1066,72	105,39	0,0000
Residual	1174,09	116	10,1215		
Total (Corr.)	61977,3	173			

Multiple Comparisons for Taux d'inhibition by traitement

Method: 95,0 percent LSD

traitement	Count	LS Mean	Homogeneous Groups
15	6	4,16791	X
11	6	6,14481	XX
12	6	6,23693	XX
28	8	8,70182	XX
2	6	8,79643	XX
22	6	9,21721	XX
17	6	10,4223	X
25	6	10,6762	X
16	6	11,1841	X
23	6	15,0433	X
13	6	15,7031	XX
4	6	18,5963	XXX
21	6	18,6485	XXX
29	4	19,3382	XX
24	6	20,9292	X
7	6	21,9176	XX
26	6	25,0822	XX
27	6	25,5328	XX
20	6	27,9106	X
14	6	45,5881	X
9	6	46,6214	X
8	6	48,2995	XX
19	6	50,4581	XX
18	6	50,62	XX
10	6	51,4789	XX
5	6	51,6657	XX
6	6	51,7976	XX
1	6	52,5744	X
3	6	65,9023	X

❖ 6 jours

ANOVA à 2 facteurs

Source	Sum of Squares	Df	Mean Square	F-Ratio	P-Value
Model	126943,0	57	2227,07	423,01	0,0000
Residual	610,721	116	5,26484		
Total (Corr.)	127554,0	173			

Multiple Comparisons for Taux d'inhibition by Traitement

Method: 95,0 percent LSD

Traitement	Count	LS Mean	Homogeneous Groups
26	6	-2,17604E-14	X
25	6	-2,12053E-14	X
22	6	-1,83187E-14	X
23	6	-1,27676E-14	X
17	6	-6,43929E-15	X
13	6	5,66214E-15	X
16	6	6,88338E-15	X
12	6	1,73195E-14	X
11	6	1,74305E-14	X
15	6	1,38519	XX
7	6	1,52963	XX
28	8	1,99444	XX
2	6	2,80926	XX
4	6	2,83704	XX
21	6	3,59074	XX
20	6	4,70556	XX
29	4	6,91111	XX
27	6	8,35185	X
24	6	16,487	X
14	6	50,813	X
19	6	55,2778	X
18	6	56,1037	XX
9	6	56,65	XXX
1	6	57,1852	XXX
10	6	58,6259	XX
6	6	58,6315	XX
8	6	59,0741	XX
5	6	61,5111	X
3	6	70,7426	X

Annexe P : Analyses statistiques d'antibiose via le surnageant bactérien *F*

oxysporum

❖ 5 jours

ANOVA à 2 facteurs

Source	Sum of Squares	Df	Mean Square	F-Ratio	P-Value
Between groups	586,915	7	83,845	27,26	0,0000
Within groups	49,221	16	3,07631		
Total (Corr.)	636,136	23			

Multiple Range Tests for Taux d'inhibition by Traitement

Method: 95,0 percent LSD

Traitement	Count	Mean	Homogeneous Groups
5	3	30,397	X
4	3	31,6991	XX
6	3	33,3491	XX
3	3	33,7709	X
2	3	39,7912	X
7	3	42,3059	X
1	3	42,6274	X
8	3	42,7118	X

❖ 10 jours

ANOVA à 2 facteurs

Source	Sum of Squares	Df	Mean Square	F-Ratio	P-Value
Between groups	1386,75	7	198,107	27,70	0,0000
Within groups	114,433	16	7,15206		
Total (Corr.)	1501,18	23			

Multiple Range Tests for Taux d'inhibition by Traitement

Method: 95,0 percent LSD

Traitement	Count	Mean	Homogeneous Groups
8	3	27,9	X
4	3	38,4889	X
1	3	38,9778	X
6	3	41,6037	X
3	3	42,6593	XX
7	3	46,8852	X
5	3	52,3	X
2	3	52,737	X

Annexe Q : Analyses statistique d'antibiose via le surnageant bactérien

❖ 4 jours

ANOVA à 2 facteurs

Source	Sum of Squares	Df	Mean Square	F-Ratio	P-Value
Between groups	2567,14	9	285,238	21,66	0,0000
Within groups	263,346	20	13,1673		
Total (Corr.)	2830,49	29			

Multiple Range Tests for taux d'inhibition by traitement

Method: 95,0 percent LSD

traitement	Count	Mean	Homogeneous Groups
1	3	21,4278	X
4	3	33,256	X
6	3	35,1852	X
7	3	42,1593	X
8	3	43,6501	X
3	3	44,496	X
10	3	45,7805	X
9	3	46,9927	X
5	3	47,5549	X
2	3	57,2011	X

❖ 6 jours

ANOVA à 2 facteurs

Source	Sum of Squares	Df	Mean Square	F-Ratio	P-Value
Between groups	1838,78	9	204,308	31,61	0,0000
Within groups	129,281	20	6,46403		
Total (Corr.)	1968,06	29			

Multiple Range Tests for taux d'inhibition by traitement

Method: 95,0 percent LSD

traitement	Count	Mean	Homogeneous Groups
1	3	26,3037	X
6	3	36,9111	X
4	3	42,3111	X
5	3	42,7444	X
8	3	43,1074	X
3	3	45,037	XX
10	3	47,463	X
9	3	48,8185	XX
7	3	52,1407	XX
2	3	55,9074	X

Annexe R : Analyses statistiques d'essai de Confrontation in vivo *S rolfsii*

❖ Control de la maladie

ANOVA à 1 facteur

Source	Sum of Squares	Df	Mean Square	F-Ratio	P-Value
Between groups	3008,11	10	300,811	13,33	0,0000
Within groups	744,889	33	22,5724		
Total (Corr.)	3753,0	43			

Multiple Range Tests for Semences saines by Traitement

Method: 95,0 percent LSD

Traitement	Count	Mean	Homogeneous Groups
5	4	74,9975	X
3	4	74,9975	X
1	4	78,33	X
9	4	79,9975	X
4	4	89,995	X
6	4	91,6625	X
8	4	91,6625	X
7	4	93,33	XX
10	4	93,33	XX
2	4	93,33	XX
11	4	100,0	X

❖ Effet des bactéries sur la plante

ANOVA à 1 facteur

Source	Sum of Squares	Df	Mean Square	F-Ratio	P-Value
Between groups	3008,11	10	300,811	13,33	0,0000
Within groups	744,889	33	22,5724		
Total (Corr.)	3753,0	43			

Multiple Range Tests for Semences saines by Traitement

Method: 95,0 percent LSD

Traitement	Count	Mean	Homogeneous Groups
5	4	74,9975	X
3	4	74,9975	X
1	4	78,33	X
9	4	79,9975	X
4	4	89,995	X
6	4	91,6625	X
8	4	91,6625	X
7	4	93,33	XX
10	4	93,33	XX
2	4	93,33	XX
11	4	100,0	X

Annexe S : Analyses statistique du test Amylase

ANOVA à 1 facteur

Source	Sum of Squares	Df	Mean Square	F-Ratio	P-Value
Between groups	7,74684	9	0,86076	1988,70	0,0000
Within groups	0,00865649	20	0,000432824		
Total (Corr.)	7,75549	29			

Multiple Range Tests for indice amylolytique by Traitement

Method: 95,0 percent LSD

Traitement	Count	Mean	Homogeneous Groups
3	3	0,0	X
7	3	0,0	X
2	3	0,0	X
9	3	1,02599	X
5	3	1,03294	X
6	3	1,08468	X
1	3	1,09741	XX
8	3	1,12453	X
10	3	1,16473	X
4	3	1,19573	X

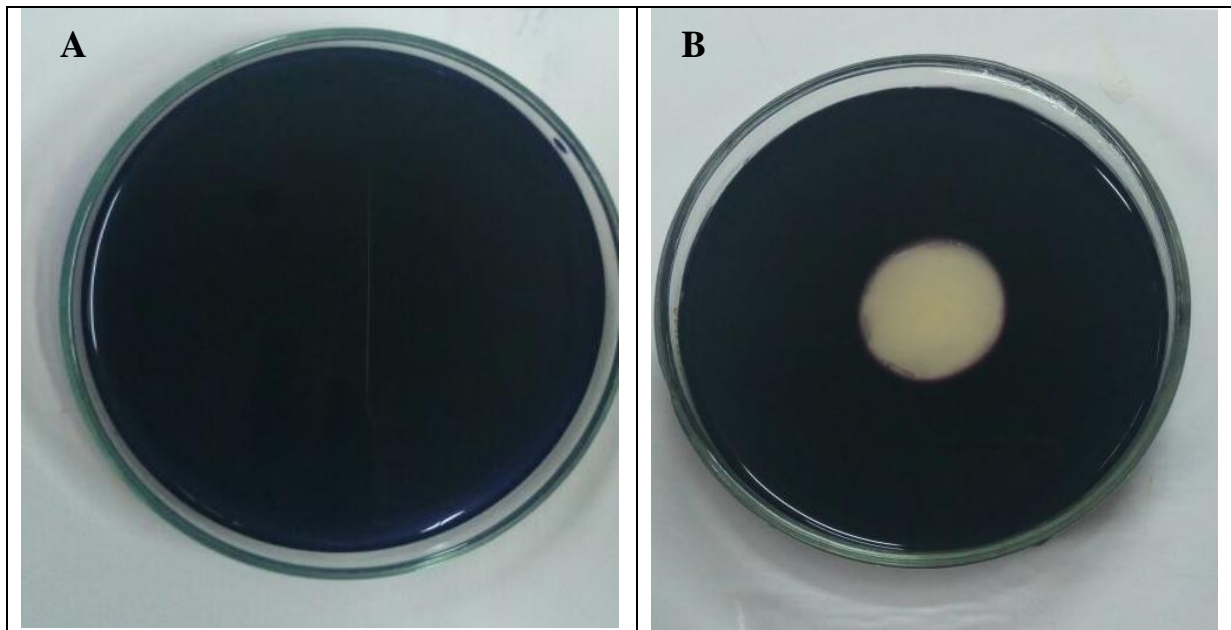


Figure 29: Test de production de l'amylase. A ; Bactérie AP 1, B ; Bactérie AP 9

Annexe T: Analyses statistiques du test protéase

ANOVA à 1 facteur

Source	Sum of Squares	Df	Mean Square	F-Ratio	P-Value
Between groups	6,84803	9	0,760892	122,07	0,0000
Within groups	0,124667	20	0,00623333		
Total (Corr.)	6,9727	29			

Multiple Range Tests for Indice proteolytique by Traitement

Method: 95,0 percent LSD

Traitement	Count	Mean	Homogeneous Groups
9	3	1,32	X
5	3	1,42667	XX
10	3	1,44	XX
3	3	1,49	XX
1	3	1,58333	XX
2	3	1,61667	XX
4	3	1,64333	X
7	3	1,98667	X
6	3	2,39667	X
8	3	2,89333	X

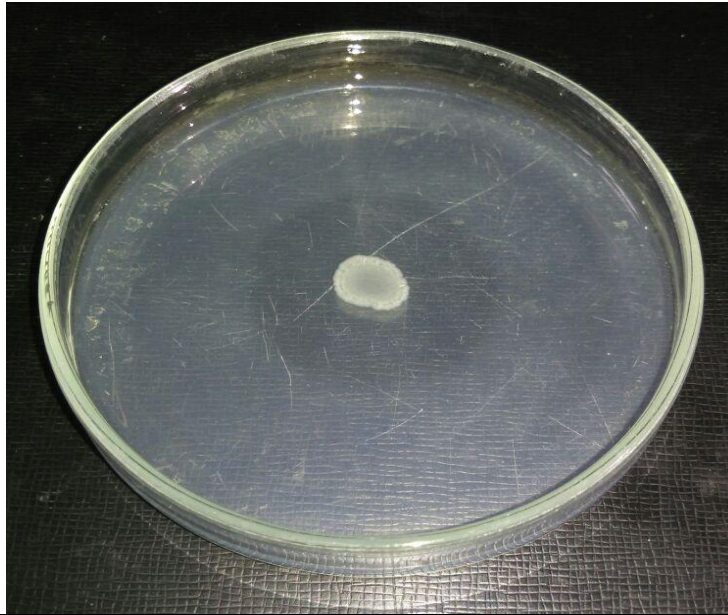


Figure 30 : Production de protéase par la bactérie ELG1

Annexe U : Analyses statistiques du test cellulase

ANOVA à 1 facteur

Source	Sum of Squares	Df	Mean Square	F-Ratio	P-Value
Between groups	13,9272	9	1,54746	166,00	0,0000
Within groups	0,186444	20	0,00932219		
Total (Corr.)	14,1136	29			

Multiple Range Tests for indice cellulosique by Traitement

Method: 95,0 percent LSD

Traitement	Count	Mean	Homogeneous Groups
4	3	0,0	X
8	3	0,0	X
10	3	0,0	X
2	3	0,0	X
6	3	0,0	X
7	3	0,0	X
3	3	1,21646	X
9	3	1,2301	X
1	3	1,2472	X
5	3	1,74789	X

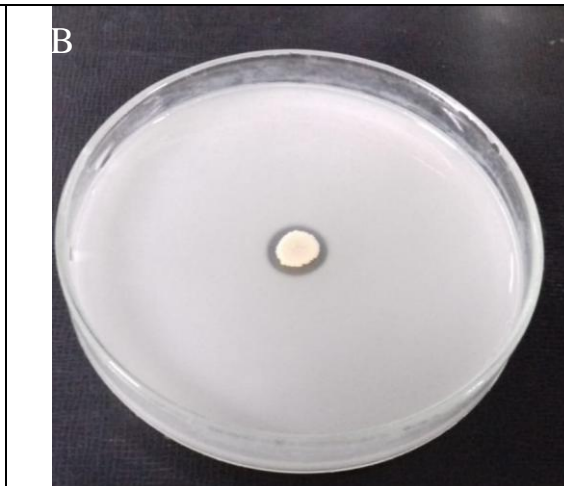
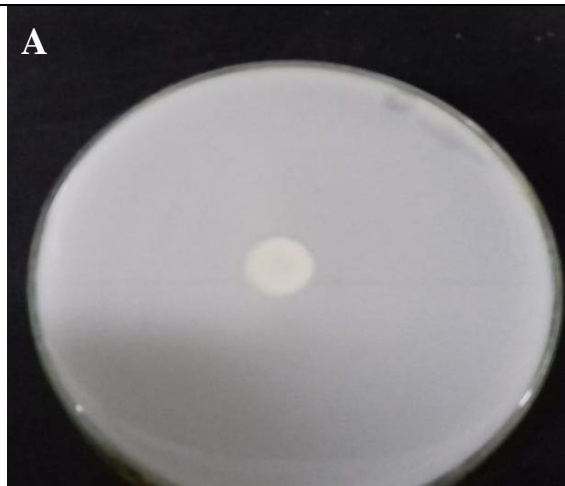


Figure 31 : test de solubilisation du phosphore, A ; Bactérie AP1, B ; Bactérie AP10

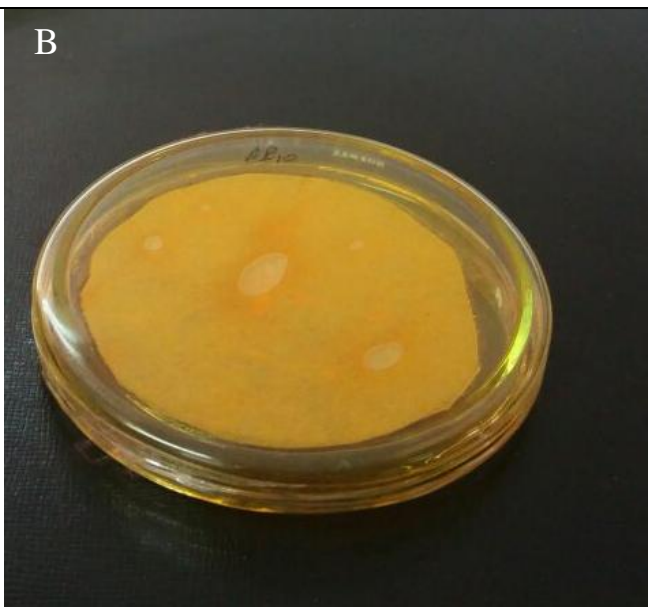
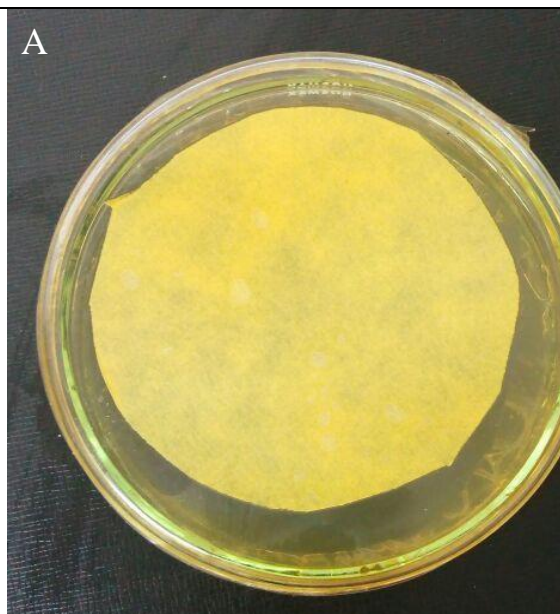


Figure 32: Test de production d'HCN. A ; Témoin, B ; bactérie AP10



Figure 33: Test de production de l'AIA. A ; Témoin, B ; Bactérie AP 3