

République Algérienne Démocratique et Populaire
Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique
Université Amar Telidji – Laghouat
Faculté des Sciences
Département des Sciences Agronomiques



Mémoire de fin d'étude
En vue de l'obtention du diplôme de Master
Option : Protection des végétaux

Présenté par :
HASSANI Louiza

Thème

Etude de l'effet antagoniste des bactéries endophytes
associées aux plantes médicinales vis-à-vis de
certains agents phytopathogènes

le 30/06/2025, devant le jury :

MALLEM Hamida	Professeure	Univ. Laghouat	Présidente
ZAZA Messaouda	MAA	Univ. Laghouat	Examinatrice
MEKHALDI Delel	MCB	Univ. Laghouat	Promotrice
AITIALEFF Khouloud	MCB	Univ. Laghouat	Co-promotrice

Année universitaire

2024/2025

Remerciements

Tout d'abord, je remercie sincèrement Allah, le Tout-Puissant, pour m'avoir donné la force, la patience et la santé nécessaires à l'accomplissement de ce travail.

Mes plus sincères remerciements à ma promotrice, Madame MEKHALDI Delel, dont le soutien indéfectible, la bienveillance et la patience ont été pour moi une source constante de motivation et de confiance. Son accompagnement attentif, ses précieux conseils et son exigence scientifique m'ont guidée à chaque étape de ce travail. Sans son engagement et sa disponibilité, ce mémoire n'aurait pas été possible. Je lui suis profondément reconnaissante pour tout ce qu'elle m'a apporté, tant sur le plan académique que personnel.

Je tiens à remercier chaleureusement Madame MALLEM Hamida et Madame ZAZA Messaouda d'avoir accepté d'évaluer ce mémoire. Leur expertise, leur temps précieux et leurs remarques constructives ont grandement contribué à l'amélioration de ce travail.

Je tiens à remercier sincèrement Madame AMEUR Djamila pour tout le temps qu'elle m'a consacré, ainsi que pour son soutien précieux dans le travail au laboratoire. Sa patience, ses conseils avisés et son accompagnement constant ont été d'une grande aide tout au long de cette étude.

Je tiens à exprimer ma gratitude à tous les ingénieurs du laboratoire pour leur soutien, leur disponibilité et leur collaboration tout au long de ce travail. Leur expertise et leur aide précieuse ont grandement facilité la réalisation de cette étude.

Je remercie chaleureusement mes collègues ainsi que toutes les personnes qui m'ont soutenue de près ou de loin durant ce parcours.

Dédicace

Avec l'aide du Dieu Tout-Puissant, qui a guidé chaque étape de mon chemin de vie.

J'ai le grand plaisir de dédier ce modeste travail

*Je dédie ce mémoire à mes parents ma mère Leïla et mon père Hadj
Aïssa pour leur amour, leur patience et leur soutien inconditionnel tout au
long de mon parcours.*

*À mon frère Brahim et à ma sœur Warda, pour leur encouragement
constant et leur présence réconfortante*

*À mes professeurs, Madame Mekhaldi Delal et Madame Ameer,
pour leur patience, leur accompagnement et leurs conseils éclairés.*

*Et à mon cher compagnon à quatre pattes, mon chat, qui m'a apporté calme
et réconfort durant les moments de travail intense*

*Enfin, à tous ceux qui ont contribué, de près ou de loin, à la réalisation de ce
travail.*

Résumé

Etude de l'effet antagoniste des bactéries endophytes associées aux plantes médicinales vis-à-vis de certains agents phytopathogènes

Ce travail a pour objectif d'examiner le potentiel antagoniste des bactéries endophytes associées à des plantes médicinales, vis-à-vis de certains agents phytopathogènes. Les isolats bactériens ont été obtenus à partir des racines de deux espèces végétales sélectionnées pour cette étude : la menthe pouliot (*Mentha pulegium*) et le thym (*Thymus vulgaris*). Quatorze isolats provenant des deux plantes ont été sélectionnés pour l'étude. Leur identification préliminaire s'est appuyée sur l'analyse de leurs caractéristiques culturales, morphologiques. Les bactéries isolées présentent une diversité morphologique, incluant des coques, bacilles et coccobacilles à Gram positif et négatif. La coloration au vert de malachite n'a révélé aucune formation de spores chez les isolats étudiés. L'identification biochimique des isolats a été réalisée à l'aide de plusieurs tests. Certains isolats ont montré une capacité à fermenter le mannitol, tandis que d'autres, non fermentaires, ont présenté une mobilité positive. Le test d'utilisation du citrate n'a donné un résultat positif que pour l'isolat Th3, révélant sa capacité à utiliser le citrate comme unique source de carbone. Concernant le test de l'oxydase, la majorité des isolats issus de la menthe pouliot se sont révélés positifs, à l'exception de Me6 et Me7, tandis que chez le thym, seuls Th1, Th2 et Th5 ont montré une activité oxydasique. La recherche de la production de fluorescence sur le milieu King B n'a révélé aucun résultat positif pour l'ensemble des isolats, indiquant qu'aucun d'eux ne produit le pigment fluorescent typique, tel que la pyoverdine. Le test d'antagonisme *in vitro* réalisé contre les souches pathogènes *Fusarium culmorum* et *F. oxysporum* f. sp. *pisi* a mis en évidence une forte capacité inhibitrice des isolats Me2, Me3, Me6 et Th2, qui ont significativement réduit la croissance mycélienne des champignons. Ces résultats suggèrent leur potentiel prometteur en tant qu'agents de biocontrôle contre les maladies fongiques des plantes.

Mot clés : Bactéries endophytes, menthe pouliot, thym, antagonisme, phytopathogène.

Abstract

Study of the Antagonistic Effect of Endophytic Bacteria Associated with Medicinal Plants Against Certain Phytopathogenic Agents

This study aims to examine the antagonistic potential of endophytic bacteria associated with medicinal plants against certain phytopathogenic agents. Bacterial isolates were obtained from the roots of two selected plant species: pennyroyal mint (*Mentha pulegium*) and thyme (*Thymus vulgaris*). Fourteen isolates from both plants were selected for the study. Their preliminary identification was based on the analysis of their cultural and morphological characteristics. The isolated bacteria displayed morphological diversity, including cocci, bacilli, and coccobacilli, both Gram-positive and Gram-negative. Malachite green staining did not reveal any spore formation in the studied isolates. Biochemical identification of the isolates was performed using several tests. Some isolates demonstrated the ability to ferment mannitol, while others, although non-fermentative, showed positive motility. The citrate utilization test yielded a positive result only for isolate Th3, indicating its ability to use citrate as a sole carbon source. Regarding the oxidase test, most isolates from pennyroyal mint tested positive, except for Me6 and Me7, while only Th1, Th2, and Th5 from thyme exhibited oxidase activity. The test for fluorescence production on King B medium was negative for all isolates, indicating the absence of the typical fluorescent pigment such as pyoverdine. The *in vitro* antagonism test against the pathogenic strains *Fusarium culmorum* and *F. oxysporum* f. sp. *pisi* revealed strong inhibitory activity by isolates Me2, Me3, Me6, and Th2, which significantly reduced the fungal mycelial growth. These findings suggest that these isolates hold promising potential as biocontrol agents against plant fungal diseases.

Key words: Endophytic bacteria, pennyroyal mint, thyme, antagonism, phytopathogen.

دراسة تأثير التضاد الحيوي للبكتيريا الداخلية المرتبطة بالنباتات الطبية ضد بعض العوامل الممرضة للنباتات

يهدف هذا العمل إلى دراسة القدرة المضادة للبكتيريا الداخلية المرتبطة ببعض النباتات الطبية تجاه بعض العوامل الفطرية الممرضة للنباتات. تم عزل السلالات البكتيرية من جذور نوعين من النباتات الطبية المختارة لهذه الدراسة: النعناع البري (*Mentha pulegium*) والزعتر (*Thymus vulgaris*). تم اختيار أربعة عشر عزلة بكتيرية من النباتين بناءً على خصائصها الزراعية والمورفولوجية. أظهرت العزلات البكتيرية تنوعاً مورفولوجياً يشمل المكورات والعصيات والكوكسي-عصيات ذات تلوين غرام موجب وسالب. لم تُظهر صبغة المالاكيت الخضراء أي دليل على تكوين الأبواغ لدى العزلات المدروسة. تم تحديد الهوية البيوكيميائية للعزلات من خلال عدة اختبارات. أظهرت بعض العزلات قدرتها على تخمير المانيتول، بينما أظهرت عزلات أخرى غير قادرة على التخمر حركة إيجابية. أعطت عزلة واحدة فقط (Th3) نتيجة إيجابية في اختبار استعمال السيترات، مما يدل على قدرتها على استخدام السيترات كمصدر وحيد للكربون. أما بالنسبة لاختبار الأوكسيداز، فقد كانت غالبية العزلات المعزولة من النعناع البري إيجابية، باستثناء Me6 و Me7، بينما كانت العزلات Th1 و Th2 و Th5 فقط من الزعتر إيجابية. لم تُظهر اختبارات إنتاج الفلورية على وسط King B أي نتائج إيجابية، مما يشير إلى عدم إنتاج أي من العزلات للصبغة الفلورية النموذجية مثل البايوفيردين. أما اختبار تأثير التضاد الحيوي *in vitro* ضد السلالات الفطرية الممرضة *Fusarium culmorum* و *Fusarium oxysporum* f. sp. *pisii*، فقد أظهر قدرة مثبتة قوية للعزلات Me2، Me3، Me6 و Th2، حيث ساهمت هذه العزلات بشكل كبير في الحد من النمو الميسيليومي للفطريات، مما يشير إلى إمكاناتها الواعدة في استخدامها كعوامل للمكافحة الحيوية ضد الأمراض الفطرية التي تصيب النباتات.

الكلمات المفتاحية: البكتيريا الداخلية، النعناع البري، الزعتر، التضاد الحيوي، العوامل الممرضة للنباتات.

Liste des abréviations

AIA	Acide indole acétique
CK	Cytokinines
Fop	<i>Fusarium oxysporum</i> f. sp. <i>pisi</i>
G	Grossissement
GA	Acide gibbérellique (gibbérelline)
HCN	Cyanure d'hydrogène
ISR	<i>Induced Systemic Resistance</i>
LPGA	Levure Peptone Glucose Agar (milieu de culture)
N₂	Azote atmosphérique
NH₃	Ammoniac
PDA	<i>Potato Dextrose Agar</i> (milieu de culture)
PGPR	<i>Plant Growth Promoting Rhizobacteria</i>
SA	Acide salicylique
SAR	<i>Systemic Acquired Resistance</i>

Liste des figures

Figure 1. Les voies de pénétration des bactéries endophytes.....	6
Figure 2. Plante de menthe pouliot (<i>Mantha pulegium</i> L.)	11
Figure 3. Le thym (<i>Thymus vulgaris</i>)	12
Figure 4. Schéma du test d'antagonisme <i>in vitro</i>	20
Figure 5. Culture pure de l'isolat endophytes Th6	23
Figure 6. Observation microscopique des frottis des isolats endophytes après la coloration de Gram (G×1000).....	25
Figure 7. Absence de spores et présence exclusive de cellules végétatives après coloration au vert de malachite	26
Figure 8. Lecture des résultats du test mannitol-mobilité	28
Figure 9. Lecture des résultats du test citrate	28
Figure 10. Lecture des résultats du test oxydase	29
Figure 11. Résultat positif du Test KOH.....	30
Figure 12. Résultat du test antagoniste <i>in vitro</i> des isolats endophytes.....	32

Liste des tableaux

Tableau 1. Description macroscopique des isolats endophytes associés à la menthe pouliot...24	24
Tableau 2. Description macroscopique des isolats endophytes associés au thym24	24
Tableau 3. Résultats des observations microscopiques après coloration des isolats26	26
Tableau 4. Résultats des observations microscopiques après coloration25	25
Tableau 5. Résultats des tests mannitol-mobilité, citrate et oxydase des isolats endophytes associés à la menthe pouliot29	29
Tableau 6. Résultats des tests mannitol-mobilité, citrate et oxydase des isolats endophytes associés au thym30	30
Tableau 7. Comparaison des résultats du test KOH avec les résultats de la coloration de Gram des isolats endophytes associés à la menthe pouliot31	31
Tableau 8. Comparaison des résultats du test KOH avec les résultats de la coloration de Gram des isolats endophytes associés au thym31	31

Table des matières

Remerciements	
Dédicace	
Résumé	
Abstract	
ملخص	
Liste des abréviations	
Liste des figures et tableaux	
Introduction.....	1

Chapitre 1. Synthèse bibliographique

1. Les endophytes	4
1.1.Définition.....	4
1.2.Les bactéries endophytes	4
1.3.Relation symbiotique entre l’endophyte et la plante hôte	5
1.4.Métabolites des bactéries endophytes	5
1.5.Mécanisme de colonisation des endophytes.....	5
1.6.Mode d’action des bactéries endophytes	7
1.6.1. Productions des phytohormones.....	7
1.6.1.1.Modulation des niveaux d’acide indole-acétique (AIA)	7
1.6.1.2.Production de cytokinines et gibbérellines	7
1.6.2. Fixation d’azote	8
1.6.3. Assimilation du phosphore	8
1.6.4. Mécanismes impliqués dans le biocontrôle des agents pathogènes.....	8
1.6.4.1.L’antibiose	8
1.6.4.2.La production d’enzymes	9
2. Les plantes médicinales	9
2.1. Définition	9
2.2. Métabolites secondaires des plantes médicinales.....	9

2.2.1. Les métabolites primaires.....	10
2.2.2. Les métabolites secondaires	10
2.3. La menthe pouliot (<i>Mentha pulegium</i> L.).....	10
2.4. Le thym (<i>Thymus vulgaris</i> L.)	11

Chapitre 2. Matériel et méthodes

1. Souches de champignons phytopathogènes utilisées	15
2. Matériel végétal	15
2.1. Site d'échantillonnage	15
2.2. Collecte des plantes	16
3. Isolement des bactéries endophytes	16
3.1. Désinfection des échantillons	16
3.2. Préparation de la solution mère	16
3.3. Ensemencement et purification	17
4. Identification des isolats obtenus	17
4.1. Description macroscopique	17
4.2. Etude microscopique	18
4.2.1. Coloration de Gram	17
4.2.2. Coloration au vert de malachite.....	18
4.3. Identification biochimique et métabolique	18
4.3.1. Test mannitol-mobilité.....	18
4.3.2. Test de citrate	19
4.3.3. Test de KOH.....	19
4.3.4. Recherche de l'oxydase.....	19
4.4. Mise en évidence de la production de fluorescence sur milieu King B	20
5. Recherche de l'activité antagoniste <i>in vitro</i> des isolats endophytes.....	20

Chapitre 3. Résultats et discussion

1. Identification des isolats endophytes obtenus	23
1.1. Description macroscopique	24
1.2. Étude microscopique	25
1.2.1. Coloration de Gram	25
1.2.2. Coloration au vert de malachite	26
2. Identification biochimique et métabolique	27
2.1. Test de mannitol-mobilité	27
2.2. Test de citrate	28
2.3. Test d'oxydase	29
2.4. Test de KOH	30
2.5. Mise en évidence de la production de fluorescence sur milieu King B	31
3. Recherche de l'activité antagoniste <i>in vitro</i> des isolats endophytes	32
4. Discussion générale	33
Conclusion	37
Références bibliographiques	39
Annexes	

Introduction

Introduction

Dans le monde entier, les plantes médicinales représentent une ressource fondamentale, servant de principal moyen de soins pour une grande partie des populations tant rurales qu'urbaines (Badiaga, 2011). L'Algérie est le plus grand pays riverain de la Méditerranée. Il est reconnu par sa diversité variétale en plantes médicinales et aromatiques, ainsi que leurs diverses utilisations populaires dans l'ensemble des terroirs du pays.

Les plantes aromatiques et médicinales sont très diversifiées et représentent la source la plus importante de métabolites secondaires (Tawaha *et al.*, 2007). Les plantes médicinales, à l'instar de nombreuses autres plantes, vivent en association étroite avec divers microorganismes endophytes qui influencent leur croissance et leur santé. Les endophytes sont des microorganismes qui colonisent les tissus internes des plantes supérieures sans provoquer de dommages apparents, et jouent un rôle clé dans la croissance et la protection des plantes grâce à la production de métabolites bioactifs (Strobel et Daisy, 2003).

Les bactéries endophytes sont des microorganismes qui colonisent lentement ou activement les tissus internes des plantes, aussi bien localement que de manière systémique. Elles jouent un rôle clé dans la promotion de la croissance des plantes en facilitant l'absorption des nutriments, en produisant des phytohormones, et en aidant les plantes à mieux résister aux stress biotiques et abiotiques. De plus, ces bactéries peuvent agir comme agents de biocontrôle en inhibant la croissance de pathogènes fongiques et bactériens, contribuant ainsi à la santé globale des cultures agricoles (Miliute *et al.*, 2015).

Dans le cadre de ce travail, nous avons porté notre choix sur deux plantes aromatiques et médicinales : le thym (*Thymus vulgaris*) et la menthe pouliot (*Mentha pulegium*), collectées dans la région de Laghouat, ces plantes entretiennent une relation étroite avec des endophytes, des micro-organismes bénéfiques qui colonisent leurs tissus et participent à leur protection. connue pour ses conditions climatiques particulières et ses ressources végétales médicinales. L'objectif principal de cette étude est d'isoler et d'identifier les bactéries endophytes associées à leurs racines, en vue d'évaluer leur potentiel antagoniste vis-à-vis des agents phytopathogènes. L'expérimentation est effectuée en enchainant trois principales parties :

- La première est dédiée à l'isolement des bactéries endophytes associées à la menthe pouliot et au thym.
- La deuxième est consacrée à l'identification préliminaire des isolats obtenus.
- La troisième porte sur l'évaluation de l'effet antagoniste des isolats face à certains champignons phytopathogènes.

Chapitre 1.

Synthèse bibliographique

Chapitre 1. Synthèse bibliographique

1. Les endophytes

1.1. Définition

Les endophytes sont des microorganismes généralement des bactéries et des champignons que l'on trouve dans les feuilles et ou les racines des plantes hôtes. Ces organismes endophytes passent la plus grande partie, voire la totalité, de leur vie à l'intérieur de leurs hôtes, sans provoquer des signes visibles de maladie (Vijay et Alan, 2014).

Les bactéries et champignons endophytes vivent dans les plantes d'une manière inter/ou intracellulaire en interagissant biochimiquement et génétiquement avec l'hôte. Cette définition élargie rapporte les fonctions principales de ces microorganismes, notamment, la promotion de la croissance et la défense par synthèse des phytohormones, d'enzymes ou des précurseurs de métabolites secondaires des végétaux, ainsi que pour fournir un nouveau répertoire de produits naturels bioactifs pouvant être utilisés dans les domaines de l'agrochimie, de l'industrie pharmaceutique et d'autres applications biotechnologiques (Vijay et Alan, 2014).

1.2. Les bactéries endophytes

Les bactéries endophytes sont des procaryotes associées aux plantes et vivant à l'intérieur des tissus, qui y hébergent sans nuire à leurs hôtes (Boisvert, 2014). Les bactéries endophytes peuvent coloniser les tissus internes de la plante hôte, y compris les parties aériennes et souterraines et les graines (Reinhold-hurek et hurek, 2011). Elles comprennent une gamme importante de bactéries à Gram-positif et à Gram-négatif appartenant aux sections des Protéobactéries, des Actinobactéries et des Firmicutes (Bacon et Hinton, 2006).

Des endophytes bactériens ont été trouvés dans toutes les espèces végétales, ainsi, une plante sans endophytes est rarement observée dans le milieu naturel (Partida-Martinez et Heil, 2011). En fait, une plante sans les bactéries bénéfiques associées serait moins apte à faire face aux agents phytopathogènes et plus sensible aux conditions de stress (Timmusk *et al.*, 2011).

Les bactéries endophytes peuvent être directement bénéfiques pour les plantes hôtes en améliorant l'absorption des nutriments et en modulant les phytohormones liées à la croissance et

aux stress. Indirectement, les bactéries endophytes peuvent améliorer la santé des plantes en ciblant les ravageurs et les agents pathogènes par la production d'antibiotiques, des enzymes hydrolytiques, une limitation des nutriments et en induisant les défenses des plantes. Certaines bactéries endophytes peuvent avoir une large gamme d'hôtes et peuvent être utilisées comme bio-inoculant pour développer un système agricole durable (Imran *et al.*, 2019).

1.3.Relation symbiotique entre l'endophyte et la plante hôte

L'interaction entre l'endophyte et la plante est caractérisée comme une relation symbiotique car les deux bénéficient de cette association (Santos *et al.*, 2014). La relation mutuelle profite aux endophytes en leur fournissant de l'énergie, des nutriments, un abri ainsi qu'une protection contre les stress environnementaux. Par ailleurs, les endophytes attribuent indirectement à la croissance des plantes en produisant des substances spécifiques principalement des métabolites secondaires et des enzymes, qui sont responsables de l'adaptation des plantes aux stress abiotiques tels que la toxicité des métaux lourds, la salinité, la sécheresse et les stress biotiques comme les attaques des insectes, des nématodes et des microorganismes pathogènes (Kogel *et al.*, 2006).

1.4.Métabolites des bactéries endophytes

Les bactéries endophytes produisent divers types de métabolites secondaires comme les antibiotiques, les acides organiques, l'ammoniac, les enzymes et les hormones de croissance. Ces métabolites ont un effet bénéfique direct ou indirect sur la plante. L'ammoniac répond à la demande en azote des plantes et les acides organiques à la solubilisation des nutriments insolubles. Dudeja et Giri (2014) ont signalé la production de métabolites par les endophytes dont ils ont trouvé que sur 109 bactéries endophytes, 33% produisaient des peptides, 33% produisaient l'enzyme pectinase et 51% produisaient l'enzyme cellulase.

1.5.Mécanisme de colonisation des endophytes

Le processus de colonisation implique une communication complexe entre les deux partenaires. Il débute généralement au niveau des racines et nécessite la reconnaissance de composés spécifiques dans les exsudats racinaires par les bactéries endophytes (Weert *et al.*, 2002 ; Rosenblueth et Martinez, 2006). Les plantes produisent ces exsudats racinaires pour interagir avec les bactéries bénéfiques pour leur propre avantage écologique (Campant *et al.*, 2005). La colonisation endophytique implique une série de facteurs environnementaux et génétiques permettant la pénétration de l'endosphère végétale (Campant *et al.*, 2010).

Les bactéries pénètrent par la zone de croissance latérales des racines ou d'autres ouvertures causées par des blessures ou des lésions mécaniques. Aux premiers stades, la plupart des endophytes sont d'abord observées dans les poils absorbants, puis dans le cortex racinaire. Cependant, les endophytes peuvent également coloniser les feuilles par les stomates, des blessures de l'épiderme ou être introduits par des vecteurs dans les espaces intercellulaires du mésophylle, la zone sous stomatiques et les tissus du xylème (Figure 1).

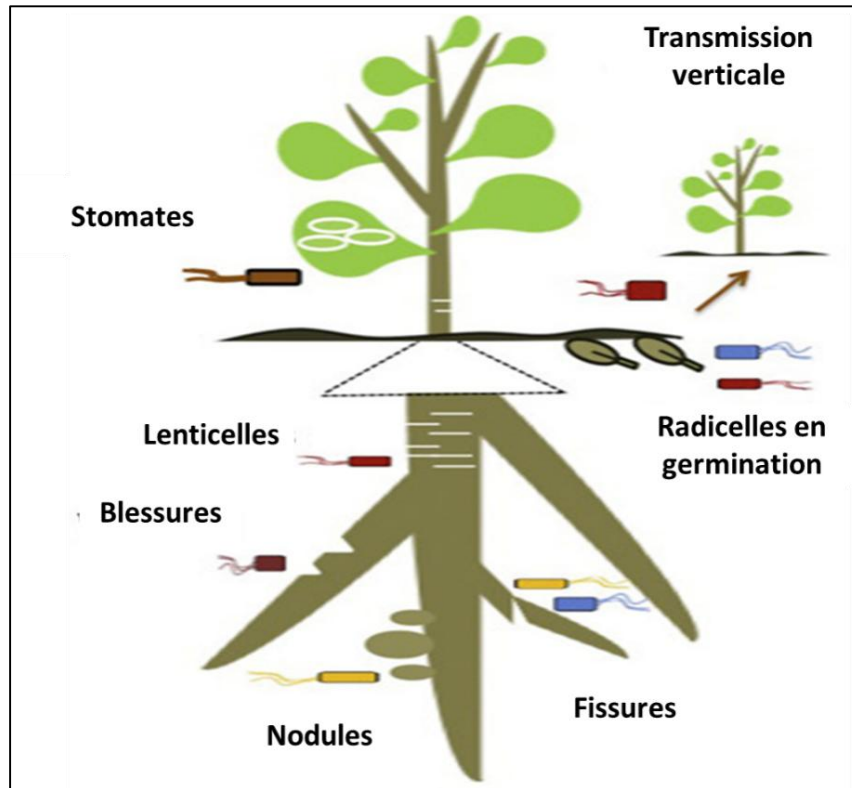


Figure 1. Les voies de pénétration des bactéries endophytes dans les différents organes de la Plante (Santoyo *et al.*, 2016).

Une fois à l'intérieur des racines, les bactéries endophytes peuvent coloniser systématiquement les tissus végétaux adjacents. Bien qu'elles pénètrent généralement dans les plantes à travers les racines, les parties aériennes des plantes, les tiges, les feuilles, les fleurs et les cotylédons peuvent également constituer des voies de pénétration (Lugtenberg, 2015).

1.6.Mode d'action des bactéries endophytes

1.6.1. Productions des phytohormones

Les phytohormones connues sous le nom d'auxines, de cytokinines et de gibbérellines favorisent les changements morphologiques des racines, influençant l'absorption des nutriments et de l'eau.

1.6.1.1.Modulation des niveaux d'acide indole-acétique (AIA)

L'AIA est une auxine végétale majeure impliquée dans de nombreux processus physiologiques, notamment la signalisation intercellulaire, la régulation du développement végétal et l'induction des systèmes de défense des plantes (Navarro *et al.*, 2006 ; Gravel *et al.*, 2007 ; Spaepen, 2007). L'AIA est également impliqué dans la formation de racines latérales et l'allongement des racines, la photosynthèse et la biosynthèse des métabolites et la médiation de la résistance dans des conditions de stress (Glick, 2012).

De ce fait, l'AIA produit par les bactéries endophytes peut soit stimuler le développement racinaires dans les cas où sa concentration dans la plante est inférieure à l'optimum, ou inhiber le développement des racines dans les cas où le niveau d'auxine est déjà optimal (Spaepen *et al.*, 2007). Une production élevée d'AIA est souvent associée aux agents phytopathogènes, et peut induire une surproduction d'éthylène, une hormone impliquée dans les réponses de stress chez les végétaux (Woodward et Bartel, 2005 ; Rashid *et al.*, 2012). L'AIA est une auxine végétale majeure impliquée dans de nombreux processus physiologique des systèmes de défense des plantes (Navarro *et al.*, 2006 ; Gravel *et al.*, 2007 ; Spaepen, 2007).

1.6.1.2.Production de cytokinines et gibbérellines

Plusieurs études ont montré que de nombreuses bactéries endophytes bénéfiques pour les plantes peuvent produire des cytokinines et des gibbérellines. Les cytokinines sont largement produites par les algues, les bactéries et les plantes supérieures. Les cytokinines contrôlent la différenciation cellulaire dans les tissus méristématiques des plantes. Stimulant la croissance, elles sont responsables de la division cellulaire, de la sénescence des plantes, de la germination des graines, du développement des fleurs et du fruits, et de la dormance apicale (De Rybel *et al.*, 2016)

Les gibbérellines interviennent dans de nombreux processus de développement chez les plantes tels que la régulation de la floraison, la germination des graines, l'élongation des tiges et feuilles, l'amélioration de la photosynthèse et l'augmentation de la teneur en chlorophylle (Khan *et al.*,

2015). Seulement quatre gibbérellines ont été identifiées chez des bactéries : GA1, GA3, GA4 et GA20. GA1 et GA4 étant les plus actifs que les autres gibbérellines (Choudhary *et al.*, 2017 ; Nelson *et al.*, 2017).

1.6.2. Fixation d'azote

L'azote est essentiel à la croissance et à la santé des plantes. Les bactéries endophytes symbiotiques du genre *Rhizobium* par exemple et non symbiotiques des genres *Azospirillum* et *Azobacter* transforment l'azote atmosphérique N₂ en une forme assimilable pour leurs plantes hôtes en utilisant leur nitrogénase (Montañez *et al.*, 2012). Les bactéries non symbiotiques fixatrices d'azote comme *Azoarcus* sp. BH72, *Azospirillum brasilense*, *Burkholderia* spp., *Gluconacetobacter diazotrophicus* et *Herbaspirillum seropedicae* ont augmenté la biomasse de la plante hôte par la fixation de N₂ dans des conditions contrôlées (Ak, 2014).

Les bactéries endophytes assimilent l'azote atmosphérique et le convertissent en ammoniac, il s'agit d'un élément essentiel au métabolisme des plantes et très important pour la synthèse des protéines, des enzymes, et de la structure chlorophyllienne des plantes. Les sols pauvres en azote entraînent généralement de faibles rendements agricoles (Jefing *et al.*, 1992).

1.6.3. Assimilation du phosphore

Même dans les sols riches en phosphore (tels que les sols fertilisés au phosphate), la majeure partie de cet élément se présente sous des formes insolubles, et seule une petite proportion (~0,1 %) est disponible pour les plantes (Podile et Kishore, 2006). La solubilisation des phosphates dans la rhizosphère est l'un des modes d'action les plus courants des microorganismes promoteurs de croissance qui améliorent la disponibilité des nutriments pour les plantes (Rodríguez *et al.*, 2006).

1.6.4. Mécanismes impliqués dans le biocontrôle des agents pathogènes

1.6.4.1. L'antibiose

L'antibiose est un processus par lequel les bactéries peuvent limiter la prolifération d'autres microorganismes en produisant des composés antimicrobiens. La plupart des endophytes produisent des métabolites secondaires, et certains d'entre eux présentent des propriétés antibactériennes et antifongiques qui contribuent à inhiber la croissance des microorganismes phytopathogènes (Hansen *et al.*, 2020). De nombreux métabolites aux propriétés antimicrobiennes synthétisés par les endophytes ont été décrits à ce jour, tels que les flavonoïdes, les peptides les

quinones, les alcaloïdes, les phénols, les stéroïdes, les terpénoïdes et les polycétides (Morales-Cedeño *et al.*, 2021).

1.6.4.2. La production d'enzymes

2.1. Les bactéries endophytes produisent de nombreuses enzymes qui facilitent successivement l'hydrolyse de la paroi cellulaire végétale. Il existe de nombreux types d'enzymes, telles que les chitinases, les cellulases, les hémicellulases et les 1,3-glucanases (Beneduzi *et al.*, 2012 ; Brígido *et al.*, 2019). Ces enzymes sont également capables de dégrader les parois cellulaires fongiques (et oomycètes), les hyphes, les spores et les sporanges, contribuant ainsi à la protection de la plante. Les bactéries des genres *Bacillus* et *Pseudomonas* produisent une variété de métabolites à activité antifongique, antibactérienne, antivirale et insecticide (Archana *et al.*, 2020).

1. Les plantes médicinales

Une plante médicinale est une plante dont au moins une partie possède des propriétés thérapeutiques, exploitées pour prévenir, soulager ou traiter diverses affections. Ces propriétés se trouvent dans différentes parties de la plante : les feuilles peuvent contenir des antioxydants, les fleurs des agents anti-inflammatoires, les tiges des substances analgésiques et les racines des composés antiviraux (Falleh *et al.*, 2022).

Les plantes médicinales commencent ces dernières années à occuper une importance place, à cause de l'intérêt multiple de ces substances naturelles dans les différents domaines d'industrie agroalimentaire et en pharmacie Leur action provient de leurs composées chimiques (métabolites primaires ou secondaires) ou de la synergie entre les différents composés présents (Naczka et Shahidi 2004).

1.1 Métabolites secondaires des plantes médicinales

Chez les plantes, les métabolites secondaires sont importants à la survie et à la propagation de l'espèce. Il joue chez celles-ci différents rôles, comme des phéromones ou des signaux chimiques permettant à la plante de s'adapter à l'environnement (Small *et* Catling, 2000).

2.1.1. Les métabolites primaires

Un métabolite primaire est un type de métabolite qui est directement impliqué dans la croissance, le développement et la reproduction normale d'un organisme ou d'une cellule. Ce composé a généralement une fonction physiologique chez l'organisme (Falleh *et al.*, 2021).

2.1.2. Les métabolites secondaires

Les plantes contiennent une grande variété de composés secondaires dont la fonction est loin de faire l'unanimité. Leur rôle est encore mal connu, mais il est clair qu'ils interviennent de manière interactive dans les relations entre la plante et son environnement. Parmi les métabolites secondaires produit par les plantes : les composés phénoliques, les saponines et les alcaloïdes, des composés azotés et les composés terpéniques (Small et Catling, 2000).

2.2. La menthe pouliot (*Mentha pulegium* L.)

La menthe pouliot (*Mantha pulegium* Linné, 1753) est une plante à usages médicaux et culinaires appelée localement en Algérie « *Fliou* ». Les Menthes désignent un genre de dicotylédones gamopétales, de l'ordre des *Lamiales* et de la famille des *Lamiacées* (Lemordant *et al.*, 1977 ; Belakhdar, 1978). La menthe pouliot est toxique à des fortes doses et peut provoquer l'avortement. Cette plante a aussi la particularité d'être insecticide puisqu'elle a été déjà utilisée pour faire éloigner les insectes (Lemordant *et al.*, 1977).

C'est au Moyen Âge que les vertus thérapeutiques de la menthe pouliot sont véritablement reconnues. Elle est alors utilisée pour ses propriétés calmantes, antiseptiques et même anesthésiques, notamment chez les personnes souffrantes afin d'atténuer la douleur. Par ailleurs, la menthe pouliot est un aromate réputé pour sa croissance rapide et sa capacité de prolifération (Addadi et Ferradji, 2014).

De point de vu botanique, la menthe pouliot une plante de 10 à 30 cm de hauteur, à inflorescence formée de nombreux verticillés denses, feuillés et distants (Figure 2). Sa saveur est fortement aromatique et son odeur est intense (Quézel et Santa, 1963). D'après Quézel et Santa (1963) et Guignard et Dupont (2004), elle est classée comme suit :

- **Règne :** *Plantae*
- **Embranchement :** Spermaphytes
- **Sous-embranchement :** Angiospermes
- **Class :** Dicotylédones
- **Sous class :** *Gamopetales*
- **Ordre :** *Lamiales*
- **Famille :** Labiacées
- **Genre :** *Mentha*
- **Especce :** *Mentha pulegium* L.



Figure 2. Plante de menthe pouliot (*Mantha pulegium* L.) (González-Tejero *et al.*, 2018).

2.3. Le thym (*Thymus vulgaris* L.)

Le thym (*Thymus vulgaris* L.) est une plante médicinale importante de la famille des Lamiacées. C'est un arbuste aromatique à tiges ramifiées, pouvant atteindre 40 cm de hauteur. Il pousse dans les régions montagneuses. Fréquemment utilisée en médecine traditionnelle, elle est prescrite pour traiter les infections buccales, gastriques, intestinales et respiratoires, la toux et la gastro-entérite, pour expulser les vers intestinaux et pour renforcer le cœur (Saleh *et al.*, 2015).

Des extraits de thym sont utilisés en médecine traditionnelle pour le traitement de plusieurs maladies respiratoires telles que l'asthme et la bronchite, ainsi que pour d'autres pathologies grâce à ses propriétés antiseptiques, antispasmodiques, antitussives, antimicrobiennes, antifongiques, antioxydantes et antivirales (Dauqan et Abdullah, 2017).

Le thym se distingue par ses petites feuilles vert foncé, aux bords recourbés, recouvertes de poils et de glandes appelées trichomes. Ces structures contiennent l'huile essentielle, principalement composée de monoterpènes. Les fleurs, de type zygomorphe, sont de petite taille et regroupées en glomérules ; leur couleur varie du blanc au violet, en passant par le rose (Figure 3). *T. vulgaris* se caractérise également par un polymorphisme floral marqué, qui a été aussi largement étudié que son polymorphisme chimique (Bruneton, 1999 ; Morales, 2002).

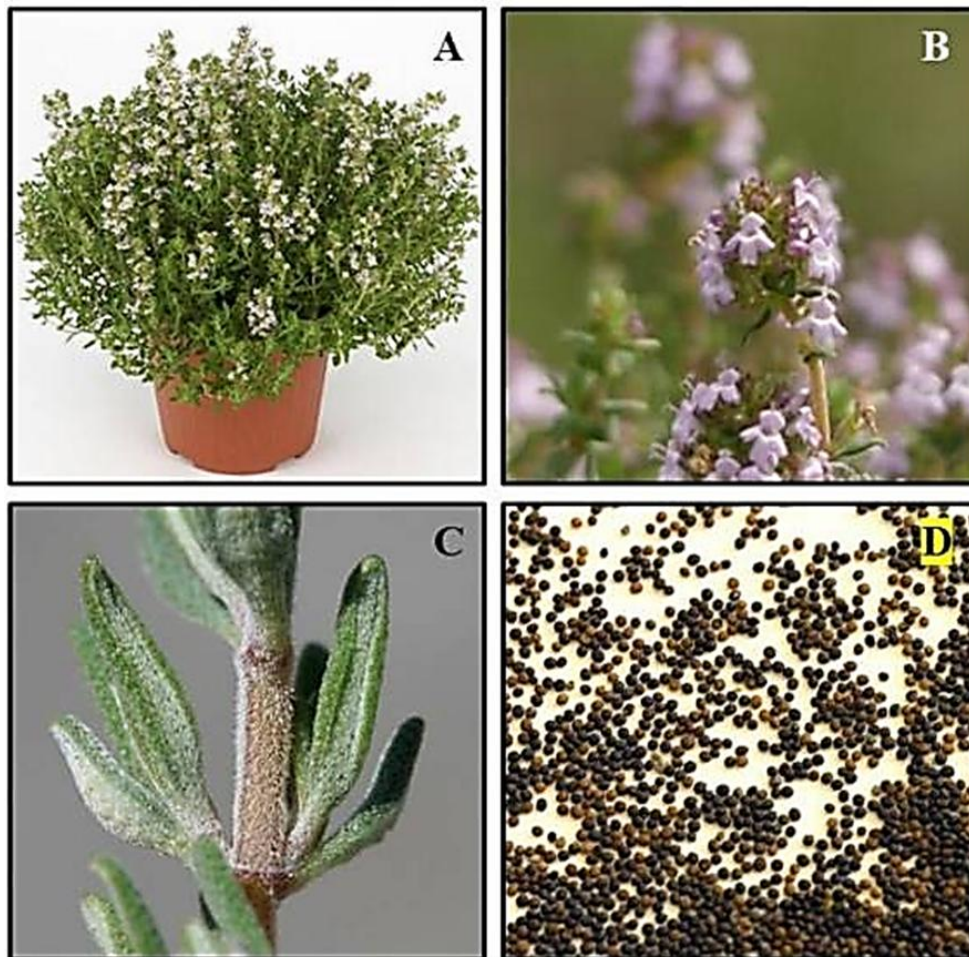


Figure 3. Le thym (*Thymus vulgaris*) (Patil *et al.*, 2021).

(A) Plante. (B) Fleurs. (C) Feuilles. (D) Graines

Selon Morales (2002), le thym est classé comme suit :

- **Règne :** *Plantae*
- **Sous-règne :** Trachéobiontes
- **Super division :** Spermatophytes
- **Division :** *Magnoliophytes*
- **Classe :** *Magnoliopsida*
- **Sous-classe :** *Asteridae*
- **Ordre :** *Lamiales*
- **Famille :** Lamiacées
- **Genre :** *Thymus*
- **Espèce :** *Thymus vulgaris* L.

Chapitre 2.

Matériel et méthodes

Chapitre 2. Matériel et méthodes

Le présent travail a pour objectif l'isolement, l'identification et l'évaluation du potentiel antagoniste des bactéries endophytes associées à deux plantes médicinales, le thym (*Thymus vulgaris*) et la menthe pouliot (*Mentha pulegium*), à l'égard de souches fongiques phytopathogènes présentant un intérêt économique majeur. L'ensemble des expérimentations a été mené au niveau des laboratoires de département des Sciences Agronomiques, faculté des Sciences, université Amar Telidji de Laghouat. Le travail a été réalisé sur une période de trois mois, s'étendant d'avril à juin 2025.

1. Souches de champignons phytopathogènes utilisées

Dans le but d'évaluer le potentiel antagoniste des isolats de rhizobactéries obtenus, ces derniers ont été confrontés à deux souches fongiques phytopathogènes : une souche de *Fusarium oxysporum* f. sp. *pisi* (Fop), agent de la fusariose vasculaire du pois, et une autre de *Fusarium culmorum*, responsable de la pourriture du collet, des racines et de la fusariose de l'épi chez le blé. Ces souches fongiques proviennent de la collection du laboratoire de mycologie du Département de Biotechnologie et d'Agro-écologie, à la Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie de l'Université Saad Dahleb - Blida 1.

2. Matériel végétal

2.1. Site d'échantillonnage

Dans le cadre de l'isolement des bactéries endophytes, deux plantes médicinales ont été sélectionnées : la menthe pouliot et le thym. Les échantillons de la menthe pouliot ont été prélevés sur un terrain non cultivé situé dans la région de Sidi Bouzid, relevant de la wilaya déléguée d'Aflou. Quant au thym, les prélèvements ont été effectués dans la région de Oued Morra, également située dans la même wilaya. Ces deux zones se trouvent sur les hauteurs de l'Atlas saharien, caractérisées par un climat semi-aride, marqué par une forte amplitude thermique entre le jour et la nuit, ainsi que par de faibles précipitations, principalement concentrées en hiver et au début du printemps.

2.2. Collecte des plantes

Dans le cadre de cette étude, deux plantes médicinales ont été choisies pour l'isolement des bactéries endophytes : le thym et la menthe pouliot. Ces plantes, appartenant à la famille des lamiacées, sont largement utilisées en phytothérapie en raison de leurs propriétés antimicrobiennes, antioxydantes et anti-inflammatoires. Les échantillons ont été prélevés à l'état frais, en sélectionnant des plants sains exempts de signes visibles de maladies. Après la récolte, les plantes ont été soigneusement conditionnées dans des sacs plastiques propres, puis maintenues à basse température afin de préserver leur intégrité biologique jusqu'à leur traitement en laboratoire.

L'isolement s'est principalement focalisé sur les racines, qui représentent un habitat privilégié pour les bactéries endophytes, potentiellement impliquées dans les mécanismes de défense de la plante contre les agents pathogènes.

3. Isolement des bactéries endophytes

3.1. Désinfection des échantillons

Juste avant l'isolement des bactéries endophytes, les racines ont été soigneusement nettoyées sous l'eau courante du robinet. La désinfection superficielle des échantillons a pour objectif d'éliminer les microorganismes qui adhèrent à la surface des tissus des racines tout en préservant la population microbienne endophyte. La désinfection des racines a été effectuée selon la méthode décrite par de Favaro *et al.* (2012).

Des segments des racines d'environ 1 cm ont été initialement désinfectés dans le méthanol à 70% pendant 1 min, puis dans une solution d'hypochlorite de sodium à 2% pendant 5 min. Ensuite, les segments ont été rincés successivement 5 fois avec de l'eau distillée stérile, puis séchés sur du papier filtre stérile.

Pour vérifier l'efficacité de la désinfection, nous avons étalé un volume de 0,1 ml du rinçage final sur le milieu de culture (LPGA) et l'incubée pendant une nuit à 30 °C. Les bactéries qui se développent seront qualifiées de « contaminants », et elles peuvent être utilisées comme référence. Si des souches identiques aux contaminants sont obtenues, elles seront systématiquement éliminées.

3.2. Préparation de la solution mère

Après la désinfection, les échantillons des racines ont été broyés à l'aide d'un pilon et d'un mortier avec 1ml d'eau distillée. Ensuite, 1 g du broyat a été placé dans le tube contenant 9ml

d'eau distillé stérile. La suspension mère ainsi préparée a été diluée en séries de cinq fois (de 10^{-2} à 10^{-6}) (Pettipher *et al.*, 2005).

3.3. Ensemencement et purification

Des aliquotes de 0,1 ml des quatre dernières suspensions, ont été déposés sur le milieu LPGA déjà coulé dans les boîtes de Pétri. Après l'ensemencement, les boîtes ont été maintenues à 30°C pendant une semaine.

Après l'incubation, les colonies bactériennes distinctes ont été sélectionnées en se basent sur leur morphologie (forme, couleur, aspect, bordure). Chaque colonie isolée a été repiquée successivement plusieurs fois sur un nouveau milieu de culture LPGA par stries d'épuisement afin d'obtenir des cultures pures. Ces ensemencements successifs ont permis la purification des isolats bactériens. Les boîtes sont par la suite mises dans l'incubateur à 30°C pendant 24 heures.

4. Identification des isolats obtenus

4.1. Description macroscopique

Pour chaque isolat endophyte, une analyse macroscopique des colonies a été effectuée pour étudier différentes caractéristiques morphologique telles que la couleur, la consistance, la forme et la tailles des colonies.

4.2. Etude microscopique

4.2.1. Coloration de Gram

La coloration de Gram est une technique qui permet de différencier les bactéries en deux groupes selon la structure de leur paroi cellulaire. Pour procéder à la cette coloration, nous avons suivi le protocole proposé par Coico (2005) :

- La coloration est réalisée sur un frottis séché a température ambiante et fixé à la flamme du bec Bunsen.
- Recouvrir la lame de violet de gentiane. Laisser agir pendant 1 minute et rincer a l'eau.
- Réaliser un mordantage au lugol pendant 1 minute et rincer a l'eau.
- L'étape d'alcool-résistance consiste à immerger la lame 3 à 4 fois dans un bain d'alcool pendant quelques secondes, puis à la rincer à l'eau.
- Recouvrir la lame de fuchsine pendant 1 minute et rincer a l'eau.

- Sécher délicatement à l'aide d'un papier filtre, puis observer au microscope à l'objectif $\times 100$ à immersion, en pleine lumière.

Les bactéries à Gram positif se colorent en violet, tandis que les bactéries à Gram négatif prennent une coloration rose après la coloration.

4.2.2. Coloration au vert de malachite

La méthode de coloration au vert de malachite, dite « méthode de Schaeffer-Fulton » (1933), permet de mettre en évidence la présence ou l'absence de spores bactériennes. La procédure a été effectuée selon les étapes suivantes :

- Prendre une lame propre et mettre une goutte d'eau distillée stérile.
- Réaliser d'un frottis à partir de la crème bactérienne.
- Fixer le frottis à la chaleur.
- Ajouter quelques gouttes d'une solution aqueuse de vert de malachite à 5%. Laisser agir pendant 3 à 5 minutes à la vapeur.
- Rincer à l'eau.
- Ajouter la safranine (ou fuchsine) pendant 30 secondes.
- Observer au microscopique à l'objectif $\times 100$ à immersion, en pleine lumière.

La présence de spores se manifeste par une coloration verte, tandis que les cellules végétatives apparaissent en rose.

4.3. Identification biochimique et métabolique

4.3.1. Test mannitol-mobilité

Le milieu Mannitol-Mobilité-Nitrate est un milieu de culture permettant de mettre en évidence l'utilisation de mannitol, la réduction de nitrate et la mobilité de la bactérie testée. Les tubes contenant le milieu ont été ensemencés par pique centrale, à l'aide du fil stérile d'une pipette de Pasteur chargé de crème bactérienne. Les tubes ont été par la suite incubés à 30°C pendant 24h.

Les résultats ont été analysés à partir des critères d'observation suivants :

- Production de gaz : formation de bulles.
- Absence de production de gaz : absence de bulles.

- Mannitol dégradé : couleur jaune due à la production d'acide due à la fermentation du mannitol.
- Mannitol non dégradé : couleur rouge due à l'absence de production d'acide.
- Bactérie mobile : trouble diffus dans la gélose molle
- Bactérie non mobile : absence de trouble dans la gélose.

4.3.2. Test de citrate

La gélose citrate de Simmons est un milieu de culture utilisé pour la différenciation des bactéries à Gram négatif sur la base de l'utilisation du citrate. Le milieu teste la capacité des organismes à utiliser le citrate comme la seule source de carbone. La pente du milieu a été ensemencée en stries à l'aide d'une anse de platine stérile chargée de la crème bactérienne de chaque isolat. Les tubes sont par la suite mis en incubation à 30°C pendant 24h.

Le changement de couleur de l'indicateur de pH, le bleu de bromothymol, contenu dans le milieu, se traduit par un passage du vert au bleu. La croissance bactérienne associée à ce virage coloré indique un résultat positif au test. En revanche, l'absence de croissance et de modification de couleur correspond à un résultat négatif.

4.3.3. Test de KOH

Le test KOH est utilisé pour confirmer le type de Gram des isolats bactériens. Une goutte de solution de KOH à 3 % est déposée sur une lame, puis une colonie bactérienne est prélevée à l'aide d'une pipette de Pasteur et mélangée à la goutte. Le mélange est laissé réagir pendant environ 5 secondes avant observation.

- Test KOH positif (+) : la suspension devient visqueuse et forme des filaments, ce qui indique une bactérie à Gram négatif.
- Test KOH négatif (-) : la suspension reste fluide et ne forme pas de filaments, ce qui correspond à une bactérie à Gram positif.

4.3.4. Recherche de l'oxydase

Le test de l'oxydase permet de détecter la présence de l'enzyme cytochrome oxydase chez les bactéries. Pour le réaliser, un disque imprégné du réactif oxydase est utilisé. À l'aide d'une pipette de Pasteur, une colonie bien isolée est prélevée puis appliquée directement sur le disque. Une

coloration bleue ou violette apparaissant rapidement indique un résultat positif, révélant la présence de l'enzyme. En l'absence de changement de couleur, le résultat est considéré comme négatif.

4.4. Mise en évidence de la production de fluorescence sur milieu King B

Pour mettre en évidence la production de fluorescence, nous avons utilisé le milieu King B conçu pour favoriser la production de pyoverdine. Pour cela, les isolats endophytes identifiés comme Gram négatifs sont prélevés à l'aide d'une anse stérile, puis ensemencés sur un milieu King B. Les boîtes de Pétri sont ensuite incubées à 30 °C pendant 24 à 48 heures.

Les colonies qui produisent la pyoverdine apparaissent fluorescentes, avec une coloration jaune-vert caractéristique. L'absence de fluorescence indique que la souche ne produit pas ce pigment.

5. Recherche de l'activité antagoniste *in vitro* des isolats endophytes

Les bactéries endophytes isolées ont été évaluées pour leur activité antagoniste *in vitro* contre des souches phytopathogènes de *Fusarium oxysporum* f.sp. *pisi* et *F. culmorum* en utilisant la méthode de confrontation directe. Cette dernière a été effectuée en utilisant deux milieux de culture différents à savoir LPGA et PDA. La méthode consiste à placer un disque mycélien de la souche phytopathogène au centre d'une boîte de Pétri contenant le milieu de culture. Ensuite, à l'aide d'une anse stérile, quatre isolats bactériens sont ensemencés de manière équidistante dans les quatre points cardinaux de la boîte, à environ 1,5 cm du centre du disque mycélien (Figure 4). Les boîtes sont par la suite incubées à 30°C pendant une semaine.

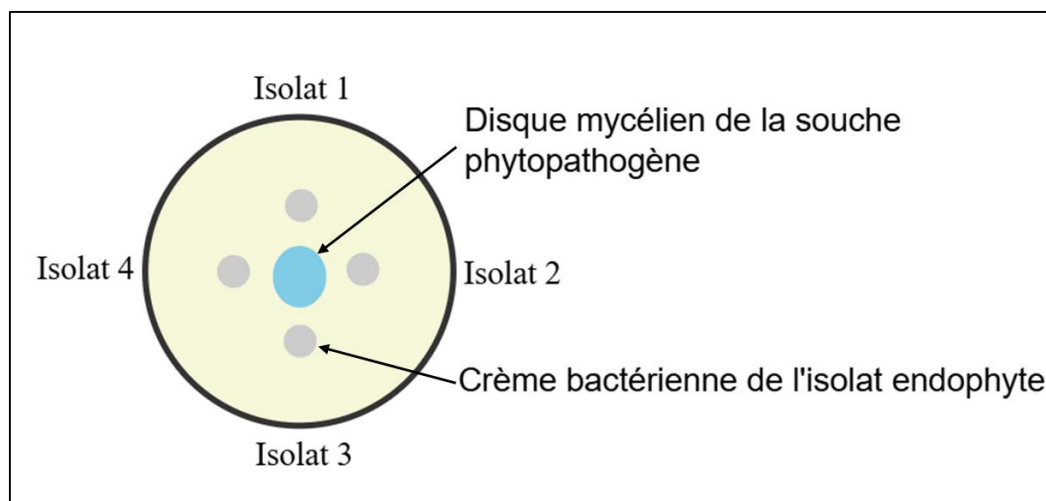


Figure 4. Schéma du test d'antagonisme *in vitro*.

Les témoins sont représentés par des boîtes de Pétri contenant uniquement les souches phytopathogènes, sans ajout d'isolats bactériens. Les interactions entre les isolats endophytes et les souches phytopathogènes, ainsi que les témoins, ont été réalisées en triplicata.

L'activité antagoniste des isolats bactériens vis-à-vis des souches phytopathogènes a été quantifiée en mesurant la zone de croissance mycélienne après une semaine d'incubation. L'inhibition de la croissance mycélienne a été déterminée à l'aide de la formule suivante (Idris *et al.*, 2007) :

$$I (\%) = \frac{R-r}{R} \times 100, \text{ dont :}$$

- **I (%)** : taux d'inhibition de la croissance mycélienne.
- **R** : rayon de la colonie fongique dans le témoin (sans bactérie).
- **r** : rayon de la colonie fongique en direction de la bactérie.

Cette méthode permet d'évaluer l'effet inhibiteur potentiel des bactéries en comparant la croissance du champignon en présence ou en absence d'interaction avec un antagoniste. Une inhibition élevée (supérieur ou égal à 20%) indique une interaction antagoniste marquée. La moyenne des trois répétitions a été utilisée pour chaque isolat testé.

Chapitre 3.

Résultats et discussion

Chapitre 3. Résultats et discussion

1. Identification des isolats endophytes obtenus

À l'issue de la phase d'isolement, quatorze isolats bactériens distincts ont été sélectionnés sur la base de leurs caractéristiques culturelles macroscopiques (forme, couleur, texture, etc.). Parmi eux, sept isolats ont été obtenus à partir de la menthe pouliot et désignés par les codes Me1 à Me7, tandis que les sept autres ont été isolés du thym, identifiés par les codes Th1 à Th7. Cette sélection visait à représenter la diversité morphologique observée au sein du microbiote endophyte associé à chaque plante.

Les différentes colonies sélectionnées ont été repiquées à plusieurs reprises sur des boîtes de Pétri contenant le même milieu d'isolement (LPGA), afin de permettre l'élimination de toute contamination. Ce processus de purification a été poursuivi jusqu'à l'obtention de cultures pures, constituées de colonies homogènes et morphologiquement identiques (Figure 5).

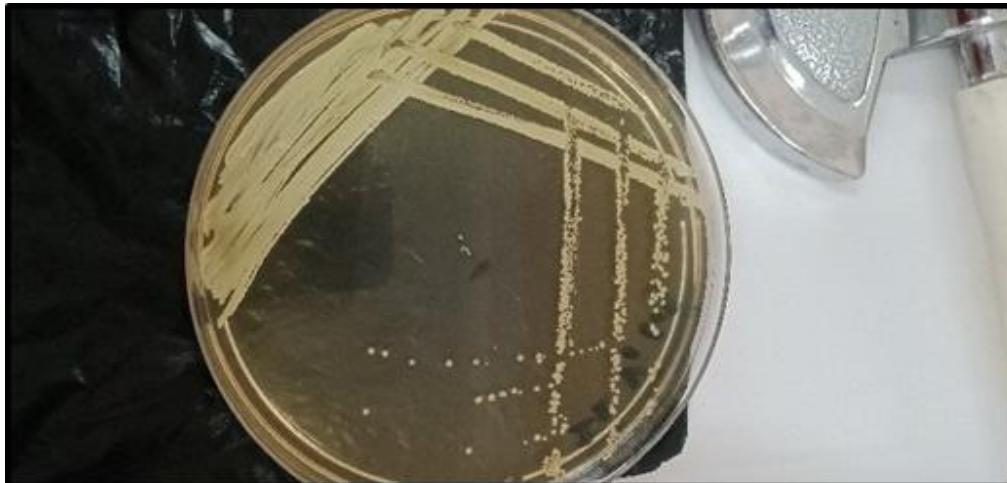


Figure 5. Culture pure de l'isolat endophytes Th6.

1.1. Description macroscopique

L'isolement a mis en évidence une diversité notable parmi les isolats bactériens, sur la base des critères macroscopiques de description des colonies. Les variations observées concernent notamment la couleur des colonies (crème, blanche, jaune ou orange), leur taille (petite à moyenne), leur aspect de surface (mat ou brillant), ainsi que leur relief (élevé, convexe ou bombé).

Bien que toutes les colonies présentent une forme circulaire, des variations ont été observées au niveau de la consistance : la majorité des isolats étaient crémeux, tandis qu'un seul isolat (Th6) se distinguait par une consistance sèche. Ces caractéristiques traduisent une hétérogénéité phénotypique parmi les isolats issus des plantes étudiées (Tableau 1 et 2).

Tableau 1. Description macroscopique des isolats endophytes associés à la menthe pouliot.

Isolat	Couleur	Taille	Aspect	Forme	Relief	consistance
Me 1	Crème	Petite	Brillante	Circulaire	Elevée	Crémeuse
Me 2	Blanche	Moyenne	Mat	Circulaire	Convexe	Crémeuse
Me 3	Blanche	Petite	Brillante	Circulaire	Elevée	Crémeuse
Me 4	Crème	Petite	Brillante	Circulaire	Elevée	crémeuse
Me 5	Blanche	Petite	Brillante	Circulaire	Elevée	Crémeuse
Me 6	Jaune	Moyenne	Brillante	Circulaire	Elevée	Crémeuse
Me 7	Blanche	Moyenne	Brillante	Circulaire	Elevée	Crémeuse

Tableau 2. Description macroscopique des isolats endophytes associés au thym.

Isolat	Couleur	Taille	Aspect	Forme	Relief	Consistance
Th 1	Crème	Petite	Brillante	Circulaire	Bombée	Crémeuse
Th 2	Crème	Petite	Brillante	Circulaire	Elevée	Crémeuse
Th 3	Blanche	Moyenne	Brillante	Circulaire	Elevée	Crémeuse
Th 4	Orange	Moyenne	Brillante	Circulaire	Elevée	Crémeuse
Th 5	Jaune	Moyenne	Brillante	Circulaire	Elevée	Crémeuse
Th 6	Blanche	Moyenne	Mat	Circulaire	Elevée	Sèche
Th 7	Blanche	Moyenne	Brillante	Circulaire	Bombée	Crémeuse

1.2. Etude microscopique

1.2.1. Coloration de Gram

L'observation des frottis fixés des isolats endophytes associés aux deux plantes, après coloration de Gram, a révélé la présence des deux types de coloration bactérienne (Figure 6). Chez la menthe pouliot, 3 isolats se sont révélés Gram positifs, tandis que 4 étaient Gram négatifs (Tableau 3). En ce qui concerne le thym, 4 isolats étaient Gram positifs et 3 Gram négatifs (Tableau 4). La diversité morphologique des cellules était également notable, avec des formes observées allant de cocci à bacilles, en incluant des cocobacilles (Tableau 3 et 4).

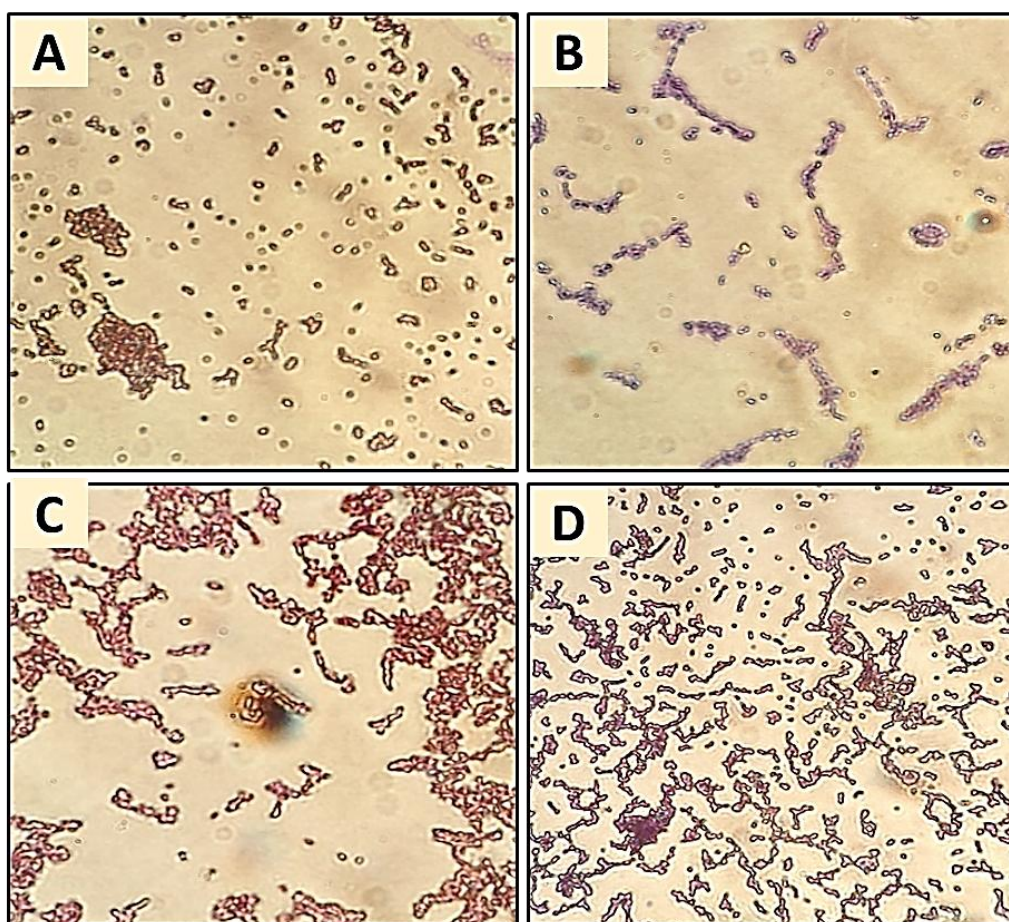


Figure 6. Observation microscopique des frottis des isolats endophytes après la coloration de Gram (G×1000).

(A) Me 7 (Gram -), (B) Me 6 (Gram+), (C) Th 4 (Gram-), (D) Th 7 (Gram+).

1.2.2. Coloration au vert de malachite

La coloration au vert de malachite a été utilisée afin d'évaluer la capacité des isolats endophytes issus des deux plantes médicinales choisies à produire des spores. Aucun des isolats testés n'a révélé la présence de spores, comme en témoigne l'absence de coloration verte spécifique (Tableau 3 et 4). En effet, seules les cellules végétatives ont été mises en évidence, apparaissant en rose sous observation microscopique, ce qui indique un résultat négatif au test de sporulation pour l'ensemble des isolats examinés (Figure 7).

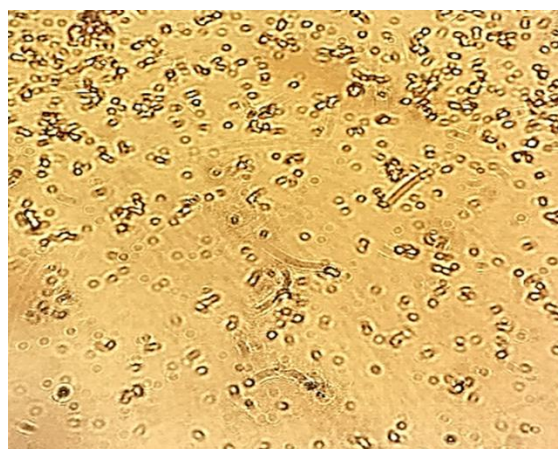


Figure 7. Absence de spores et présence exclusive de cellules végétatives après coloration au vert de malachite.

Tableau 3. Résultats des observations microscopiques après coloration des isolats endophytes associés à la menthe pouliot.

Isolat	Morphologie	Type de Gram	Sporulation
Me 1	Cocci	(-)	(-)
Me 2	Coccobacille	(+)	(-)
Me 3	Cocci	(-)	(-)
Me 4	Bacille	(-)	(-)
Me 5	Cocci	(+)	(-)
Me 6	Bacille	(+)	(-)
Me 7	Coccobacille	(+)	(-)

Tableau 4. Résultats des observations microscopiques après coloration des isolats endophytes associés au thym.

Isolat	Morphologie	Type de Gram	Sporulation
Th 1	Cocci	(-)	(-)
Th 2	Cocci	(+)	(-)
Th 3	Bacille	(-)	(-)
Th 4	Bacille	(+)	(-)
Th 5	Cocci	(+)	(-)
Th 6	Coccobacille	(-)	(-)
Th 7	Cocci	(+)	(-)

2. Identification biochimique et métabolique

2.1. Test mannitol-mobilité

Après 24 heures d'incubation des tubes de test mannitol-mobilité, et parmi les isolats endophytes associés à la menthe pouliot, trois ont provoqué un changement de couleur du milieu vers le jaune, indiquant leur aptitude à fermenter le mannitol. En revanche, les quatre autres isolats n'ont montré aucun changement, le milieu restant rouge, ce qui traduit une incapacité à utiliser cette source de carbone (Figure 8.A et B). Concernant la mobilité bactérienne, seuls les isolats M4 et M6 ont démontré une mobilité, mise en évidence par la formation d'un trouble diffus dans le milieu (Figure 8.C, Tableau 5).

Pour les isolats endophytes associés au thym, cinq d'entre eux sont capables d'utiliser le mannitol, tandis que deux isolats ne l'ont pas utilisé, le milieu restant inchangé. En ce qui concerne la mobilité, seuls les isolats Th4 et Th6 ont montré une capacité de déplacement, observée par la formation d'un trouble diffus autour de la piqûre centrale (Tableau 6).

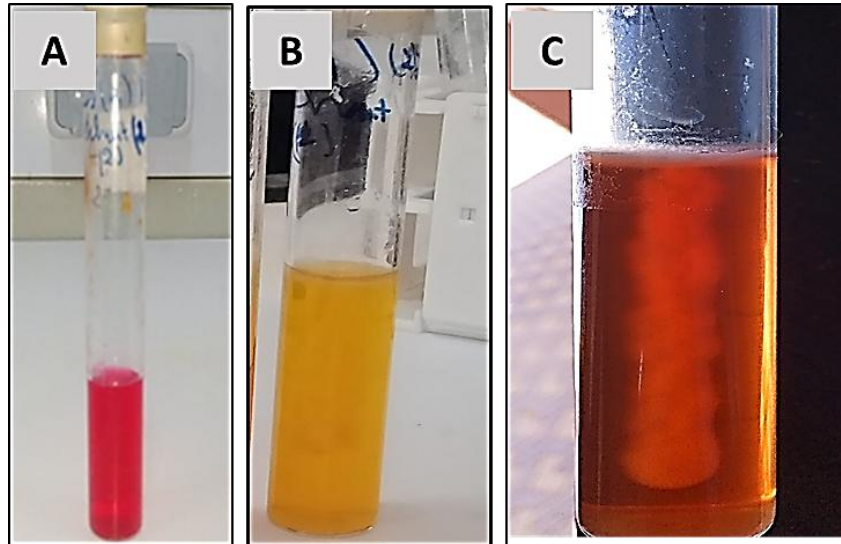


Figure 8. Lecture des résultats du test mannitol-mobilité.

(A) Th3 mannitol (-), (B) Me5 mannitol (+), (C) Th4 mobilité.

2.2. Test de citrate

Après incubation, parmi l'ensemble des isolats endophytes testés, seul l'isolat Th3, issu du thym, a montré une capacité à utiliser le citrate comme unique source de carbone, ce qui s'est traduit par un changement de couleur du milieu du vert au bleu. Les autres isolats se sont révélés négatifs au test du citrate, le milieu n'ayant subi aucune modification de couleur (Figure 9, Tableau 5 et 6).

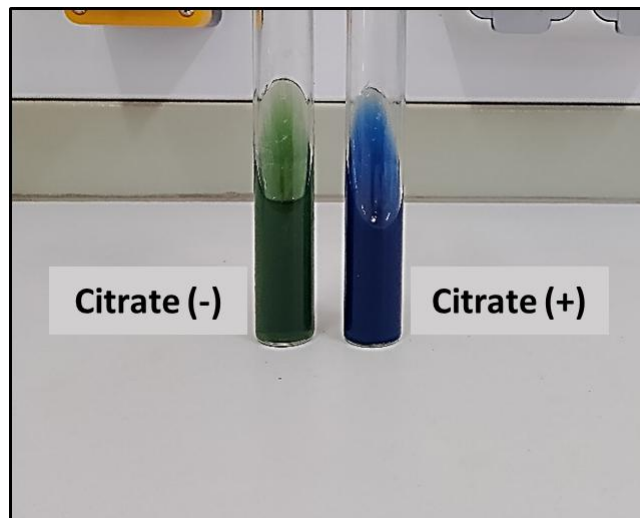


Figure 9. Lecture des résultats du test citrate.

2.3. Recherche de l'oxydase

Parmi les 7 isolats endophytes obtenus à partir de la menthe pouliot, 5 ont donné un résultat positif au test de l'oxydase. Cela signifie qu'ils possèdent l'enzyme cytochrome oxydase, capable d'oxyder le réactif présent sur le disque de test, entraînant ainsi l'apparition rapide d'une coloration bleu-violet caractéristique (Figure 10, Tableau 5). En ce qui concerne les isolats issus du thym, 4 ont également présenté une réaction positive, tandis que les 3 autres se sont révélés négatifs, indiquant l'absence de cette enzyme chez ces souches (Tableau 6). Ce test permet de différencier les bactéries en fonction de leur système respiratoire.

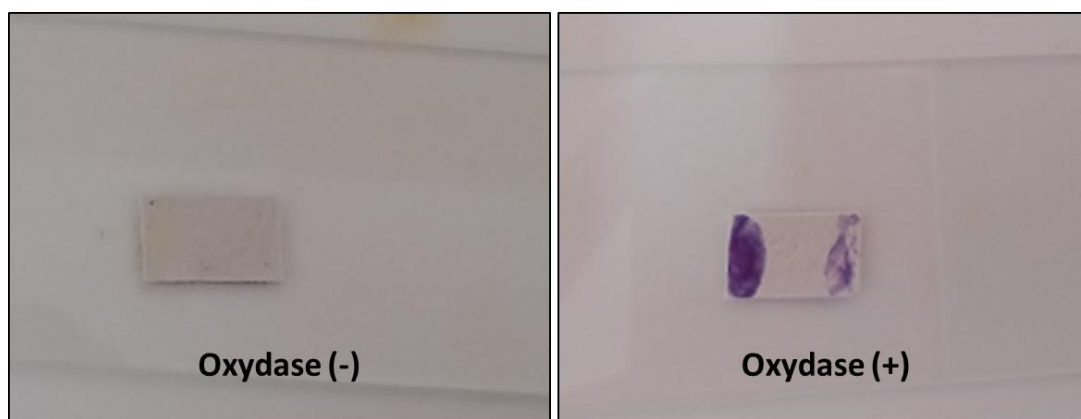


Figure 10. Lecture des résultats du test oxydase.

Tableau 5. Résultats des tests mannitol-mobilité, citrate et oxydase des isolats endophytes associés à la menthe pouliot.

Isolat	Mannitol	Mobilité	Citrate	Oxydase
Me 1	(-)	(-)	(-)	(+)
Me 2	(-)	(-)	(-)	(+)
Me 3	(-)	(-)	(-)	(+)
Me 4	(+)	(+)	(-)	(+)
Me 5	(+)	(-)	(-)	(+)
Me 6	(-)	(-)	(-)	(-)
Me 7	(+)	(+)	(-)	(-)

Tableau 6. Résultats des tests mannitol-mobilité, citrate et oxydase des isolats endophytes associés au thym.

Isolat	Mannitol	Mobilité	Citrate	Oxydase
Th 1	(-)	(-)	(-)	(+)
Th 2	(+)	(-)	(-)	(+)
Th 3	(-)	(-)	(+)	(-)
Th 4	(+)	(+)	(-)	(-)
Th 5	(+)	(-)	(-)	(+)
Th 6	(+)	(+)	(-)	(-)
Th 7	(+)	(-)	(-)	(-)

2.4. Test de KOH

Les résultats du test KOH ont permis de distinguer de manière rapide et fiable les deux types de bactéries en fonction de la structure de leur paroi cellulaire. Ces observations ont confirmé les résultats obtenus par la coloration de Gram : tous les isolats identifiés comme Gram négatifs ont produit un filament visqueux lors du contact de leur masse bactérienne avec le réactif, signe caractéristique de ce type de paroi (Figure 11, Tableau 7 et 8).



Figure 11. Résultat positif du Test KOH a formation d'un filament visqueux d'isolat Me3.

Tableau 7. Comparaison des résultats du test KOH avec les résultats de la coloration de Gram des isolats endophytes associés à la menthe pouliot.

Isolat	Type de Gram	KOH
Me 1	(-)	(-)
Me 2	(+)	(-)
Me 3	(-)	(+)
Me 4	(-)	(+)
Me 5	(+)	(-)
Me 6	(+)	(-)
Me 7	(+)	(-)

Tableau 8. Comparaison des résultats du test KOH avec les résultats de la coloration de Gram des isolats endophytes associés au thym.

Isolat	Type de Gram	KOH
Th 1	(-)	(+)
Th 2	(+)	(-)
Th 3	(-)	(+)
Th 4	(+)	(-)
Th 5	(+)	(-)
Th 6	(-)	(+)
Th 7	(+)	(-)

2.5. Mise en évidence de la production de fluorescence sur milieu King B

Après incubation, aucun des isolats endophytes testés n'a présenté de fluorescence sur le milieu King B. Cette absence peut s'expliquer par le fait que les isolats testés n'appartiennent probablement pas aux espèces de *Pseudomonas* capables de produire des pigments fluorescents tels que la pyoverdine. En effet, seules certaines espèces du genre, notamment *P. aeruginosa* et *P. fluorescens*, sont connues pour sécréter ce type de pigment.

Par ailleurs, il est important de noter qu'environ 10 % des souches de *P. aeruginosa* ne produisent pas de pyoverdine. Il est donc possible que les isolats étudiés soit d'autres genres

bactériens, soit des souches de *Pseudomonas* dépourvues de cette capacité métabolique. L'absence de fluorescence témoigne ainsi de l'incapacité de ces isolats à produire ce pigment spécifique.

3. Recherche de l'activité antagoniste *in vitro* des isolats endophytes

Dans le but d'évaluer l'efficacité antagoniste des bactéries endophytes issues des deux plantes médicinales, nos isolats ont été mis en interaction avec deux agents pathogènes fongiques, *Fusarium culmorum* et *F. oxysporum* f.sp. *pisi* (Fop). Des zones d'inhibition se sont manifestées lors de certaines interactions, attestant du pouvoir inhibiteur de certains isolats. Les isolats qui ont montré un effet inhibiteur de la croissance mycélienne du pathogène sont Me2 et Me3 issus de la menthe et Th2 issu du thym, en enregistrant des zones d'inhibition les plus importantes par rapport au témoin (Figure 12).

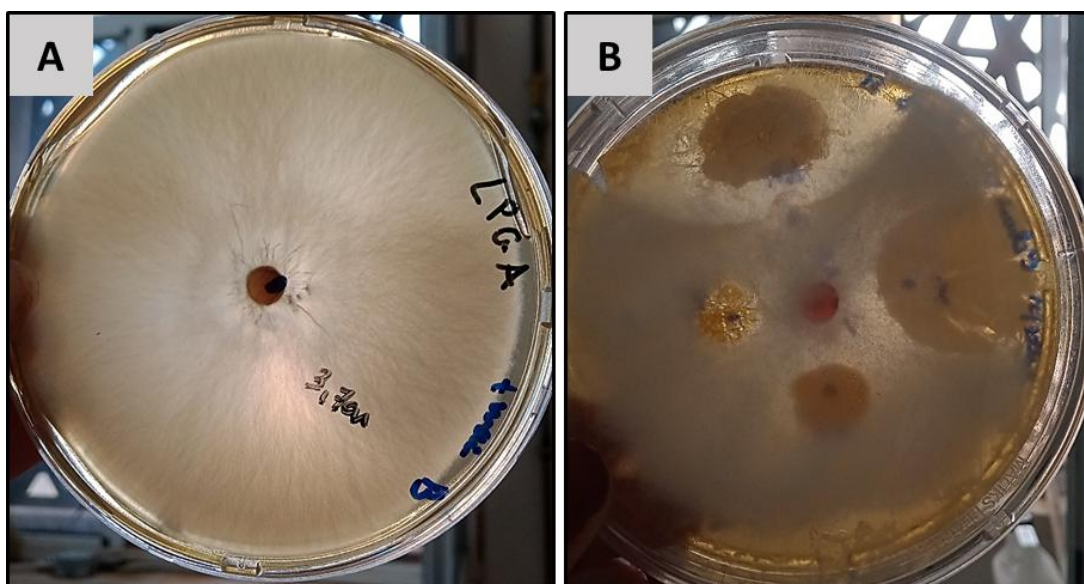


Figure 12. Résultat du test antagoniste *in vitro* des isolats endophytes.

(A) Témoin de Fop. (B) En interaction avec les isolats endophytes.

L'activité antagoniste des isolats bactériens endophyte contre les souches phytopathogènes a été évaluée en calculant le taux d'inhibition de la croissance fongique. Sur le milieu LPGA, les résultats les plus élevés ont été enregistrés pour l'isolat Me2, avec un taux d'inhibition de 81,08 % contre *Fusarium culmorum*, ainsi que pour Me3, avec 82,35 % contre Fop. L'isolat Me6 a présenté une inhibition de 64,70 % vis-à-vis de *F. culmorum*, tandis que Th2 a atteint 76,47 % contre le même pathogène. Ces données confirment le potentiel antifongique significatif de certains isolats testés.

4. Discussion générale

Ce travail avait pour objectif d'isoler les bactéries endophytes associées à la menthe pouliot et au thym, et mettre en évidence l'activité antagoniste des isolats obtenus vis-à-vis des souches phytopathogènes de *Fusarium culmorum* et *F. oxysporum* f.sp. *pisi*.

La première partie de cette étude consiste à isoler les bactéries endophytes qui colonisent les racines des deux plantes médicinales. Pour cela, un protocole rigoureux de désinfection de surface a été appliqué afin d'éliminer les microorganismes épiphytes présents à la surface des racines. Après l'isolement, nous avons sélectionné 7 isolats pour chaque plante. L'examen des isolats en état frais a mis en évidence une grande diversité morphologique. Les bactéries se manifestent sous plusieurs formes distinctes, notamment des coques, des bacilles et des coccobacilles, illustrant ainsi la variété des types bactériens endophytes présents dans les échantillons.

L'observation microscopique des frottis colorés au Gram a permis de distinguer la morphologie cellulaire et le type de Gram des isolats endophytes. Nos résultats révèlent une diversité morphologique et structurale parmi les isolats. Dans une étude d'Abdelshafy Mohamad *et al.* (2020), portant sur les populations bactériennes endophytes bénéfiques associées à la plante médicinale *Thymus vulgaris*, 117 souches de bactéries endophytes ont été isolées à partir des racines, des tiges et des feuilles de cette plante, collectée dans le nord du Sinaï, en Égypte. Ces isolats appartiennent à 17 genres et 30 espèces, avec une prédominance de bactéries Gram positives comme *Bacillus* (47%) et *Microbacterium* (20%), ainsi que des bactéries Gram négatives telles que *Enterobacter* (5,5%) et *Klebsiella* (4,6%).

L'identification des souches a été réalisée à l'aide de tests biochimiques, notamment la fermentation du mannitol, l'utilisation du citrate et l'évaluation de la mobilité bactérienne. Pour les isolats issus de la menthe pouliot, Me1, Me2, Me3 et Me6 ont montré des résultats négatifs aux tests de fermentation du mannitol et d'utilisation du citrate, ce qui indique qu'ils ne possèdent pas les enzymes nécessaires pour métaboliser ces composés comme source de carbone. En revanche, les isolats Me4, Me5 et Me7 se sont révélés positifs pour la fermentation du mannitol et ont également montré une mobilité active, bien qu'ils soient incapables d'utiliser le citrate. Concernant les isolats associés au thym, Th1 et Th3 n'ont pas fermenté le mannitol. Cependant, Th3 a donné un résultat positif au test du citrate, indiquant sa capacité à l'utiliser comme source unique de

carbone. Parmi les autres isolats, certains ont montré une fermentation positive du mannitol, tandis que Th4 et Th6 ont présenté une mobilité positive, tout en restant négatifs au test d'utilisation du citrate. Ces résultats témoignent de la diversité métabolique des isolats endophytes selon la plante hôte.

La recherche de l'activité oxydase parmi les bactéries isolées de la menthe pouliot (Me1, Me3, Me4) et du thym (Th1, Th3) a révélé que ces isolats, tous à Gram négatif et de forme bacille, présentent un résultat positif au test de l'oxydase. Ces observations sont cohérentes avec les travaux de Le Minor et Véron (1989), qui indiquent que ce test permet de détecter la capacité des bacilles Gram négatif à oxyder un substrat spécifique, entraînant une coloration violette rapide. Cette activité enzymatique constitue un critère de présomption important pour l'identification de diverses bactéries Gram négatif oxydase positives, telles que celles appartenant aux genres *Pseudomonas* ou *Neisseria*.

Parmi les isolats obtenus, cinq souches, deux issues de la menthe pouliot (Me3, Me4) et 3 du thym (Th1, Th2, Th3), ont donné un résultat positif au test KOH, mis en évidence par la formation d'un filament visqueux lors du contact entre la culture bactérienne et la solution d'hydroxyde de potassium, indiquant ainsi leur nature Gram négatif. Selon Kassogue *et al.* (2024), le test au KOH à 3% constitue une méthode rapide et alternative à la coloration de Gram pour identifier le type Gram des bactéries.

L'absence de fluorescence observée chez l'ensemble de nos isolats cultivés sur le milieu King B peut s'expliquer par le fait que ce milieu est spécifiquement conçu pour favoriser la production de pyoverdine, un pigment fluorescent jaune-vert caractéristique de certaines espèces du genre *Pseudomonas*, comme *Pseudomonas aeruginosa*. Si les isolats ne produisent pas de fluorescence, cela peut indiquer qu'ils n'appartiennent pas à ces espèces, ou qu'ils sont issus d'autres genres bactériens, y compris des bactéries endophytes Gram négatif, mais non productrices de pyoverdine. Ainsi, l'absence de fluorescence reflète une incapacité à synthétiser ce pigment spécifique (Schaad *et al.*, 2001).

Cette étude s'est intéressée aussi à l'évaluation du pouvoir antagoniste des isolats endophytes obtenus vis-à-vis des souches phytopathogènes fongiques. Les champignons ont été cultivés seuls sur deux milieux de culture, LPGA et PDA, afin d'évaluer leur croissance de référence. Par la suite,

leur développement a été observé en présence des isolats endophytes sélectionnés. Les isolats Me2, Me3, Me6 et Th2 ont montré un effet inhibiteur de la croissance mycélienne de Fop et de *F. culmorum*. Cela suggère que ces isolats peuvent produire des composés antimicrobiens efficaces. Ces résultats rejoignent ceux de **Bastas (2020)** qui, dans son étude sur la gestion d'*Erwinia amylovora* par des biopesticides potentiels *in vitro* et *in vivo*, a testé 20 matériaux végétaux pour leur efficacité antimicrobienne contre le feu bactérien, observant des zones d'inhibition pouvant atteindre 27 mm pour certains extraits, comme la cannelle et le thym, démontrant ainsi le fort potentiel de certaines substances végétales contre l'agent pathogène.

De même, une étude menée par Abdelshafy Mohamad *et al.*, (2020) a mis en évidence le rôle bénéfique des populations bactériennes endophytes associées à la plante médicinale *Thymus vulgaris*. Leurs travaux ont non seulement montré que ces endophytes pouvaient atténuer le stress salin, mais également qu'ils conféraient une résistance significative contre *Fusarium oxysporum*, confirmant ainsi que les plantes médicinales abritent des souches microbiennes bénéfiques ayant un potentiel considérable pour la lutte biologique. À l'inverse, certains isolats comme Me8, Th1 et Th7 n'ont pas montré d'effet inhibiteur, ce qui pourrait s'expliquer par un faible potentiel de production de molécules bioactives ou une incompatibilité physiologique avec le pathogène testé.

Plusieurs études récentes ont mis en évidence l'effet antagoniste des bactéries endophytes associées à des plantes médicinales telles que *Thymus vulgaris* contre le champignon phytopathogène *F. oxysporum*. Ces bactéries bénéfiques contribuent non seulement à atténuer le stress salin subi par la plante, mais elles renforcent également sa résistance face à ce pathogène. Par exemple, des isolats du genre *Bacillus*, largement reconnus pour leurs capacités antagonistes, produisent des métabolites antifongiques, des enzymes hydrolytiques et des sidérophores qui inhibent la croissance mycélienne de *F. oxysporum*. Des études *in vitro* et *in silico* ont montré que certains composés produits par ces endophytes, comme le β -amyrin et l'acide dihydroxy octadécénoïque, interagissent avec des enzymes clés du champignon telles que la chitin-synthase et la glucan-synthase, perturbant ainsi la synthèse de la paroi fongique et entraînant la déformation des hyphes. Ces mécanismes confèrent aux bactéries endophytes un rôle crucial dans la lutte biologique, offrant une alternative écologique et durable aux traitements chimiques pour la protection des cultures contre les fusariose (Abdelshafy Mohamad *et al.*, 2023).

Conclusion

Conclusion

Dans le cadre de ce mémoire, notre étude a été menée sur les bactéries endophytes associées à deux plantes médicinales, dans le but d'explorer leur potentiel en tant qu'agents de biocontrôle. La menthe pouliot (*Mentha pulegium*) et le thym (*Thymus vulgaris*) ont été choisis comme plantes hôtes pour l'isolement des bactéries endophytes. Au total, 14 isolats ont été sélectionnés en se basant sur leurs caractéristiques macroscopiques et culturales.

Notre travail a permis de démontrer que les racines de la menthe pouliot et du thym abritent des bactéries endophytes. Les isolats obtenus ont été identifiés à travers des observations microscopiques (coloration de Gram et au vert de malachite), complétées par une série de tests biochimiques visant à caractériser leurs propriétés enzymatiques et métaboliques.

Le pouvoir antagoniste des isolats endophytes issus des deux plantes médicinales a été évalué *in vitro* par confrontation directe avec les souches phytopathogènes *Fusarium oxysporum* f.sp *pisi* et *F. culmorum*. Les isolats Me2, Me3, Me6 et Th2 ont montré une activité inhibitrice marquée, suggérant qu'il s'agit de souches potentiellement actives, capables de produire des substances antifongiques ou d'autres composés impliqués dans l'inhibition des agents pathogènes. En revanche, les autres isolats n'ont présenté aucun effet inhibiteur contre les souches testées.

Bien que préliminaire, ce travail a permis de poser les fondations pour l'étude de l'effet antagoniste des bactéries endophytes associées aux plantes médicinales contre certains agents phytopathogènes. Ces bactéries peuvent jouer un rôle essentiel dans la bioprotection des plantes, notamment par la production de métabolites secondaires antimicrobiens capables d'inhiber efficacement les pathogènes, contribuant ainsi à la santé végétale. Pour la suite de cette étude, il serait pertinent de poursuivre l'identification approfondie des isolats, en mettant en évidence les métabolites secondaires impliqués dans leur activité antagoniste. Il serait également judicieux de tester ces souches contre d'autres agents phytopathogènes et d'évaluer leur efficacité dans des conditions *in vivo*, notamment en plein champ.

Références bibliographiques

Références Bibliographiques

- Bacon, C. W., & Hinton, D. M. (2006). Bacterial endophytes: The endophytic niche, its occupants, and its utility. In S. S. Gnanamanickam (Ed.), *Plant-associated bacteria* (pp. 155–194).
- Bloemberg, G. V., & Lugtenberg, B. J. J. (2001). Molecular basis of plant growth promotion and biocontrol by rhizobacteria. *Current Opinion in Plant Biology*, 4(4), 343-350.
- Boisvert, Katy. (2014). *Évaluation du déplacement de modèles d'endophytes dans le maïs et de leur effet sur la photosynthèse*.
- Brígido, C., Menéndez, E., Paço, A., Glick, B. R., Belo, A., Félix, M. R., et al. (2019). Mediterranean native leguminous plants: A reservoir of endophytic bacteria with potential to enhance chickpea growth under stress conditions. *Microorganisms*, 7 (11), 392
- Bruneton J. (1999). Pharmacognosie et phytochimie des plantes médicinales. 3^{ème} Ed Tec&Doc. Paris.
- Choudhary, D. K., Johri, B. N. (2017). Interactions of Bacillus spp. and plants – With special reference to induced systemic resistance (ISR). *Microbiological Research*, 184, 13-24.
- Compant, S., Clément, C., & Sessitsch, A. (2010). Plant growth-promoting bacteria in the rhizo- and endosphere of plants: Their role, colonization, mechanisms involved and prospects for utilization. *Soil Biology and Biochemistry*, 42(5), 669-678.
- Compant, S., Duffy, B., Nowak, J., Clément, C., & Barka, E. A. (2005). Use of plant growth-promoting bacteria for biocontrol of plant diseases: principles, mechanisms of action, and future prospects. *Applied and Environmental Microbiology*.
- Dauqan, E. M. A., & Abdullah, A. (2017). Medicinal and Functional Values of Thyme (*Thymus vulgaris* L.) Herb. *Journal of Applied Biology & Biotechnology*, 5(2), 17–22
- De Rybel, B., et al. (2016). Auxin cell biology in plant pattern formation. *Canadian Journal of Botany*, 94(5), 327-338

- Dudeja, S. S., & Giri, R. (2014). Beneficial properties, colonization, establishment and molecular diversity of endophytic bacteria in legumes and non legumes. *African Journal of Microbiology Research*, 8(15), 1557-1570.
- Falleh, H., Hafsi, C., Ben Jemia, M., Ksouri, R., & Abdelly, C. (2021). Évaluation de différents procédés d'extraction des composés phénoliques d'une plante médicinale : *Verbena officinalis*. *Biologie Aujourd'hui*, 215(3-4), 133-142
- Glick, B. R. (2012). Plant growth-promoting bacteria: mechanisms and applications. *Scientifica*, 2012, Article ID 963401, 15 pages
- González-Tejero R., Mesa J. M., Casares Porcel M. y Benítez Cruz G. (2018). *Mentha pulegium* L. Inventario Español de los Conocimientos Tradicionales relativos a la Biodiversidad : 198-202.
- Gravel, V., Antoun, H., & Tweddell, R. (2007). Plant growth-promoting bacteria as inoculants in agricultural soils. *Canadian Journal of Microbiology*, 53(5), 503-514.
- Hallmann, J., Quadt-Hallmann, A., Mahaffee, W. F., & Kloepper, J. W. (1997). Bacterial endophytes in agricultural crops. *Canadian Journal of Microbiology*, 43(10), 895–914.
- Idris H., Labuschagne N. and Korsten L. (2007). Screening rhizobacteria for biological control of Fusarium root and crown rot of sorghum in Ethiopia. *Biological Control* 40 (1): 97-106.
- Imran, A., Khan, A. L., Waqas, M., Shahzad, R., Tariq, A., Lee, I. J. (2019). Plant beneficial endophytic bacteria: Mechanisms, diversity, host specificity and their role in plant growth promotion. *Microbiological Research*, 221, 36-49.
- Kogel, K. H., Franken, P., & Hüchelhoven, R. (2006). Endophytes and plant disease control. In S. S. Gnanamanickam (Ed.), *Plant-associated bacteria* (pp. 97-122).
- Lemordant, D., Boukef, K., & Bensalem, M. (1977). Plantes utiles et toxiques de Tunisie. *Fitoterapia*, 48(5), 191–214.
- Montañez, A., Rodríguez Blanco, A., Barlocco, C., Beracochea, M., & Sicardi, M. (2012). Characterization of cultivable putative endophytic plant growth promoting bacteria

- associated with maize cultivars (*Zea mays* L.) and their inoculation effects in vitro. *Soil Science and Plant Nutrition*, 58(3), 345-354.
- Morales, R. (2002). The history, botany and taxonomy of the genus *Thymus*. In : *Thyme : the genus Thymus*. Ed. Taylor & Francis, London. pp. 1-43
- Morales-Cedeño, L. R., Orozco-Mosqueda, M. d. C., Loeza-Lara, P. D., Parra-Cota, F. I., de los Santos-Villalobos, S., & Santoyo, G. (2021). Plant growth-promoting bacterial endophytes as biocontrol agents of pre- and post-harvest diseases: Fundamentals, methods of application and future perspectives. *Microbiological Research*, 242, 126612
- Nair, D. N., & Padmavathy, S. (2014). Impact of endophytic microorganisms on plants, environment and humans. *The Scientific World Journal*, 2014, Article ID 250693.
- Patil SM, Ramu R, Shirahatti PS, Shivamallu C, Amachawadi RG. (2021). A systematic review on ethnopharmacology, phytochemistry and pharmacological aspects of *Thymus vulgaris* Linn. *Heliyon*, 18, 7 (5): e07054.
- Podile, A. R., & Kishore, G. K. (2006). Plant growth-promoting rhizobacteria. In S. S. Gnanamanickam (Ed.), *Plant-Associated Bacteria* (pp. 195–230).
- Quézel, P., & Santa, S. (1963). *Nouvelle Flore de l'Algérie et de ses régions désertiques méridionales. Tome II*. Paris : Éditions du Centre National de la Recherche Scientifique. 601 pages.
- Rashid, S., Charles, T. C., & Glick, B. R. (2012). Isolation and characterization of new plant growth-promoting bacterial endophytes. *Applied Soil Ecology*, 61, 217-224
- Rosenblueth, M., & Martínez-Romero, E. (2006). Bacterial endophytes and their interactions with hosts. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 19(8), 827-837.
- Saleh H, Azizollah JK, Ahmadreza H, Raham A. The Application of *Thymus vulgaris* in traditional and modern medicine: A Review. *Global Journal of Pharmacology*. 2015; 9 (3): 260-266.

- Santoyo G., Moreno-Hagelsieb G., Orozco-Mosqueda Mdel C. and Glick B. R. (2016). Plant growth-promoting bacterial endophytes. *Microbiol Res.*, 183: 92-9.
- Small, E., & Catling, P. M. (2000). *Les cultures médicinales canadiennes*. Ottawa (Ontario) : Presses scientifiques du Conseil national de recherches du Canada. 281 p.
- Spaepen, S., Vanderleyden, J., & Remans, R. (2007). Indole-3-acetic acid in microbial and microorganism-plant signaling. *FEMS Microbiology Reviews*, 31(4), 425–448.
- Vijay, C. V., & Alan, C. G. (2014). *Advances in Endophytic Research*. Institute of Medical Sciences, Banaras Hindu University. Springer. ISBN 978-8132215752.
- Woodward, A. W., & Bartel, B. (2005). Auxin: regulation, action, and interaction. *Annals of Botany*, 95(5), 707–735.

Annexes

Annexes

Composition des milieux de culture utilisés

LPGA (Levure Peptone Glucose Agar)

Peptone	7 g
Glucose	7 g
Extrait de levure	7 g
Agar	15 g
Eau distillée	1000 ml
pH	7

King B

Protéose peptone	20 g
Phosphate dibasique de potassium	1,145 g
Sulfate de magnésium heptahydraté	1,5 g
Glycérol	15 ml
Agar	15 g
Eau distillée	1000 ml
pH	7,2

PDA (*Potato Dextrose Agar*)

Pomme de terre	200 g
Glucose	15 g
Agar	20 g
Eau distillée	1000 ml
pH	5,6

Mannitol-Mobilité

Hydrolysats tryptique de caséine	10,0 g
Mannitol	7,5 g
Rouge de phénol	0,04 g
Nitrate de potassium	1,0 g
Agar	3,5 g
Eau distillée	1000 ml
pH	7,6

Citrate de Simmons

Citrate de sodium	1,0g
Bleu de bromothymol	0,08g
Chlorure de sodium	5,0g
Sulfate de magnésium	0,2g
Hydrogénophosphate de potassium	1,0g
Dihydrogénophosphate d'ammonium	1,0g
Agar-agar	15,0g
Eau distillée	1000 ml
pH	6,9