



REPUBLIQUE ALGERIENNE DEMOCRATIQUE ET POPULAIRE



MINISTERE DE L'ENSEIGNEMENT SUPERIEUR ET DE

LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE

UNIVERSITE ABBES LAGHROUR KHENCHELA

INSTITUT DES SCIENCES DE LA NATURE ET DE LA VIE

DEPARTEMENT : DE BIOLOGIE

Mémoire

Présenté pour l'obtention du diplôme de Master académique en biologie

Option : Microbiologie

TITRE

*Mise en évidence des souches de
Pseudomonas fluorescens à effet
antagoniste contre la fusariose de blé*

Présenté par :

-AFOUFOU HABIBA

- AGAGNA IMANE

Devant le Jury :

-Président	:Melle Laabani	F/Z .	Enseignante . Université Abbes Laghrou _ Khenchela
-Promotrice	: Mme Sebihi	F/ Z .	Enseignante. Université Abbes Laghrou _ Khenchela
-Examinatrice	: Melle Chorfi	K .	Enseignante . Université Abbes Laghrou_ Khenchela

Année Universitaire
2013 - 2014



Dédicace

A mon très cher père

Tes conseils m'ont suivi et m'ont permis d'atteindre le bout du chemin. Sois fier de moi aujourd'hui et vois à travers ce travail mon amour sincère et ma gratitude profonde.

A ma très chère mère

Ma douce et tendre mère. Quoique je fasse, je ne pourrais te rendre ce que tu as fait pour moi. Si je suis arrivée là, c'est bien grâce à toi. Que dieu te donne longue vie et te protège pour moi.

Je vous dédie ce travail avec tous mes vœux de bonheur, et de santé.

A mon très cher mari

Quand je t'ai connu, Ma vie à tes cotés est remplie de belles surprises. Tes sacrifices, ton soutien moral et matériel, ta gentillesse sans égal, ton profond attachement m'ont permis de réussir mes études.

A mes très chers frères

Djamel, Samir, Mourad, Toufik, et leurs épouses et leurs enfant Abdelmoumen et nabil, je vous souhaite un avenir plein de joie, de bonheur, de Réussite et de sérénité.

A tous les membres de la famille de mon marie grands et petits

A tous mes chères amies

Imane, Karima, Soumia, Biba, Dalila,

A mes oncles, tantes, cousins et cousines

A TOUTE MA FAMILLE

A TOUS MES CAMARADES DE PROMOTION

Ainsi qu'a tous ceux qui me sont chers

HABIBA

Remerciements

*Nous tenons tout d'abord à remercier Dieu le tout puissant et
miséricordieux, qui nous a donné la force et la patience d'accomplir ce
Modeste travail.*

*Ce mémoire n'aurait pas pu être réalisé sans la contribution de nombreuses
personnes que nous tenons à remercier par ces quelques lignes*

*La première personne que nous tenons à remercier est notre promoteur
MADAME SEBIHI F/Z, pour l'orientation, la confiance, la patience
qui a constitué un apport considérable sans lequel ce travail n'aurait pas
pu être mené au bon port. Qu'il trouve dans ce travail un hommage vivant
à sa haut personnalité*

*Nous remercions aussi très vivement, **Mlle LAABANI F/Z** vous nos
faites le grand honneur de présider ce modeste travail. Nous vous prions
de bien vouloir recevoir le témoignage de notre profond respect.*

*Un tout grand merci à **Mlle CHORFI K**; Nous vous remercions de nos
fares l'honneur de juger ce modeste travail, et Veuillez accepter nos
chaleureux remerciements pour votre participation à ce jury*

*Nous tenons à exprimer nos sincères remerciements à chef de laboratoire de
biologie Abbas Laghrour Khenchela Madame **CHORFI RAFIKA** et tout
l'équipe du laboratoire sans exception surtout **RAHIMA** et **FATIMA**
pour leurs aide et surtout leurs gentillesse*

*Merci à tous ceux qui, d'une manière ou d'une autre ont contribué à la
réalisation de ce travail, et que nous ne pouvons citer individuellement*

Liste des figures

-Figure N° 01 : <i>Pseudomonas</i> spp.....	05
-Figure N° 2 : Structure de <i>Pseudomonas fluorescens</i>	08
- Figure N° 03: Les grains de blé.....	10
- Figure N°04 : La fusariose de l'épi.....	11
- Figure N°5 : Les Types de fusariose.....	12
- Figure N°06 : La morphologie microscopique de <i>Fusarium</i> sp.....	14
- Figure N°07 : Interactions entre les <i>Pseudomonas</i> spp. fluorescents, les microorganismes pathogènes et les cellules racinaires.....	18

-Chapitre 02:Matériel et méthodes

- Figure N° 08 : Les étapes de dilution.....	20
- Figure N° 09 : Milieu King B incliné pour la conservation des souches bactériennes.....	21
- Figure N° 10 : Des souches de <i>Fusarium</i> pures.....	22
- Figure N° 11: La chambre noir à UV.....	23
- Figure N°12 : Le test catalase	24
- Figure N° 13: Milieu Mannitol mobilité.....	25
- Figure N° 14 : Ensemencement du Mannitol mobilité.....	26
- Figure N° 15 : Des tubes contenant l'eau physiologique stérile.....	26
- Figure N°16 : Le milieu moeller.....	27
- Figure N° 17 : Le milieu de culture à la gélatine.....	28
- Figure N° 18 : Ensemencement de milieu à la gélatine.....	28
- Figure N° 19 : Ensemencement de milieu en spots.....	29

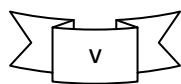
- Figure N° 20 : La galerie API 20 NE.....	31
- Figure N° 21 : Préparation de la double culture.....	32
- Figure N° 22 : Des béciers contenant le sol	32
- Figure N° 23 : La stérilisation des boites.....	33
- Figure N° 24 : Placement du sol dans les boites.....	33
- Figure N° 25 : La stérilisation des graines de blé.....	34
- Figure N° 26 : La germination des graines de blé.....	35
- Figure N° 27 : La plantation des graines de blé.....	35
- Figure N° 28 : L'inoculum de <i>Pseudomonas fluorescens</i> après l'incubation.....	36
- Figure N° 29 : Préparation du l'inoculum de <i>Fusarium</i>	37
- Figure N° 30 : Inoculation des boites par <i>Pseudomonas fluorescens</i>	38
- Figure N° 31 : Inoculation des boites par le champignon <i>Fusarium</i>	38
- Figure N° 32 : Le test de croissance de mycélium fongique.....	39
- Figure N° 33 : Préparation d'un frottis fongique pour l'identification	40

-Chapitre 03:Résultats et discussion

- Figure N° 34 : Photos d'isolement des bactéries à partir du sol.....	42
- Figure N° 35 : Photo des souches sou UV	43
- Figure N° 36 : Photo de repiquage des souches.....	43
- Figure N° 37 : Photo du Gram.....	44
- Figure N°38 : Photo du test d'oxydase.....	44
- Figure N°39 : Photo du Test de la catalase.....	45
- Figure N°40 : Résultat du test arginine déshydrogénase.....	45

- Figure N°41 : Test positif de la lipase.....	46
- Figure N°42 : Résultat positif du test gélatinase.	47
- Figure N°43 : Résultat de mannitol mobilité.....	47
Figure N° 44: Photo de Culture à température 04 C.....	48
- Figure N° 45 : Photo de test négatif à température 41 C°.....	48
- Figure N° 46: Résultat négatif de l'activité antifongique de nos souches contre <i>Fusarium</i>	52
- Figure N° 47 : Photos du résultat positif de l'activité antifongique.....	52
- Figure N° 48 : Plantes témoins	53
- Figure N°49: Plantes inoculées par les souches bactériennes.....	54
- Figure N° 50 : Les Plantes témoins après 07semaines...;;.....	55
- Figure N°51 : Photos des plantes inoculées par les isolats après 07 semaines.....	55
- FigureN°52 : Effet de <i>Fusarium</i> sur les plantes témoins.....	56
- Figure N°53 : Effet de <i>Fusarium</i> sur les plantes inoculées par <i>Pseudomonas fluorescens</i>	56
Figure N°54 : La croissance du mycélium fongique après aux premier jour.....	57
- Figure N°55 : La croissance du mycélium fongique après 02 jours.....	57
- Figure N°56 : La croissance du mycélium fongique après 3jour.....	58
- Figure N°57 : La croissance du mycélium fongique après 04jours.....	58
- Figure N° 58 : La croissance du mycélium fongique après 05 jours	58
- FigureN° 59: La croissance du 07 souches fongiques après 05 jours.....	59
- Figure N°60: Résultats de l'observation microscopique des frottis mycéliennes...	60

-



Liste des tableaux

-Tableau N°01 : Caractères d'identification des principales espèces de <i>Pseudomonas</i>	07
-Tableau N° 02 : Tableau de lecture de la galerie API 20 NE.....	30
-Tableau N° 03 : Résultats de la coloration de Gram des isolats purifiés.....	43
-Tableau N° 04 : Résultats des tests biochimiques réalisés.....	48
-Tableau N°05: Résultats d'identification Par Les Galeries Api 20 NE.....	50
-Tableau N°06: Résultats de moyenne de la longueur des plantes de blé pendant 44 jours...	52
-Tableau N°07 : Résultats de la longueur des plantes inoculés par <i>Pseudomonas fluorescens</i> après 07 semaines.	54
-Tableau N°08: Résultats des moyenne de mycélieme fongique pendant 05 Jours.....	56

Liste des abréviations

- ADH : Arginine dihydrolase
- ADN : Acide désoxyribonucléique
- ARN : Acide ribonucléique
- ARNr : Acide ribonucléique ribosomique
- API 20 NE : Appareillage et Procédés d'Identification des Non Entérobactéries
- ATP : Adénosine triphosphate
- E.P.S : Exo-polysaccharide
- *F. avenaceum* : *Fusarium avenaceum*
- Fe³⁺ : Le fer ferrique
- FE(OH)₃ : Hydroxyde de fer
- Gram - : Gram négatif
- Gram + : Gram positif
- H₂O₂ : Peroxyde d'hydrogène (L'eau oxygénée)
- HR : Réaction hypersensible
- ISR : Résistance systémique induite
- NaCl : Chlorure de sodium
- NO₃⁻ : Nitrate
- PDA : Potato-dextrose-agar
- PGPR : Plant Growth Promoting Rhizobactéria
- *P. fluorescens* : *Pseudomonas fluorescens*
- *P. syringae* : *Pseudomonas. Syringae*
- SAR : Résistance systémique acquise
- U V : Ultra-violette

Sommaire

-Liste des tableaux.....	1
-Liste des figures.....	ii
1-Liste des abréviations.....	
-Introduction	01

Chapitre 01: Synthèse bibliographique

I -Partenaire bactérien.....	04
I-1-Le genre <i>Pseudomonas</i>	04
I-1-1-Caractéristiques morphologiques et métaboliques	05
I-1-2- Les caractères physiologiques.....	06
I-1-3- La classification	06
I-1-4-L'identification des différents espèces de <i>Pseudomonas</i>	06
I-2- <i>Pseudomonas fluorescens</i>	07
I-2-1-Une diversité taxonomique importante	08
II –Partenaire végétal : Le BLé	09
III-La maladie : (élb ed esoirasuf aL).....	10
III-1-Les types de fusariose.....	11
IV- L' agent causal de la fusariose : (Le <i>Fusarium</i>)	12
IV-1-La morphologie microscopique.....	13
IV-2-La Taxonomie.....	13
IV-3- La production des mycotoxines.....	13
IV-4-Caractères cultureux généraux.....	14

V-Moyens de lutte contre le <i>Fusarium</i>	14
V-1-L'utilisation des fongicides	14
V-2- Les pratiques culturales.....	15
V- 3- Les PGPRs en tant qu'agents de lutte biologique.....	15
V- 1-Mode d'action des PGPR.....	15
V- 2-1-Intéraction PGPR/Phathogène	16
-La compétition	16
* La compétition pour l'espace et les nutriments.....	16
*La compétition pour le fer et production des sidérophore.....	16
-Antibiose et parasitisme	16
V- 2-2-Intéraction PGPR/ Plante.....	17
-La stimulation de la croissance des plantes.....	17
-Renforcement de la capacité défensive du plante	17
-Diminution de l'agressivité du pathogène	18

Chapitre 02 : Matériel et méthodes

I -1-Matériel biologique.....	20
Souches de <i>Pseudomonas fluorescens</i>	20
I -1-1- L'échantillonnage	20
I -1-2 -Isolement de <i>Pseudomonas fluorescens</i>	20
Préparation de la solution mère.....	20
-Préparation des dilutions.....	20
I -1-3- Ensemencement de milieu de culture.....	21.
I-1-4-Purification des souches.....	21

I-1-5- Conservation des souches.....	21
-Le champignon : <i>Fusarium</i>	22
1-2-Matériel végétale	22
II- Identification phénotypique des souches de <i>Pseudomonas</i> isolées.....	22
II-1-Etude morphologique.....	22
II-1-1- Aspect macroscopique.....	22
-La Production de pigment fluorescent.....	23
II -1-2- Aspect microscopique	23
-La coloration de Gram.....	23
II-2- Les Tests biochimiques.....	24
II-2-1- Recherche de la catalase.....	24
II -2-2- Le test de l'oxydase.....	24.
II-2-3- Test Mannitol Mobilité	25
II -2-4-Test de la température de 4°C et 41°C:.....	26
II -2-5-Test de l'arginine déshydrogénase	26
II -2-6-Test de gélatinase (Collagénase).....	27
II -2-6-Test de lipase.....	28
II-3- Identification des souches par la galerie Api 20 NE.....	29
III -Test d'antagonisme	31
III -1-Test d'antagonisme in vitro.....	31
III -1-1-Test de double culture.....	31
III -2-Test d'antagonisme <i>in planta</i>	32
III -2-1- Stérilisation du sol et boites.....	33

III -2-2- Stérilisation et germination des graines de blé.....	33
III -2-3- Plantation des grains.....	35
III -2-4 -Préparation les inoculum de <i>Pseudomonas</i> et <i>Fusarium</i> :.....	37
IV -Mesure le diamètre de croissance du mycélium fongique.....	38
V -Identification des souches de <i>Fusarium</i>	39

Chapitre 03:Résultat et discussion

1- Résultats	42
I- Isolement des souches.....	42
-Aspect morphologique.....	43
II Caractérisation des isolats:.....	43
- L'étude microscopique.....	43
-Les tests biochimiques.	44
- Recherche de la catalase.....	45
- Test Arginine déshydrogénase.....	45
-Test de lipase.....	45
-Recherche de la gélatinase.....	46
-Croissance à la température de 4°C et 41°C.....	48
III-Identification par la galerie API 20 NE.....	50
IV - Test d'antagonisme.....	51
IV -1 -Test d'antagonisme <i>in vitro</i> (Test de double culture)	51
IV -2- Test d'antagonisme <i>in planta</i>	54
-Mesure le diamètre de croissance.....	56
V -Identification des souches de <i>Fusarium</i>	58

-Conclusion	62
-Abstract.....	63
-ملخص.....	64
-Références bibliographiques.....	66
Annexe.....	77

Au niveau de la rhizosphère qui est une zone riche en matière organique et où les populations microbiennes sont très abondantes. Les interactions entre les microorganismes sont nombreuses et très intenses, ces interactions sont catalysées par les exsudats racinaires qui favorisent certains groupes de microorganismes au dépend d'autres au sein de la communauté microbienne (Curl et Truelove, 1986).

Les *Pseudomonas* ont une capacité élevée à coloniser la rhizosphère ainsi que les racines des plantes et sont capables de former des associations intimes avec leurs hôtes. (Höfte et de Vos, 2006) comme par exemple le blé (Weller et Cook 1983) . Elles sont très largement représentées parmi les bactéries à effet **PGPR** (Plant Growth Promoting Rhizobactéria) qui promouvaient la croissance des plantes. Ces bactéries sont aussi largement retrouvées parmi les agents potentiels de lutte biologique qui ont pour effet d'améliorer la santé des plantes et sont notamment connues pour leur effet antagoniste avec les phytopathogènes (Bloemberg et Lugtenberg, 2001).

Le blé joue un rôle essentiel dans l'alimentation directe et également indirecte d'une très large fraction de l'humanité. C'est actuellement la céréale la plus cultivées dans le monde, avec une production annuelle dépassant 350 millions de tonnes. Mais, cette plante peut être attaquée par de nombreuses maladies et moisissures toxiques à différents stades de son développement. Parmi les moisissures toxigènes qui contaminent de nombreuses plantes au champ, les plus préjudiciables appartiennent au genre *Fusarium sp.*

Les *Fusariums* sont des champignons filamenteux imparfaits appartenant à la classe des Deutéromycètes. Ce genre comprend 50 à 70 espèces, dont plusieurs sont phytopathogènes, provoquant sur les plantes cultivées des maladies regroupées sous le terme de fusariose.

Durant les dernières décennies du siècle dernier, des recherches considérables ont démontré que plusieurs microorganismes de diverses origines phylogénétiques sont capables d'inhiber différents agents pathogènes et maladies. Les microorganismes à l'origine de cette inhibition utilisent plus qu'un mécanisme pour la suppression des pathogènes et la réduction de l'incidence des maladies à savoir: compétition, antibiose ou parasitisme. Ils agissent en partie, par la sécrétion de substances antimicrobiennes ayant soit une activité antibactérienne soit une activité antifongique.

Introduction

L'objectif de notre travail est la mise en évidence de l'activité antagoniste des souches de *Pseudomonas fluorescens* isolées de la rhizosphère de blé, contre le champignon phytopathogène le *Fusarium*. Ainsi, l'identification l'espèce de *Fusarium* responsable de la fusariose de blé.

La stratégie d'étude de ce travail consiste à isoler, identifier et caractériser, à partir de la rhizosphère, une population bactérienne spécifique *Pseudomonas fluorescens* ; en évaluant leurs contributions dans la croissance et la santé de blé et tester *in vitro* et *in vivo* leur capacité antagoniste contre Le *Fusarium*.

I –Partenaire bactérien

I-1-Le genre *Pseudomonas*

Dans le sol, les *Pseudomonas* représentent une grande fraction de la communauté microbienne partageant le milieu avec des commensaux représentés principalement par les genres *Bacillus* et *Actinomyces* (Haas et Keel., 2003). Le genre *Pseudomonas* est découvert en 1894 par Migula, il appartient au phylum des Protéobacteria, classe des Gammaproteobacteria, famille des *Pseudomonaceae*, ordre des *Pseudomonales* (Moore *et al.*, 2006). Ce genre contient des bâtonnets droits ou faiblement incurvés (Prescott *et al.*, 2003).

Les *Pseudomonas* ont une capacité élevée à coloniser la rhizosphère ainsi que les racines des plantes, et sont capables de former des associations intimes avec leurs hôtes. Ces associations peuvent mener à une maladie chez les plantes hôtes sensibles, comme par exemple de nombreux pathovars de *Pseudomonas syringae* qui mettent en place des interactions pathogènes avec les plantes (Höfte et de Vos, 2006). *P. syringae*, comme beaucoup d'autres *Pseudomonas* phytopathogènes, est capable d'induire chez les plantes résistantes non hôtes, une réaction hypersensible (HR) à l'origine de la SAR (Systemic Acquired Resistance) (Alfano et Collmer, 1997).

Les bactéries du genre *Pseudomonas* occupent la plupart des environnements naturels. Elles sont isolées de l'eau, du sol, des poussières en suspension dans l'air et des végétaux. Elles présentent un fort potentiel d'adaptation physiologique et génétique et sont capables d'utiliser une grande variété de nutriments (Ramos, 2004). D'un point de vue écologique, les *Pseudomonas* regroupent des espèces bénéfiques pour l'environnement et des espèces pathogènes (Ramos, 2004).

Ces bactéries sont aussi largement retrouvées parmi les agents potentiels de lutte biologique qui ont pour effet d'améliorer la santé des plantes et sont notamment connues pour leur effet antagoniste avec les phytopathogènes (Dubuis *et al.*, 2007). La grande diversité des mécanismes d'action de ces *Pseudomonas* est principalement liée à leur grande capacité à produire une large gamme de métabolites secondaires et à induire l'ISR (Induced Systemic Resistance) chez les plantes (Bloemberg et Lugtenberg, 2001 ; van Loon, 2007 ; Weller *et al.*, 2002 et 2007 ; Whipps, 2001).

I -1-1-Caractéristiques morphologiques et métaboliques

Les *Pseudomonas* sont des bacilles Gram négatifs fins droits et très mobiles grâce à un flagelle polaire : ciliature monotriche, dépourvus de spores et de capsules (Gerard. Tortora *et al.*, 2003). De plus, ces bactéries sont très faciles à isoler et à cultiver au laboratoire, et se prêtent aisément aux manipulations génétiques (Fenton *et al.*, 1992; Chin-A-Woeng *et al.*, 2001).

Ce sont des aérobies obligatoires, à l'exception de certaines qui peuvent utiliser le NO_3^- comme accepteur d'électrons. Elles ont un métabolisme mésophile et chimio-organotrophe oxydatif (Moore *et al.*, 2006). Certains *Pseudomonas* pouvant tirer leur énergie d'une réaction catabolique en anaérobiose, par l'hydrolyse de l'arginine : Système de l'arginine dihydrolase (ADH) qui est constitutif ; ce système a permis de renforcer l'hypothèse selon laquelle la mobilité due au mouvement de flagelles est liée à l'ATP (Eyquem *et al.*, 2000). Il est mis en évidence chez *Pseudomonas fluorescens* immobile en anaérobiose mais qui devient mobile en présence d'arginine (J.L Avril *et al.*, 1992).

Les espèces du genre *Pseudomonas* produisent une couche d'exopolysaccharide entourant leurs cellules, la protégeant de la phagocytose par les macrophages chez les mammifères. Cette couche d'exo-polysaccharide (E.P.S) leur permet de former des bio films, grâce aux quels elles peuvent rester collées aux surfaces, de telle manière qu'il est difficile de les déloger (Visca *et al.*, 2007). Ce genre produit beaucoup de poly hydroxy alcanates et d'alginate ainsi que d'autres substances métaboliques. Ce qui les rend d'un grand intérêt biotechnologique (Holloway, 1992).

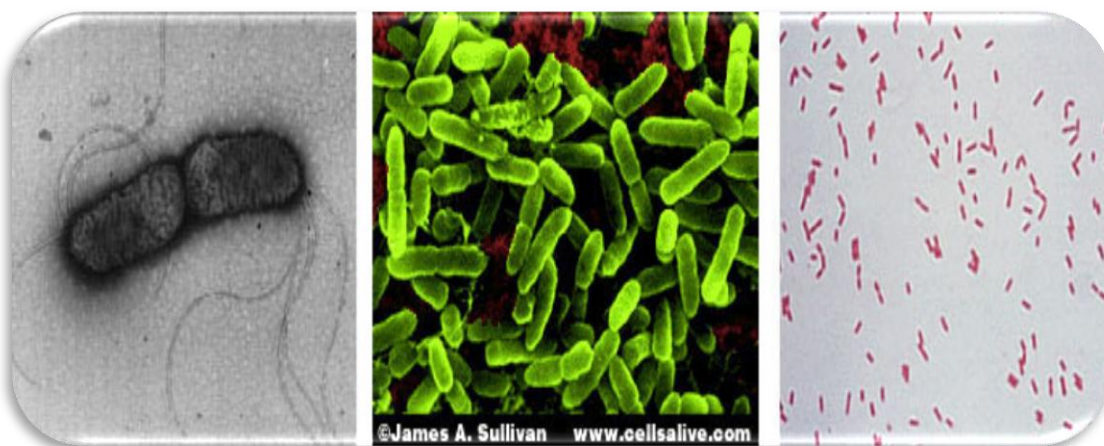


Figure N° 01 : *Pseudomonas* spp.

(Site N°01: <http://www.bact.wisc.edu/Bact303/MajorGroupsOfProkaryotes>)

*De nombreuses espèces ou souches de *Pseudomonas*, ne cultivent pas à 37°C, alors que la température de 30°C conviennent à tous pathogènes et saprophytes (Eyquem *et al.*, 2000). La culture est facile sur milieu complexe avec ou sans production de pigment. Ils sont capables de cultiver sur des milieux minéraux synthétiques avec une source simple de carbone : acétate, pyruvate (Eyquem *et al.*, 2000).

I-1-2- Les caractères physiologiques

La caractéristique physiologique la plus importante est la production du pigment, certaines produisent des pigments fluorescents soluble dans l'eau. Ce sont les pigments jaunes verts appelés pyocyanine et pyoverdine qui diffusent dans le milieu et apparaissent fluorescents en lumière ultra-violette (Jerome J. *et al.*, 2004).

I-1-3- La classification

Le genre *Pseudomonas* sensu stricto est communément divisé en deux groupes : les *Pseudomonas spp.* Fluorescents (par exemple *P. aeruginosa*, *P. fluorescens*, *P. putida* ou *P. syringae*) et les *Pseudomonas spp.* Non-fluorescents (par exemple *P. alcaligenes*, *P. fragi* ou *P. stutzeri*). Les autres espèces *Pseudomonas* sensu lato (groupes ARN II à V) ont été reclassées dans d'autres genres. (Kerstens *et al.*, 1996).

Le plus grand succès de la classification des *Pseudomonas*, selon les caractères génotypiques fût atteint par Palleroni et ses collaborateurs. Qui ont classifiés ce groupe bactérien en cinq sous-groupes d'ARNr, sur la base d'homologies ARN/ADN (Palleroni *et al.*, 1973). Toutefois ces sous classes d'ARNr sont phylogénétiquement trop éloignés, et finalement seules les bactéries appartenant au groupe ARNr I sont retenues dans le genre *Pseudomonas* (Peix *et al.*, 2009)

I-1-4-L'identification des différents espèces de *Pseudomonas* :

L'identification est basée sur différents paramètres présentés dans le tableau N°01 (A.Eyquem *et al.*, 2000).

Tableau N° 01 : Caractères d'identification des principales espèces de *Pseudomonas* (A. Eyquem *et al.*, 2000).

caractères	<i>P.aeruginosa</i>	<i>P.fluorescens</i>	<i>P.putidia</i>	<i>P.stutzei</i>	<i>P.simendocina</i>	<i>P.alcaligens</i>	<i>P.pseudoalcaligens</i>
oxydase	+	+	+	+	+	+	+
flagelles	1	>1	>1	1	1	1	1
King A	+	-	-	-	-	-	-
King B	-	+	+	-	-	-	-
Reduction NO ₃	±	±	-	+	+	-	-
ADH	+	+	+	-	+	±	±
Hydrolyse	-	-	-	-	-	-	-
Exuline	±	+	-	-	-	-	-
gélatine							
Assimilation :							
Glucose	+	+	+	+	+	-	-
Tréhalose	-	±	-	-	-	-	-
Maltose	-	-	-	+	-	-	-
Mannito	±	+	-	-	-	-	-
m.inositol	-	±	-	-	-	-	-
Lactose	+	+	+	+	+	+	+
Caractère complémentaire	Culture 41° +	Lécithine+ Culture 41° -	culture 41° -	Colonies Jaune plissées		PHB - Fructose -	PHB ± Fructose +

I-2- *Pseudomonas fluorescens*

Les bactéries appartenant au groupe des *Pseudomonas* spp fluorescents sont parmi les plus abondantes dans la rhizosphère. Dans certains cas, elles représentent plus de 60% de la microflore bactérienne totale du sol (Digat et Gardan, 1987). D'où leur application comme agents de contrôle biologique grâce à leurs abondance dans les sols naturels et les racines des plantes (Sands et Rovira, 1971). Les *Pseudomonas*, principalement l'espèce *P. fluorescens*, sont connues depuis longtemps pour leur aptitude à réduire l'incidence des maladies racinaires dans certains champs, ainsi qu'à inhiber la croissance d'un grand nombre d'agents phytopathogènes *in vitro*.

Pseudomonas fluorescens est une bactérie Gram négatif, oxydase positive, en forme de bâtonnet appartenant au genre des *Pseudomonas*. Elle est mobile grâce à des multiples

flagelles. De plus, elle tient la deuxième partie de son nom (*fluorescens*) du fait qu'elle est fluorescente. Cette fluorescence est due à la production d'un pigment appelé fluorescéine. Sa température de croissance optimale se situe entre 20°C à 30°C. Sa croissance à 42 est négative ; ce point est important par la différencier de *Pseudomonas aeruginosa* (Eyquem *et al.*, 2000).

I-2-1-Une diversité taxonomique importante

L'espèce *P. fluorescens* compte parmi les espèces qui présentent une forte hétérogénéité phénotypique et génotypique. En 2000, Bossis *et al* ont rassemblé des informations concernant les différentes études taxonomiques entreprises au sein de l'espèce *P. fluorescens*.

L'espèce comprend maintenant 5 biovars, dont l'appartenance repose sur l'assimilation de différents éléments carbonés. L'utilisation de clés dichotomiques (Bossis *et al* 2000), ainsi que le sidérotypage permettent de déterminer avec précision l'appartenance d'une souche bactérienne à un biovar donné. Toutefois, la désignation de cette espèce est encore controversée car elle ne correspond pas à la définition génotypique actuelle de l'espèce bactérienne. Les pourcentages d'hybridation ADN/ADN entre souches de la même espèce, et dans certains cas du même biovar, sont fréquemment inférieurs à 50%. La diversité de la structure du génome apparaît plus grande que la diversité physiologique (Ginard *et al.*, 1997).



FigureN° 2 : Structure de *Pseudomonas fluorescens*

(Site N°02:http://web.mst.edu/~microbio/BIO22_2009/images_2009/Pseudomonas-1.jpg)

Les *Pseudomonas* spp. fluorescents sont connus pour leurs aptitude d'adhésion aux particules du sol et au rhizoplan, mais sont aussi mobiles et prototrophes (de Weger *et al.*,

1994), produisant des antibiotiques (Garbaye, 1994 ; Natsch *et al.*, 1994), et des enzymes hydrolytiques (Lim *et al.*, 1991; Neilsen *et al.*, 1998; Neilsen et Sorensen, 1999) . Ces bactéries sont d'excellents compétiteurs vis-à-vis de la microflore fongique et bactérienne du sol par leur temps de génération *in situ* relativement court (Garbaye, 1994).

Les espèces de *Pseudomonas* fluorescents ont un grand pouvoir de chélation du fer et pourraient rendre l'ion ferrique inaccessible aux autres microorganismes. Elles peuvent aussi reconnaître et utiliser les sidérophores produits par d'autres souches, alors que ces dernières ne sont pas capables d'utiliser le sidérophore qu'elles produisent (Mercado-Blanco et Bakker, 2007).

Pseudomonas fluorescens diminuent la sévérité de la maladie et stimulent la croissance des plantes comme le riz (Sakthivel et Gnanamanickam , 1987), la pomme de terre (Kloepper *et al.*,1980) , et le blé (Weller et Cook, 1983).

II –Partenaire végétal : Le BLé

Le blé est la principale ressource alimentaire de l'humanité (Feillet, 2000). Le blé est une plante annuelle appartenant à la famille des graminacées. Elle fait partie du groupe des monocotylédones (plantes dont la graine est entière) . Ses deux principales formes d'utilisation sont la fabrication de pain et de pâtes. Toutefois, le blé possède d'autres applications en industrie agro-alimentaire qui utilise les farines ou les semoules comme matières premières, par exemple la pâtisserie (Feillet,2000).

Le blé est également employé dans l'alimentation animale. L'utilisation, bien que relativement limitée dans les pays industrialisés revêt une importance particulière pour certains pays en développement et pourrait représenter, à certain titre, un potentiel de développement intéressant.



Figure N° 03: Les grains de blé

(Site N°04 : fr.wikipedia.org/wiki/Grain_de_blé).

Le blé peut être attaqué par de nombreuses maladies à différents stades de son développement. Ces attaques peuvent occasionner des pertes importantes lorsque les variétés utilisées sont sensibles et les conditions de l'environnement sont favorables à l'expansion des maladies.

De nombreuses maladies fongiques peuvent attaquer les différents organes du blé, à différents stades de son développement (Parry *et al.*, 1995). Parmi les moisissures toxigènes qui contaminent de nombreuses plantes au champ, notamment les céréales et le maïs, les plus préjudiciables appartiennent au genre *Fusarium* spp. Ces moisissures sont à l'origine de pertes considérables au niveau des récoltes et de la détérioration de la qualité des grains liée à des maladies connues sous le nom fusariose (Doguiet ,2010). De plus, certaines espèces fongiques synthétisent des mycotoxines qui s'accumulent dans les grains, c'est le cas pour la plupart des espèces responsables de la fusariose (Parry *et al.*, 1995).

III-La maladie : (La lb ed esoirasufé)

La fusariose de l'épi est une maladie fongique affectant les céréales et due à des champignons du genre *Fusarium* (Chandelier *et al.*, 2003). Elle est favorisée par des temps doux et pluvieux entre le stade de la floraison et le stade de la formation des grains. En plus de comporter des risques de pertes de rendement considérables , la fusariose peut produire des mycotoxines dangereuses pour le bétail et l'humain (Lacroix, 2008). Les symptômes des fusarioses sur épis sont diversifiés : dessèchement des glumes avec un liseré brun, épillets

échaudés (parfois épi entier blanc), colorations roses sur les glumes. Les grains atteints sont maigres et présentent une coloration blanche ou rose (Agrios, 2005)



Figure N°04 : La fusariose de l'épi

(Site N° 05 :www.agro.basf.fr/.../la...ble/.../Fusariose.htm)

* La fusariose de l'épi peut être causée par une vingtaine d'espèces du genre *Fusarium* et une espèce du genre *Michrodochium* (Arseniuk *et al.*, 1999). Parmi ces espèces, cinq sont principalement responsables de la fusariose, il s'agit de *F. avenaceum*, *F. culmorum*, *F. graminearum*, *F. poae* et *Michrodochium nivale* (Parry *et al.*, 1995).

III-1-Les types de fusariose

Le terme "fusariose" des céréales regroupe trois types de symptômes (Parry *et al.*, 1995).

- Seedling Blight : fusariose des semences, provoquent des manques à la levée et des fonds des semis.
- Foot Rot : fusariose du collet, entraînant la nécrose de ces tissus
- Head Blight : fusariose de l'épi .

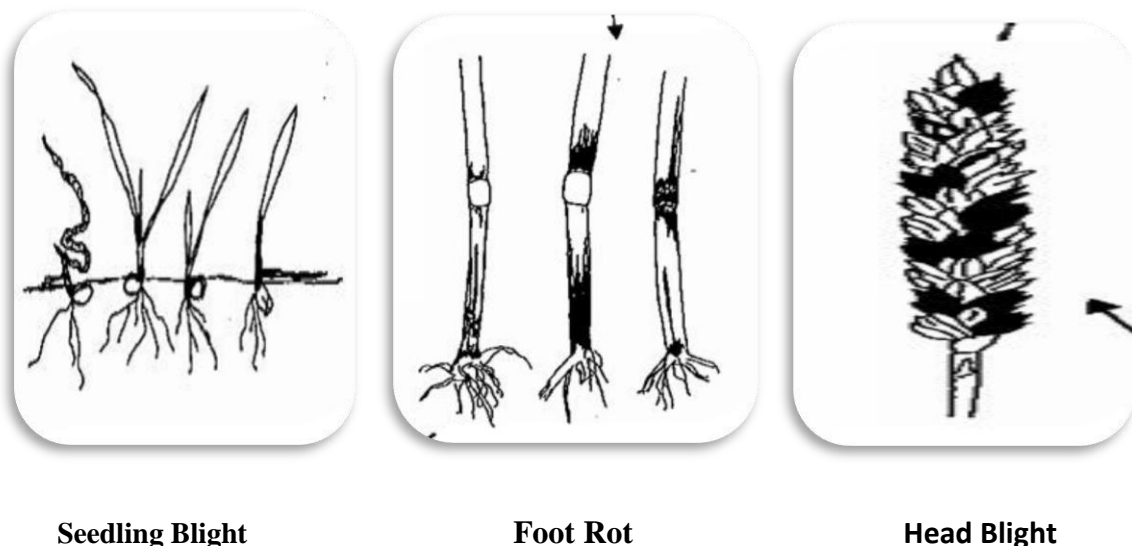


Figure N°5 : Les Types de fusariose (Parry *et al.*, 1995)

IV- L'agent causal de la fusariose : (Le *Fusarium*)

Les *Fusarium* sont parmi les champignons telluriques les plus agressifs, causant des flétrissements et des pourritures sur de nombreuses espèces végétales cultivées. (Benhamou *et al.*, 1997). Ce genre inclue des champignons imparfaits appartenant à la classe des *Deutéromycètes*. Les formes parfaites ou téléomorphes de quelques espèces de *Fusarium* sont connues, et appartiennent à la classe des *Ascomycète* (Nelson *et al.*, 1983).

Le champignon se conserve dans le sol grâce à ses chlamydospores et au mycélium capable de survivre sur les débris. La dissémination se fait au niveau du sol par les eaux de ruissellement, le vent ou les éclaboussures ou les importations dans l'exploitation de terreaux ou de plantes contaminés.

La croissance de *Fusarium* dépend de certaines conditions et notamment des conditions météorologiques de température (> à 15°C) et d'humidité (teneur en humidité dans le substrat entre 22 et 25 %) durant la floraison. Lorsque toutes les conditions sont réunies, l'infestation est massive et il y a production de grains fusariés qui peuvent engendrer des pertes allant de 30 à 70 % sur la production totale (Chandelier *et al.*, 2003).

L'infection par le *Fusarium* est favorisée par des conditions de pluie et d'humidité qui surviennent pendant la période épiaison-floraison chez les céréales et la sortie des soies chez le maïs (Bailey *et al.*, 2004).

Fusarium spp peuvent se comporter comme saprophytes lorsque les conditions environnementales ne sont pas propices. En hiver par exemple, *Fusarium* spp sont capables de survivre dans le sol et les débris végétaux ce qui constitue au champ une source de contamination importante (Schaafsma *et al.*, 2001). La dissémination des spores par le vent ou les insectes est également une autre voie de contamination (Sutton, 1982). Une fois sur les plantes, les spores y pénètrent via les blessures provoquées par des ravageurs et /ou le canal des soies chez le maïs et les anthères chez le blé (Miller *et al.*, 2004; Schmale *et al.*, 2005).

Quand les conditions environnementales sont favorables, les spores germent, le mycélium envahit les grains et conduit à la production de mycotoxines (Butkeraitis *et al.*, 2004; Munaut & Hove, 2004; Ogido *et al.*, 2004; Tran *et al.*, 2005).

IV-1-La morphologie microscopique

Les champignons du genre *Fusarium* sont des moisissures filamenteuses (Laurent, 1998). Le principal caractère morphologique des *Fusarium* est la présence de macroconidies fusiformes et cloisonnées (le nom de *Fusarium* vient du latin « *fusus* » car les spores de ces moisissures sont en forme de fuseau (Roquebert, 1998)).

IV-2-La Taxonomie

Le genre *Fusarium* appartient au phylum des Deutéromycètes (champignons imparfaits), car la plupart des espèces étaient d'abord décrites sur la base de caractères morphologiques et une reproduction sexuée n'a pas été observée (Lepoivre, 2003). Ces formes imparfaites (anamorphes) sont caractérisées par un mycélium septe et la production de conidies hyalines généralement unicellulaires sur des conidiophores libres; elles sont classées dans le groupe des Moniliales (Lepoivre, 2003). De plus, *Fusarium* produit des macroconidies composées de 2 à plusieurs cellules. Leur forme recourbée typique avec une cellule apicale plus ou moins pointue est un des critères d'identification des représentants du genre ; dans beaucoup d'espèces on observe une cellule basale en forme de pied (Seifert, 2001). La production de métabolites secondaires et notamment de toxines (mycotoxines et phytotoxines) est courante parmi les *Fusarium*, et le profil de ces composés peut être utilisé pour la classification des espèces (Thrane, 2001).

IV-3- La production des mycotoxines

Les espèces du genre *Fusarium* peuvent produire trois grandes familles de mycotoxines appelées fusariotoxines : les fumonisines, les trichothécènes et la zéaralénone . La biosynthèse

de ces fusariotoxines se déroule majoritairement au champ par opposition à celle d'autres mycotoxines telles que les aflatoxines et les ochratoxines dont la production a lieu au cours de stockage. Les fusariotoxines sont très stables et leur présence sur les grains et produits céréaliers n'est pas totalement éliminée par les étapes de nettoyage des grains et au cours des processus industriels (Hazel et Patel, 2004; Karunaratne *et al.*, 1990; Ryu *et al.*, 2002).

IV-4- Caractères culturaux généraux

Les *Fusarium* poussent sur milieu Sabouraud, mais se développent mieux sur gélose au malt ou sur milieu PDA (potato-dextrose-agar). Leur température optimale de croissance est comprise entre 22 et 37°C. Sur les milieux de culture, les *Fusarium* forment des colonies duveteuses ou cotonneuses de couleur variable (blanche, crème, jaune, rose, rouge, violette ou lilas) selon les espèces. Le revers peut être crème, rouge à pourpre, lilas ou violet. Les pigments diffusent souvent dans la gélose (Chermette et Bussieras, 1993).

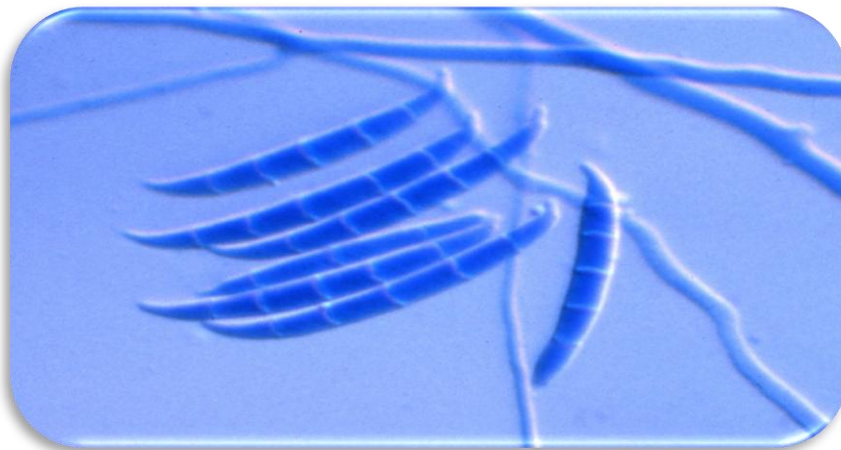


Figure N °06 : La morphologie microscopique de *Fusarium* sp

(Site N° 06 : [http /www.studyblue.com](http://www.studyblue.com))

V-Moyens de lutte contre le *Fusarium*

Différents moyens de lutte existent, cependant la prévention reste la meilleure arme contre les épidémies de fusariose en champ.

V-1-L'utilisation des fongicides

De nombreux fongicides sont disponibles pour lutter contre les champignons (Thangavelu et al, 2004). Mais, aucun fongicide ne réprime complètement le champignon de la fusariose de

l'épi. L'usage d'un fongicide contribue à réduire l'incidence de la maladie et le contenu des grains en toxines. Sous des conditions très favorables à l'infection, le fongicide aide à obtenir une récolte qui rencontre les exigences des utilisateurs (Lauzon ,2007).

V-2- Les pratiques culturales

La production de spores infectieuses à partir des déchets végétaux présents dans les champs est la première étape du cycle infectieux de *F. graminearum*. Il convient donc de ne pas réutiliser les déchets végétaux pour fumer les cultures. Au niveau du semis, il est recommandé de semer les céréales dans un sol bien travaillé. Idéalement le sol doit favoriser une germination et une levée rapide. De cette manière la jeune plante peut être plus robuste pour faire face à une infection. Une pratique d'alternance de culture apporte des effets bénéfiques compte tenu de la préservation nécessaire des ressources du sol. De plus, elle induit une variation naturelle de la flore favorable à la résistance aux pathogènes (Asran *et al.*, 2003).

L'irrigation, la fertilisation azotée et le contrôle des adventices jouent également un rôle dans le développement de la fusariose (Wagacha et Muthomi , 2007)

V- 3- Les PGPR en tant qu'agents de lutte biologique

La lutte biologique consiste à combattre une maladie causée par un organisme au moyen d'un autre organisme. La rhizosphère constitue une région du sol où l'activité bactérienne est très intense. Ces bactéries, sont capables de coloniser efficacement les systèmes racinaires et influencent de manière bénéfique la plante en stimulant sa croissance et / ou en la protégeant contre des infections par des agents phytopathogènes. Ces bactéries rhizosphère sont alors reprises sous le terme PGPR (Plant Growth-Promoting Rhizobactéria) (Haas et Defago, 2005).

V- 1-Mode d'action des PGPR

Durant les dernières décennies du siècle dernier, des recherches considérables ont démontré que plusieurs microorganismes de diverses origines phylogénétiques sont capables d'inhiber différents agents pathogènes. Les microorganismes à l'origine de cette inhibition utilisent plus d'un mécanisme pour la suppression des pathogènes et la réduction de l'incidence des maladies à savoir : compétition, antibiose ou parasitisme (Chet *et al.* , 1990).

Ils agissent en partie, par la sécrétion de substances antimicrobiennes ayant soit une activité antifongique (Smirnov et Kiprianova , 1990) soit une activité antibactérienne (Veselova et al 2008). Ces capacités antagonistes et PGPR (plant growth promoting rhizobactéria), sont dues à des mécanismes directs et indirects.

V- 2-1-Interaction PGPR/Pathogène

❖ La compétition

* La compétition pour l'espace et les nutriments

On a beaucoup discuté l'idée qu'une rhizobactérie à croissance rapide pourrait éliminer les pathogènes fongiques par la compétition pour le carbone et les sources d'énergie. Les PGPR doivent être présent sur les racines en nombre suffisant pour avoir un effet bénéfique sur les plantes et pour être capable d'instaurer une compétition pour les nutriments dans la rhizosphère (Haas et Defago 2005). Outre la vitesse de croissance intrinsèque, les autres propriétés renforçant le potentiel colonisateur d'une souche sont la mobilité (présence d'un flagelle) (Jofre *et al.*, 2004), le chimiotactisme et la faculté d'utilisation des composés excrétés par les racines en tant que sources de carbone et d'azote (Berggren *et al.* 2001; Gupta 2003; Grover 2004). Les bactéries se trouvent dans des environnements hautement compétitifs, comme l'interface sol /racines (rhizosphère). Dans de telles niches, elles sont en compétition perpétuelle pour les nutriments, aussi bien que pour l'espace écologique.

*La compétition pour le fer et production des sidérophores

Les *Pseudomonas fluorescens* ont la capacité de synthétiser des sidérophores qui sont des molécules extracellulaires chélatrice du fer nécessaire à leur croissance (Ongena *et al.*, 2002). Les composés ont une grande affinité pour le fer ferrique (Fe^{3+}), Ce dernier est présent dans le sol à faible concentration sous forme de $Fe(OH)_3$ (Kapulnik, 1996 ; Lynch, 1990).

En chélatant les ions ferriques présentes dans la rhizosphère par exemple ; elles les rendent ainsi non disponibles pour les champignons pathogènes, ce qui provoque une diminution de sa croissance (Isabelle Sick *et al.*, 2010).

Pseudomonas fluorescens peuvent aussi reconnaître et utiliser les sidérophores produits par d'autres souches, alors que ces dernières ne sont pas capables d'utiliser les sidérophores qu'elles produisent .cette particularité peut favoriser la souche dans le processus de la colonisation et la compétition pour le substrat mieux que d'autres habitants microbiens de la rhizosphère (Ongena *et al.*, 2002).

❖ Antibiose et parasitisme

L'antibiose est l'inhibition d'un micro-organisme par le produit métabolique d'un autre (Gagné, 1984). L'antibiose est probablement le mécanisme le plus connu et peut-être le plus

important utilisé par les PGPR pour limiter l'invasion de pathogènes dans les tissus de la plante hôte. Il consiste en une inhibition directe de la croissance du pathogène via la production de métabolites aux propriétés antifongiques et/ou antibiotiques (Peypoux *et al.*, 1999). Certaines souches de PGPR ont la capacité d'excréter des métabolites qui jouent un rôle important dans l'inactivation des facteurs de germination du pathogène ou la dégradation de leurs facteurs de pathogénicité comme les toxines. Ainsi, la capacité de certaines bactéries à parasiter et à dégrader les spores des pathogènes à travers la production d'enzymes détruisant la barrière cellulaire a été démontrée (Whipps, 2001).

V- 2-2-Interaction PGPR/ Plante

❖ La stimulation de la croissance des plantes

Les PGPR améliorent la croissance des plantes directement ou indirectement. La promotion indirecte se produit lorsque ces bactéries empêchent ou diminuent les effets nocifs des microorganismes phytopathogènes par colonisation et production d'antibiotiques. La promotion directe consiste à améliorer la croissance des plantes. Elle se fait soit en fournissant à la plante des phytohormones favorisant la croissance végétale ou de faciliter l'absorption de certains éléments nutritifs de l'environnement par production des sidérophores ou par fixation d'azote (Doubou *et al.*, 2001). Les modes d'action des PGPR sont : **la production de phytohormones** (Frankenberger et Arshad, 1991), **la production de sidérophore** (O'Sullivan et O'Gara, 1992; Loper et Henkels, 1999), **la solubilisation des phosphates** (Kloepper *et al.*, 1989).

❖ Renforcement de la capacité défensive de plante

La reconnaissance par la plante de certaines bactéries de la rhizosphère peut conduire à une réaction d'immunisation lui permettant de mieux se défendre vis-à-vis d'une attaque par un organisme pathogène (van Loon, 2007). Cette « immunisation » de la plante est appelée résistance systémique induite (ISR) (van Loon *et al.*, 2005 ; Jourdan *et al.*, 2008). Ce phénomène d'induction de résistance systémique par les rhizobactéries est considéré comme une stratégie prometteuse dans la lutte biologique contre les maladies des cultures (Ramos Solano *et al.*, 2008). L'ISR peut être induite par des microorganismes variés incluent des bactéries à Gram positif comme *Bacillus pumilus*, ou des bactéries à Gram négatif appartiennent au genre *Pseudomonas* (*fluorescens*, *putida*, *aeruginosa*), et aux entérobactéries comme *Serratia* (*marcesens*, *plymuthica*) ou *Pantoea agglomerans* (Jourdan *et al.*, 2008).

❖ Diminution de l'agressivité du pathogène :

Un agent de biocontrôle peut également agir en affectant les facteurs de pathogénicité de l'agent pathogène (Jijakli, 2003). L'expression potentielle de certains de systèmes de régulation (compétition, antibiose...etc.) aboutirait à l'atténuation de virulences des agents pathogènes (les endopolygalacturonases ou pectate...etc.) sur le site de l'infection. Ce mécanisme correspond à une détoxification et/ou une inhibition de la synthèse des facteurs de virulence des pathogènes. (Isabelle Sick et al, 2010). La carence en fer, par exemple, est impliquée non seulement dans les processus de compétition, mais aussi dans la régulation de l'expression de facteurs de virulence des pathogènes (Isabelle Sick *et al.*, 2010).

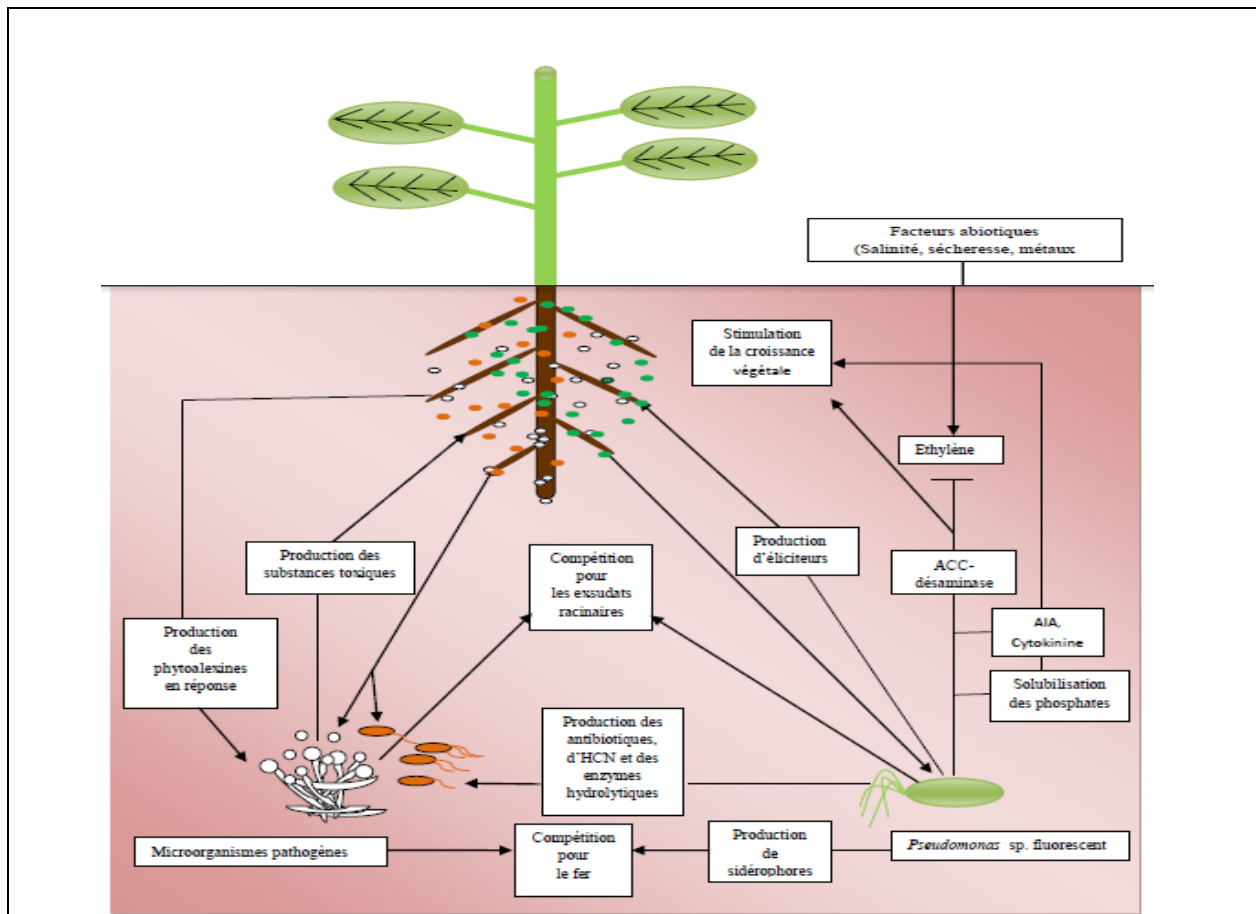


Figure N°07 : Interactions entre les *Pseudomonas* spp. fluorescents, les microorganismes pathogènes et les cellules racinaires (Rabhi, 2011)

I -Matériels :

I -1-Matériel biologique

❖ **Souches de *Pseudomonas fluorescens***

I -1-1- L'échantillonnage:

Pour réaliser notre travail, nous avons utilisé des échantillons de sol prélevés des champs de blé à partir de la wilaya de Khenchela.

Les échantillons sont prélevés à partir de la rhizosphère (15 à 20 cm de profondeur) et sont stockés dans le réfrigérateur à 4°c jusqu'au leurs utilisation.

I -1-2 -Isolement de *Pseudomonas fluorescens*:

L'isolement des bactéries appartenent au genre *Pseudomonas* du sol rhizosphérique a été effectué par la méthode des suspensions-dilutions décrite par Vidhyasekaran *et al*, (1997).comme l'indique le Figure N°08

✚ **Préparation de la solution mère :**

A partir d'un échantillon de sol destiné à l'analyse microbiologique, 10g de sol sont pesé puis introduit dans un erlen meyer de 200 ml contenant 90ml d'eau physiologique stérile, et sont agités à l'aide d'un agitateur pendant 30 minutes, pour récupérer les bactéries de la rhizosphère.

Le contenu de l'erlen meyer représente la solution mère.

✚ **Préparation des dilutions :**

Dans un tube contenant 9ml d'eau physiologique stérile, 1ml de la solution mère est ajoutée, ce qui représente la dilution (10^{-1}).

- 1ml de cette dilution a été mélangé avec 9ml d'eau physiologique correspondra à la dilution (10^{-2}), On continue ainsi jusqu'à l'obtention de la dilution (10^{-7}).

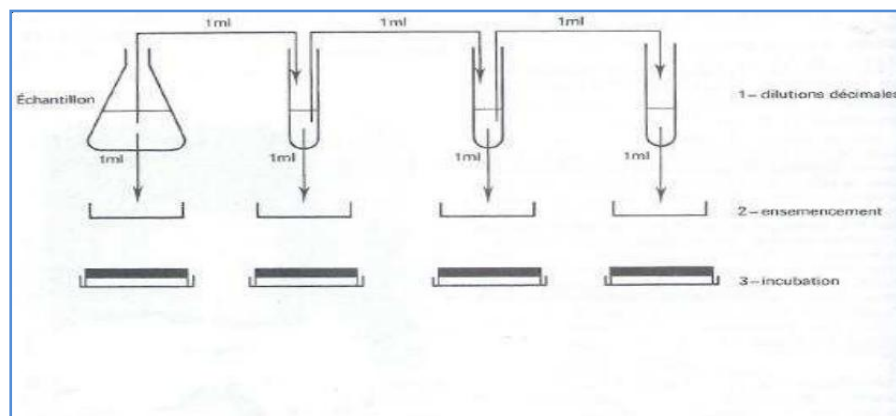


Figure N ° 08 : Les étapes de dilution
(Site N° 07 :http://www.physics.csbsju.edu/stats/chi_fit.html)

✚ Le milieu de culture:

Le milieu utilisé pour l'isolement des *Pseudomonas fluorescens* est le King B dont la composition se trouve dans l'annexe.

- I -1-3- Ensemencement de milieu de culture

- Le milieu de culture King B est réparti dans des boîtes de pétri à une hauteur d'environ 3 à 4 mm.
- À l'aide d'une micro pipette, on prélève 0,1 ml de la solution mère et de chaque dilution, ensuite, on fait l'étalement sur toute la surface de la boîte de pétri par une pipette pasteur coudée sous forme d'un râteau.
- L'incubation se fait à 30°C pendant une durée de deux à trois jours

I-1-4-Purification des souches

Après 2 à 3 jours d'incubation, nous passons à l'étape de purification des cultures puisque cette étape est indispensable pour avoir des souches bactériennes pures.

* La sélection des colonies est basée sur l'aspect macroscopique des colonies à savoir l'aspect fluorescent des colonies, la couleur, la forme, le diamètre, l'opacité. (Martinneau, 1996). Chaque type de colonie est prélevé ensuite purifié par repiquage successif sur le milieu King B jusqu'à l'obtention au sein d'une boîte de pétri des colonies homogènes.

II -2- Conservation des souches

Les souches isolées sont conservées dans des tubes à essai contenant le milieu King B incliné. Les souches sont ensemencées sur la pente des tubes, puis incubées à 30°C pendant 24 à 48 heures. Les tubes dans lesquels il y a eu une croissance seront conservés à 4°C jusqu'à leur utilisation (Marchal et Bourdon, 1982). Pour la conservation pendant une longue durée, il faut ajouter le glycérol 10 % au milieu de culture.

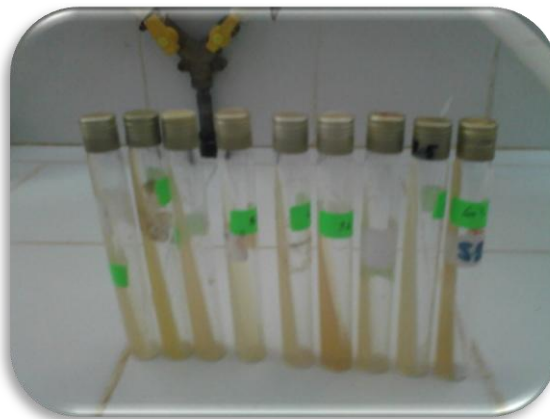


Figure N° 09 : Milieu King B incliné pour la conservation des souches bactériennes

❖ **Le champignon : *Fusarium***

Les souches fongiques utilisées sont obtenues après isolement par la méthode suivante :

Les échantillons (les plantes de blé) qui présentent les symptômes de la maladie sont découpés, ensuite désinfectés par l'éthanol pendant 02 minutes, puis dans l'eau de Javel pendant 15 minutes, suivie d'un rinçage par l'eau distillée stérile, puis ils sont séchés dans un papier absorbant stérile . Les échantillons sont déposés dans des boîtes de pétri contenant le milieu PDA, puis sont incubés à la température ambiante du laboratoire pendant 07 jours (Bouregghda , 2010) . Après l'incubation, plusieurs repiquages ont été effectués jusqu'a l'obtention des souches pures.

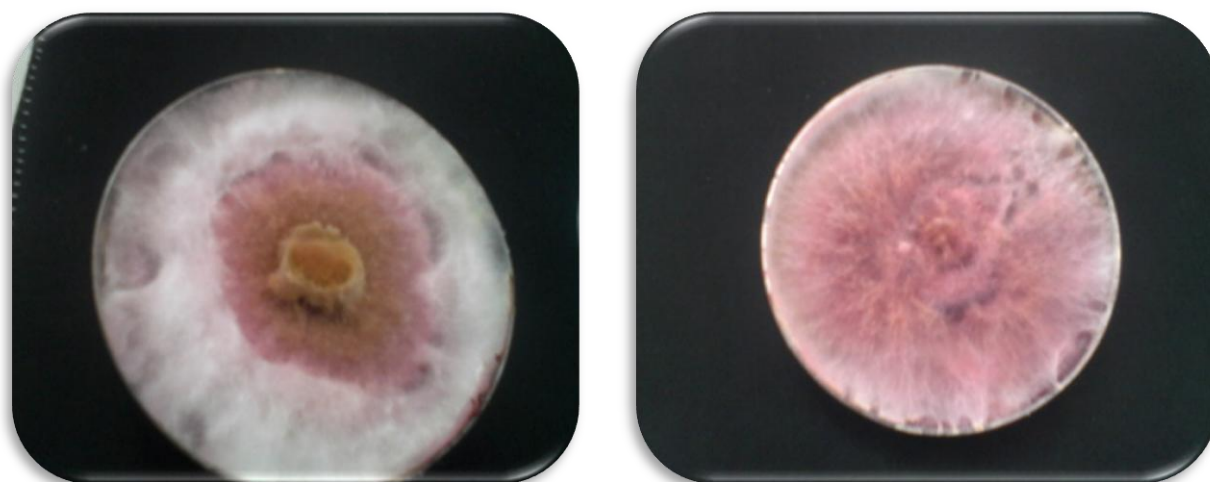


Figure N° 10 : Des souches de *Fusarium* pures

1-2-Matériel végétale

-**Les grains de blé :** sont obtenues à partir des champs de blé de la wilaya de Khenchela

II- Identification phénotypique des isolats bactériens

L'identification des souches isolées est réalisée en se basant sur l'étude morphologique et des tests biochimiques.

II-1-Etude morphologique

II-1-1- Aspect macroscopique

L'observation de l'aspect macroscopique des colonies permet d'effectuer une première sélection, avec une orientation possible des résultats au cours de l'identification.

- D'après Joffin et Leyral (2006), les éléments d'identifications macroscopiques sont :

-La couleur des colonies est blanchâtre à crème et produisant un pigment fluorescent dans le milieu à 365 nm sous l'effet des UV. Le diamètre des colonies est compris entre 1 et 3 mm.

- **La Production de pigment fluorescent:**

La production du pigment fluorescent a été recherchée sur milieu King B. Après une incubation de 24 à 96 heures 30 °C, le développement du pigment fluorescent a été révélé à l'œil nu ou par la chambre noire à UV.



Figure N° 11: La chambre noir à UV

II -1-2- Aspect microscopique:

- **La coloration de Gram**

Ce test permet de distinguer les bactéries Gram+ et Gram- en fonction de la teneur en lipides de la paroi.

- ✓ **Préparation des frottis :**

- Mettre une goutte d'eau distillée au centre d'une lame à l'aide d'une pipette Pasteur
- Prélever une colonie à partir des colonies des souches purifiées.
- Déposer la colonie à côté de la goutte pour la visualiser et la mélanger avec l'eau.
- Sécher les frottis.

- ✓ **Technique de coloration :**

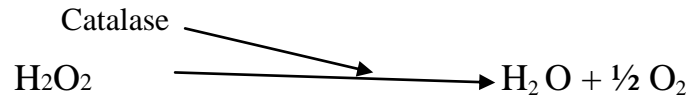
- Verser le violet de gentiane. Laisser agir pendant une minute.
- Ajouter du lugol (solution d'iode- iodo-iodurée), et laisser agir 20 secondes.
- Décoloration avec le mélange d'éthanol et d'acétone (volume par volume) pendant 30 secondes.
- Sécher le frottis sur le bec bunsen

* L'observation se fait par l'ajout de l'huile à immersion . Les bactéries Gram positif se colorent en violet alors que les bactéries Gram négatif se colorent en rose .

II-2- Les Tests biochimiques

II-2-1- Recherche de la catalase

La catalase est une enzyme ayant la propriété de décomposer le peroxyde d'hydrogène (H_2O_2) avec dégagement d'oxygène selon la réaction suivante:



✓ La technique

La catalase a été révélée en déposant sur une lame en verre propre, une colonie bactérienne en présence de H_2O_2 .



Figure N°12 : Le test catalase

Une réaction catalase positive se traduit par l'apparition de bulles, suite au dégagement gazeux d'oxygène (Lévy *et al.*, 1992).

II -2-2- Le test de l'oxydase

Le test est à la base de l'identification des bactéries Gram -.

-Ce test permet de mettre en évidence une enzyme : **la phénylène diamine oxydase** des bactéries à partir de leur culture en milieu gélosé. Cette enzyme est capable d'oxyder un réactif : **le N diméthyl paraphénylène diamine**

✓ **La technique**

A l'aide d'une pince, Déposer sur une lame propre un disque de diméthylparaphénylène diamine (disque oxydase) préalablement trempé dans de l'eau distillée stérile.

– Prélever une partie de la colonie à étudier à l'aide d'une anse de platine et l'étaler sur le disque.

• **La lecture**

Une coloration violette foncée apparaît immédiatement sur le disque ou en quelques secondes puis elle vire vers le noir ; La réaction est tardive entre 10 et 60 secondes, et elle est négative après 60 secondes.

II-2-3- Test Mannitol Mobilité :

Le milieu Mannitol mobilité permet la recherche simultanément de la fermentation du mannitol et la mobilité des bactéries (Marchal et Bourdon, 1982).



Figure N° 13: Milieu Mannitol mobilité

✓ **La technique**

On ensemence le milieu Mannitol par pique centrale à l'aide d'une pipette Pasteur ou l'anse de platine chargée de culture à étudier. Incubation à 30°C, pendant 24 heures à 48 heures.

• **La Lecture :**

- Fermentation du mannitol entraîne le virage du milieu au jaune.

-Les souches mobiles diffusent à partir de la ligne d'ensemencement tandis que les souches immobiles croissent uniquement le long de la pique.



Figure N° 14 : Ensemencement du Mannitol mobilité

II -2-4-Test de la température de 4°C et 41°C:

Pour ce test, il est très important d'identifier les souches bactériennes qui poussent à ces deux températures, car seul *Pseudomonas aeruginosa* qui peut supporter une température allant jusqu'à 42°C.

✓ La technique

- Les tubes contenant l'eau physiologique stérile sont ensemencés à l'aide d'une anse de platine, par les 56 souches.

-L'incubation est réalisée à la température 41°C dans l'étuve et 4°C dans le réfrigérateur pendant 24 à 48 heures.



Figure N° 15 : Des tubes contenant l'eau physiologique stérile

II -2-5-Test de l'arginine déshydrogénase

+ Le milieu de culture

Le milieu de culture utilisé dans ce test est le milieu de Moeller (Annexe)



Figure N°16 : Le milieu moeller

✓ La technique

A l'aide d'une anse de platine, inoculer les tubes qui contiennent le milieu de culture avec les bactéries à identifier.

- Ajouter environ 01ml d'huile de paraffine dans chaque tube.
- Pour chaque souche: -02 tubes pour milieu moeller (témoin);
 - 02 tubes pour milieu moeller + arginine
- Incubation des tubes dans l'étuve de 18 à 24 heures.

*La Lecture

- Réaction positive: le milieu demeure violet ou rose
- Réaction négative : le milieu devient jaune orange

II -2-6-Test de gélatinase (Collagénase)

La gélatine peut être incorporée dans un milieu de culture afin de mettre en évidence sa dégradation par certaines bactéries possédant une gélatinase. Cette enzyme hydrolyse le collagène en acides aminés ou en peptides (Joffin et Leyral, 2006)

✚ Milieu de culture à la gélatine

Les composants de ce milieu se trouvent dans l'annexe.

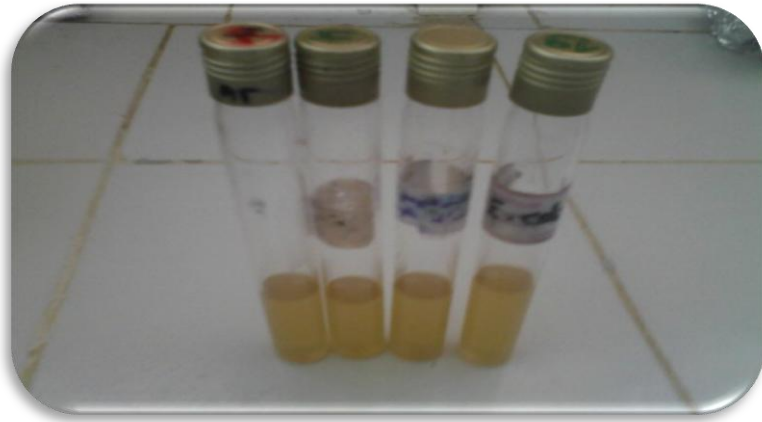


Figure N° 17 : Le milieu de culture à la gélatine

✓ La technique

- Le milieu à la gélatine est préparé, On fait leur ensemencement par pique centrale
- Incubation pendant 24 à 48 heures à 30°C.
- Enlever les tubes de gélatine nutritive de l'étuve et les placer dans le réfrigérateur à 4°C pendant 30 minutes ou dans un bain de glace pendant 3 à 5 minutes.

• La Lecture

- * Si la gélatine nutritive est liquide, ceci indique que la gélatine a été hydrolysée par la bactérie.
- * Si le milieu est un gel, aucune hydrolyse ne se produisait,

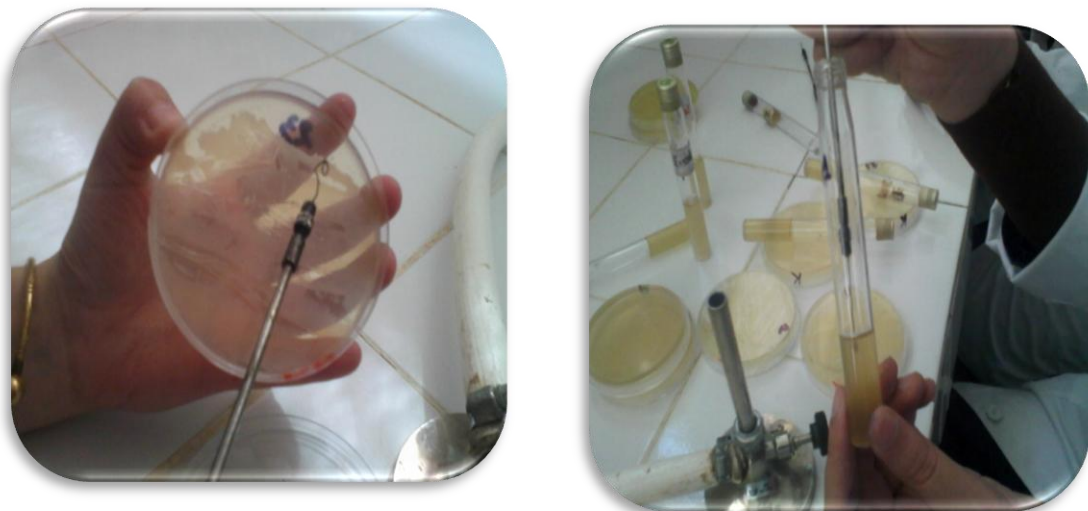


Figure N° 18 : Ensemencement de milieu à la gélatine

II -2-6-Test de lipase

✓ La technique

Une gélose en boîte de Pétri (ici la gélose est le King B), additionnée de tween 80 à 16ml/l (monoléate de sorbitol), est ensemencée par spots à partir d'une culture en milieu solide de la souche à étudier.

-Incubation 24 à 48 heures à 37°C.

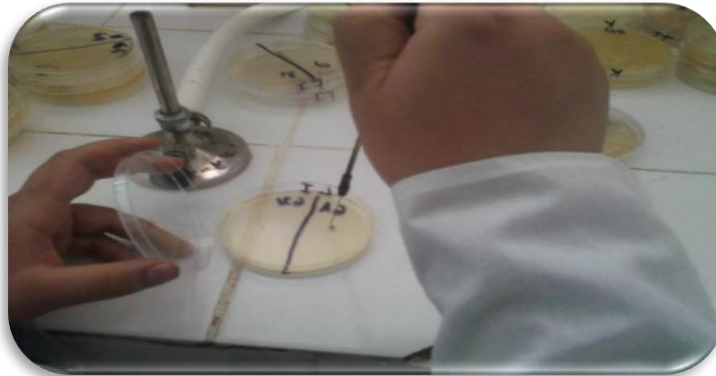


Figure N° 19 : Ensemencement de milieu en spots

• La lecture

Après incubation, les colonies des souches lipase (+) sont entourées d'un halo opaque formé suite à la précipitation d'acides gras issus de la lipolyse

-II-3- Identification des souches par la galerie Api 20 NE

La galerie API 20 NE se compose de 20 micro-tubes contenant milieux et substrats sous forme déshydratée. Il permet l'identification des bacilles Gram (-) non entérobactéries par la réalisation rapide et facile de tests biochimiques miniaturisés.

Les réactions produites durant la période d'incubation se traduisent par des virages colorés spontanés ou révélés par l'addition de réactifs.

✓ La technique

- Préparer une suspension de la bactérie

. Inoculer une grosse colonie (diamètre de 2-3mm) de la bactérie dans une solution de 0.85% NaCl, on doit s'assurer que la suspension est homogène sans agrégats de bactéries qui flottent .

Puis incubation des suspensions dans l'étuve.

- Inoculer la bande API

En tenant la bande à un léger angle avec le dessus de la table, on inocule la suspension bactérienne dans chacun des puits avec une pipette pasteur stérile.

-Ensemencement de la galerie API 20E.

-Tableau N° 02 : Tableau de lecture de la galerie API 20

Tests	Composants actifs	QTE (mg / CUP)	Réaction / Enzyme	Résultat	
				négative	positive
NO ₃	Potassium nitrate	0,136	Réduction des nitrates en nitrites	NIT1 + NIT2 /5min	
				incolore	Rose-rouge
			Réduction des nitrates en azote	Zn/5min	
			Rose	incolore	
TRP	L-tryptophane	0,2	Formation d'indole (TRYPTOPHANE)	JAMES / immédiat	
				Incolore / Vert pale / jaune	Rose
GLU	D-glucose	1,	Fermentation (GLUCOSE)	Bleu à vert	jaune
ADH	L-arginine	1,92	Arginine DiHydrolase	jaune	Orange/rose/rouge
URE	Urée	0,76	UREase	jaune	Orange/rose/rouge
ESC	Esculine citrate de fer	0,56 0,72	Hydrolyse(β-glucosidase)	jaune	Gris/marron/noir
GEL	Gélatine	0,6	Hydrolyse (protéase) (GÉLATINE)	Pas de diffusion du pigment	Diffusion du pigment noir
PNPG	4-nitrophényl-βD-galactopyranoside	0,22	β-galactosidase (para-NitroPhényle-βD-Galactopyranosidase)	incolore	jaune
GLU	D-glucose	1,56	Assimilation (GLUCOSE)	transparence	Trouble
ARA	L-arabinose	1,4	Assimilation (ARABINOSE)	Transparence	Trouble
MNE	D-mannose	1,36	Assimilation (MANNOSE)	Transparence	Trouble
MAN	D-mannitol	1,28	Assimilation (MANNITOL)	Transparence	Trouble
NAG	N-acetyl-glucosamine	1,4	Assimilation (N-ACÉTYL-GLUCOSAMINE)	Transparence	Trouble
MAL	D-maltose	1,84	Assimilation (MALTOSE)	Transparence	Trouble
GNT	Potassium gluconate	0,78	Assimilation (potassium GLUCONATE)	Transparence	Trouble
CAP	Acide caprique	1,12	Assimilation (acide CAPRIQUE)	Transparence	Trouble
ADI	Acide adipique	1,56	Assimilation (acide ADIPIQUE)	Transparence	Trouble
MLT	Acide malique	2,28	Assimilation (MALIQUE)	Transparence	Trouble
CIT	Trisodium citrate	0,8	Assimilation (TRISODIUM CITRATE)	Transparence	Trouble
PAC	Acide phénylacétique		Assimilation (Acide PHÉNYLACÉTIQUE)	Transparence	Trouble



Figure N° 20 : La galerie API 20 NE

- **La lecture**

*La lecture de ces réactions se fait à l'aide du Tableau de lecture (Annexe), et l'identification est obtenue à l'aide du tableau d'identification (Annexe).

III -Test d'antagonisme

III -1-Test d'antagonisme in vitro

Ce test est effectué pour vérifier l'existence d'une éventuelle action inhibitrice des souches isolées vis-à-vis d'un agent phytopathogène: Le *Fusarium*.

Le milieu utilisé pour cette étude est le milieu PDA (Potato Dextrose Agar) qui est un milieu de culture propice pour la croissance d'une large gamme des champignons phytopathogènes à étudier.

- ✚ **Le milieu de culture**

Pour ce test, on utilise le milieu PDA (Composition dans l'annexe)

III -1-1-Test de double culture

Les 56 isolats , ont été étudiées in vitro contre le *Fusarium*.

-Le test d'antagonisme fongique été réalisé sur le milieu de culture solide (PDA)

- ✓ **La technique**

Un disque de 07 mm de diamètre d'un mycélium est prélevé à partir d'une culture fraîche de 6 jours à l'aide d'un embout, puis placé au centre de la boîte de Pétri contenant le milieu PDA (Potato Dextrose Agar) inoculé avec les cultures bactérienne étudiée. Le témoin est inoculé uniquement par le champignon à tester (Hariprasad *et al.*, 2009). Pour chaque boîte de pétri, on teste l'activité antifongique de 03 à 05 souches ; La distance entre les souches est de 02 à 03cm.

Cette confrontation des bactéries avec les champignons cryptogames est suivie pendant une semaine à température ambiante, la distance entre l'extrémité des colonies et celle

du mycélium fongique est alors mesurée, et est comparée au témoin ne contenant que le mycélium fongique

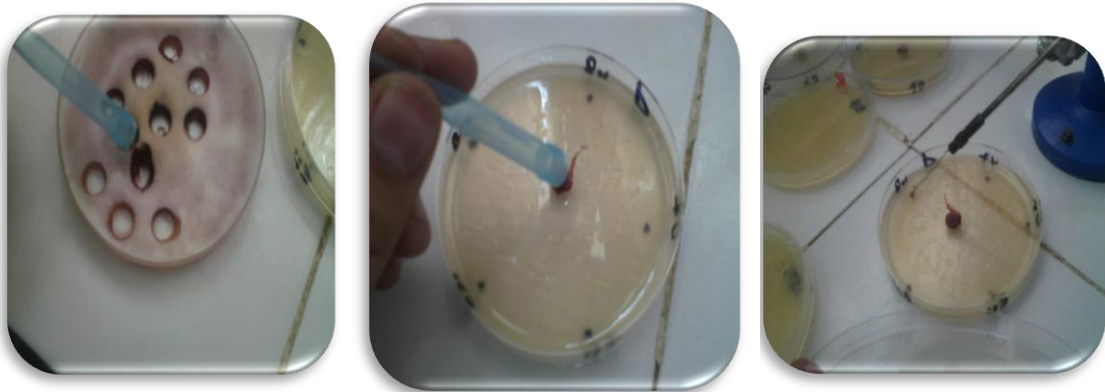


Figure N° 20: Préparation de la double culture

III -2-Test d'antagonisme *in planta*

III -2-1- Stérilisation du sol et boîtes :

- Stérilisation du Sol

- Prélever une grande quantité de sol à partir des champs de blé, et le tamiser à l'aide d'un tamis.

-Mettre le sol tamisé dans des bécards de 03L et les couvrir par un papier aluminium.

- La stérilisation du sol se fait dans l'autoclave à 120°C pendant 01heure.



Figure N° 21 : Des bécards contenant le sol .

- Stérilisation des boîtes :

- Prendre des boîtes en plastique et faire leurs stérilisation avec l'Ethanol une par une devant le bec benzène.

- Renverser les boites jusqu'à son séchage complet.



Figure N° 22 : La stérilisation des boites

- Placer le sol stérile dans les boites et les couvrir par le papier aluminium.



Figure N° 23 : Placement du sol dans les boites

III -2-2- Stérilisation et germination des graines de blé :

- **Stérilisation des graines**

- Prélever 04 ou 05 flacons, chaque flacon contient une quantité de graines de blé.

- Ajouter l'éthanol à chaque flacon et on laisse pendant 02 minutes.
- Verser l'éthanol et ajouter l'eau de Javel à chaque flacon et laisser agir pendant 15 min.
- Verser l'eau de Javel.
- Laver les grains par l'eau distillée stérile et répéter cette opération 10 fois.
- A la 11ème fois, ajouter l'eau distillée stérile dans chaque flacon et le laisser pendant 30 min jusqu'au le gonflement des graines.
- Puis, verser les graines dans un papier absorbant stérile pour égoutter ces dernières.



Figure N° 24 : La stérilisation des graines de blé

- **La germination des graines**

- Verser le King B préparé dans des boîtes de pétri devant le bec benzène et laisser les boîtes ouvertes (pendant 3min).
- Placer et séparer les graines dans les boîtes.
- Couvrir les boîtes par un papier aluminium.
- Conserver les boîtes dans un milieu convenable (température ambiante).



Figure N° 25 : La germination des graines de blé

III -2-3- Plantation des graines : (19/03/2014)

- Après la germination des grains, on les plante dans les boites qui contiennent le sol stérile, dans chaque boite, on dépose quatre graines . La plantation se fait devant le bec bunzen.

-Irriguer le sol par l'eau distillée stérile.



Figure N° 26: La plantation des graines de blé

III -2-4 -Préparation les inoculum de *Pseudomonas* et *Fusarium* :

✓ L'inoculum de *Pseudomonas* :

- Verser l'eau physiologique stérile dans 07 flacons stériles de 250 ml, pour faire 07 inoculum de bactéries parmi les bactéries identifiés.
- Inoculer chaque flacon par une souche bactérienne un par un.
- Incubation des flacons dans l'étuve 24 à 48 heures jusqu'à l'obtention d'une solution trouble et homogène.



Figure N° 27 : L'inoculum de *Pseudomonas fluorescens* après l'incubation

✓ L'inoculum de *Fusarium*

- Verser le milieu PDA liquide (500 ml) dans quatre flacons stériles de 250 ml.
- Les boîtes de pétri qui contient le *Fusarium* sont grattés par une spatule pour récupérer le maximum du matériel fongique, puis l'inoculer dans les flacons qui contient le PDA liquide.
- Incubation des flacons dans l'étuve pendant 05 à 07 jours.



Figure N° 28 : Préparation du l'inoculum de *Fusarium*

III -2-5- Inoculation des boîtes par *Pseudomonas* et *fusarium*

On a divisé les 100 boîtes en :

- 04 boîtes avec le champignon (*Fusarium*) et sans souches (*Pseudomonas fluorescens*).
- 07 boîtes avec les souches (*Pseudomonas fluorescens*). Chaque boîte est inoculée par une souche avec 04 répétitions pour chaque souche, donc on à 28 boîtes.
- 07 boîtes avec les souches bactériennes et avec le champignon avec 04 répétitions, donc on à 28 boîtes.
- Les autres boîtes restent comme des témoins
- Dans les boîtes qui contiennent les souches sans ou avec le champignon, chaque graine est inoculée avec 2mL de souche.-

--

Pour le champignon, l'inoculation se fait par pulvérisation.



Figure N° 29 : Inoculation des boîtes par *Pseudomonas fluorescens*



Figure N° 30 : Inoculation des boîtes par le champignon *Fusarium*

IV -Mesure le diamètre de croissance du mycélium fongique

✓ La technique

A l'aide d'un embout de 07mm, On coupe un échantillon de gélose qui contient le champignon et on le dépose aux centre d'une boîte de pétri qui contient le milieu PDA,

-On a 07 souches de *Fusarium*, pour chaque souche, on fait 02 répétitions.

-L'incubation des boîtes se fait dans l'étuve à 30°C pendant 07 jours, L'évolution de la croissance mycélienne est effectuée toutes les 24heures par la mesure du diamètre de la colonie mycélienne du champignon pathogène.



Figure N° 31 : Le test de croissance de mycélium fongique

V -Identification des souches de *Fusarium*

Dans le but d'identifier les isolats fongiques, plusieurs critères sont recherchés ;car sur les milieux de culture, les *Fusarium* forment des colonies duveteuses ou cotonneuses de couleur variable (blanche, crème, jaune, rose, rouge, violette ou lilas) selon les espèces. Le revers peut être crème, rouge à pourpre, lilas ou violet. Les pigments diffusent souvent dans la gélose (Chermette et Bussieras, 1993). Le principal caractère morphologique des *Fusarium* est la présence des macroconidies fusiformes et cloisonnées (Roquebert, 1998)

✓ La technique

- Déposer sur une lame une partie d'un échantillon fongique,
- Ajouter quelques gouttes de colorant lacto-fushine sur le frottis puis le recouvrir par une lamelle.
- Faire l'observation microscopique aux grossissements * 40 et *100.

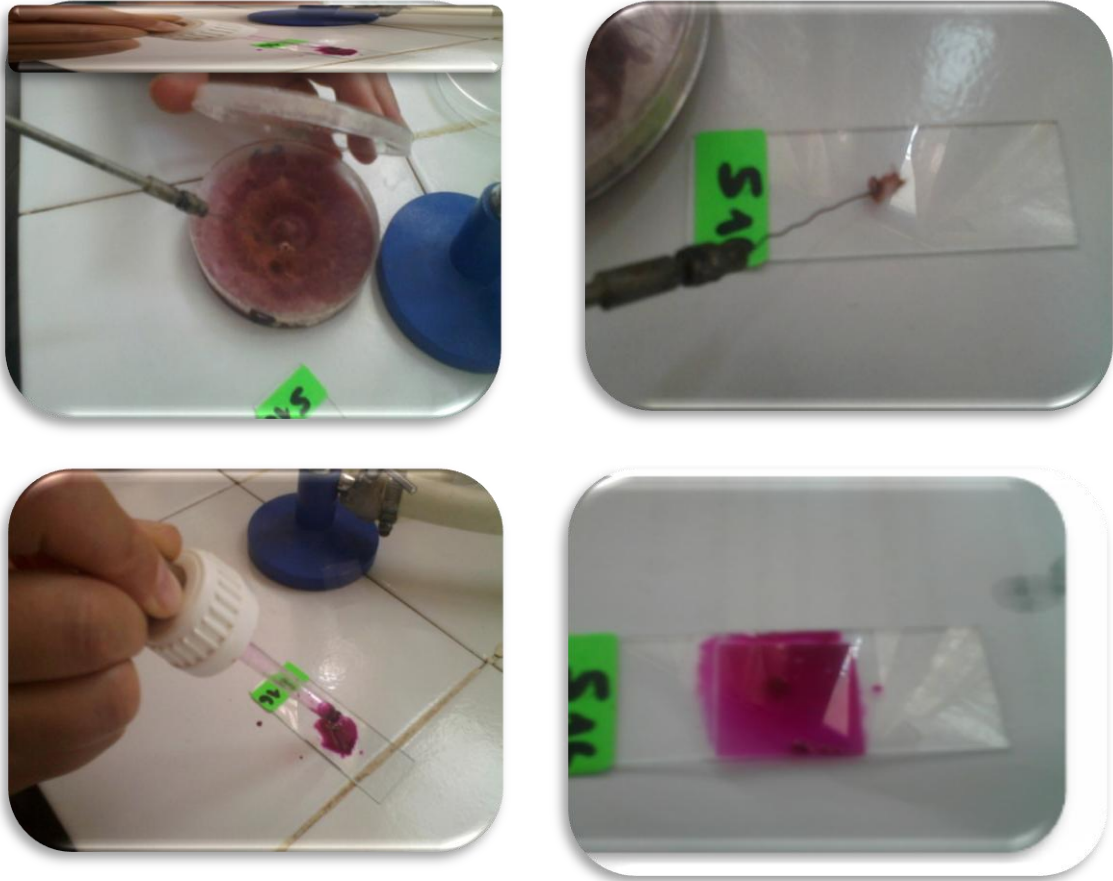


Figure N° 32 : Préparation d'un frottis fongique pour l'identification

Conclusion

Dans une première partie, l'isolement effectué nous a permis de sélectionner 60 souches bactériennes dont la plupart des isolats comme étant des *Pseudomonas fluorescens*, qu'ils ont les caractéristiques suivantes : Bacille Gram négatif produit un pigment fluorescent sur le milieu King B, oxydase positif, catalase positif, production de l'arginine déshydrogénase, croissance à 4°C et pas à 41°C, et la présence de flagelle (exprimé par la croissance sur milieu mannitol mobilité). Mais la caractérisation par les galeries montre qu'uniquement 6 isolats présentent l'espèce *Pseudomonas fluorescens*.

Dans une deuxième partie, le test antagoniste de nos isolats *in vitro* et *in vivo*, est en fonction de la production de substances antifongiques qu'on peut apprécier sur gélose, et par la stimulation de la croissance de plante.

Pour l'espèce de *Fusarium* isolé et responsable de la maladie de fusariose de blé appartient à l'espèce *Fusarium culmorum*.

Ces résultats montrent que nos isolats de *Pseudomonas fluorescens*, sélectionnés sur la base de leurs propriétés phénotypiques, métaboliques reconnus dans l'antagonisme peuvent constituer un moyen de lutte biologique efficace contre le *Fusarium* pour limiter l'utilisation des produits chimiques.

Pour l'identification des souches, l'analyse de l'ADN reste la seule technique qui permette une meilleure identification des isolats.

1- Résultats

I- Isolement des souches :

- Les colonies bactériennes isolées du sol sur milieu king B présentant l'aspect fluorescent sont observées sous UV a 365nm, (a fin de noter la présence ou l'absence de fluorescence) sont retenus, et nous ont permit la constitution d'une collection de 60 souches bactériennes fluorescentes.
- L'identification des isolats est déterminée à base de l'aspect phénotypique des colonies, de l'examen microscopique et des caractères biochimiques spéciaux, les résultats sont représentés dans Figure N° 34 .

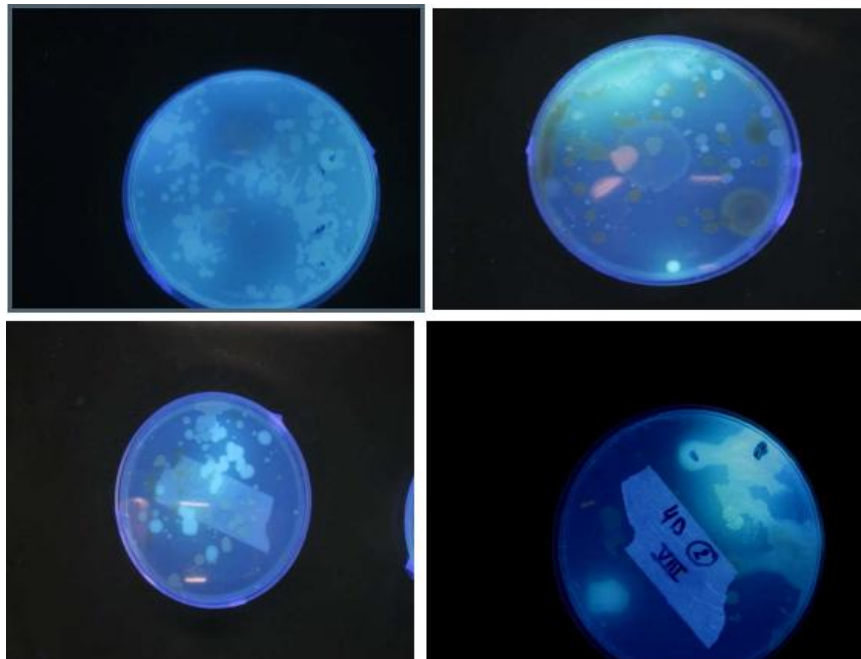


Figure N° 34: Photos d'isolement des bactéries à partir du sol.

❖ Aspect morphologique

Les colonies des souches bactériennes retenues sur le milieu King B, ont une coloration blanchâtre à crème, mais seulement 56 souches qui apparaissent fluorescentes sous UV, Après 48 heures d'incubation le diamètre des colonies se situe entre 01 et 03 mm et sont généralement abondantes. Les résultats sont représentés dans la photo ci dessous.

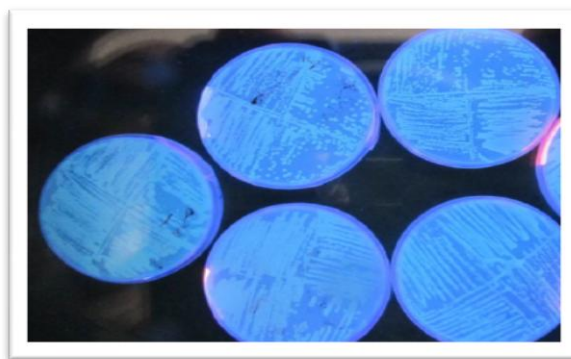


Figure N° 35 : Photo des souches sou UV

Après ce test, 4 souches sont éliminées (S3 .S31. S57. S60) car ne présentent pas l'aspect fluorescent.

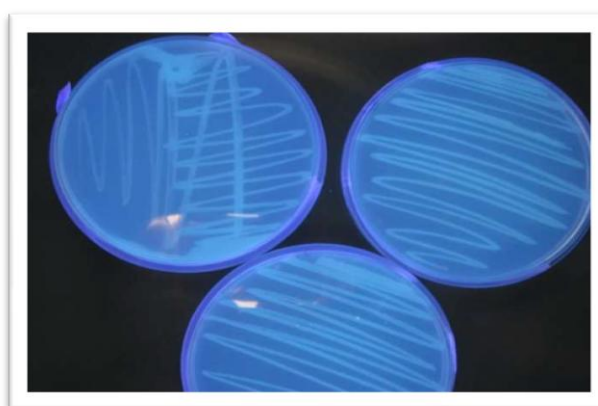


Figure N° 36 : Photo de repiquage des souches.

II- Caracterisation:

- ✓ L'étude microscopique : L'observation microscopique a été réalisée après une coloration de Gram des 60 souches. Les résultats obtenus sont présentés dans le tableau

-Tableau N° III : Résultats de la coloration de Gram des isolats purifiés.

Souche	Gram	Souche	Gram	Souche	Gram	Souche	Gram
S1	-	S16	-	S31	+	S46	-
S2	-	S17	-	S32	-	S47	-
S3	+	S18	-	S33	-	S48	-
S4	-	S19	-	S34	-	S49	-
S5	-	S20	-	S35	-	S50	-
S6	-	S21	-	S36	-	S51	-
S7	-	S22	-	S37	-	S52	-
S8	-	S23	-	S38	-	S53	-
S9	-	S24	-	S39	-	S54	-
S10	-	S25	-	S40	-	S55	-

S11	-	S26	-	S41	-	S56	-
S12	-	S27	-	S42	-	S57	+
S13	-	S28	-	S43	-	S58	-
S14	-	S29	-	S44	-	S59	-
S15	-	S30	-	S45	-	S60	+

L'observation microscopique après la coloration de Gram révèle que les 56 souches, sont bacilles à Gram négatif, et 4 souches sont des Gram positive (S3 .S31. S57. S60), Ce Résultat été confirmatif on le comparant avec la production de pigments de ses souches.

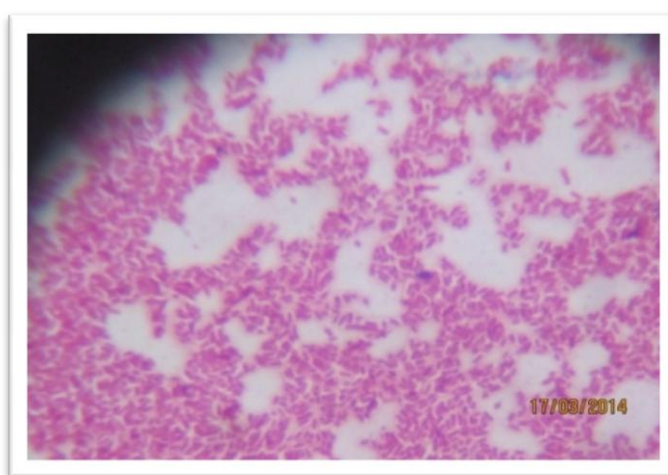


Figure N° 37 : Photo du Gram.

Les tests biochimiques.

Après la purification des 56 souches, les tests biochimiques réalisés sont :

- ✓ Recherche de l'oxydase: le test de l'oxydase considéré comme caractère taxonomique permettant de discriminer aisément les *Pseudomonas* fluorescents (Palleroni *et al.*, 1984; Jacques, 1994; Bossis, 1995), nous a permis de détecté une oxydase chez tout nos souches , le résultat est exprimé dans la photo suivante:(Figure N°38).



Figure N°38 : Photo du test d'oxydase.

- ✓ **Recherche de la catalase** : Une réaction catalase positive se traduit par l'apparition de bulles, suite au dégagement gazeux d'oxygène (Lévy *et al.*, 1992). Toutes les bactéries sont catalase positives. Le résultat est exprimé dans la photo.(Figure N°39).



Figure N°39: Photo du Test de la catalase.

- **Test Arginine déshydrogénase** : L'arginine représente une source d'azote intéressante dans les milieux riches en matière organique. Elle constitue une source d'énergie en aérobiose et en anaérobiose. La complexité du catabolisme de l'arginine révèle l'intérêt de ce substrat pour les microorganismes (Cunin *et al.*, 1986). La dégradation de l'arginine est une voie caractéristique des *Pseudomonas* spp. fluorescents saprophytes (Thornley, 1960).

*Les 56 souches testées donnent des résultats positifs. (Figure N°40) .

- Coloration Jaune : Il y a eu acidification du milieu liée à l'utilisation du glucose mais il n'y a pas eu réalcalinisation . Le substrat (arginine) n'a donc pas été dégradé alors La bactérie ne possède pas l'ADH
- Coloration violette : Il y a eu acidification du milieu liée à la fermentation du glucose puis il y eu réalcalinisation du milieu liée à la dégradation du substrat (arginine) par la bactérie alors La bactérie possède l'ADH.

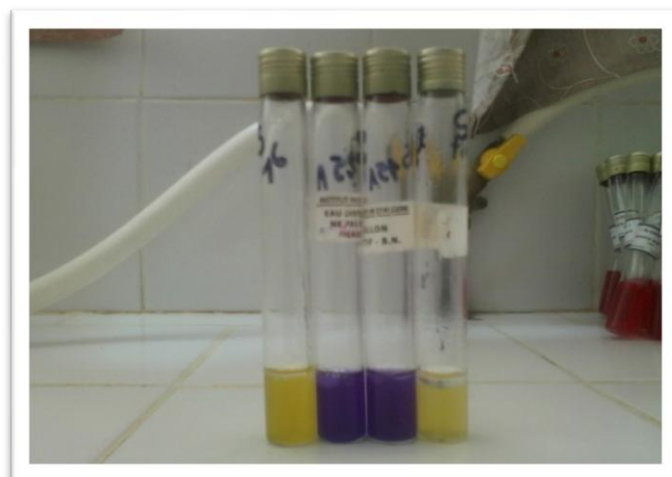


Figure N°40 : Résultat du test arginine déshydrogénase.

- ✓ **Test de lipase :** De nombreuses bactéries douées d'activité lipolytique et estérasique. Les graisses sont décomposées en acides gras et glycérol par une enzyme appelée la lipase. Les lipases sont des enzymes constitutives, extracellulaires, capables d'hydrolyser les lipides. Les souches lipase positif donnent la présence d'un halo opaque formé suite à la précipitation d'acides gras issus de la lipolyse (Degroot *et al.*, 1991). Tous nos souches testées donnent des résultats positifs ceci est exprimé par la photo. (Figure N°41).



Figure N°41 : Test positif de la lipase .

- ✓ **Recherche de la gélatinase :** La gélatinase ou collagénase est une protéase qui hydrolyse le collagène en acides aminés ou en peptides. La production de protéases extracellulaires, comme évidence l'hydrolyse de la gélatine, est une propriété universelle de *P. aeruginosa*, présente chez *P. fluorescens* mais absente chez *P. putida* (Stanier *et al.*, 1966).
- ✓ L'hydrolyse ou la liquéfaction de gélatine est montrée par un test dans lequel l'organisme se développe dans un milieu nutritif a solidifié par la gélatine. La gélatine nutritive est liquide uniquement à l'endroit de la pique fait par l'ance de platine, ceci indique que la gélatine a été hydrolysée par la bactérie.
Nos 38 souches bactériennes disposent d'une gélatinase et 18 souches ne disposent pas.



Figure N°42 : Résultat positif du test gélatinase.

- ✓ **Test Mannitol-Mobilité** : Le mannitol est un dérivé de réduction du mannose. La réduction des oses simples peut se faire sur les fonctions aldéhyde ou acétone : on obtient alors des polyalcools .Ce polyalcool peut être fermenté par la bactérie avec libération de produits acides qui font virer l'indicateur de pH du rouge en milieu basique au jaune en milieu acide. Donc : bactérie mannitol (+).
- La fermentation du mannitol a été observée chez 47 souches. Un virage de l'indicateur au jaune a également été noté. Ceci peut s'expliquer par le fait que l'acidification produite par les bactéries aérobies strictes.
 - En ce qui concerne la mobilité, les 56 isolats sont mobiles suite a leurs diffusion à partir de la ligne d'ensemencement, qui assure que nos 56 souches possèdent des flagelles .Les résultats sont représentés dans la photo.(Figure N°43).



mannitol(+)



mobilité (+)

Figure N°43 : Résultat de mannitol mobilité.

- ✓ **Croissance à la température de 4°C et 41°C** : Ce test est très important car il permet de différencier les bactéries psychrophiles (4°C) et de celles qui sont mésophiles (41°C). La croissance bactérienne est estimée par l'apparition des troubles dans l'eau physiologique. On observe si les souches poussent à ces températures ou pas.
- A partir des résultats obtenus, on distingue que nos souches sont capable de se multiplier à une basse température 4°C et uniquement 11 poussent a 41°C.



Figure N° 44: Photo de Culture à température 04 C°.



Figure N° 45 : Photo de test négatif à température 41 C°.

Les résultats des tests sont présentés dans le tableau N° 04

Tableau N 04 : Résultats des tests biochimiques réalisés.

Test souche	oxydase	catalase	Arginine déshydrogénase	Lipase	Gélatinase	Mannitol mobilite	T°4°c	T°41°C
S1	+	+	+	-	-	-/+++	+	-
S2	+	+	+	+	+	++	+	-
S3	+	+	+	-	+	-/+++	+	+

Résultats et discussions

S4	+	+	+	+	+	++	+	+
S5	+	+	+	-	+	++	+	+
S6	+	+	+	-	+	++	+	-
S7	+	+	+	+	-	++	+	-
S8	+	+	+	-	-	-/++	+	-
S9	+	+	+	-	-	-/+	+	-
S10	+	+	+	-	+	-/+	+	-
S11	+	+	+	-	+	++	+	-
S12	+	+	+	-	+	++	+	-
S13	+	+	+	-	+	++	+	-
S14	+	+	+	-	+	++	+	-
S15	+	+	+	-	+	++	+	-
S16	+	+	+	+	-	-/++	+	-
S17	+	+	+	-	+	++	+	-
S18	+	+	+	-	+	++	+	-
S19	+	+	+	-	+	++	+	-
S20	+	+	+	-	-	- /+	+	-
S21	+	+	+	+	+	++	+	-
S22	+	+	+	-	+	++	+	-
S23	+	+	+	-	+	-/+	+	-
S24	+	+	+	-	+	++	+	-
S25	+	+	+	-	-	++	+	-
S26	+	+	+	-	+	++	+	-
S27	+	+	+	-	+	-/+	+	-
S28	+	+	+	-	-	++	+	-
S29	+	+	+	-	+	++	+	-
S30	+	+	+	-	+	-/+	+	+
S31	+	+	+	-	-	-/+	+	-
S32	+	+	+	-	-	++	+	-
S33	+	+	+	-	-	++	+	-
S34	+	+	+	-	-	++	+	-
S35	+	+	+	-	-	++	+	-
S36	+	+	+	-	+	++	+	+
S37	+	+	+	-	+	-/++	+	-
S38	+	+	+	-	+	++	+	-
S39	+	+	+	-	+	++	+	-
S40	+	+	+	-	+	++	+	-
S41	+	+	+	-	+	++	+	+
S42	+	+	+	-	+	++	+	+
S43	+	+	+	-	+	++	+	-
S44	+	+	+	-	+	-/+	+	-
S45	+	+	+	-	-	++	+	-
S46	+	+	+	-	+	++	+	-
S47	+	+	+	-	-	++	+	-
S48	+	+	+	-	+	++	+	-
S49	+	+	+	-	-	++	+	-
S50	+	+	+	-	-	++	+	-
S51	+	+	+	+	+	-/+	+	-

S52	+	+	+	+	-	++	+	-
S53	+	+	+	+	+	++	+	+
S54	+	+	+	+	+	++	+	+
S55	+	+	+	-	+	++	+	+
S56	+	+	+	-	+	-+	+	-

- ❖ (+):Résultat positive .
- ❖ (-):Résultat négative .

III- Identification Par Les Galeries Api 20 NE :

L'utilisation de galeries API 20NE permettent généralement un diagnostic correct des espèces *P. aeruginosa*, *P. chlororaphis*, *P.fluorescens*, *P. plaida* et *P. stutzeri* (**Lacroix et al., 1995**).

Nos résultats avec cette identification montrent que nous disposons de 06 souches de *Pseudomonas fluorescens*, une *Pseudomonas aeruginosa* et une *Pseudomonas putida*, et les autres appartiennent à d'autres espèces.

L'utilisation de galerie permette d'identifier les *Pseudomonas*, mais l'analyse de l'ADN reste la seule technique qui permette une meilleure identification des isolats.

Tableau N 05 : Résultats identification Par Les Galeries Api 20 NE

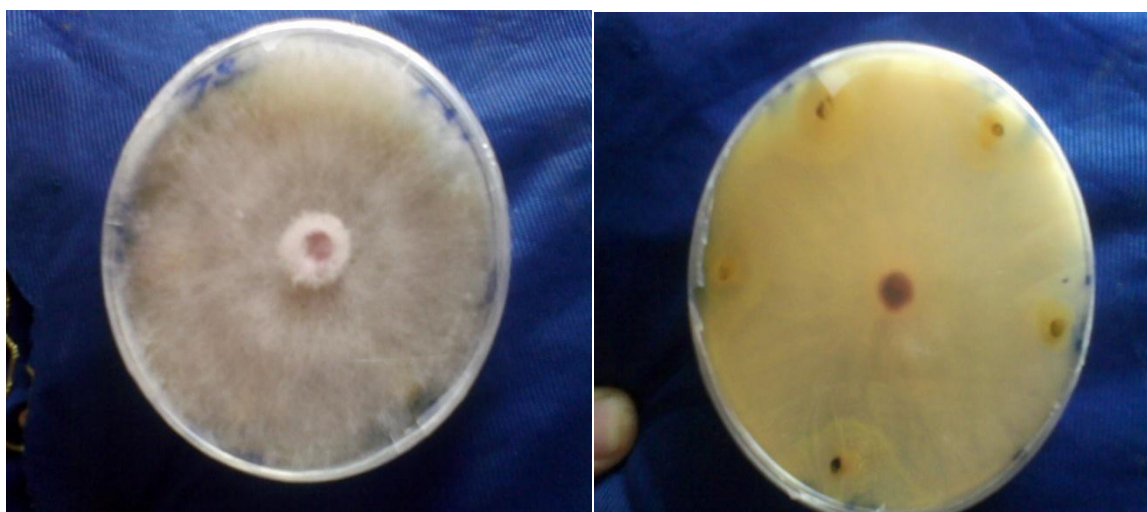
les testes:	les probabilités:	Résultat:	Appelation
1	0,994	EXC ID 0,86	PSEUDOMONAS FLURESCENS
2	0,693	PAS BON 0,09	CHRYSEOMONAS LUTEOLA
3	0,76	PAS BON 0,04	PSEUDOMONAS FLUORESCENS
4	0,693	PAS BON 0,09	CHRYSEOMONAS LUTEOLA
5	0,693	PAS BON 0,09	CHRYSEOMONAS LUTEOLA
6	0,693	PAS BON 0,09	CHRYSEOMONAS LUTEOLA
7	0,693	PAS BON 0,09	CHRYSEOMONAS LUTEOLA
8	0,693	PAS BON 0,09	CHRYSEOMONAS LUTEOLA
9	0,693	PAS BON 0,09	CHRYSEOMONAS LUTEOLA
10	0,693	PAS BON 0,09	CHRYSEOMONAS LUTEOLA
11	0,693	PAS BON 0,09	CHRYSEOMONAS LUTEOLA
12	0,693	PAS BON 0,09	CHRYSEOMONAS LUTEOLA
13	0,693	PAS BON 0,09	CHRYSEOMONAS LUTEOLA
14	0,693	PAS BON 0,09	CHRYSEOMONAS LUTEOLA
15	0,693	PAS BON 0,09	CHRYSEOMONAS LUTEOLA
16	0,693	PAS BON 0,09	CHRYSEOMONAS LUTEOLA
17	0,999	PAS BON 0,12	CHRYSEOMONAS LUTEOLA
18	0,693	PAS BON 0,09	CHRYSEOMONAS LUTEOLA
19	0,693	PAS BON 0,09	CHRYSEOMONAS LUTEOLA
20	0,693	PAS BON 0,09	CHRYSEOMONAS LUTEOLA
21	0,693	PAS BON 0,09	CHRYSEOMONAS LUTEOLA

22	0,693	PAS BON 0,09	CHRYSEOMONAS LUTEOLA
23	0,921	TB ID 0,64	PSEUDOMONAS FLUORESCENS
24	0,868	PAS BON 0,15	CHRYSEOMONAS LUTEOLA
25	0,873	PAS BON 0,25	BURKHOLDERIA CEPACIA
26	0,693	PAS BON 0,09	CHRYSEOMONAS LUTEOLA
27	0,693	PAS BON 0,09	CHRYSEOMONAS LUTEOLA
28	0,693	PAS BON 0,09	CHRYSEOMONAS LUTEOLA
29	0,693	PAS BON 0,09	CHRYSEOMONAS LUTEOLA
30	0,693	PAS BON 0,09	CHRYSEOMONAS LUTEOLA
31	0,967	BON ID 0,33	PSEUDOMONAS FLUORESCENS
32	0,354	PAS BON 0,6	SPHINGOBACTERIUM MULTIVORUM
33	0,846	PAS BON 0,33	AEROMONAS HYDROPHILAE/CAVIAE
34	0,693	PAS BON 0,09	CHRYSEOMONAS LUTEOLA
35	0,87 5	PAS BON 0,22	PSEUDOMONAS FLUORESCENS
36	0,69 3	PAS BON 0,09	CHRYSEOMONAS LUTEOLA
37	0,98 2	TB ID 0,70	PSEUDOMONAS PUTIDA
38	0,69 3	PAS BON 0,09	CHRYSEOMONAS LUTEOLA
39	0,98 2	BONNE ID 0,44	BURKHOLDERIA CEPACIA
40	0,97 6	BON ID 0,36	PSEUDOMONAS FLUORESCENS
41	0,69 3	PAS BON 0,09	CHRYSEOMONAS LUTEOLA
42	0,86 3	TB ID	PSEUDOMONAS AERUGINOSA
43	0,69 3	PAS BON 0,09	CHRYSEOMONAS LUTEOLA
44	0,69 3	PAS BON 0,09	CHRYSEOMONAS LUTEOLA
45	0,47 5	EXC ID 0,81	RALSTONIA PICKETTII
46	0,50 3	PAS BON 0,11	BURKHOLDERIA CEPACIA
47	0,89 9	PAS BON 0,15	BURKHOLDERIA CEPACIA

V- Test d'antagonisme

- ✓ **Test d'antagonisme *in vitro* (Test de double culture) :** Le pouvoir antagoniste a été testé par la mise en contact de nos isolats avec le champignon pathogène, a fin de voir l'inhibition de la croissance mycélienne de *Fusarium*. L'activité antagoniste de ces bactéries est en fonction de la production de substances antifongique qu'on peut apprécier sur gélose. Ces substances sont produites de manières constitutives observables sur PDA, où les colonies fongiques sont nettement colorées, et où la coloration est plus accentuée lors de confrontations fongiques à proximité du mycélium. En milieu de culture solide (PDA), 56 souches ont été testées pour leur pouvoir antagoniste.
- Deux isolats de *Fusarium* (souche S4 et S3) ont été confronté avec nos isolats bactériens, les observations ont portées sur l'existence ou l'absence d'une inhibition de la croissance mycélienne.

- Après 06 jours, les résultats obtenus, dans nos essais d'antagonisme *in vitro*, suggèrent que 11 isolats bactériens seulement ont montré une activité antagoniste appréciable sur la croissance de *Fusarium* (souche S4), alors que 45 souches ne présentent aucune activité. Les résultats sont représentés dans les photos (N° 46).
 - Alors que le test effectué avec la souche S3, a montré des résultats complètement différentes; 3 isolats seulement ne montrent pas l'effet antagoniste contre *Fusarium* (Photo N 47).
- ✚ Le tableau des résultats pour les deux tests se trouve en(annexe 3).



Recto

Verso

Figure N° 46: Résultat négatif de l'activité antifongique de nos souches contre *Fusarium*

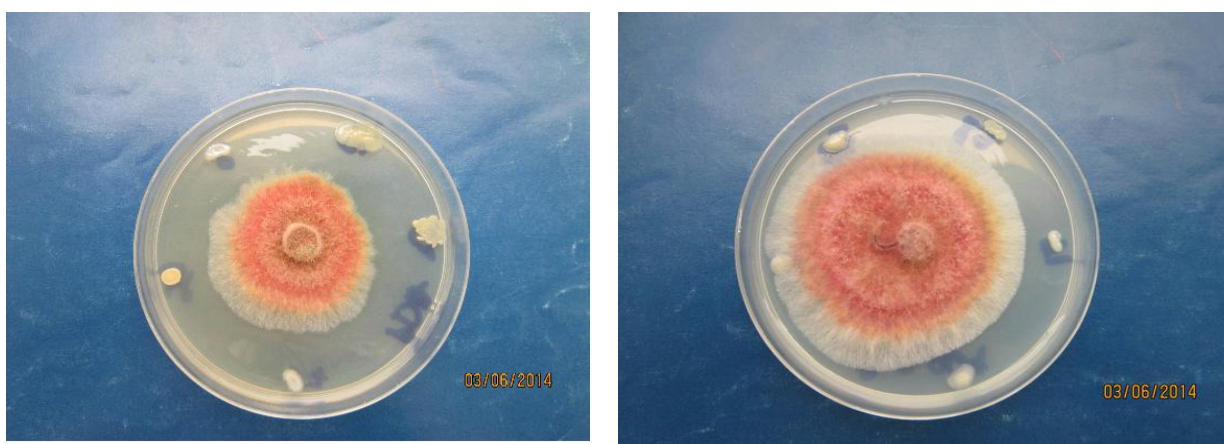


Figure N° 47 : Photos du résultat positif de l'activité antifongique.

- **Test d'antagonisme *in planta*** : comme expliqué dans matériels et méthodes, les plantes de blés sont divisés en Trois groupes, le premier étant le témoin, le deuxième été inoculer avec la souche et le champignon, le dernier uniquement inoculer par le champignon (Le test été réalisé avec la souche fongique S5).

-Après 11jours de la plantation, ont a mesuré la longueur des plantes de blé et les résultats exprimés se trouvent dans le tableau N°05

Tableau N°05: Résultats de moyenne de la longueur des plantes de blé pendant 44 jours.

souches jours	après 11 jours	Après 18 jours	Après 25 jours	Après 35 jours	Après 44 jours
Souches 05	17,53 cm	23,93 cm	25,90 cm	27,93 cm	34,10 cm
Souches 06	18,13 cm	27,23 cm	28,50 cm	28,80 cm	29,06 cm
Souches 08	17,5 cm	29,19 cm	29,36 cm	29,46 cm	31,43 cm
Souches 09	17,83 cm	25,40 cm	25,50 cm	30,30 cm	31,66 cm
Souches 10	19,73 cm	28,00 cm	28,36 cm	30,66 cm	31,37 cm
Souches 11	16,86 cm	25,00 cm	28,10 cm	28,23 cm	30,36 cm
Souches 12	16,93 cm	26,33 cm	26,50 cm	28,33 cm	29,40 cm
Les témoins	20,20 cm	31,67 cm	33,83 cm	35,20 cm	35,40 cm

- Les résultats des témoins comparer avec les autres boites inoculés avec les souches bactériennes et le champignon montrent que :
- ✓ La croissance des plantes de blé témoins, été plus rapide par rapport a celle des autres boites inoculés par les souches les premier jours.



Figure N° 48 : Plantes témoins.



Figure N°49: plantes inoculées par les souches bactériennes.

- ✓ Après 07 semaines, On observe un ralentissement de croissance des plantes témoins jusqu'à la mort de la plupart de ces plantes. Par contre, les plantes inoculées par les souches bactériennes continuent leur croissance, ceci indique que nos souches bactériennes stimulent la croissance des plantes de blé .Le tableau N°6 et les photos suivantes expriment ces résultats.

Tableau N°06 : Résultats de la longueur des plantes inoculés par *Pseudomonas fluorescens* après 07 semaines.

	la longueur (cm)			La moyenne
Souche 05	35	34	34,5	34,5
Souche 06	47,3	33	35	38,34
Souche 08	42,5	38	30	36,83
Souche 09	33	33,6	29	31,86
Souche 10	36,5	35,1	33	34,86
Souche 11	42	37	36,4	38,46



Figure N° 50 : Les Plantes témoins après 07 semaines.



Figure N°51 : Photos des plantes inoculées par les isolats après 07 semaines.

- Les plantes infectés par *Fusarium* avaient développé des flétrissements et la symptomatologie observée après deux semaines de l'inoculation du pathogène a montré des tâches brunes sur les feuilles.
- ❖ Avec la Souche 05,08, 10 : une moyenne stimulation de la croissance avec un effet moyen d'antagoniste contre *Fusarium*.
- ❖ Avec la Souche 06, 11 : Bonne stimulation de croissance avec une bonne effet antagoniste contre *Fusarium*.
- ❖ Avec Souche 09 : Faible stimulation de croissance avec effet antagoniste de *Fusarium* sur la culture de blé.
- ❖ Avec Souche 12 : Ni stimulation de la croissance ni effet antagoniste.



Figure N°5 : Effet de *Fusarium* sur les plantes témoins.



Figure N°53 : Effet de *Fusarium* sur les plantes inoculées par *Pseudomonas fluorescens*

➤ **Mesure le diamètre de croissance du mycélium fongique.**

Tableau N°07: Résultats des moyenne de mycélium fongique pendent 5Jours (d=0 ,7cm).

	Souches 1	Souches 2	Souches 3	Souches 4	Souches 5	Souches 6	Souches 7
Jours 1	1,85	1,15	1,65	1,05	1,20	0,95	1,25
Jours 2	04	1,85	2,50	2,10	2,85	2,55	2,95
Jours 3	6,25	3,25	4,90	4,20	5,30	4,10	4,80
Jours 4	7,75	4,80	6,90	6,20	7,55	5,55	6,20
Jours 5	8,20	6,05	8,00	7,90	8,20	6,45	7,65

- Les résultats illustrés dans le tableau précédent expriment le diamètre de croissance du mycélium fongique des 07 souches.
- La croissance des souches 01 et souches 05 sont plus rapide que les Souches 02, 03, 04, 06.

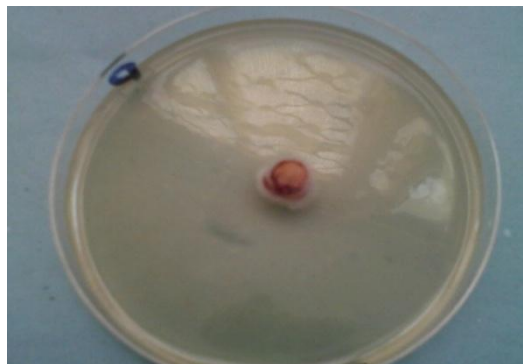


Figure N°54 : La croissance du mycélium fongique après aux premier jour

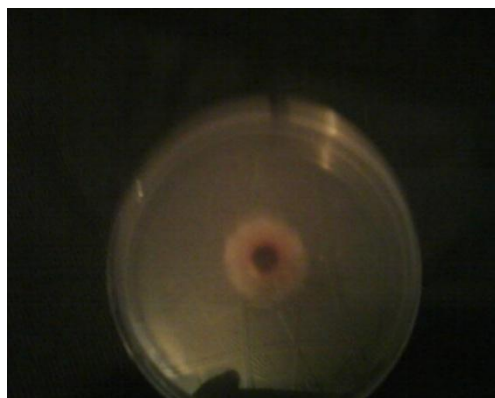


Figure N°55 : La croissance du mycélium fongique après 2jour.

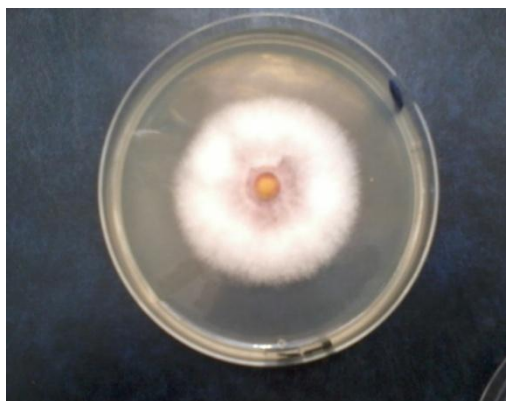


Figure N°56 : La croissance du mycélium fongique après 3jour.



Figure N°57 : La croissance du mycélium fongique après 04jours



Figure 58 : La croissance du mycélium fongique après 05 jours

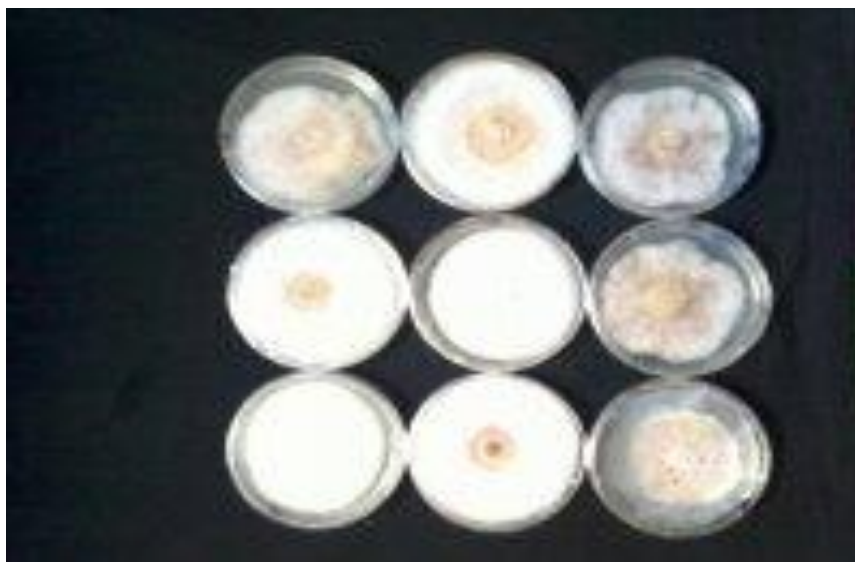


Figure 59: La croissance de 07 souches fongiques après 05 jours.

IV -Identification des souches de *Fusarium*.

Les isolements effectués à partir des échantillons du blé présentant les symptômes typiques de la fusariose, ont permis d'obtenir un total de 07 isolats. Après l'isolement de 07 souches de *Fusarium*, on a essayé d'identifier ces souches, Mais vu le temps réduit de mémoire, on a fait que l'identification d'une seule souche (La souche 01).

La caractérisation été basé sur les critères suivants :

- La taille et la forme des macroconidies.
- La présence ou l'absence des microconidies.
- L'aspect et la coloration du mycélium sur milieu PDA.
- La présence ou l'absence de chlamydospores.

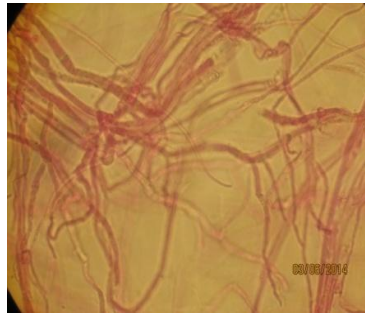
-L'aspect et la coloration du mycélium sur milieu PDA

L'isolat 01 : Sur milieu PDA, cet isolat donne des colonies de couleur qui vire du blanc vers le rose. Le mycélium est cotonneux, aérien et abondant devient rouge en contact avec le milieu, les macroconidies sont abondante. La présence de spores portées par les macroconidies est également observée, les microconidies sont absentes. Cette description correspond à l'espèce *Fusarium culmorum* selon Tousson et Nelsson (1976), Zi Ilinsky (1983) et Leslie et Summere II (2006).

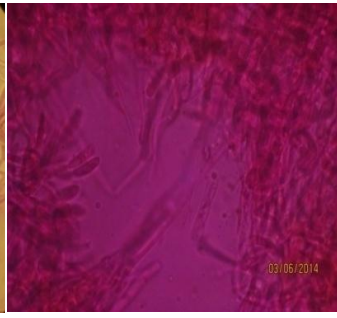
Ces résultats sont exprimés par la photo. (N°60).



***Macroconidies.**



*** Mycélium cloisoné.**



*** Conidiophore.**



*** la sporulation.**

Figure N°60: Résultats de l'observation microscopique des frottis fongiques.

A

- Alfano, J.R. and Collmer, A., 1997.** Type III (Hrp) secretion pathway of plant pathogenic bacteria: trafficking harpins, Avr proteins, and death. *J. Bacteriol.* **179**: 5655-5662.
- **Asran M.R., Buchenauer H.,** Pathogenicity of *Fusarium graminearum* isolates on maize (*Zea mays* L.) Cultivars and relation with deoxynivalenol and ergosterol
- Avril , J . L .Dabernat , H ., Den , F., and Morteil , H .,1992.**Bactériologie clinique.3^{ème} édition .Paris .P 265-268.

B

- **Bailey, Couture, Gossen , Gugel and Morrall ., 2004.** Maladies des grandes cultures au Canada. Éd. : La Société canadienne de Phytopathologie, 328 pp.
- Benhamou N., Rey P., Cherif M., Hockenhull J., and Tirilly Y., 1997.** Treatment with the mycoparasite *Pythium oligandrum* triggers induction of defence-related reactions in tomato roots when challenged with *Fusarium oxysporum* f. sp. *radicis- lycopersici*. *Phytopathology* **87**, p. 108–121.
- Berggren, I., van Vuurde, J.W.L. and Martensson, A.M., 2001.** Factors influencing the effect of deleterious *Pseudomonas putida* rhizobacteria on initial infection of pea roots by *Rhizobium leguminosarum* pv. *viceae*. *Appl. Soil Ecol.* **17**(2):97-106-
- Bloemberg, G.V. and Lugtenberg, B.J., 2001.** Molecular basis of plant growth promotion and biocontrol by rhizobia. *Current Opinion in Plant Biology*, **4**: 343-350.
- Bossis E., 1995.** Les Pseudomonas fluorescents de la rhizosphère : étude taxonomique et effets sur la croissance de la tomate et du maïs, de la germination à la levée, Thèse de doctorat, Université de Nantes, France, 143p.
- Bossis, E., Lemanceau, P., Latour, X. and Gardan, L., 2000.** The taxonomy of *Pseudomonas fluorescens* and *Pseudomonas putida*: current status and need for revision. *Agronomie* .**20**: 51-63.
- **Bouregghda Houda , Djeghmoum Chérifa , Bouroubi Nabila .(article en cours)** Etude de la croissance *in vitro* et de l'agressivité de quelques isolats de *Fusarium* spp. agent de la gale de l'épi et des pourritures racinaires du blé, Département de botanique-Institut National Agronomique (INA)-EI Harrach-Alger.
- Butkeraitis, P., Oliveira, C. A. F., Ledoux, D. R., Ogido, R., Albuquerque, R., Rosmaninho, J. F. & Rottinghaus, G. E ., 2004 .** Effect of dietary fumonisin B-1 on laying Japanese quail. *British Poultry Science* **45**, 798-801.

C

- Camille Dellarras ., 2007.** Micobiologie pratique pour le laboratoire .Edition médicale internationale.11,rue LavoisierF-75008. Paris. P 92-94,340,349
- Chandelier., A. and M.H. KESTEMONT., 2003.** *Le problème de la fusariose de l'épi et des mycotoxines en froment d'hiver : Etat des connaissances.* Livre Blanc "céréales" F.U.S.A et CRA-W Gembloux .
- Chapman, G.P., 2009.** Grass evolution and domestication,Grass evolution and domestication, xviii + 390 pp .
- **Chermette R., Bussieras J., 1993,** Parasitologie vétérinaire. Mycologie, Edité par le Service de Parasitologie de l'Ecole Nationale Vétérinaire de Maisons-Alfort.
- Chet, I., Ordentlich, A., Shapira, R. and Oppenheim, A., 1990.** Mechanisms of biocontrol of soil-borne plant pathogens by Rhizobacteria. *Plant and Soil*, **129**: 85-92
- **Chin-A-Woeng, T. F.C., Thomas-Oates, J. E., Lugtenberg, B. J.J. and Bloemberg, G. V., 2001.** Introduction of the phzH gene of *Pseudomonas chlororaphis* PCL1391 extends the range of biocontrol ability of phenazine-1-carboxylic acid-producing *Pseudomonas* spp. strains. *Mol. Plant-Microbe Interact.* **14**:1006-1015.
- Cunin, R., Glansdorff, N., Piérard, A. and Stalon, V., 1986.** Biosynthesis and metabolism of arginine in bacteria. *Microbiol. Rev.* **50**: 314-352.

D

- **de Weger, L.A., Dekkers, L.C., van der Bij, A.J. and Lugtenberg, B.L.L., 1994.** Use of phosphate-reporter bacteria to study phosphate limitation in the rhizosphere and in bulk soil. *Mol. Plant-Microbe Interact.* **7**: 32-38.
- Digat, B. and Gardan, L., 1987.** Caractérisation, variabilité et sélection des souches bénéfiques de *Pseudomonas fluorescens* et *Pseudomonas putida*. *Bull OEPP.* **17**: 559-568.
- Doguiet K. Denis Dalie ., 2010.** Biocontrôle des moisissures du genre *Fusarium* productrices de fumonisines par sélection de bactéries lactiques autochtones de maïs ,université de bordeau .p 01.
- **Doumbou C.L., Salove M.K., Crawford D.L. and Beaulieu C., 2001.** Actinomycetes, promising tools to control plant diseases and to promote plant growth. *Phytoprotection.* **82**, 85-1021.

- **Dubuis, C., Keel, C. and Haas, D., 2007.** Dialogues of root-colonizing biocontrol pseudomonads. Dans "New perspectives and approaches in plant growth-promoting rhizobacteria research", Lemanceau, P., Bakker, P.A.H.M., Raaijmakers, J.M., Bloemberg, G., Höfte, M. et Cooke, B.M. (Eds). Springer, Pays-Bas, p 311-328.

E

-**Eyquem, A., Alouf, J., Montagnier, L., 2000.** Traité de micro biologie Clinique .2ème édition .Peccin Nouval Libraria S.P.A, Padoue, Italie .P23-24, 37.

F

-**Feillet P. 2000.** Le grain de blé composition et utilisation. In: INRA Editions, Paris, France, 308p.

- **Fenton, A.M., Stephens, P.M., Crowley, J. O'Callaghan, M. and O'Gara, F., 1992.** Exploitation of gene(s) involved in 2,4-diacetylphloroglucinol biosynthesis to confer a new biocontrol capability to a *Pseudomonas* strain. *Appl. Environ. Microbiol.* **58**: 3873-3878.

G

- **Garbaye, J., 1994.** Helper bacteria: a new dimension to the mycorrhizal symbiosis. *New Phytol.* **128**: 197-210.

-**Gerard, Tortora., Berdell R, Funke., Christine, L Case., 2003.** Introduction à la microbiologie .Edition du Renouveau pédagogique Inc . Canada.P : 292, 336-337.

- **Ginard, M., Lalucat, J., Tummler, B., and Romling, U., 1997.** Genome organization of *Pseudomonas stutzeri* and resulting taxonomic and evolution ary considerations. *Int J Syst Bacteriol* **47**: 132-143

-**Grover, J.P., 2004.** Predation, competition, and nutrient recycling: a stoichiometric approach with multiple nutrients. *J. Theor. Biol.* **229**(1):31-43.

-**Gupta, S.S., 2003.** Chemotactic response of plant-growth-promoting bacteria towards roots of vesicular-arbuscular mycorrhizal tomato plants. *FEMS Microbiol. Ecol.* **45**(3):219-227.

H

Haas, D. and Keel, C., 2003. Regulation of antibiotic production in root-colonizing *Pseudomonas* spp. and relevance for biological control of plant disease. *Annu. Rev. Phytopathol.* **41**:117–153.

-Haas, D. and Defago, G., 2005. Biological control of soil-borne pathogens by fluorescent pseudomonads. *Nat. Rev. Microbiol.* **3**(4):307-319.

-Hariprasad, P., H.M. Navya, S. Chandranayaka, and S.R. Niranjana., 2009. Advantage of using PSIRB over PSRB and IRB to improve plant health of tomato. *Biol. Control.* **50**: 307-316

-Hazel, C. M. and Patel, S., 2004. Influence of processing on trichothecene levels. *Toxicology Letters* **153**, 51-59

-Höfte, M., and N. Altier., 2010. *Fluorescent Pseudomonas* as biocontrol agents for sustainable agricultural systems. *Res. Microbiol.* **161**: 464-471

-Höfte, M. and de Vos, P., 2006. Plant pathogenic *Pseudomonas* species. In: Plant-associated bacteria. Part. 3 Gnanamanickam, S.S. (Eds). Springer, Netherlands, pp.507-533.

- Holloway, B. W., 1992. *Pseudomonas* in the late twentieth century. In: *Pseudomonas*, Molecular Biology and Biotechnology (E Galli, S Silver, B Witholt,eds), Am Soc Microbiol, Washington, DC, 1-8.

I

-Isabelle Sick . 2010. La lutte biologique vers de nouveau équilibre biologique .Edition quae.26, B docteur petjean- BP Versailles .P107 -109

J

-Jacques, M. A., 1994. Écologie quantitative et physiologie de la communauté bactérienne épiphyllé de *Cichorium endivia* var. *latifolia* L. Thèse de doctorat, université de Paris-XI, Orsay, 123 p.

- Joffin J. N. et Leyral G., 2006. Microbiologie technique, Tome1 :Dictionnaire des techniques, 4ème édition. Edition CRDP d'aquitaine. P368.

-Jofre, E., Lagares, A. and Mori, G., 2004. Disruption of dTDP-rhamnose biosynthesis modifies lipopolysaccharide core, exopolysaccharide production, and root colonization in *Azospirillum brasilense*. *FEMS Microbiol. Lett.* **231**(2):267-275.

K

-**Kapulnik, Y ., 1996** .Plant Growth Promotion by Rhizosphère Bacteria .In Plant roots ,The Hidden Half. Eds .Y .Waisel , A .Eshel and U. Kafkati .Marcel Dekker, Inc .,New York . P 769,781

-**Karunaratne, A., Wezenberg, E. and Bullerman, L. B., 1990.** Inhibition of Mold Growth and Aflatoxin Production by *Lactobacillus* Spp. *Journal of Food Protection* **53**, 230-236.

-**Kent NL . and Evers AD., 1994.** *Technology of Cereals*. Oxford:PergamonPress Ltd.

-**Kerstens K., Ludwig W., Vancanneyt M., Devos P., Gillis M. and Schleifer K.H., 1996.** Recent changes in the classification of Pseudomonads: an overview. *Syst. Appl. Microbiol.* **19**: 465–477.

- **Kloepper, J.W., Leong, J., Teintze, M. and Schroth, M.N., 1980a.** Enhancing plant growth by siderophores produced by plant growth-promoting rhizobacteria. *Nature*, **286**: 885–886.

L

-**Lansing-M Prescott , John-P , Harley, and Donald-A Klein.2003.**Microbiologie,2ème édition française . Rue des Minimes 39, B-1000 Bruxelles .P503 .

-**Lepoivre P., 2003.** Phytopathologie: bases moléculaires de biologie des pathosystèmes et fondement des stratégies de lutte. De Boeck & Presses Agronomiques de Gembloux (Eds.), Brussels, Belgium, 149-167.

-**Leslie J.F., Summerell B.A., 2006.** The *Fusarium* laboratory Manual. Blackwell publishing, Ames, USA.388 p.

-**Lynch, J.M., 1990.**Microbial metabolites . In the rhizosphère , Eds. J . M. Lynch.Wiley series in Ecological and Applied Microbiology .P177, 206 .

M

-**Marchal N. and Bourdon J. L., 1982.** Les milieux de cultures pour l'isolement et l'identification biochimique des bactéries. Ed. Doin, Paris

-**Marttneau B., 1996.** Systématique bactérienne, Guide d'identification des bactéries aérobies. Edition Declarie ; Montréal.

- **Mercado-Blanco, J., and P.A.H.M. Bakker. 2007.** Interactions between plants and beneficial *Pseudomonas* spp.: exploiting bacterial traits for crop protection. *Antonie van Leeuwenhoek.* **92**: 367-389

-Miller, S. S., Chabot, D. and Ouellet, T., 2004. Use of a *Fusarium graminearum* strain transformed with green fluorescent protein to study infection in wheat (*Triticum aestivum*). *Canadian Journal of Plant Pathology* **26**, 453 - 463.

-Moore, E.R.B., B.J. Tindall, V.A.P. Martins Dos Santos, D.H. Pieper, J.L. Ramos, and N.J. Palleroni., 2006. Nonmedical: *Pseudomonas*, p.646-703. In M. Dworkin, S. Falkow, E. Rosenberg, K. H. Schleifer, et E. Stackebrandt (ed.), *Prokaryotes*, Springer, USA.

-Munaut, F. and Hove, F. v., 2004. Diversity in pathogenicity and mycotoxin production of the *Gibberella fujikuroi* group in the tropics. *Bulletin des Seances, Academie Royale des Sciences d'Outre- Mer* **50**, 127-139.

N

-Natsch, A., Keel, C., Pfirter, H.A., Haas, D. and Défago, G., 1994. Contribution of the global regulator gene *gacA* to persistence and dissemination of *Pseudomonas fluorescens* biocontrol strain CHAO introduced into soil microcosms. *Appl. Environ. Microbiol.* **60**, 2553-2560.

-Nelson P.E., Toussoun T.A., and Marasas W.F.O., 1983 . *Fusarium* species: an illustrated manual for identification. Pennsylvania state Univ. editor

-Nielsen, M.N., Sørensen, J., Fels, J. and Pedersen, H.C., 1998. Secondary metabolite- and endochitinase-dependent antagonism toward plant-pathogenic microfungi of *Pseudomonas fluorescens* isolates from sugar beet rhizosphere. *Appl. Environ. Microbiol.* **64**: 3563–3569.

-Nielsen, T.H., Christophersen, C., Anthoni, U. and Sorensen, J., 1999. Viscosinamide, a new cyclic depsipeptide with surfactant and antifungal properties produced by *Pseudomonas fluorescens* DR54. *J. Appl. Microbiol.* **87**: 80-90.

O

-Ogido, R., Oliveira, C. A. F., Ledoux, D. R., Rottinghaus, G. E., Correa, B., Butkeraitis, P., Reis, T. A., Goncales, E. and Albuquerque, R., 2004. Effects of prolonged administration of aflatoxin B-1 and fumonisin B-1 in laying Japanese quail. *Poultry Science* **83**, 1953-1958.

-Ongena, M Jacques, P.Delfosse, P. and Thonart ,P., 2002.Unusual traits of the pyoverdin- mediated iron acquisition system in pseudomonas putida strain BTP1.*Biometals*. 15(1):1-13

- O'Sullivan D.J. and O'gara F., 1992. Traits of fluorescent *Pseudomonas* spp. involved in suppression of plant root pathogens. *Microbiol. Rev.* **56**, 662-676.

P

- Palleroni, N.J., 1984. Genus I. *Pseudomonas* Migula 1894. In: Krieg, N.R., Holt, J.G.(Eds.), *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*, vol. I. Williams and Wilkins Co, Baltimore, USA, pp. 141–171.

-Palleroni, N.J., Kunisawa, R., Contopoulou, R. and Doudoroff, M., 1973. Nucleic acid homologies in the genus *Pseudomonas*. *Int. J. Syst. Bacteriol.* **23**: 333–339.

-Parry D. W., Jenkinson P. and McLeod L., 1995. *Fusarium* ear blight (scab) in small grain cerei- Review.*Plant Pathol.*44 : 207-238.

-Peix, A., Ramírez-Bahena, M.H. and Velázquez, E., 2009. Historical evolution and current status of the taxonomy of genus *Pseudomonas*. *Infect. Genet. Evolution*, **9**: 1132–1147

-Peypoux, F., Bonmatin, J. M. and Wallach, J. , 1999. Recent trends in the biochemistry of surfactin. *Appl. Environ Microbiol.* **51**(5):553-563.

R

-Rabhi Nour EL Houda ., 2011. Isolement de *Pseudomonas* spp. fluorescents d'un sol salé . Effet d'osmoprotecteurs naturels . Thèse de Magister de l'université Ferhat Abbes Sétif, Microbiologie , Génie microbiologique. P38.

-Ramos, J.L., 2004 .*Pseudomonas*. Kluwer Academic Publisher, New-York.

-Rebiere-Huet, J., Guerillon, J., Pimenta, A.L., Di Martino, P., Orange, N., and Hulen, C., 2002. Porins of *Pseudomonas fluorescens* MFO as fibronectin binding proteins. *FEMS MicrobiolLett* **215**: 121-126.

- **Roquebert M.F., 1998**, Taxonomie des moisissures ; Méthodes de culture et techniques d'observation ; Identification”, in “*Moisissures des aliments peu hydratés*”, Ed. Tec & Doc, 39-95

-**Ryu, D., Jackson, L. S. & Bullerman, L. B., 2002**. Effects of processing on zearalenone. *Advances in Experimental Medicine and Biology* **504**, 205-216

S

-**Sakthivel, N. and Gnanamanickal, S.S., 1987**. Evaluation of *Pseudomonas fluorescens* for Suppression of Sheath Rot Disease and for Enhancement of Grain Yields in Rice (*Oryza sativa* L.). *Appl. Environ. Microbiol.* **53**(9):2056-2059.

-**Sands , D.C. and Rovira, A.D., 1971**. Fluorescent Pseudomonads a Residual

- **Schaafsma, A. W., Tamburic-Ilinic, L., Miller, J. D. and Hooker, D. C. ,2001**. Agronomic considerations for reducing deoxynivalenol in wheat grain. *Canadian Journal of Plant Pathology* **23**, 279-285

-**Schmale , D. G., Arntsen, Q. A. and Bergstrom, G. C., 2005**. The forcible dischargedistance of ascospores of *Gibberella zeae*. *Canadian Journal of Plant Pathology* **27**, 376 - 383.

-**Seifert, K.A., 2001**. *Fusarium* anamorphic generic concepts. In: *Fusarium*. (Eds. Summerell B.A., Leslie J.F., Backhouse D., Bryden W.L. , Burgess L.W), APS Press St. Paul, USA.

-**Stanier, R.Y, Palleroni, N.J. and Doudoroff, M., 1966**. The aerobic pseudomonads, a taxonomic study. *J. Gen. Microbiol.* **43**: 159-271

-**Sutton J.C., 1982** .Epidemiology of wheat head blight and maize ear rot caused by *Fusarium graminearum*.*Canadian Journal of Plant Pathology*, **4**, 195-209.

T

-**Thangavelu R., Palaniswami A., and Velazhahan R., 2004**. Mass production of *Trichoderma harzianum* for managing fusarium wilt of banana, *Agriculture, Ecosystems and Environment*, Volume 103, Issue 1, P 259-263.

- **Thornley, M.J., 1960**. The differentiation of *Pseudomonas* from other gram-negative bacteria on the basis of arginine metabolism. *J. Appl. Bacteriol.* **23**: 37-52.

- Tran, S. T., Auvergne, A., Benard, G., Bailly, J. D., Tardieu, D., Babile, R. and Guerre, P., 2005. Chronic effects of fumonisin B-1 on ducks. *Poultry Science* **84**, 22-28.
- Thrane, U., 2001. Developments in the taxonomy of *Fusarium* species based on secondary metabolites. In : *Fusarium*. (Eds. Summerell B.A., Leslie J.F., Backhouse D., Bryden W.L., Burgess L.W.), APS Press St. Paul, USA.
- Tousson, T. A. and P. E. Nelson. 1976. A pictorial guide to the identification of *Fusarium* species. Pennsylvania State University Press, University Park 5 1 pp.

V

- Van Loon, L.C., 2007. Plant responses to plant growth-promoting rhizobacteria. *European Journal of Plant Pathology*, **119**: 243-254.
- Van Loon, L.C., Bakker, P.A.H.M. and Pieterse, C.M.J., 1998. Systemic resistance induced by rhizosphere bacteria. *Annual Review of Phytopathology* **36** : 453-483.
- Veselova, A., Klein, S.H., Bass, I.A., Lipasova, V.A., Metlitskaya, A.Z., Ovadis, M.I., Chernin, L.S. and Khmel, I.A., 2008. Quorum Sensing Systems of Regulation, Synthesis of Phenazine Antibiotics, and Antifungal Activity in Rhizospheric Bacterium *Pseudomonas chlororaphis* 449. *Rus. J. Genetics*, **44**: 1400–1408.
- Vidhyasekaran, P., Sethuraman, K., Rajappan, K. and Vasumathi K., 1997. Powder formulations of *Pseudomonas fluorescens* to control pigeonpea wilt. *Bio. Control*, **8**: 166–171
- Visca, P., Imperi, F. and Lamont, I.L., 2007. Pyoverdine siderophores: from biogenesis to biosignificance. *Trends Microbiol.* **15**: 22–30.

W

- Wagacha JM, Muthomi JW., 2007. *Fusarium culmorum*: Infection process, mechanisms of mycotoxin production and their role in pathogenesis in wheat. *Crop Protection* **26**, 877-885
- Weller, D.M. and Cook, R.J., 1983. Suppression of take-all of wheat by seed treatment with fluorescent pseudomonads. *Phytopathol.* **73**: 463–469.
- Weller, D.M., Raaijmakers, J.M., McSpadden Gardener, B.B. and Thomashow, L.S., 2002. Microbial populations responsible for specific soil suppressiveness to plant pathogens. *Annual Review of Phytopathology*, **40**: 309-348
- Weller, D.M., Landa, B.B., Mavrodi, O.V., Schroeder, K.L., de la Fuente, L., Blouin-Bankhead, S.B., Allende-Molar, R., Bonsall, R.F., Mavrodi, D.V. and Thomashow

Références bibliographiques

L.S., 2007. Role of 2,4-diacetylphloroglucinol-producing fluorescent *Pseudomonas* spp. in the defense of plant roots. *Plant Biology*, **9**: 4-20.

- **Whipps, J.M., 2001.** Microbial interactions and biocontrol in the rhizosphere. *Journal of Experimental Botany*, **52**: 487-511.

-Sites d'internet

- Site N°01:(<http://www.bact.wisc.edu/Bact303/MajorGroupsOfProkaryotes>)

-Site N°02:(http://web.mst.edu/~microbio/BIO22_2009/images_2009/Pseudomonas-1.jpg)

-Site N°03: (r0.unctad.org/infocomm/francais/ble/utilisat.htm)

-Site N°04 : (fr.wikipedia.org/wiki/Grain_de_blé)-

- Site N°05:

(http://www.gembloux.ulg.ac.be/pp/Phytopat/Partie4/Lutte_chimique/fiche/Fiche_Fusarium.htm)

- Site N° 06 : ([http //www.studyblue.com](http://www.studyblue.com))

-Site N° 07 : (http://www.physics.csbsju.edu/stats/chi_fit.html)

-Annexe 1:

Milieux de culture

- **Le king B:** (Camille Delarras, 2007).

-Peptone	20 g
- Glycérol	15 ml
- Sulfate de potassium	1,5 g
- Chlorure de magnésium	1,5 g
- Agar	20 g
-L'eau distillée	1000 ml

PH=6,8

-Milieu Moeller

-Extrait de levure	03 g
-L-arginine	05 g
-Glucose	01 g
-Bromocrésol pourpre	0,16 mg
-Éthanol	01 mL
-Chlorure de sodium	05 g
-L'eau distillée	1000 ml

PH = 6,8

Milieu de culture à la gélatine

Peptone	10 g
Extrait de viande	04 g
Na cl	2.5 g
Gélatine	120 g
Eau distillé	1000 ml

-Milieu Levane

-Sucre de table	50 g
-D- glucose	2.5 g
-Agar	20 g
-L'eau distillée	1000 ml

-Milieu de culture PDA (Potato Dextrose Agar)

-Pomme de terre	200 g
-Sucre de table	20 g
-D – Glucose	20 g
-Agar	20 g
L'eau distillée	1000 ml

-L'eau physiologique

Na cl	09 g
L'eau distillée	1000 ml


-Annexe 2:

-Tableau d'identification de la galerie API 20 NE .

API 20 NE	V7.0	NO3	TRP	GLU	ADH	URE	ESC	GEL	PNGP	GLUa	ARAa	MNEa	MANa	NAGa	MALa	GNTa	CAPa	ADLa	MLTa	CITa	PACa	OX	
<i>Achromobacter denitrificans</i>	93	0	0	0	1	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	1	86	20	96	99	94	93	100
<i>Achromobacter xylosoxidans</i>	81	0	0	1	0	0	1	0	0	99	0	30	1	1	1	100	81	94	99	98	96	100	
<i>Acinetobacter baumannii/calcoaceticus</i>	2	0	8	0	1	1	1	0	0	57	73	1	1	1	1	20	98	80	100	99	87	0	
<i>Acinetobacter haemolyticus</i>	1	0	14	0	0	0	0	96	0	1	0	0	0	0	0	0	99	2	99	81	1	0	
<i>Acinetobacter junii/johnsonii</i>	1	0	0	0	1	0	0	0	0	24	8	2	0	0	0	0	99	4	95	70	0	0	
<i>Acinetobacter lwoffii</i>	3	0	0	0	2	0	0	0	0	11	1	0	1	1	0	0	70	20	46	1	36	0	
<i>Acinetobacter radioresistens</i>	2	2	0	2	0	0	0	0	0	19	2	0	0	0	2	0	97	100	2	2	97	0	
<i>Aeromonas hydrophila/caviae</i>	99	89	99	78	1	89	97	98	99	80	78	99	99	99	99	95	84	1	99	37	1	99	
<i>Aer.salm.ssp masoucida/achromogenes</i>	100	21	9	0	0	2	33	0	66	0	33	50	2	21	2	0	0	0	2	0	0	100	
<i>Aeromonas testosteroni/Ps.alcaligenes</i>	100	0	57	35	0	100	99	18	84	1	0	96	84	99	99	0	1	99	1	0	0	100	
<i>Aeromonas salmonicida ssp salmonicida</i>	100	86	96	86	0	1	99	99	100	12	99	99	99	100	100	93	0	99	81	0	0	100	
<i>Alcaligenes faecalis 1</i>	1	0	0	0	0	0	1	0	1	0	0	0	0	0	0	0	3	77	100	97	38	0	
<i>Alcaligenes faecalis 2</i>	78	0	0	0	0	0	0	0	0	3	0	0	0	0	0	0	99	73	91	100	69	73	
<i>Bergeyella zoohelcum</i>	0	0	0	0	99	0	74	0	0	0	2	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	99	
<i>Bordetella avium</i>	0	0	0	0	0	0	0	0	0	4	0	0	0	0	0	0	0	99	100	100	100	95	
<i>Bordetella bronchiseptica</i>	76	0	0	0	96	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	5	94	85	91	80	100	
<i>Brevundimonas diminuta/Oligella urethralis</i>	1	0	1	0	1	1	0	0	1	0	1	0	0	0	0	0	2	1	99	33	0	100	
<i>Brevundimonas vesicularis</i>	16	0	0	0	0	98	12	34	72	1	1	3	10	72	1	1	1	1	40	0	0	98	
<i>Burkholderia cepacia</i>	39	0	24	1	1	46	70	72	100	75	99	96	99	8	97	99	93	100	99	99	91	0	
<i>Burkholderia pseudomallei</i>	100	0	0	98	0	5	100	0	100	0	99	100	100	0	100	100	99	100	99	94	100	0	
<i>Chromobacterium violaceum</i>	97	1	99	100	0	0	100	0	100	0	66	10	97	0	100	75	0	100	35	0	0	97	
<i>Chryseobacterium indologenes</i>	20	81	1	0	70	98	99	22	55	12	37	1	0	66	1	0	1	1	12	12	99	0	
<i>Chryseobacterium meningosepticum</i>	0	83	1	0	5	99	95	93	86	1	80	76	70	61	0	0	1	0	25	0	0	99	
<i>Comamonas testosteroni/Ps.alcaligenes</i>	75	0	0	6	4	0	4	1	11	3	3	4	1	2	42	55	38	87	32	3	98	0	
<i>Delftia acidovorans</i>	96	0	0	0	0	0	1	0	1	1	0	76	0	0	99	71	89	99	28	83	100	0	
<i>Grimontia holisae</i>	100	100	31	0	0	0	0	3	10	67	68	0	24	1	41	0	0	94	0	0	0	100	
<i>Mannheimia haemolytica / Pasteurella trehalosi</i>	95	0	2	0	0	2	0	85	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	85	
<i>Methylobacterium mesophilicum</i>	21	0	0	0	76	0	0	0	21	40	0	0	1	0	7	0	5	75	8	0	0	99	
<i>Moraxella lacunata</i>	90	0	0	0	0	0	99	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	9	1	0	1	99	
<i>Moraxella spp</i>	34	0	0	0	0	0	1	1	1	0	0	1	0	0	1	17	1	0	1	0	1	99	
<i>Myroides spp</i>	0	1	0	0	94	1	99	0	1	0	0	0	1	0	0	0	0	1	0	1	0	100	
<i>Ochrobactrum anthropi</i>	80	0	0	0	84	1	0	1	82	75	60	20	75	76	34	34	4	99	47	1	99	0	
<i>Oligella ureolytica</i>	71	0	0	0	99	0	0	0	1	0	0	0	0	0	1	1	1	95	95	26	96	0	
<i>Pasteurella aerogenes</i>	100	0	97	0	100	0	0	100	99	75	97	1	80	99	97	0	0	95	0	0	0	77	
<i>Pasteurella multocida</i>	96	96	1	0	0	0	0	10	1	0	2	1	1	2	1	0	1	1	0	0	0	86	
<i>Pasteurella pneumotropica</i>	100	61	26	0	85	0	0	83	6	1	6	0	6	3	6	0	1	6	0	0	0	84	
<i>Pasteurella spp</i>	96	1	2	2	1	1	1	4	19	1	1	1	1	1	1	0	1	13	1	0	0	87	
<i>Photobacterium damsela</i>	99	0	94	99	99	2	0	11	11	0	6	0	1	6	0	0	0	63	0	0	0	100	
<i>Plesiomonas shigelloides</i>	99	99	98	98	0	0	0	86	94	0	12	0	77	98	99	77	0	94	0	0	0	99	
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	96	0	0	80	20	1	92	1	99	1	1	89	84	1	97	98	91	98	99	1	98	0	
<i>Pseudomonas fluorescens</i>	27	0	0	80	1	1	39	1	99	71	97	89	85	1	99	99	10	99	99	16	99	0	
<i>Pseudomonas luteola</i>	78	0	13	71	1	100	30	98	99	99	88	12	76	85	62	1	94	94	1	2	0	0	
<i>Pseudomonas mendocina</i>	100	0	0	94	0	0	0	0	100	0	0	0	0	0	99	100	0	100	100	0	0	100	
<i>Pseudomonas oryzae/habitans</i>	0	0	0	0	1	0	11	1	100	99	99	100	0	84	99	88	2	99	99	0	1	0	
<i>Pseudomonas putida</i>	3	0	1	88	1	0	0	1	99	56	57	5	2	1	97	99	1	100	99	58	99	0	
<i>Pseudomonas stutzeri</i>	94	0	0	1	1	0	1	0	98	1	10	67	0	75	87	87	1	99	85	1	100	0	
<i>Psychrobacter phenylpyruvicus</i>	60	0	0	0	95	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	1	3	1	0	0	100	
<i>Ralstonia pickettii</i>	32	0	1	1	3	0	1	0	96	35	1	10	14	0	99	86	62	99	98	16	99	0	
<i>Rhizobium radiobacter</i>	98	0	0	0	65	99	1	99	100	100	100	99	99	90	2	0	100	0	0	0	1	99	
<i>Shewanella putrefaciens group</i>	96	0	1	0	1	71	95	0	6	11	0	0	95	10	1	71	1	90	2	0	0	100	
<i>Sphingobacterium multivorum</i>	0	0	1	0	95	100	1	99	99	91	99	0	99	99	0	0	0	1	0	0	0	99	
<i>Sphingobacterium spiritivorum</i>	0	0	0	0	1	100	0	100	100	1	99	10	100	100	0	0	0	0	0	0	0	99	
<i>Sphingomonas paucimobilis</i>	10	0	0	0	1	97	1	90	99	83	75	15	64	95	34	9	3	61	45	1	73	0	
<i>Stenotrophomonas maltophilia</i>	37	1	0	0	0	99	99	87	84	3	95	2	98	99	2	1	0	99	98	0	7	0	
<i>Vibrio alginolyticus</i>	98	93	93	0	0	65	91	10	76	1	18	75	57	74	76	1	0	99	1	0	99	0	
<i>Vibrio cholerae</i>	99	100	99	0	0	1	99	99	88	0	30	78	75	97	98	1	0	99	97	1	100	0	
<i>Vibrio metschnikovii</i>	0	50	64	0	0	7	100	50	100	0	71	99	99	99	99	17	0	99	50	0	0	0	
<i>Vibrio parahaemolyticus</i>	99	99	100	1	6	1	98	97	90	81	82	99	51	98	90	0	1	99	21	1	99	0	
<i>Vibrio vulnificus</i>	100	95	95	0	1	95	99	99	9	0	10	9	1	6	28	0	0	95	91	0	100	0	
<i>Wautersia paucula</i>	1	0	0	0	23	0	1	0	1	1	0	1	0	1	89	89	86	99	96	14	98	0	
<i>Weeksella virosa/Empedobacter brevis</i>	12	5	0	0	0	1	100	0	1	1	1	0	0	0	1	1	0	3	1	0	98	0	


✓ Vérifier la mobilité / Check the motility / Beweglichkeit überprüfen / Verificar la movilidad / Verificare la mobilità /

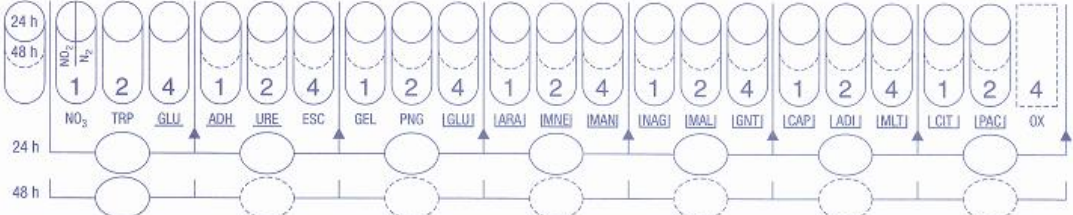
-Fiche d'identification de la galerie API 20 NE



REF : _____

Origine / Source / Herkunft /
 Origen / Origen / Προέλευση /
 Ursprung / Oprindelse / Pochodzenie :





Autres tests / Other tests / Andere Tests /
 Otras pruebas / Altri test / Outros testes /
 Άλλες εξετάσεις / Andra tester /
 Andere tests / Inne testy :

Ident. / Ταυτοποίηση :

-Annexe 3.**-Tableau des Résultats Test d'antagonisme *in vitro* (Test de double culture)**

isolats bacteriens	Test d'antagonisme <i>in vitro</i>		isolats bacteriens	Test d'antagonisme <i>in vitro</i>	
	<i>Fusarium</i> (souche S3)	<i>Fusarium</i> (souche S4)		<i>Fusarium</i> (souche S3)	<i>Fusarium</i> (souche S4)
Souche 01	+	+	Souche 29	+	+
Souche 02	+	+	Souche30	+	+
Souche 03	+	+	Souche31	+	+
Souche 04	+	+	Souche32	+	+
Souche 05	+	+	Souche33	+	+
Souche 06	+	+	Souche34	+	+
Souche 07	+	+	Souche35	+	+
Souche 08	+	+	Souche36	+	+
Souche 09	+	+	Souche37	+	+
Souche 10	+	-	Souche38	+	+
Souche 11	+	+	Souche39	+	+
Souche 12	+	+	Souche40	+	-
Souche 13	+	-	Souche41	+	+
Souche 14	+	+	Souche42	+	+
Souche 15	+	+	Souche43	+	+
Souche 16	+	-	Souche44	-	+
Souche 17	+	-	Souche45	+	+
Souche 18	+	-	Souche46	+	+
Souche 19	+	+	Souche47	+	-
Souche 20	+	+	Souche48	+	+
Souche 21	-	-	Souche49	+	+
Souche 22	+	+	Souche50	+	+
Souche 23	+	-	Souche51	+	+
Souche 24	+	+	Souche52	+	+
Souche 25	+	-	Souche53	+	+
Souche 26	+	+	Souche54	+	+
Souche 27	+	-	Souche55	-	+
Souche28	+	+	Souche56	+	+

❖ (+):Résultat positive de Test d'antagonisme *in vitro*.❖ (-):Résultat négative de Test d'antagonisme *in vitro*.

-Tableau des Résultats de la longueur(cm) des plantes de blé pendant 44 jours

souches Jours	Souche 05	Souche 06	Souche 08	Souche 09	Souche 10	Souche 11	Souche 12	Les témoins
	Après 11 jours	18,00	16,50	20,00	18,20	19,7	17,10	17,50
16,02		17,40	16,00	18,30	20,20	17,00	18,00	20,50
18,04		18,20	16,00	17,00	19,30	16,50	15,30	20,10
Après 18 jours	26,00	26,40	24,50	26,50	24,00	20,00	26,40	29,50
	24,50	28,30	28,20	28,50	26,50	24,50	25,60	30,00
	23,70	26,60	29,10	29,10	27,60	25,80	26,00	31,00
Après 25 jours	29,60	29,00	28,60	28,80	26,80	24,70	27,00	31,00
	27,20	30,00	29,00	30,00	28,00	27,50	26,70	31,80
	26,60	28,80	30,50	29,60	29,90	23,10	28,30	33,00
Après 35 jours	29,80	29,60	28,90	30,20	28,40	25,80	28,40	33,30
	28,40	30,10	31,00	30,10	27,20	28,40	26,9	34,00
	28,50	29,00	29,16	31,00	30,30	29,80	29,80	34,10
Après 44 jours	31,00	30,50	31,20	31,10	30,50	33,00	26,90	34,70
	37,00	30,00	33,00	30,40	31,90	29,90	29,90	25,50
	34,30	29,70	30,40	31,00	33,00	30,10	29,10	37,00

-Tableau des Résultats des diamètre de mycélième fongique pendente 5 Jours (d0=0,7cm)

Jours	Souche 1		Souche 2		Souche 3		Souche 4		Souche 5		Souche 6		Souche 7	
	B1	B2	B1	B2	B1	B2	B1	B2	B1	B2	B1	B2	B1	B2
Jours 1	2.3	1.4	1,1	1,2	02	1,3	1,1	01	1,3	1,1	0,9	01	1,2	1,3
Jours 2	4.3	3.7	02	1,7	2,5	2,5	02	2,2	2,7	03	2,5	2,6	3,1	2,8
Jours 3	6.6	5.9	03	3,5	4.9	4,9	4,2	4,2	05	5,6	04	4,2	4,9	4,7
Jours 4	7.7	7.8	5,2	4,4	07	6,8	6,2	6,2	8,1	07	5,6	5,5	6,2	6,2
Jours 5	8.2	8.2	6,2	5,9	08	08	7,9	7,9	8,3	8,3	6.4	6,5	7.6	7.7

B1 :Boite1**B2 :Boite2.**

الملخص

بعض الكائنات الدقيقة ، وفي المقام الأول البكتيريا، قادرون على استعمار على نحو فعال النظم الجذرية و التأثير عليها ايجابا من خلال تحفيزها على النمو و/ أو حمايتها ضد مسببات الأمراض النباتات . هذه البكتيريا يتم اخذها من ال ريزوسفير والتي تصنف تحت مجموعة PGPR, من بين هذه البكتيريا *Pseudomonas fluorescens* وخصوصا تعتبر هذه الاخيرة من المركبات البيولوجية للتربة الزراعية، وهي المسؤولة عن مكافحة الأمراض الفطرية في المحاصيل، وتحفيز نمو النباتات مثل القمح. يمكن للقمح ان يهاجم من قبل فطريات ممرضة من بينها *Fusarium* والذي يعتبر أكثر عدوانية و يتسبب في خسائر كبيرة . وتوجد أيضا PGPR على نطاق واسع بين عوامل مكافحة البيولوجية المحتملة لأنها تستخدم أكثر من آلية واحدة للقضاء على مسببات الأمراض والحد من انتشار الأمراض وهي : المنافسة، التضاد أو التطفل. في دراستنا عزلنا 60 سلالة من مجموعة *Pseudomonas spp fluorescents* . بعد الخصائص المورفولوجية والفسولوجية والبيوكيميائية، أظهرت ان 06 من ها *Pseudomonas fluorescens* . من دراستنا، فقد تبين أيضا أن هناك تأثير إيجابي لهذه السلالات المعزولة على زيادة ونمو نباتات القمح وأيضا تأثير عدائي ضد الفطريات الممرضة للنبات (*Fusarium*).

كلمات البحث: ريزوسفير، *Pseudomonas fluorescens* ، والقمح، *Fusarium* ، PGPR

Abstract

Some microorganisms, primarily bacteria, are able to effectively colonize the root systems and beneficially influence the plant growth stimulating and / or protecting against infections with plant pathogens. These rhizosphere bacteria are then listed under the term PGPR, among these bacteria the *Pseudomonas fluorescens*.

Pseudomonas fluorescens are considered as biological compounds agricultural land and are responsible for the control of fungal diseases in crops, and stimulate the growth of plants such as wheat.

Wheat can be attacked by the phytopathogenic fungus *Fusarium* is a soil fungus more aggressive, causing considerable yield losses.

PGPR are also widely found among potential biocontrol agents ,because they use more than one mechanism for the elimination of pathogens and reducing the incidence of diseases namely: competition, antibiosis or parasitism.

In our work, we have isolated 60 strains of *Pseudomonas* spp. fluorescents After morphological, physiological and biochemical characterization, we found that only 06 species have the *Pseudomonas fluorescens*.

From our study, it was also shown that there is a large positive effect of the bacteria *Pseudomonas fluorescens* on the increase and growth of wheat plants and also an antagonistic effect against the phytopathogenic fungus (*Fusarium*).

Key words: The rhizosphere, *Pseudomonas fluorescens*, Wheat, *Fusarium*, PGPR

Résumé

Résumé

Certains micro-organismes, principalement des bactéries, sont capables de coloniser efficacement les systèmes racinaires et influencent de manière bénéfique la plante en stimulant sa croissance et/ou en la protégeant contre les infections par des agents phytopathogènes. Ces bactéries de la rhizosphère sont alors reprises sous le terme PGPR (Plant Growth Promoting Rhizobactéria), parmi ces bactéries le genre *Pseudomonas* et essentiellement l'espèce *Pseudomonas fluorescens*.

Les *Pseudomonas fluorescens* sont considérées comme des composés biologiques du sol agricole, et sont responsable de la suppression des maladies fongiques dans les cultures, et stimulent la croissance des plantes comme le blé.

Le blé peut être attaqué par le champignon phytopathogène le *Fusarium* qui est un champignon tellurique plus agressif, causant des pertes de rendement considérables.

Les PGPR sont aussi largement retrouvées parmi les agents potentiels de lutte biologique puisqu'elles utilisent plus d'un mécanisme pour la suppression des pathogènes et la réduction de l'incidence des maladies à savoir : compétition, antibiose, ou parasitisme.

Dans notre travail, nous avons pu isoler 60 souches de *Pseudomonas* spp. fluorescents, après une caractérisation morphologique, physiologique et biochimique, la plupart de ces souches présentent l'espèce *Pseudomonas fluorescens* ; Mais la caractérisation par les galeries montre qu'uniquement 6 isolats présentent l'espèce *Pseudomonas fluorescens*, vue les mauvaises conditions du laboratoire .

A partir de notre étude, on a montré aussi qu'il ya un grand effet positif des bactéries de *Pseudomonas fluorescens* sur l'augmentation et la croissance des plantes de blé et aussi un effet antagoniste contre le champignon phytopathogène (*Le Fusarium*).

Mots clés : La rhizosphère, *Pseudomonas fluorescens*, le blé , *Le Fusarium* , PGPR ,

Nom et prénom	-AFOUFOU HABIBA -AGAGNA IMANE
Nature de diplôme	Master en biologie option : Microbiologie
Titre	Mise en évidence de <i>Pseudomonas fluorescens</i> à effet antagoniste contre la fusariose de blé
Résumé	<p>Certains micro-organismes, principalement des bactéries, sont capables de coloniser efficacement les systèmes racinaires et influencent de manière bénéfique la plante en stimulant sa croissance et/ou en la protégeant contre des infections par des agents phytopathogènes. Ces bactéries de la rhizosphère sont alors reprises sous le terme PGPR, parmi ces bactéries le genre <i>Pseudomonas</i> et essentiellement l'espèce <i>Pseudomonas fluorescens</i>.</p> <p>Les <i>Pseudomonas fluorescens</i> sont considérées comme des composés biologiques du sol agricole, et sont responsables de la suppression des maladies fongiques dans les cultures, et stimulent la croissance des plantes comme le blé.</p> <p>Le blé peut être attaqué par le champignon phytopathogène le <i>Fusarium</i> qui est un champignon tellurique plus agressif, causant des pertes de rendement considérables.</p> <p>Les PGPR sont aussi largement retrouvées parmi les agents potentiels de lutte biologique puisqu'elles utilisent plus d'un mécanisme pour la suppression des pathogènes et la réduction de l'incidence des maladies à savoir : compétition, antibiose, ou parasitisme.</p> <p>Dans notre travail, nous avons pu isoler 60 souches de <i>Pseudomonas</i> spp. fluorescents, Après une caractérisation morphologique, physiologique et biochimique, nous avons trouvé uniquement 56 qui présentent l'espèce <i>Pseudomonas fluorescens</i>. Mais la caractérisation par les galeries montre qu'uniquement 6 isolats présentent l'espèce <i>Pseudomonas fluorescens</i>.</p> <p>A partir de notre étude, on a montré aussi qu'il y a un grand effet positif des bactéries de <i>Pseudomonas fluorescens</i> sur l'augmentation et la croissance des plantes de blé et aussi un effet antagoniste contre le champignon phytopathogène (<i>Le Fusarium</i>).</p>
Mots clés	La rhizosphère , <i>Pseudomonas fluorescens</i> , Le blé , <i>Le Fusarium</i> , PGPR
Laboratoire de recherche	Laboratoire de biologie, Faculté des sciences de la nature et de la vie , Université Abbes Laghrour Khenchela
Membre de jury	-Président : LAABANI F/Z. -Promotrice : SEBIHI F/Z. -Examinatrice : CHORFI K.