



REPUBLIQUE ALGERINNE DEMOCRATIQUE ET POPULAIRE
MINISTERE DE L'ENSEIGNEMENT SUPERIEUR ET DE
LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE
UNIVERSITE ABBAS LAGHROUR KHENCHELA
INSTITUT DES SCIENCES DE LA NATURE ET DE LA VIE
DEPARTEMENT : DE BIOLOGIE

Mémoire

Présenté pour l'obtention du diplôme de Master II

En Microbiologie

TITRE

PURIFICATION DES SOUCHES DE
PSEUDOMONAS FLUORESCENS À EFFET
ANTAGONISTE CONTRE LA FUSARIOSE DE BLÉ

Devant le Jury :

-Président : Derouiche Faouzia
prof. Université Abbes Lagrou Khenchela

-Examineur :

*Ben Rdjem Lamia prof. Université Abbes Lagrou Khenchela

*Merabti Rima prof. Université Abbes Lagrou Khenchela

-Rapporteur : Sebihi F/Z prof. Université Abbes Lagrou Khenchela

Présenté par :

-Bourari Amel

-Hadji Siham

Année universitaire
2012/2013

Remerciements

En préambule à ce mémoire nous remerciant ALLAH qui nous aide et nous donne la patience et le courage durant ces longues années d'étude.

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 haute personnalité.

Nous remercions aussi très vivement, M^{lle} Derouiche Faouzia, Vous nos faites le grand honneur de présider ce jury. Nous vous prions de bien vouloir recevoir le témoignage de notre profond respect.

Un tout grand merci à M^{lle} MERABTI RYMA, et M^{lle} BEN RDJEM LAMIA ; Nous vous remercions de nos faire 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 CHORHI RAFIKA et toute l'équipe du laboratoire sans exception surtout Madame RIM pour leur 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

Dédicace

A ma très chère mère

Affable, honorable, aimable : Tu représentes pour moi le symbole de la bonté par excellence, la source de tendresse et l'exemple du dévouement qui n'a pas cessé de m'encourager et de prier pour moi.

Ta prière et ta bénédiction m'ont été d'un grand secours pour mener à bien mes études.

A mon Père

Aucune dédicace ne saurait exprimer l'amour, l'estime, le dévouement et le respect que j'ai toujours eu pour vous.

Rien au monde ne vaut les efforts fournis jour et nuit pour mon éducation et mon bien être.

Ce travail est le fruit de tes sacrifices que tu as consentis pour mon éducation et ma formation.

A mon très cher frère Saïd

Je te souhaite un avenir plein de joie, de bonheur, de réussite et de sérénité.

Je t'exprime à travers ce travail mes sentiments de fraternité et d'amour.

A mes sœurs : Hayet , Fairouz , Sadika , Sara , Bouchra et Barka .

A ma belle famille grands et petits ,sans oublier : Hassiba, Romaiissa, Samiha, Hadjer, Abd el hafidh, Imen, Nassira, Noura, Malek, Chahrazad, Yacin , Fatah, Ammar ,Hamza, Tariq,Nabil N, Salim , Zahia et toute la famille noubli

*A mes oncles, tantes, cousins et cousines.
Vous avez de près ou de loin contribué à ma formation.
Affectueuse reconnaissance*

A mes chères ami(e)s

Amel B , Soumia , Hanane , Kadidja , Ahlem , Radhia , Sakina , Manel , Dalila , Salima , Leila ,Nawel, Saidia , Souad ,Fahima , Walida , Yasmina ,Zainab et Amel S.

A mon amie d'enfance Khansa

A mes chers collègues

Nabil G et Djamel

A toutes mes amies

*A toute la promo de microbiologie
Ainsi qu'a tous ceux qui me sont chers*

Siham

DEDICACES

A mon 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 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.

A mes très chères sœurs

Rokja et Souha

Entémoignage de l'attachement, de l'amour et de l'affection que je porte pour vous. Je vous dédie ce travail avec tous mes vœux de bonheur, de santé et de réussite.

A mes très chers frères

Abdelhakim, Saber, et Bassim

J'ai beaucoup apprécié l'estime et l'amour fraternel que vous me portez. Que Dieu vous préserve.

A ma belle famille surtout mes grands pères SLIMANE ET HSSEN, mes grand mères HAFSSIA, LOUIZA, ZOUBIDA

A mes oncles, tantes, cousins et cousines.

A mes chères amies : Siham, Djalila, Amel, Rafika, Leila, Zakia, Djahida, Somia M, Lina, Fatima, Khadidja, Sara, Yasmina, Walida, Hanane, Somia Z, Je ne peux trouver les mots justes et sincères pour vous exprimer mon affection et mes pensées, vous êtes pour moi des sœurs et des amies sur qui je peux compter

A TOUTE MA FAMILLE

A TOUTES MES AMIES

A TOUS MES CAMARADES DE PROMOTION

AMEL

Liste des tableaux

Tableau N⁰ 01 : Résultats de l'étude microscopique des 20 souches purifiés	27.
Tableau N⁰ 02 :Résultats des tests biochimiques réalisés	29
Tableau N^o 03 :Résultats de tests de température 4⁰C et 41⁰ C	30.
Tableau N⁰ 04 : Résultats du test d'antagonisme fongique.....	36.

Liste des figures

Figure N° 01 : Photo de <i>Pseudomonas fluorescens</i>	03.
Figure N° 02 : Représentation schématique de la boucle de rétrocontrôle décrivant les interactions plantes microorganismes dans la rhizosphère.....	05.
Figure N° 03 : Morphologie du plant, de l'épi, de l'épillet et de la fleur du blé.....	07.
Figure N° 04 : Grains de blé sains et fusariés.....	09.
Figure N° 05:photos de la fusariose de l'épi.....	10.
Figure N° 06 : Boîtes de pétrie contenant le King B (a gauche), ensemencement (a droite).....	14.
Figure N° 07: Chambre noir à UV.....	15.
Figure N° 08 : Dépôt de gouttes d'eau oxygéné sur la lame puis dépôt de la colonie.....	17.
Figure N° 09 : Apparition de bulles d'oxygène (a gauche) et Pas d'apparition de bulles d'oxygène (a droite).....	17.
Figure N° 10 : Milieu Mannitol mobilité.....	18.
Figure N° 11 : Ensemencement du Mannitol mobilité.....	18.
Figure N° 12 : Ensemencement du gélatinase.....	19.
Figure N° 13 : Ensemencement de la lipase.....	20.
Figure N° 14 :Réaction de la levane.....	21.
Figure N° 15 : Milieu Arginine déshydrogénase.....	22.
Figure N° 16: Ensemencement du milieu Arginine déshydrogénase.....	22.
Figure N° 17 : Ensemencement de milieu King B pour faire le test de température.....	23.
Figure N° 18 : Préparation du PDA.....	24.
Figure N° 19 : Photo des souches sous UV.....	26.
Figure N°20 : Photo de repiquage des souches.....	27.
Figure N° 21 : Photos du gram.....	28.

Figure N° 22 : photo du Test de la catalase.....	30.
Figure N° 23 : Test de mobilité.....	31.
Figure N° 24 : Photo du test gélatinase.....	32.
Figure N° 25 : Test positif de la lipase.....	33.
Figure N° 26 : Photos du test de levane.....	34.
Figure N° 27 : Test d'arginine déshydrogénase.....	34.
Figure N° 28: Photo de Culture à la température de 4⁰ C.....	35.
Figure N° 29 : Photo de Culture à la température de 41⁰ C.....	35.
Figure N° 30 : Résultat positif de l'activité antifongique de nos souches contre Fusarium.....	36.
Figure N° 31: Résultat positif de l'activité antifongique de nos souches contre Fusarium.....	37.

Table des matières

Introduction.....	01.
-------------------	-----

Chapitre I : Synthèse Bibliographique

I-Généralité:

I-1- Genre <i>Pseudomonas</i>	03.
-------------------------------------	-----

I-2-Morphologie est structure.....	03.
------------------------------------	-----

I-3-Classification.....	03.
-------------------------	-----

I-4- <i>Pseudomonas fluorescens</i>	04.
---	-----

I-5- Une diversité taxonomique importante	04.
---	-----

I-6-Production de pigment.....	05.
--------------------------------	-----

II-Les <i>Pseudomonas</i> fluorescents agents de lutte biologique et de croissance des plantes.....	05.
---	-----

II-1-Capacités d'Antagonisme et stimulation de la croissance.....	06.
---	-----

II-2- Le blé.....	07.
-------------------	-----

II-3- Utilisations du blé	08.
---------------------------------	-----

II-4- Pathologies.....	09.
------------------------	-----

II-5- La fusariose	10.
--------------------------	-----

II-6-Fusarium.....	11.
--------------------	-----

II-7- Moyens de lutte contre Fusarium	12.
---	-----

-Pratiques culturales.....	12.
----------------------------	-----

- Utilisation de fongicides.....	12.
----------------------------------	-----

Chapitre II: Matériel et méthodes

I-Matériel :

I-1-Verreries et outils.....	13.
------------------------------	-----

I-2-Appareillage.....	13.
-----------------------	-----

II- Matériels biologique

II-1 -Souches de <i>Pseudomonas fluorescens</i>	14.
-Préparation de milieu de culture King B	14.
- Ensemencement des souches	15.
- Purification des souches	15.
- Conservation des souches	15.
III- Identification des souches purifiées	16.
III-1- Etude morphologique	16.
A-Aspect macroscopique	16.
B- Aspect microscopique	17.
Par la Coloration de Gram	17.
* Préparation et fixation des frottis	17.
*Technique de coloration	17.
III-2- Analyses biochimiques	17.
III-2-1-Recherche de la catalase	17.
*Technique	17.
III-2-2- Test Mannitol mobilité	19.
III-2-3- Recherche de gélatinase (Collagénase)	19.
*Milieu de culture gélatinase	20.
* Préparation	20.
*La technique	20.
III-2-4- Recherche de lipase	21.
*La technique	21.
III-2-4- Test de la levane	21.
* Préparation du milieu levane	22.
III-2-5- Test de l'arginine déshydrogénase	22.
* Milieu Arginine	22.

III-2-6- Test de la température de 4°C et 41°C.....	24.
III-2-7- Test d'antagonisme.....	24.
* Préparation du milieu de culture.....	24.

Chapitre III: Résultats et discussion

Résultats et discussions

1-Aspect morphologique.....	27.
2-L'étude microscopique.....	28.
3- Les tests biochimiques.....	29.
3-1- Recherche de la catalase	31.
3-2- Test Mannitol-Mobilité.....	32.
3-3-Recherche de la gélatinase	33.
3-4-Test de lipase.....	34.
3-5-Test de la levane.....	35.
3-6-Test Arginine déshydrogénase.....	35.
3-7-Croissance à la température de 4⁰C et 41⁰C.....	36.
4- Test d'antagonisme in vitro.....	37.
-Discussion générale.....	39.
Conclusion.....	40.
Référence bibliographiques.....	41.

Introduction

Introduction

Depuis plus d'un siècle, la compréhension des interactions plantes-microorganismes dans la rhizosphère a suscité l'intérêt de nombreux chercheurs. La rhizosphère est définie comme étant la zone de sol entourant la racine qui est directement ou indirectement influencée par cette dernière et qui présente une forte activité microbienne.

La rhizosphère constitue une bonne source de micro-organismes antagonistes potentiellement efficaces comme agents de lutte biologique puis qu'ils sont bien adaptés aux conditions du milieu et que dans certains cas, ils ont évolué avec la plante et sont capables de coloniser activement le système racinaire de celle-ci en présence d'une microflore compétitive.

L'effet bénéfique de certains micro-organismes ne se limite pas dans tous les cas à une réduction des dommages causés par des agents pathogènes. Certains micro-organismes peuvent également avoir un effet bénéfique sur la croissance et le développement de la plante hôte. Le terme PGPR (Plant growth- promoting rhizobacteria) est utilisé pour décrire les bactéries qui, lorsqu' ils sont introduits dans un sol contenant une microflore compétitive, ont un effet positif sur la croissance de la plante.

Les bactéries de du genre *Pseudomonas* sont connues pour leur activité antagoniste envers plusieurs phytopathogènes. Cette capacité d'inhibition peut se faire selon plusieurs mécanismes incluant la production d'une large gamme de métabolites antagonistes et de sidérophores. Ces derniers permettent de compétitionner farouchement pour l'acquisition du fer. Dans un milieu comme le sol où cet élément est présent en très faible quantité, cela peut nuire à la croissance saprophyte de plusieurs agents pathogènes et ainsi réduire la sévérité de la maladie. On note également pour certaines souches une capacité à induire les mécanismes de défense chez la plante. Mais dans la plupart des cas d'inhibition, le facteur déterminant est la production d'antibiotiques qui agissent directement sur l'agent pathogène.

L'objectif de notre travail est d'apporter un plus dans la lutte biologique par la mise en évidence de bactéries indigènes bénéfiques pour les plantes.

La stratégie d'étude de ce travail consiste à identifier et caractériser, à partir de la rhizosphère, une population bactérienne spécifique *Pseudomonas fluorescents* ; en évaluant leurs contributions dans la croissance et la santé de blé et tester in vitro leur capacité antagoniste contre les champignons pathogènes (*fusarium*).

chapitre I

Revue bibliographique

Synthèse bibliographique

I- Généralité

I- 1-Genre *Pseudomonas*

Le genre *Pseudomonas* est un grand groupe bactérien particulièrement important qui appartient à la sous-classe γ des protéobactéries et comprend plus d'une centaine d'espèces ubiquitaires (Bossis et al, 2000). Les *Pseudomonas* appartiennent au phylum des Proteobacteria, classe des Gammaproteobacteria, ordre des Pseudomonales.

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 *P. syringae* qui mettent en place des interactions pathogènes avec les plantes (Höfte et de Vos, 2006). Néanmoins, d'autres espèces de *Pseudomonas* sont capables de mettre en place des interactions mutualistes. Elles sont très largement représentées parmi les bactéries à effet PGPR qui ont un effet promoteur sur la croissance des plantes.

I- 2- Morphologie et structure

Ce sont des bacilles à Gram négatif, droits et fins, aux extrémités arrondies, d'une taille moyenne de 2 sur 0,5 μm (Palleroni, 1984). Ces bactéries sont mobiles grâce à une ou plusieurs flagelles polaires. Elles se cultivent sur des milieux usuels non enrichis et sont capables d'utiliser de nombreux substrats hydrocarbonés comme sources de carbone et d'énergie. Ils présentent un type respiratoire aérobie strict et un type métabolique chimio-organotrophe oxydatif. L'espèce-type du genre, *P. aeruginosa*, est mésophile tandis que la majorité des espèces sont psychrotrophes.

I- 3-Classification

En 1984, Palleroni et al, ont montré que le genre était génétiquement hétérogène avec l'existence de cinq groupes d'ARN distincts.

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. (Kersters et al, 1996).

Synthèse bibliographique

I- 4-Pseudomonas fluorescens

Les *Pseudomonas fluorescens* forment un groupe diversifié de bactéries qui peuvent généralement être distinguées visuellement des autres *Pseudomonas* par leur aptitude à produire un pigment jaune vert soluble dans l'eau qui sont les pyoverdines produites dans des milieux pauvres en fer. Se sont des bacilles à Gram négative (Gram-), non sporulés, mobiles avec un flagelle polaire, aérobies à métabolisme strictement respiratoire et chimioorganotrophes (Palleroni, 2008), sa température de croissance optimale se situe entre 20°C à 30°C, sa croissance à 42 et négative ; ce point est important par la différencier de *Pseudomonas aeruginosa*.

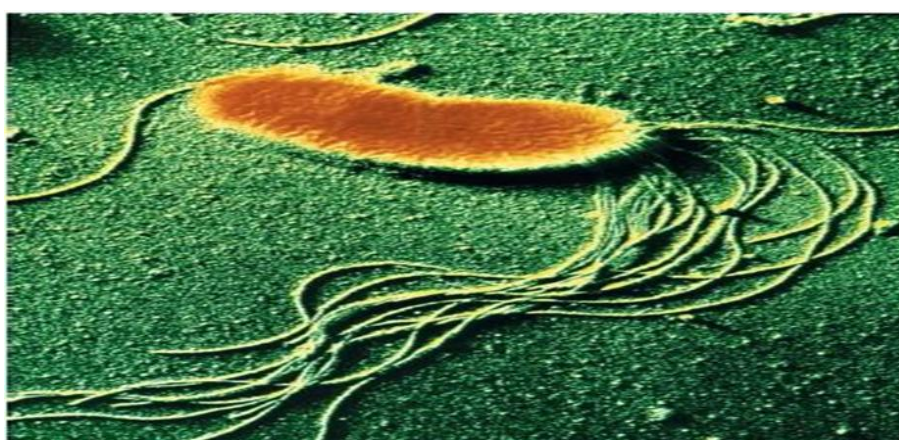


Figure N°01 : Photo de *Pseudomonas fluorescens*

(<http://microbiologyglossary.wikispaces.com/Pseudomonas+fluorescens>)

I- 5- 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).

Synthèse bibliographique

I- 6-Production de pigment

Les pyoverdines sont des pigments fluorescents sous UV, de couleur jaune-vert, solubles dans l'eau et insolubles dans le chloroforme. Elles jouent un rôle physiologique important car ce sont de puissants sidérophores. Elles sont constituées d'un chromophore quinoléique associé à des peptides dont la taille et la composition en acides aminés sont variables. La synthèse des pyoverdines dépend de la quantité de fer (Fe^{3+}) disponible dans le milieu de croissance et des besoins de la bactérie. Les pyoverdines sont ainsi synthétisées lorsque la concentration en fer libre dans le milieu est trop faible pour permettre la croissance bactérienne.(Bossis et al., 2000),

II-Les *Pseudomonas fluorescents* agents de lutte biologique et de croissance des plantes

Les *Pseudomonas* représentent une grande fraction de la communauté microbienne partageant leur milieu avec des commensaux représentant principalement les genres *Bacillus* et *Actinomyces*. On les retrouve sous tous les horizons, particulièrement sur les systèmes racinaires des plantes. Les différentes espèces de *Pseudomonas* qui colonisent la rhizosphère possèdent plusieurs caractéristiques intrinsèques qui les rendent particulièrement intéressantes pour une utilisation comme agents de lutte biologique. Premièrement, leur capacité à coloniser les racines et à y maintenir une forte densité de population est remarquable (Haas and Keel 2003). Cette grande rhizocompétence vient sans doute de leur taux de croissance plus élevé que celui de la plupart des autres rhizobactéries et de leur capacité à métaboliser efficacement plusieurs composés des exsudats racinaires (Chin-A-Woeng et al. 2002). De plus, ces bactéries sont très faciles à isoler et à cultiver au laboratoire et se prêtent aisément aux manipulations génétiques (Chin-A-Woeng et al. 2001).

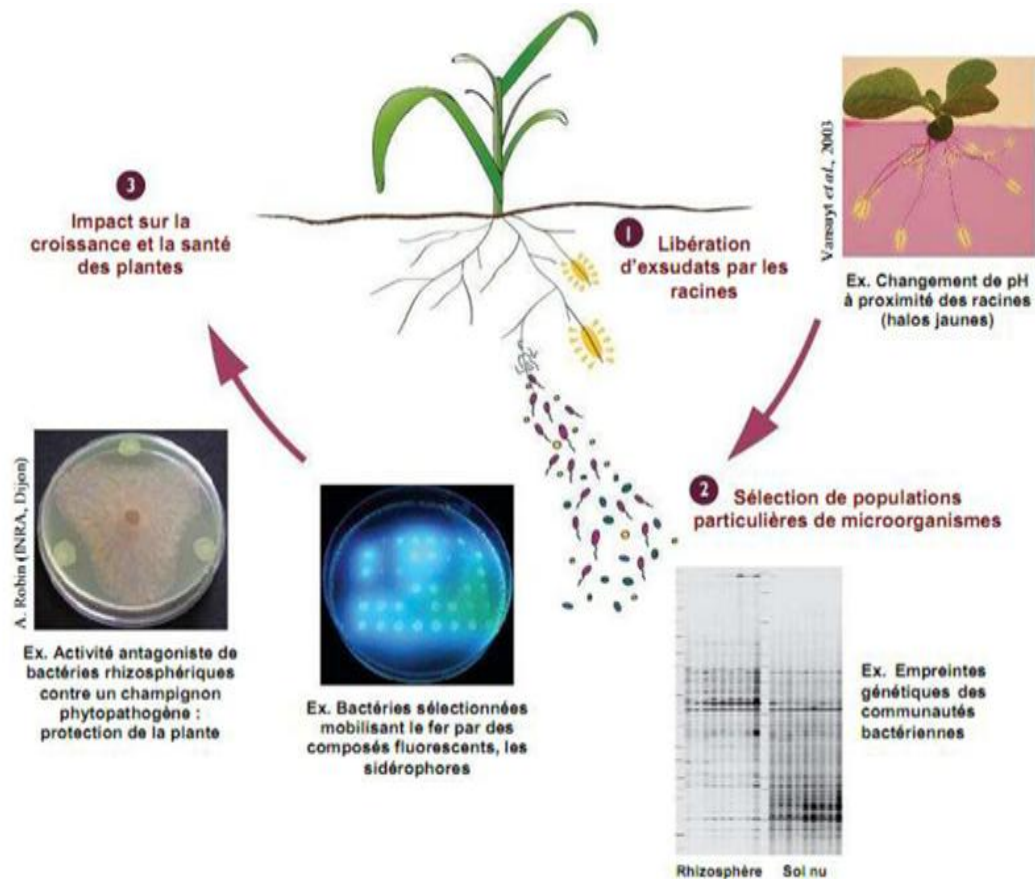


Figure N°02 : Représentation schématique de la boucle de rétrocontrôle décrivant les interactions plantes microorganismes dans la rhizosphère (Lemanceau et al. 2006).

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.

Elles sont très largement représentées parmi les bactéries à effet PGPR qui ont un effet promoteur sur 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 (Dubuis et al 2007)

II-1-Capacités d'Antagonisme et stimulation de la croissance

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.

Synthèse bibliographique

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.

Les mécanismes indirects utilisés par ces *Pseudomonas fluorescents*, comprennent la production d'antibiotiques contre des bactéries pathogènes (Thomashow et al, 1990), la réduction de fer disponible pour les phytopathogènes présents dans la rhizosphère (Scher et Baker, 1982), la synthèse d'enzymes dégradant les parois cellulaires fongiques et la compétition avec les microorganismes délétères pour les niches sur la plante.

Les mécanismes directs concernent, la séquestration du fer pour les plantes par les sidrophores. La production de phytohormones ou encore par solubilisation de formes de phosphore insolubles, rendant ainsi le phosphore biodisponible (Salisbury, 1994), et diminuer les taux d'éthylène produits par la plante (Glick et al 1999). Ces bactéries sont capable d'induire une résistance systémique contre un pathogène donné, et porte le nom d'ISR (Pieterse et al, 2001). Il est également reconnu que des bactéries de la mycorrhizosphère, encore appelées bactéries auxiliaires de la mycorrhization, stimulent sélectivement l'établissement de la symbiose ectomycorhizienne (Garbaye, 1994).

II-2-Le blé

Le blé constitue une céréale d'importance primordiale à travers le monde, d'un point de vue économique et en tant que denrées alimentaires pour l'homme.

Le blé est une monocotylédone de la famille des Poaceae appartenant au genre *Triticum*. Cette plante annuelle produit un fruit sec indéhiscant, le caryopse. Le blé tendre (*Triticum aestivum*) et le blé dur (*Triticum durum*) sont les deux espèces les plus cultivées dans le monde.(Chapman, 2009)

Les blés sont des plantes à feuilles alternes, formées d'une tige (chaume) portant un épi constitué de deux rangées d'épillets sessiles et aplatis (Feillet, 2000)

La taille du grain (de 5 à 7 mm de long, de 2,5 à 4 mm de large et de 2,5 à 3,5 mm d'épaisseur) et son poids (entre 20 et 50 mg) (Surget et Barron, 2005).

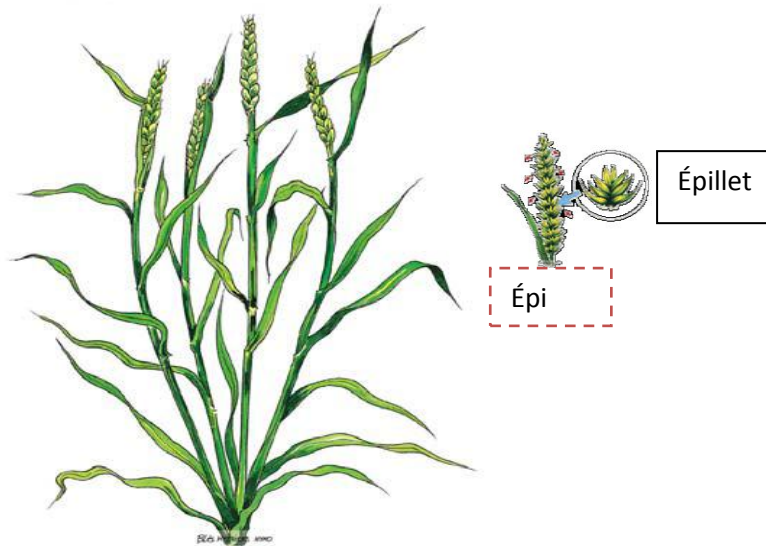


Figure N°03 : Morphologie du plant, de l'épi, de l'épillet et de la fleur du blé.

(http://www.hyno.com/ble_hybride/cadre_navigation.asp?rub=infotheque)

II-3-Utilisations du blé

Le blé fait partie des trois céréales les plus cultivées dans le monde avec le riz et le maïs. Le blé est principalement utilisé pour 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 et la viennoiserie. Les dérivés céréaliers entrent aussi dans la composition de nombreux produits non alimentaires tels les médicaments, les papiers, les textiles, les colles, les lessives, les peintures, les plastiques, et maintenant les biocarburants (les "carburants verts"). (Feillet, 2000).

Les différentes variétés de blé peuvent être classées d'un point de vue technologique selon la texture de leur albumen et leur teneur en protéines, caractéristiques qui conditionnent le rendement en farine ou en semoule lors de la première transformation et la qualité culinaire des produits de seconde transformation. Ces critères de classification sont sous l'influence, à la fois, de facteurs génétiques et environnementaux (Kent et Evers, 1994).

II-4-Pathologies

Un grand nombre de ravageurs du blé, incluant par exemple des limaces, des pucerons, des nématodes, des cécidomyies, des larves de tipules, peuvent avoir un impact plus ou moins important sur le rendement et la qualité des récoltes. Par exemple, la jaunisse nanisante de l'orge, qui peut également affecter le blé, est une maladie véhiculée par des pucerons, entraînant des anomalies des parties aériennes de la plante (au niveau de l'épi) ainsi que des malformations des grains. Les zabres sont des insectes dangereux à tous les stades de leur

Synthèse bibliographique

développement ; la larve remonte de la terre pendant la nuit et dévore les parties inférieures et tendres du pied de blé ; les adultes s'attaquent aux grains et peuvent causer de grandes pertes de production. Des ravageurs des récoltes stockées existent également, l'un des principaux exemples étant le charançon dont les larves rongent les grains. En plus des pertes de rendement, les insectes causent des blessures qui favorisent les infections fongiques (Sutton, 1982). De nombreuses maladies fongiques peuvent attaquer les différents organes du blé, à différents stades de son développement. On peut citer par exemple le piétin verse et le piétin échaudage (agent causal : *Gaeumannomyces graminis*), les septorioses (agents causal : *Septoria tritici*, *Septoriano durum*), la carie (agent causal : *Tilletia tritici*), l'oïdium (agents causal : *Erysiphe graminis*), le charbon nu (agent causal : *Ustilag otritici*), le charbon foliaire (agent causal: *Urocystisa gropyri*), les rouilles brune, noire et jaune (agent causal : Puccinia), les fusarioses (agent causal : Fusarium). Ces attaques peuvent occasionner des pertes importantes lorsque les variétés utilisées sont sensibles et que les conditions de l'environnement sont favorables à l'expansion des maladies. Les maladies fongiques ont une influence sur le rendement puisqu'elles contaminent pour certaines une partie de la feuille voire la totalité (ex : la septoriose) ce qui inhibe le rendement photosynthétique. Certaines maladies affectent les épis et les grains (ex : la carie, le charbon, la fusariose). 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).



Figure N°04 : Grains de blé sains et fusariés

(<http://www.cropdiseasescouncil.ca/>)

Synthèse bibliographique

II-5- La Fusariose

La fusariose est une maladie des céréales dites "à petits grains" qui sévit à travers le monde (Parry et al, 1995). Sous des conditions climatiques favorables, la fusariose peut attaquer à tous les stades de développement et tous les organes de la plante, depuis les racines jusqu'aux épis. 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 fontes des semis
- "Foot Rot" : fusariose du collet, entraînant la nécrose de ces tissus
- "Head Blight": fusariose de l'épi (Goswami et Kistler, 2004).

Le centre international pour l'amélioration du maïs et du blé ("International Maize and Wheat Improvement Center, CIMMYT") a identifié la fusariose comme un facteur majeur limitant la production de blé dans de nombreuses parties du monde (Goswami et Kistler, 2004).

L'importance économique de la fusariose est attribuée aux pertes de rendements considérables (avortement des fleurs, diminution du nombre et du poids des grains) et à l'altération de la qualité des grains (Pirgozliev et al, 2003). Les grains de blé fusariés sont petits, légers, ridés et parfois couverts d'un duvet blanc ou rose (figure 2) (Champeil et al. 2004)



.Figure N°05:photos de la fusariose de l'épi.

(<http://www.cropdiseasescouncil.ca/>)

II-6-Fusarium

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. (Samapundo et al, 2005b)

Les champignons du genre *Fusarium* sont des moisissures filamenteuses qui appartiennent à la classe des ascomycètes et à l'ordre des pyrénomycètes. Ces moisissures sont divisées en deux sections : *Discolor* et *Liseola*. (Laurent, 1998).

On distingue chez les espèces de *Fusarium* deux modes de reproduction : un mode asexué (anamorphe) conduisant à la production de conidies et ou de chlamydozoospores et un mode sexué (télémorphe) nécessitant dans la majeure partie des cas la présence de deux partenaires de types sexuels différents (hétérotallisme). (Leslie, 1995)

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 (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 (Tran et al, 2005).

II-7- Moyens de lutte contre Fusarium

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

-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

Synthèse bibliographique

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. De plus la culture de variétés résistantes est à privilégier.

-Utilisation de fongicides

De nombreux fongicides sont disponibles pour lutter contre les champignons. Pour empêcher la fonte des semis des céréales, les semenciers enrobent, lors du conditionnement, les graines de fongicide (captane ou thirame). La graine bénéficie alors d'une protection lors de la germination ainsi que lors du début de la croissance de la plantule. (Thangavelu et al, 2004).

chapitre II

Materiels et méthodes

I-MATERIELS

I-1-Verreries et outils

- Tubes
- Bécher de 1L
- Flacons 250 ml
- Eprouvette graduée de 1L et de 100 ml
- Lames et lamelles
- Fiole Jaugée de 1L
- Anse de platine
- Portoir pour tubes
- Barreaux magnétiques
- Bec bunsen
- Boites de Pétri
- Huile à immersion
- Spatule
- Pince
- Papier aluminium

I-2-Appareillage

- Autoclave
- Balance électronique de précision
- Etuve électrique
- Microscope optique
- Bain marée
- Chambre noire à UV
- Réfrigérateur
- PH mètre électronique

I-3-Matériels biologique

Souches de *Pseudomonas fluorescens*

Les souches bactériennes utilisées dans la partie pratique, sont obtenues à prés isolement à partir du sol des champs de blé. L'isolement a été effectué au laboratoire de biologie de l'université Abbas Laghrour Khenchela en Mai 2012.

-Préparation de milieu de culture : King B (Camille Delarras ,2007).

La composition	(g / L)
-Peptone	20 g
-Glycérol	15 ml
-Phosphate bipotassique anhydre (K_2HPO_4)	1,5 g
-Agar	20 g
-Sulfate de magnésium ($MgSO_4 \cdot 7H_2O$)	1,5 g
- L'eau distillée	1000 ml

PH 7,02 +/- 0,2

Matériels et méthodes

- Dissoudre les composants un par un en mélangeant, dans un bécher contenant 500 ml d'eau distillée.
- Agiter constamment le milieu sur un agitateur magnétique jusqu'à la dissolution complète des composants et l'obtention d'une solution homogène.
- Ajuster le PH du milieu avec le PH mètre.
- Compléter le volume jusqu'à 1000 ml avec de l'eau distillée avec l'agitation.
- Ajouter l'agar en dernier moment.
- Verser le milieu de culture dans des flacons de 250 ml.
- Autoclavage (120°C pendant 20 min).

Ensemencement des souches

Dans ce travail on utilise 20 souches isolées dans le laboratoire de l'Université de Khenchela. Le milieu de culture King B, réparti dans des boites de pétri, estensemencé par les souches bactérienne, à l'aide d'une anse de platine selon la méthode des quatre cadrons.

- L'incubation se fait à 30°C pendant une durée de 24 heures.



Figure N° 06: Boites de pétri contenant le King B (a gauche), ensemencement (a droite)

Purification des souches

Cette étape est indispensable pour avoir des souches bactériennes pures, car après isolement et conservation des souches pendant l'été, on risque d'avoir de souches contaminées, pour cela, après 24heures d'incubation, plusieurs repiquage sont effectué.

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).

Matériels et méthodes

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 a 48 heures. Les tubes dans lesquels il y a eu une croissance seront conservés à 4°C pour une durée de 24heures. (Marchal et Bourdon, 1982).

III-Identification des souches purifiées

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

III-1-Etude morphologique

A-Aspect macroscopique

C'est une description directe faite sur boites d'isolement, permettant au moins une distinction des souches les unes des autres à fin de les purifier.

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

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

-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.



Figure N° 07: Chambre noir à UV

Matériels et méthodes

B-Aspect microscopique

L'observation microscopique permet de faire une étude morphologique des cellules d'une espèce bactérienne. Elle comprend :

Coloration de Gram

C'est une double coloration qui nous permet de connaître la forme, l'arrangement, la pureté ainsi que la nature biochimique de la paroi des cellules purifiées. Cette coloration est réalisée systématiquement sur les différentes colonies purifiées pour préciser le caractère Gram+ou Gram-. Avec cette coloration double, les bactéries Gram positive apparaissent en violet foncé tandis que les bactéries Gram négatives sont colorées en rose ou en rouge (Marchal et Bourdon, 1982).

- Préparation et fixation des frottis

- Mettre une goutte d'eau distillée à l'aide d'une pipette pasteur au centre de la lame,
- Prélevé une colonie à partir des colonies sélectionnées distinctement les unes de autres selon la forme.
- Dépose la colonie sur la lame et le faire homogénéisé sur la goutte de l'eau,
- Faire sécher complètement.

- Technique de coloration

- Recouvrir au violet de Gentiane pendant 1min ;
- Eliminer l'excès par l'eau distillés ;
- Ajouter du Lugol : et laisser agir 20 secondes, jeter l'excès par l'eau distillés;
- Décoloration avec mélange d'éthanol-acétone pendant 30 secondes, puis rincé à l'eau;
- Recolorer à la Fuschine pendant 1 minute, rincé à l'eau puis sécher;

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

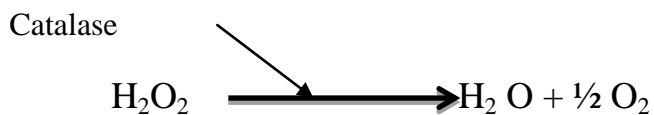
III-2- Analyses biochimiques

Les épreuves biochimiques permettent en général de distinguer les espèces, même étroitement apparentées entre elles (Tortora et al, 2003). Cette approche nous oriente sur le métabolisme suivit par les bactéries et les enzymes qu'elles possèdent.

Matériels et méthodes

III-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:



Technique

- Déposer sur une lame une goutte d'eau oxygénée sur une lame, comme est illustré dans les figures si après.
- Prélever dans la zone d'asepsie une colonie à l'aide d'une anse de platine.
- Déposer la colonie dans la goutte d'eau oxygénée. (Marchal et Bourdon , 1982).

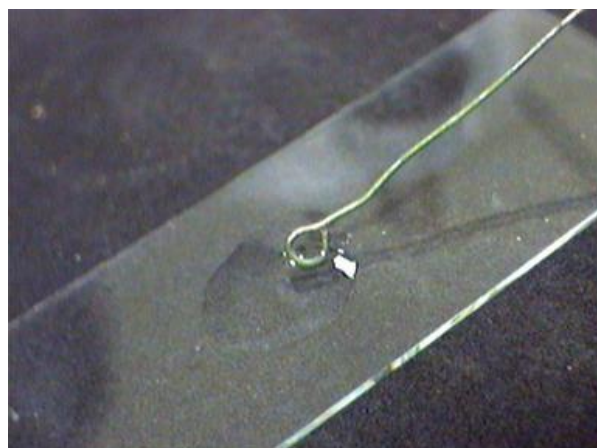
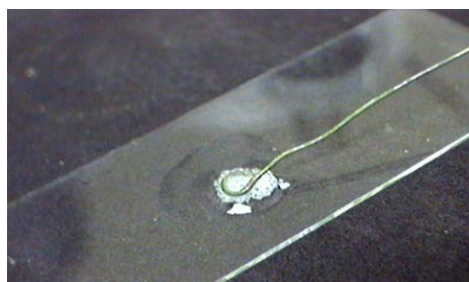


Figure N° 08 : Dépôt de gouttes d'eau oxygénéé sur la lame puis dépôt de la colonie.

Lecture



Catalase+

Catalase –

Figure N° 09 : Apparition de bulles d'oxygène (a gauche) et Pas d'apparition de bulles d'oxygène (a droite)

Matériels et méthodes

III-2-2- 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° 10: Milieu Mannitol mobilité

Ensemencer le milieu mannitol par piqure centrale à l'aide d'une pipette pasteur chargée de culture à étudier. Incuber à 30°C, pendant 24 heures à 48 heures.

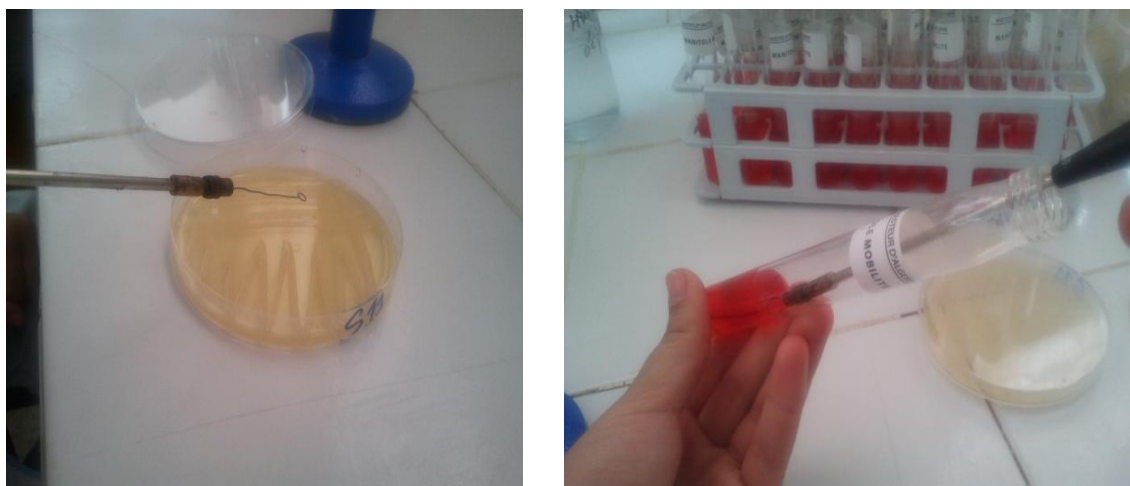


Figure N°11 : Ensemencement du Mannitol mobilité

- La fermentation du Mannitol entraîne le virage du milieu au jaune.
- Les souches mobiles diffusent à partir de la ligne d'ensemencement.

III-2-3-Recherche 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).

Matériels et méthodes

Milieu de culture gélatinase (Composition	g/L)
Peptone	10 g
Extrait de viande	4 g
Na cl	2.5 g
Gélatine	120 g
Eau distillé	1000 ml

Préparation

- Dissoudre les produits un par un dans 800ml H₂O distillée
- Ajuster le ph à 6.8 avec le Ph mètre
- Compléter à un litre par H₂O distillée
- Verser le milieu de culture dans des flacons de 250ml
- Autoclavage (a 120°C pendant 20 minutes)

La technique

Le milieu à la gélatine est préparé, stériliser à l'autoclave et réparti dans les tubes à essais.

Ensemencer le milieu par pique centrale



Figure N° 12 : Ensemencement du gélatinase

Matériels et méthodes

-Incuber pendant 24 – 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.

- Notifier si la surface du milieu est liquide ou gel. Si la gélatine nutritive est liquide, ceci indique que la gélatine a été hydrolysée par la bactérie. Si aucune hydrolyse ne se produisait, le milieu demeurera un gel.

III-2-4-Recherche 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 en pique (ou par spots) à partir d'une culture en milieu solide de la souche à étudier. Incuber 24 à 48 heures à 37°C.

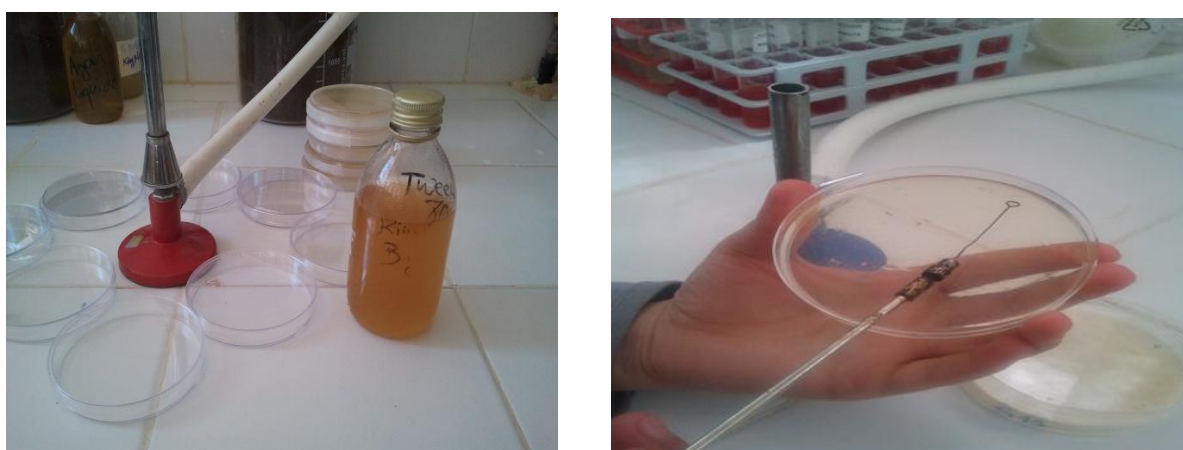


Figure N° 13 : Ensemencement de la lipase

Après incubation, les colonies de souches lipase (+) sont entourées d'un halo opaque formé suite à la précipitation d'acides gras issus de la lipolyse. (Ruiz et al. 2002)

III-2-4-Test de la levane

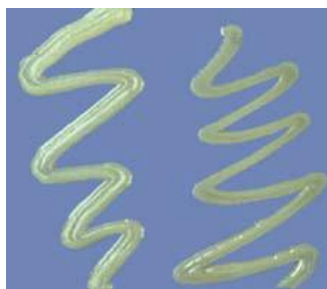
-Inoculer le milieu levane par stries .

-Incuber à 26⁰ C pour 48 heures .

-Suite à l'incubation, lire la réaction obtenue.

Matériels et méthodes

-Réaction positive ; Strie partiellement saillante et luisante



-Réaction négative ; Strie

Prostrée et non

luisante

Figure N° 14 :Réaction de la levane (Lelliott et al, 1987)

Préparation du milieu levane

Composition	g / L
Sucre de table	50.000
D- glucose	2.500
Nutrient Agar	23 .000

-Dissoudre les produits un à un dans un 500 ml d'eau distillée.

-Compléter à 1 litre avec l'eau distillée,

-Stériliser 15 minutes à 121°C.

-Couler 18 à 20 ml de milieu par boîte de Pétri.

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

Milieu Arginine Composition	g / L
-Peptone	1
-Chlorure de Na (Na cl)	5
-Phosphate de K dibasique (K2 Hpo4)	0.3
-Agar	3
- Rouge phénol (0.1%)	10 ml
-Arginine H cl	10 ml

PH = 7, 1

-Dissoudre 0, 1 g de rouge de phénol dans 100 ml d'éthanol (solution 0,1%).

-Mélanger les autres produits un à un dans un 500 ml d'eau distillée ; Ajouter le rouge phénol.

-Compléter le volume à 1 litre avec l'eau distillée.

Matériels et méthodes

- Distribuer 3 ml de milieu par tube.
- Stériliser 10 minutes à 120°C.

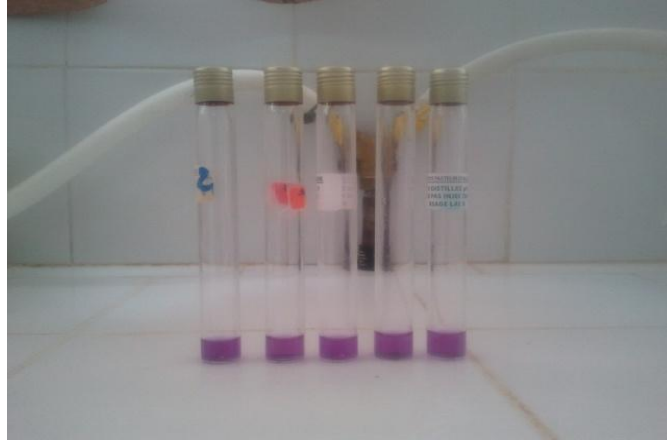


Figure N° 15 : Milieu Arginine déshydrogénase

A l'aide d'une anse de platine, inoculer le milieu de culture arginine avec la bactérie à identifier (culture de 18 à 24 heures).



Figure N° 16: Ensemencement du milieu Arginine déshydrogénase

Matériels et méthodes

- Ajouter environ 1 ml d'huile de vaseline stérile,
- Incuber à 26°C pour 24 à 48 heures,
- Suite de l'incubation, lire la réaction obtenue.

III-2-6-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.

- Les tubes contenant le milieu de King B liquide sont ensemencés à l'aide d'une anse de platine, par les 20 souches.

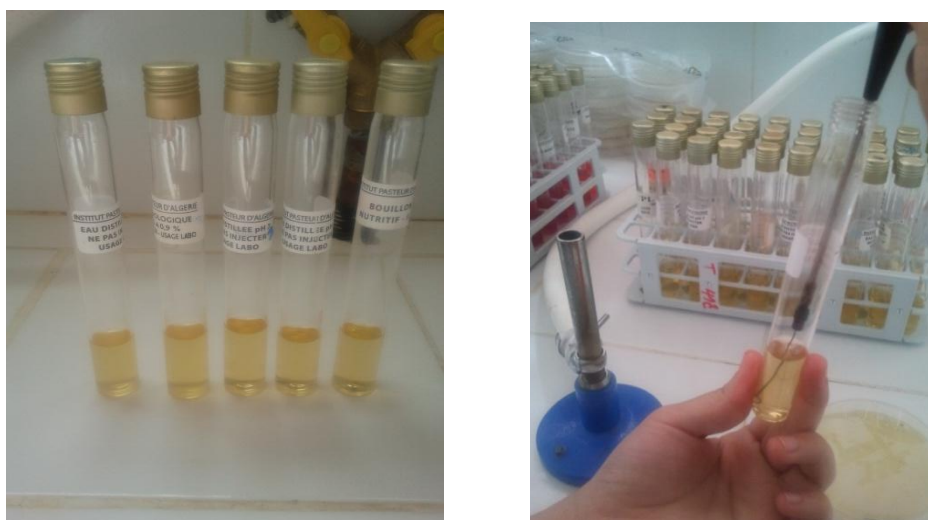


Figure N° 17 : Ensemencement de milieu King B pour faire le test de température

- L'incubation est réalisée à 4°C pendant 24 à 48 heures dans le réfrigérateur.
- On fait la même manipulation pour la température 41°C à 48 heures dans l'étuve.

III-2-7-Test d'antagonisme (méthode de stries ou de doubles couches)

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.

Matériels et méthodes

Préparation du milieu de culture

Composition	(g)
pomme de terre	200 g
sucre de table	20 g
D – Glucose	20 g
Agar	20 g

1 litre d'eau distillée.

- Dissoudre 20 g d'agar-agar dans 300 ml d'eau distillée, homogénéiser la solution.
- Peser 200 g de pomme de terre, éplucher la pomme de terre, mélanger 200 g de pomme de terre bien découpé avec 300 ml d'eau distillée, bouillir à 100°C pendant 20 à 25 minutes, ensuite recueillir l'eau de la pomme de terre environ 300 ml.
- Le 300 ml de l'eau venant de la pomme de terre est mélangé à 300 ml de la solution agar - agar.
- Ajuster ensuite le volume du mélange au moyen de l'eau distillée jusqu'à 1000 ml.
- Autoclavage (120°C pendant 20 min) (Mumba Djamba.2011).



Figure N° 18: Préparation du PDA

Matériels et méthodes

Les 18 souches de *Pseudomonas fluorescents* identifiées, ont été étudiées *in vitro* contre le *Fusarium*.

Le test d'antagonisme fongique été réalisé sur le milieu de culture solide (PDA) selon la méthode décrite par Vincent et al. (1991). Les isolats sélectionnés sont étalés sur une moitié d'une boîte gélosée, alors qu'un disque fongique de 4 mm provenant d'une culture d'au moins cinq jours est déposé à l'opposé sur l'autre moitié. Ce dernier est placé suivant un axe diamétral équidistant des bactéries. 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.

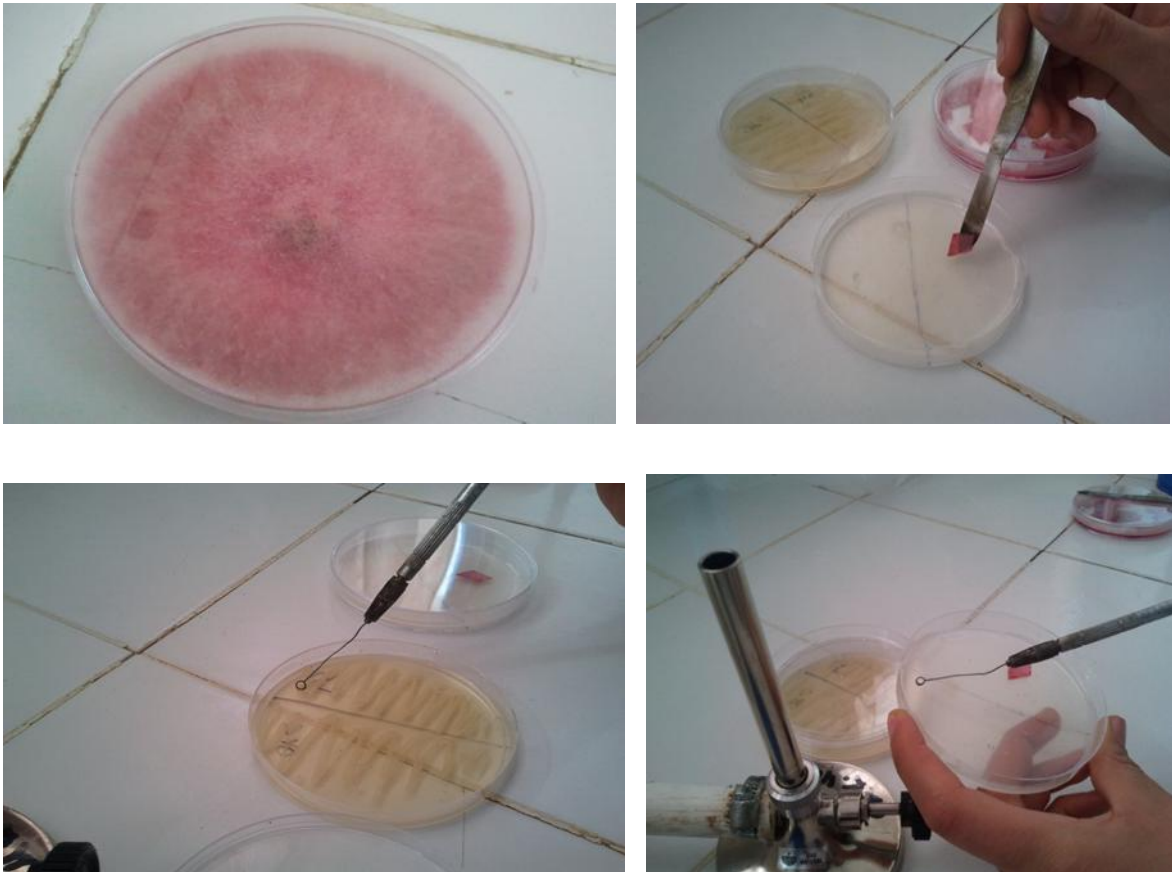


Figure N^o19: Préparation de la double culture

chapitre III

Résultats et discussions

Résultats et discussions

1-Aspect morphologique

Après l'ensemencement sur le milieu King B et l'incubation à l'étuve à 30⁰ C pendant 24 heures, les colonies bactériennes retenues, sont de coloration blanchâtre à crème et produisent un pigment fluorescent dans le milieu à une lumière ultraviolette à 365 nm, qui est la pyoverdine. Après 48 heures d'incubation, le diamètre des colonies devrait se situer entre 1 et 3 mm et sont généralement abondantes.

Les résultats sont représentés dans la photo si dessous.



Figure N°20: Photo des souches sous UV

Après ce test, 2 souches sont éliminées (P3, P7) car ne présentent pas l'aspect fluorescent.

Les 18 colonies sont repiquées sur le King B, puis elles ont été testées biochimiquement.



Figure N°21 : Photo de repiquage des souches

2 -L'étude microscopique

L'observation microscopique a été réalisée après coloration de Gram des 18 souches. Les résultats obtenus sont présentés dans le tableau N°01 et les photos.

Tableau N°01 : Résultats de l'étude microscopique des 20 souches purifiés .

Souche	S1	S2	S3	S4	S5	S6	S7	S8	S9
Gram	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Souche	S10	S11	S12	S13	S14	S15	S16	S17	S18
Gram	-	-	-	-	-	-	-	-	-

L'observation microscopique après la coloration de Gram révèle que les 18 souches, Sont bacilles à Gram négatif .

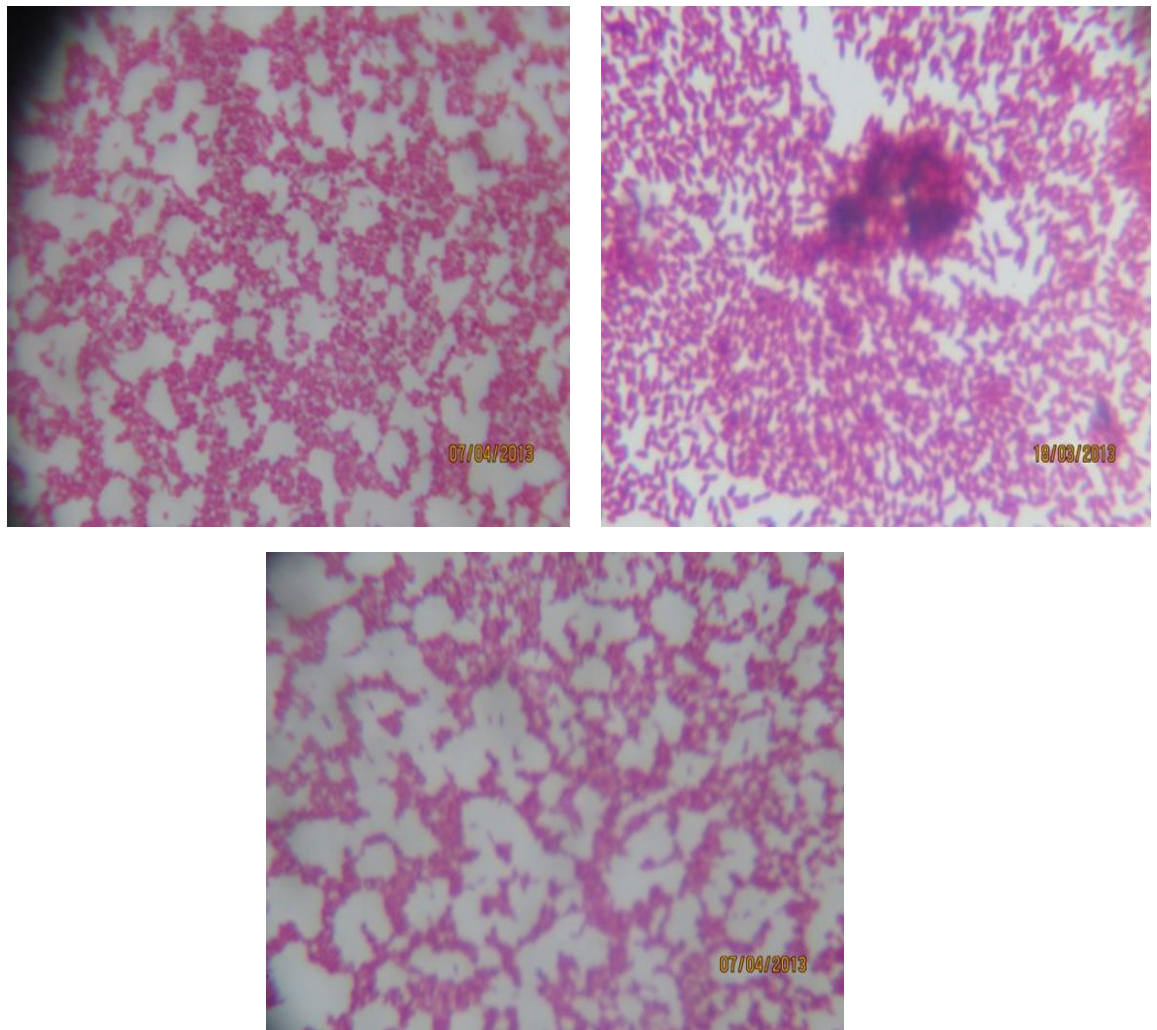


Figure N° 22 : Photos du gram

3- Les tests biochimiques

Après la purification des 18 souches, on a réalisé a partir les colonies pures un ensemble de tests qui sont :

- Recherche de la catalase.
- Test de Mannitol mobilité.
- Recherche de gélatinase.
- Recherche de lipase.
- Test de levane.
- Test de l'arginine déshydrogénase.

Résultats et discussions

-Culture à la température de 4⁰C et de 41⁰C.

Les résultats des tests sont présentés dans les tableaux N⁰ 02 et N^o 03.

Tableau N⁰ 02 : Résultats des tests biochimiques réalisés .

Souche / Teste		Catalase	Mannitol mobilité	Gélatinase	Levane	L'arginine déshydrogénase	Lipase
S1	R1	+	+	+	+	+	+
	R2	+	+	+	+	+	
S2	R1	+	+	+	+	+	+
	R2	+	+	+	+	+	
S3	R1	+	+	+	+	+	+
	R2	+	+	+	+	+	
S4	R1	+	+	+	+	+	+
	R2	+	+	+	+	+	
S5	R1	+	+	+	+	+	+
	R2	+	+	+	+	+	
S6	R1	+	+	+	+	+	+
	R2	+	+	+	+	+	
S7	R1	+	+	+	+	+	+
	R2	+	+	+	+	+	
S8	R1	+	+	+	+	+	+
	R2	+	+	+	+	+	
S9	R1	+	+	+	+	+	+
	R2	+	+	+	+	+	
S10	R1	+	+	+	+	+	+
	R2	+	+	+	+	+	
S11	R1	+	+	+	+	+	+
	R2	+	+	+	+	+	
S12	R1	+	+	+	+	+	+
	R2	+	+	+	+	+	
S13	R1	+	+	+	+	+	+
	R2	+	+	+	+	+	
S14	R1	+	+	+	+	+	+
	R2	+	+	+	+	+	
S15	R1	+	+	+	+	+	+
	R2	+	+	+	+	+	
S16	R1	+	+	+	+	+	+
	R2	+	+	+	+	+	
S17	R1	+	+	+	+	+	+
	R2	+	+	+	+	+	
S18	R1	+	+	+	+	+	+
	R2	+	+	+	+	+	

Résultats et discussions

Tableau N° 03 : Résultats de tests de température 4⁰C et 41⁰C .

<i>Souche /température</i>	<i>Répétition</i>	<i>S1</i>	<i>S2</i>	<i>S3</i>	<i>S4</i>	<i>S5</i>	<i>S6</i>	<i>S7</i>	<i>S8</i>	<i>S9</i>
41 ⁰ c	R1	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	R2	-	-	-	-	-	-	-	-	-
41 ⁰ c		S10	S11	S12	S13	S14	S15	S16	S17	S18
	R1	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	R2	-	-	-	-	-	-	-	-	-
4 ⁰ c		S1	S2	S3	S4	S5	S6	S7	S8	S9
	R1	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	R2	+	+	+	+	+	+	+	+	+
4 ⁰ c		S10	S11	S12	S13	S14	S15	S16	S17	S18
	R1	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	R2	+	+	+	+	+	+	+	+	+

3-1- Recherche de la catalase

La catalase est une enzyme qui catalyse la décomposition du peroxyde d'hydrogène (H₂O₂) en eau et oxygène. Elle est synthétisée par la plupart des bactéries aérobies, elle élimine le peroxyde d'hydrogène produit au cours du métabolisme aérobie. Le test de la catalase sert à détecter la présence de cette enzyme dans une souche bactérienne donnée.

Un dégagement gazeux est observé dès l'étalement des suspensions bactériennes dans le peroxyde d'hydrogène (H₂O₂).

Toutes les bactéries sont catalase positives. Les résultats sont exprimés dans la photo .



Figure N° 23 : photo du Test de la catalase

3-2- 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 cétone : 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 18 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 bactéries mobiles ont diffusé à partir de la ligne verticale d'ensemencement en créant un trouble donc les 18 souches sont mobiles, qui assure que nos souches possèdent des flagelles.

Les résultats sont représentés dans la photo.

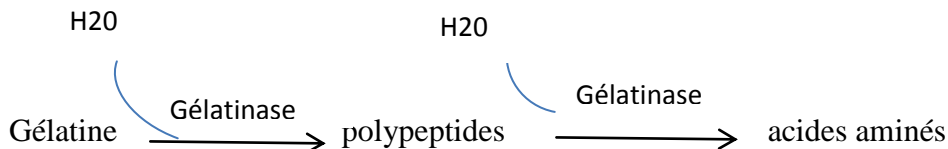


Figure N° 24 : Test de mannitol mobilité

3-3-Recherche de la gélatinase

La gélatinase ou collagénase est une protéase qui hydrolyse le collagène en acides aminés ou en peptides.

Gélatinase comprennent une famille d'enzyme extracellulaire produite et sécrétée par certains microorganisme à hydrolyser la gélatine, ensuite les acides aminés libérés peuvent être absorbés par la cellule et utilisés à des fins métaboliques.



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'anse de platine, ceci indique que la gélatine a été hydrolysée par la bactérie.

Nos 18 souches bactériennes disposent d'une gélatinase. Les résultats sont exprimés dans la photo.



Figure N° 25 : Photo du test gélatinase

3-4-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. Tous nos souches testées donnent des résultats positifs ceci est exprimé par la photo.

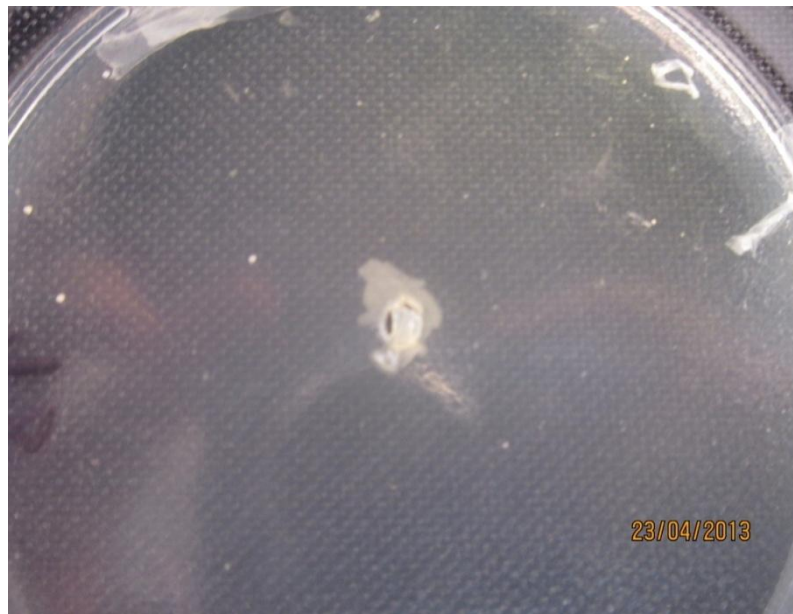


Figure N° 26 : Test positif de la lipase

3-5-Test de la levane

Ce test sert à vérifier la polymérisation du fructose en polyfructose par la bactérie.

Toutes les souches testées donnent des résultats positifs, (voir photo si dessous).

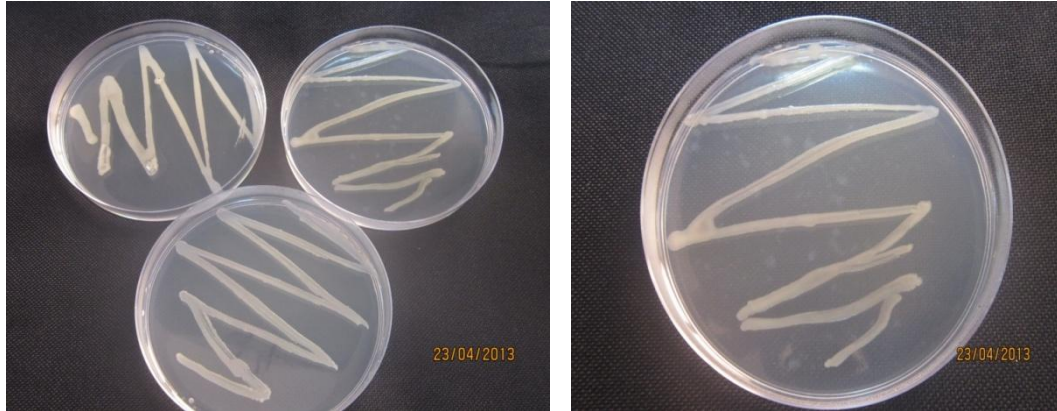


Figure N° 27 : Photos du test de levane.

3-6-Test Arginine déshydrogénase

La mise en évidence de cet enzyme est très intéressante pour la caractérisation des bactéries, Le test arginine déshydrogénase sert à déterminer si la bactérie transforme l'arginine (un acide aminé) à l'aide de l'enzyme arginine déshydrogénase, cet enzyme libère l'ammoniac et la citruline a partir de l'arginine.

Le témoin doit avoir une coloration jaune, elle traduit la fermentation du glucose, l'arginine est transformé quand le milieu à une coloration violette .Elle ne l'est pas s'il est jaune comme le témoin.

Les 18 souches testées donnent des résultats positifs, ceci exprimé par les photos.

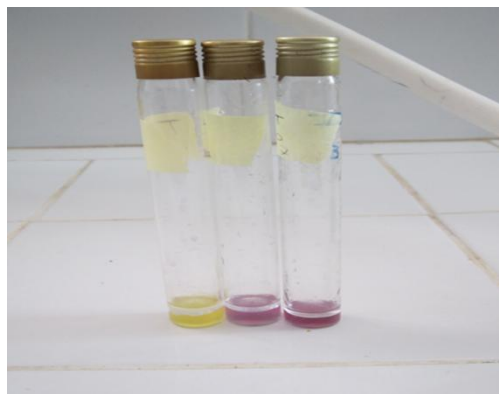


Figure N° 28: Test d'arginine déshydrogénase.

3-7-Croissance à la température de 4⁰C et 41⁰C

Ce test est très important car il permet de différencier les bactéries psychrophiles (4⁰C et de celles qui sont mésophiles (41⁰C).

La croissance bactérienne est estimée par l'apparition des troubles dans le milieu King B liquide.

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 4⁰C et ne poussent pas a 41⁰C.



Figure N° 29: Photo de Culture à la température de 4⁰ C



Figure N° 30 : Photo de Culture à la température de 41⁰ C

4- Test d'antagonisme in vitro

L'activité antifongique des souches bactériennes purifiées a été mise en évidence sur le milieu de culture solide (PDA) par la technique de double couche.

Les résultats obtenus sont rassemblés dans le tableau N°04.

Tableau N°04 : Résultats du test d'antagonisme fongique.

Souche	S1	S2	S3	S4	S5	S6	S7	S8	S9
Résultats	-	-	+	+	-	+	+	+	-
Souche	S10	S11	S12	S13	S14	S15	S16	S17	S18
Résultats	-	+	-	+	+	+	+	-	-

Le pouvoir antagoniste de nos isolats, a été testé par l'inhibition de la croissance mycélienne de *Fusarium*.

En milieu de culture solides(PDA). 18 souches bactériennes ont été testées.

La *Fusarium* a été confronté à ces différentes souches, les observations ont portées sur l'existence ou l'absence d'une inhibition de la croissance mycélienne (ici le calcul de la zone d'inhibition n'a pas été effectué car c'était pas le but du travail).

Les résultats obtenus, dans nos essais d'antagonisme in vitro, suggèrent que 10 souches seulement ont montré une activité antagoniste appréciable, in vitro, sur la croissance de *Fusarium* alors que 8 souches ne présentent aucune activité.



Figure N° 31 : Résultat positif de l'activité antifongique de nos souches contre *Fusarium*.

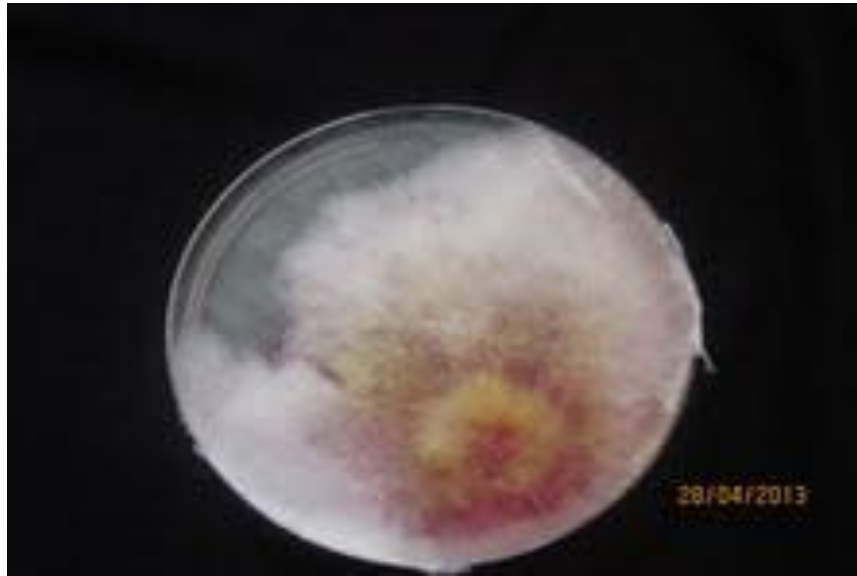


Figure N° 32: Résultat positif de l'activité antifongique de nos souches contre Fusarium

Discussion générale

L'efficacité des isolats de *Pseudomonas fluorescens* dans la lutte biologique repose sur la convergence d'une multitude de propriétés physiologiques, métaboliques et écologiques. De cette première partie du travail, ils en sont ressortis des 18 souches présentant des caractéristiques suivantes : gram négatifs, production de la levane, gélatinase, lipase, arginine déshydrogénase, croissance à 4⁰c et pas à 41⁰c , la présence de flagelle (exprimé par la croissance sur mannitol mobilité).

D'une deuxième partie L'inhibition de la croissance mycélienne de *Fusarium* par les 18 souches de *Pseudomonas fluorescens* observée sur milieu suggère que 10 souches ont montré une activité antagoniste par l'extraction des substances antifongiques.

conclusion

Conclusion

Le contrôle biologique des maladies dues à des pathogènes du sol, par l'introduction de microorganismes bénéfiques dans la rhizosphère a été proposé comme une alternative pour l'utilisation des substances chimiques. Certaines bactéries associées aux plantes particulièrement les *Pseudomonas fluorescens* ont fait l'objet d'explorations suppressives des maladies des cultures par antagonisme direct entre la bactérie et les phytopathogènes du sol.

Nous avons pu identifier les 20 souches de *Pseudomonas fluorescens* sur la base de certain critère morphologique, biochimique et physiologique. Ces isolats ont montré un pouvoir antagoniste, in vitro, vis-à-vis de phytopathogènes fongiques (fusarium)

Références bibliographiques

Références bibliographiques

- 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.
- Camille dellarras.,2007.Micobiologie pratique pour le laboratoire .Edition médicale internationale.11,rue LavoisierF-75008Paris.p92-94,340,349
- Chapman, G.P., 2009. Grass evolution and domestication.Grass, xviii + 390 pp.
- 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
- Champeil A., Dore T. et Fourbet J.F., 2004. Fusarium head blight: epidemiological origin of the effects of cultural practices on head blight attacks and the production of mycotoxins by Fusarium in wheat grains. *Plant Science*, 166, 1389-1415.
- Chin-A-Woeng, T. F., J. E. Thomas-Oates, B. J. Lugtenberg, and G. V. Bloemberg., 2001. Introduction of the *phzH* gene of *Pseudomonas chlororaphis* PCL1391 extends the range of biocontrol ability of phenazine-1-carboxylic acid-producing *Pseudomonas* spp.
- Feillet P. 2000. Le grain de blé composition et utilisation. In: INRA Editions, Paris, France, 308p.
- Garbaye, J. 1994. Helper bacteria: a new dimension to the mycorrhizal symbiosis. *New Phytol.*128: 197-210.
- Glick, B.R., 1995. The enhancement of plant growth by free-living bacteria.*Can. J. Microbiol.* 41: 109-117.
- Ginard, M., Lalucat, J., Tummler, B., and Romling, U. ,1997.Genome organization of *Pseudomonas stutzeri* and resulting taxonomic and evolution ary considerations.*Int J SystBacteriol* 47: 132-143.
- Goswami R.S. et Kistler H.C., 2004.Heading for disaster: *Fusarium graminearum* on cereal crops. *Molecular Plant Pathology*, 5, 515-525
- Joffin J. N. et Leyral G., 2006. Microbiologie technique, Tome1 :Dictionnaire des techniques, 4ème édition. Edition CRDP d'aquitaine. P368.

Références bibliographiques

- Haas, D., and C. Keel., 2003. Regulation of antibiotic production in root-colonizing *Pseudomonas spp.* and relevance for biological control of plant disease. *Annu.Rev.Phytopathol.* 41:117-153. strains. *Mol. Plant Microbe Interact.* 14:1006-1015.
- 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
- Kent NL, Evers AD. 1994. *Technology of Cereals*. Oxford: Pergamon Press Ltd.
- Kerstens, I., Huys, G., Van Duffel, H., Vancanneyt, M., Kersters, K., and Verstraete, W., 1996. Survival potential of *Aeromonas hydrophila* in fresh waters and nutrient-poor waters in comparison with other bacteria. *J Appl Bacteriol* 80: 266-276.
- Laurent, D., 1998. Mycotoxines de *Fusarium moniliforme* impliquées dans la leuco encéphalomalacie équine, pp. 204. Toulouse.: Université Pierre et Marie-Curie.
- Lelliot R.A. et D.E. Stead. 1987. Methods for the diagnosis of bacterial diseases of plants. *Methods in Plant Pathology Vol 2.* pp. 182, 193 et 194.
- Leslie, J. F., 1995. *Gibberellafujikuroi*: available populations and variable traits. *Canadian Journal of botany* 73 (suppl. 1), S282 -S291
- Marchal N. et 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
- Mavrodi, O.V., Mc Spadden Gardener, B.B., Mavrodi, D.V., Bonsall, R.F., Weller, D.M. and Thomashow, L.S., 2001. Genetic diversity of *phlD* from 2,4-diacetylphloroglucinol-producing fluorescent *Pseudomonas* species. *Phytopathol.* 91: 35–43.
- 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., 2008. The road to the taxonomy of *Pseudomonas*. In: Cornelis, P.(Ed.), *Pseudomonas: Genomics and Molecular Biology*. Caister Academic Press, Belgium, pp. 1–18.

Références bibliographiques

- Parry D.W., Jenkinson P. & McLeod L., 1995. Fusarium ear blight (scab) in small grain cereals-a review. *Plant Pathology*, 44, 207-238
- Pieterse, C.M.J., Ton, J. and Van Loon, L.C., 2001. Cross-talk between plant defence signalling pathways: boost or burden? *Ag.Biotech. Net.* 3: ABN 068.
- Pirgozliev S.R., Edwards S.G., Hare M.C. & Jenkinson P. 2003. Strategies for the control of Fusarium head blight in cereals. *European Journal of Plant Pathology*, 109, 731-742.
- 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 Microbiol Lett* 215: 121-126.
- Salisbury, F.B., 1994. The Role of Plant Hormones. In: *Plant-Environment Interactions*. Wilkinson, R.E. (ed.). Marcel Dekker, New York, USA., pp. 39-81
- Scher, F.M. and Baker, R., 1982. Effect of Pseudomonas putida and a synthetic iron chelator on induction of soil suppressiveness to Fusarium wilt pathogens. *Phytopathol.* 72:1567-1573
- Smirnov, V.V. and Kiprianova, E.A., 1990. Bakteriiroda Pseudomonas (Bacteria of the Genus Pseudomonas), Kiev: Naukova Dumka, pp. 100-111.
- 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.
- Surget A, Barron C. 2005. Histologie du grain de blé. *Industrie des céréales*, 3-7.
- Samapundo, S., Devlieghere, F., De Meulenaer, B., Geeraerd, A. H., Van Impe, J. F. et Debevere, J. M. 2005a. Predictive modelling of the individual and combined effect of water activity and temperature on the radial growth of Fusarium verticillioides and F. Proliferatum on corn. *International Journal of Food Microbiology* 105, 35-52.
- Schaafsma, A. W., Tamburic-Ilinic, L., Miller, J. D. & Hooker, D. C. ,2001. Agronomic considerations for reducing deoxynivalenol in wheat grain. *Canadian Journal of Plant Pathology* 23, 279-285.
- Singleton P, (1999), Bactériologie, Edition Duonod 4ème édition Paris. P.415

Références bibliographiques

- Sutton , J. C. (1982). Epidemiology of wheat head blight and maize ear rot caused by *Fusarium graminearum*. Canadian Journal of plant pathology 195, 195 - 209.
- Schmale , D. G., Arntsen, Q. A. & Bergstrom, G. C. 2005. The forcible discharge distance of ascospores of Gibberellazeae. Canadian Journal of Plant Pathology 27, 376 -383.
- Thangavelu R., Palaniswami A., Velazhahan R., Mass production of Trichoderma harzianum for managing fusarium wilt of banana, Agriculture, Ecosystems and Environment, Volume 103, Issue 1, 2004, Pages 259-263.
- Thomashow, L.S., Weller, D.M., Bonsall, R.F. and Pierson, L.S., 1990. Production of the antibiotic phenazine-1-carboxylic acid by fluorescent Pseudomonas species in the rhizosphere of wheat. Appl. Environ. Microb. 56: 908-912.
- Tortora G .J., FUNKE B.R. et CASE C. L., 2003. Introduction à la microbiologie. Ed. de Renouveau pédagogique Inc. pp : 157- 355
- Tran, S. T., Auvergne, A., Benard, G., Bailly, J. D., Tardieu, D., Babile, R. & Guerre, P. (2005). Chronic effects of fumonisin B-1 on ducks. Poultry Science 84, 22-28. Tsitsigiannis, D. I., Kowieski, T. M., Zarnowski
- Veselova, M.A. Klein, Sh., 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. Gen. 44(12): 1400–1408.
- <http://microbiologyglossary.wikispaces.com/Pseudomonas+fluorescens>
- http://www.hyno.com/ble_hybride/cadre_navigation.asp?rub=infotheque
- <http://www.cropdiseasescouncil.ca/>

Résumé

Les *Pseudomonas fluorescens* sont les habitants type des sols agricoles et la rhizosphère des plantes, et sont impliqués dans de nombreuses interactions avec les plantes. Ces bactéries sont considérées comme des composés biologiques du sol agricole, et sont responsables de la suppression des maladies fongiques dans les cultures. Ces *Pseudomonas* diminuent la sévérité de la maladie et stimulent la croissance des plantes comme le blé.

De nombreuses études sont dédiées à 20 souches bactériennes qui ont été isolées au laboratoire de biologie de l'université Abbas Laghrour Khenchela en Mai 2012.

Une caractérisation morphologique, physiologique et biochimique, sur des milieux spécifiques, ont été réalisées au laboratoire de biologie de l'université Abbas Laghrour Khenchela.

L'identification des 20 souches, aboutie que 18 souches ont les caractéristiques de base de *Pseudomonas fluorescens*.

Ces isolats ont montré un pouvoir antagoniste, *in vitro*, vis-à-vis le phytopathogène fongique (*Fusarium*)

Mots clés : identification, sol, King B, *Pseudomonas fluorescens*, *Fusarium*

المخلص

Pseudomonas fluorescens هو المقيم النوعي للتربة الزراعية و ريزوسفير النباتات ، وتشارك في العديد من التفاعلات مع النباتات. وتعتبر هذه البكتيريا مركبات عضوية للأراضي الزراعية، وهي المسؤولة عن مكافحة الأمراض الفطرية في المحاصيل. هذه *pseudomonas* تقلل من شدة المرض وتحفز نمو النباتات مثل القمح .

العديد من الدراسات اجريت ل 20 سلاسة بكتيرية كانت معزولة في مختبر علم الاحياء في جامعة عباس لغرور خنشلة في ماي 2012 .

تحديد الخصائص المورفولوجية والفسولوجية والبيوكيميائية للسلالات على اوساط غذائية مختلفة تم اجرائها في مختبر علم الأحياء في جامعة عباس لغرور خنشلة.

تحديد 20 سلالة اكدت ان 18 سلالة فقط لديها الخصائص الاساسية ل *Pseudomonas fluorescens*. اظهرت هذه السلالات المعزولة في المخبر قوة معادية ضد مسببات المرض النباتية الفطرية *fusariums*

الكلمات الدلالية : تحديد الهوية، التربة , *Fusarium* , *Pseudomonas fluorescens* , King B

Abstract

Abstract

Pseudomonas fluorescens are the types of agricultural soil and plant rhizosphere inhabitants, and are involved in many interactions with plants. These bacteria are considered organic compounds of agricultural land and are responsible for the control of fungal diseases in crops. This *Pseudomonas* decrease the severity of the disease and stimulate the growth of plants such as wheat.

Many studies are dedicated to 20 bacterial strains were isolated in the laboratory of biology at the University Abbas Laghrour Khenchela in May 2012.

A morphological, physiological and biochemical on specific areas, summers are performed in the laboratory of biology at the University Abbas Laghrour khenchela.

Identifying 20souches led 18 strains that have the basic characteristics of *Pseudomonas fluorescens*.

These isolates showed an antagonistic power, in vitro, vis-à-vis the fungal plant pathogens (*Fusarium*)

Keywords: identification, soil, King B, *Pseudomonas fluorescens*, *Fusarium*