

الجمهورية الجزائرية الديمقراطية الشعبية
République Algérienne Démocratique et Populaire
وزارة التعليم العالي والبحث العلمي
Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique
جامعة 8 ماي 1945 قالمة
Université 8 Mai 1945 Guelma
Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie, Sciences de la Terre et de l'Univers



Mémoire En Vue de l'Obtention du Diplôme de Master

Domaine: Sciences de la Nature et de la Vie
Filière: Sciences Agronomiques
Spécialité /Option: Phytopharmacie et protection des végétaux
Département: Ecologie et Génie de l'Environnement

Etude de l'effet de certaines bactéries telluriques sur la croissance de certains phytopathogènes

Présenté par : BENHAROUN Sarra

Devant les jurys :

Président : Mme. ALLIOUI. N	(MCB)	Université 8 Mai 1945. Guelma
Examineur : Mr.KHALADI. O	(MAA)	Université 8 Mai 1945. Guelma
Encadreur: Mr.BENADA. M	(MAA)	Université 8 Mai 1945. Guelma

Juin 2018



Remerciements

*Je rends grâce à Allah, le Clément, le tout Miséricordieux, pour la chance qui je suis donnée pour poursuivre mes études supérieures, et pour le courage qu'Il m'a donné pour bien mener ce travail.
Gloire à Allah*

J'exprime toute ma gratitude et mes vifs remerciements à mon encadreur

*Mr. **BENADAMHAMED** qui m'a honoré en acceptant de diriger ce travail, pour ses encouragements, ses conseils, sa disponibilité. Merci d'avoir me guidée avec patience et d'avoir consacré autant d'heures pour les corrections de ce manuscrit.*

Mes vifs remerciements à tous les membres de jury pour avoir accepté de juger ce travail :

*Dr. **ALLIOUI NOÛRA** pour l'honneur qu'il nous fait en acceptant de présider le jury. Et je le remercie pour son rôle durant ma formation, pour tout ce que vous m'avez apporté tout au long de mes années d'études.*

*Mr. **KHALADI OMAR**, pour avoir accepté d'examiner ce travail. J'tiens à lui exprimer ma haute considération et respect.*

*Mes remerciements s'adressent également à Dr. **BOUSBIA Aïssa** pour sa patience, sa gentillesse, et sa grande disponibilité, pour son aide.*

*Je me sentirai coupable d'ingratitude si je ne remercie Monsieur **FAREH IMED** pour son soutien son aide, ses précieux conseils.*

*Mes remerciements vont aussi au **Mme LAOUAR** et **Mme BENBELKACEM** enseignantes à l'université 8 Mai 1945, Guelma.*

*Je remercie aussi l'ensemble du personnel travaillant au laboratoire de Microbiologie de l'université 8 Mai 1945, Guelma. **Mme HOURIA, ASMA, HOUDA, LOUIZA**. Je vous remercie d'avoir enrichi mes connaissances et de m'avoir guidé durant toute la période du stage.*

Mes remerciements vont aussi à tous mes enseignants de département d'écologie et génie d'environnement, particulièrement les enseignants de Phytopharmacie et protection des végétaux chacun par son nom, vous restez à mes yeux des personnes entières et pleines de talents aussi bien dans la recherche que dans les relations humaines. Merci beaucoup à tout ce que vous avez fait pour moi.

Je remercie tous ceux qui ont contribué de près ou de loin à la réalisation de ce travail.





Dédicace

Je dédie ce modeste travail à mes très chers parents qui m'ont guidée durant les moments les plus difficiles de ce long chemin.

Ma chère mère qui a été à mes côtés et m'a soutenu durant toute ma vie

*Mon très cher père qui a sacrifié toute sa vie afin de me voir devenir ce que je suis,
merci mes parents.*

A mes chers frères Houssam, Raouf et Takï qui ont toujours été là pour moi

A mon fiancé Sassi

A mes grandes mères

A ma belle famille

A tous mes tantes et mes oncles

A mes cousines Nihed, Abir, Rahma, Meriem, Anfel.

A tous mes enseignants, je leurs exprime ma profonde gratitude.

*A mes copines Ahlem, Oumaima, Maïssa, Loubna, Madîha, Nahla, Hayam,
Yasmine, Khadîdja, Besma, Saïda, pour leurs amitiés, leurs soutiens inconditionnels
et leurs encouragements*

A tous les étudiants de ma promotion de l'année 2016 spécialité immunologie

A tous les étudiants de ma promotion phytopharmacie et protection des végétaux.

Et toute personne qui me connait.

♥♥ Sarra ♥♥



Sommaire

<i>Titre</i>	<i>Pages</i>
Liste des tableaux.....	<i>i</i>
Liste des figures.....	<i>ii</i>
Liste des abréviations.....	<i>iii</i>
Introduction	1
Chapitre I : Revue Bibliographique	3
I. Pathologies des cultures	4
I.1. Les champignons phytopathogènes.....	4
I.1.1 <i>Fusarium sp</i>	4
I.1.2. <i>Alternaria sp</i>	7
I.1.3. <i>Aspergillus sp</i>	9
I.2. Les bactéries phytopathogènes.....	10
I.2.1. Le genre <i>Erwinia</i>	10
Chapitre II : La lutte biologique	14
I. Concepts de la lutte biologique.....	15
I.1. Généralité	15
I.2 Définition	15
I.3. Objectifs	16
II. Les principales méthodes de lutte biologique	17
III. Les acteurs de la lutte biologique	18
IV. La lutte microbiologique	18
IV. 1. L'utilisation des microorganismes	18
IV.2. Mécanismes d'action des microorganismes.....	18
IV.2.1. Utilisation des bactéries contre champignons phytopathogènes	19
IV.2.3. Utilisation des bactéries contre bactéries phytopathogènes	19

IV.2.4. Les bactéries du genre <i>Pseudomonas</i>	21
IV.2.5. Les bactéries du genre <i>Serratia</i>	22
Chapitre III : Matériel et méthodes	24
1. Lieu d'étude	25
2. Souches bactériennes.....	25
2.1. Présentation des souches bactériennes antagonistes	25
2.2 Origine des souches.....	25
2.3 Isolement et purification	26
2.3.1 Les milieux de cultures	26
2.4. Identification de bactéries utilisées (test de confirmation)	26
2.4.1. Caractérisations morphologique	26
2.4.1.1. Aspect macroscopique (colonies)	26
2.4.1.2. Aspect microscopique	27
2.4.2. Caractérisations biochimiques.....	27
2.4.2.1. Recherche de la catalase	27
2.4.2.2 Recherche d'oxydase	28
2.4.2.3 Production de pigment	28
2.4.2.4 Test de mise en évidence de l'activité levane sucrase	28
2.4.2.5 La galerie classique	28
2.4.2.6 La galerie API 20E Biomérieux	29
3- Tests de confrontations	31
3.1. Recherche de l'activité antibactérienne.....	31
3.1.1 Méthode de diffusion sur disque	31
3.1.2 Technique des cylindres d'agar et choix du milieu optimal pour les activités antimicrobiennes	32

4. Souches fongiques	32
4.1. Purification des souches fongique	33
4.1.1. Repiquage successive	33
4.1.2. Culture monospore.....	33
4.2. Caractérisation des souches fongiques	35
4.3 Effet antifongique des souches bactérienne	35
4.3.1 La confrontation directe.....	35
4.3.2 Méthode de diffusion sur disque	36
4.3.3 Technique des cylindres d'agar.....	36
5. Analyse statistique	37
Chapitre IV : Résultats et discussion	38
1. Test de confirmation des souches bactériennes.....	39
1.1 Les caractérisations morphologiques	39
1.1.1 Aspect macroscopique	39
1.1.2 Aspect microscopique	41
1.2 Caractéristiques biochimiques	42
1.2.1 Test catalase	42
1.2.2 Test oxydase	43
1.2.3 La galerie classique	44
1.2.3.1. Utilisation de citrate	44
1.2.3.2. Le milieu mannitol-mobilité	44
1.2.4. Identification par la galerie 20E.....	46
2. Le matériel fongique	47
2.1. Purification et identification des isolats	47
2.1.2. Etude microscopique	48
3. Test de confrontation	50

Sommaire

3.1. Recherche de l'activité antibactérienne	50
3.2. Recherche de l'activité antifongique	54
3.2.1. Confrontation directe	54
3.2.2 Méthodes de diffusion sur disques et technique de cylindre d'agar	56
Discussion	62
Conclusion	65
Résumés	
Références bibliographique	
Annexe	

Liste des tableaux

Listes des tableaux

N°	Titre	Pages
01	Répartition des souches étudiées	25
02	Origine des souches de <i>Serratia plymuthica</i>	25
03	Répartition des souches fongiques	33
04	Morphologie des colonies de (Erwinia, Pseudomonas, Serratia) sur milieu King B	39
05	Morphologie des colonies sur milieu Levane.	39
06	Morphologie des colonies sur milieu LB, LPGA.	40
07	Résultats de coloration de Gram	42
08	Résultats des test catalase et test oxydase	43
09	Résultats des tests de la galerie classique (citrate de Simmons et Mannitol-mobilité)	45
10	Résultats du test des galeries API 20E	46
11	Observations macroscopiques des différents isolats pathogènes obtenus (photos personnelle)	47
12	Etude Microscopique des souches fongiques isolées à partir de microscope optique (G X40) (photos personnelle)	49

Liste des figures

N°	Titre	Pages
01	Les symptômes de la pourriture racinaire de la plante de tomate (<i>Fusarium crown and root rot</i>)	05
02	Aspect microscopique de <i>Fusarium oxysporum sp</i>	06
03	Progression de la pourriture des semences	06
04	<i>Fusarium roseum</i> Détail de spores asexuées (conidies), pluricellulaires observées au microscope optique	06
05	(A) <i>Alternaria alternata</i> sur feuilles (B) <i>Alternaria alternata</i> sur tubercule	08
06	Spores d' <i>Alternaria alternata</i>	08
07	Symptômes de la pourriture des grains de maïs causée par (<i>Aspergillus Niger</i>)	10
08	Aspect microscopique d' <i>Aspergillus niger</i> (G X40)	10
09	Symptômes du feu bactérien sur poirier, (A) nécroses sur pousses, (B) nécroses et exsudat sur fleurs, (C) exsudat sur tronc	11
10	Pourriture molle et humide causée par <i>Pectobacterium sp</i>	13
11	Symptômes de la jambe noire sur la partie aérienne du plant de pomme de terre	13
12	Mécanismes d'action des Rhizobactéries	20
13	Les caractéristiques morphologiques des colonies bactériennes	27
14	La galerie 20 ^E (photo personnelle)	31
15	Les différentes étapes de culture monospore	34
16	Aspect macroscopique des colonies sur les différents milieux utilisés (photos personnelle)	41
17	Colonies typiques d' <i>Erwinia carotovora</i> isolées sur milieu LPGA observées à la loupe binoculaire	41
18	Observation au microscope optique et à l'immersion (G x1000). Les souches	42

	révélant la couleur rose des Gram négatif (-) (photos personnelle)	
19	Test catalase et test d'oxydase (Test catalase positif (+), formation des bulles) (Test oxydase positif (+), apparition d'une couleur violette) (photos personnelle)	44
20	Tests citrate de Simmons et Mannitol mobilité	45
21	Résultat de la plaque galerie 20 ^E (photo personnelle)	46
22	Les taux d'inhibitions de la croissance d' <i>Erwinia amylovora</i> par les 15 isolats antagonistes (1), (2)	51
23	Les taux d'inhibitions de la croissance de la souche <i>Erwinia carotovora</i> par les souches de <i>Serratia plymuthica</i>	52
24	Influence de <i>Pseudomonas fluorescens</i> sur la croissance d' <i>Erwinia amylovora</i> (1430)	53
25	Influence de <i>Serratia plymuthica</i> sur la croissance d' <i>Erwinia amylovora</i> (1430) et <i>Erwinia carotovora</i> (194), par les 2 méthodes utilisées	53
26	Croissance de <i>Fusarium roseum</i> . En absence et en présence des souches de <i>Pseudomonas fluorescens</i> et <i>Serratia plymuthica</i>	54
27	Croissance d' <i>Aspergillus niger</i> . En absence et en présence des souches de <i>Pseudomonas fluorescens</i> et <i>Serratia plymuthica</i>	54
28	Croissance d' <i>Alternaria alternata</i> . En absence et en présence des souches de <i>Serratia plymuthica</i>	55
29	Pourcentage d'inhibition de la croissance mycélienne des champignons Phytopathogènes par <i>Pseudomonas fluorescens</i> et <i>Serratia plymuthica</i>	56
30	Représentation graphique des taux d'inhibitions des champignons par les souches de <i>Pseudomonas fluorescens</i> NA et NB.	57
31	Représentation graphique des taux d'inhibitions des champignons par la souche de <i>Pseudomonas fluorescens</i> NC.	58
32	Représentation graphique des taux d'inhibitions des champignons par les souches de <i>Pseudomonas fluorescens</i> .	59
33	Résultats de test de confrontation sur <i>Aspergillus niger</i> par les souches de <i>Pseudomonas fluorescens</i>	59

Liste des figures

34	Représentation graphique des taux d'inhibitions des champignons par les souches de <i>Serratia plymuthica</i> .	60
35	Résultats de test de confrontation sur <i>Aspergillus niger</i> par les souches de <i>Serratia plymuthica</i>	61
36	Résultats de test de confrontation sur <i>Alternaria alternata</i> et <i>Fusarium oxysporum</i> par les souches de <i>Serratia plymuthica</i>	61

Liste des abréviations

BCA : Biological Control Agents

FAO : L'Organisation pour l'alimentation et l'agriculture (Food and Agriculture Organization)

INRA : L'Institut national de la recherche agronomique

ISR : Induced Systemic Resistance (la résistance systémique induite)

LB : Milieu Luria Bertani

LPGA : Milieu Levure-Peptone-Glucose-Agar

Ox : Oxydase

PDA : Potato Dextrose Agar

PGPR : Plant Growth Promoting Rhizobacteria

SRPV : Station Régionale De La Protection Des Végétaux

UFC : Unité Formant Colonie (CFU, Colony Forming Unit)



Introduction

La production agricole mondiale a connu une augmentation importante sur les plans quantitatifs, qualitatifs et diversification des produits, afin de subvenir aux besoins alimentaires d'une population humaine sans cesse croissante (FAO, 2010). L'intensification des systèmes de production par la mécanisation, l'utilisation des intrants chimiques sous forme de fertilisants et pesticides et l'utilisation des géotypes performants exigeants davantage d'intrants, sont à la base de l'amélioration des rendements des cultures. Néanmoins, les effets négatifs des produits chimiques de synthèse sur l'environnement (Elmholt, 1991), sur la biodiversité (Giller et al., 1997) et sur la santé humaine (Huang et al., 2005) ainsi que le développement des résistances chez les agents pathogènes (Ishii, 2006) ont motivé la communauté scientifique à chercher d'autres alternatives aux intrants chimiques afin d'assurer la durabilité de l'agriculture en augmentant sa rentabilité et en sauvegardant les ressources naturelles aux générations futures.

Les maladies parasitaires des plantes sont causées par l'action d'agents pathogènes (virus, bactéries, champignons, protozoaires, les phanérogames parasites, etc...). Ces parasites sont généralement infectieux car ils envahissent l'hôte et s'y multiplient et sont contagieux, par leur transmission d'une plante infectée à une plante saine (Lepoivre, 2003).

Choudhary et al. (2009) considèrent que le contrôle biologique des maladies par l'introduction de micro-organismes bénéfiques dans la rhizosphère peut être une solution de rechange ou complémentaire à l'utilisation des produits chimiques de synthèse., globalement, l'effet protecteur conféré par ces agents de lutte biologique est basé sur la compétition pour les nutriments essentiels, sur l'activité antagoniste vis-à-vis de la croissance des pathogènes via la production d'antibiotiques ou d'enzymes et /ou sur leur capacité à stimuler des systèmes de défense chez l'hôte végétal.

L'antagonisme microbien, lié à la production de métabolites ayant des propriétés antibiotiques, est également un mécanisme par lequel les bactéries rhizosphérique protègent les plantes contre les microorganismes phytopathogènes (Mazurier et al., 2009 ; Van Loon, 2007).

La résistance systémique peut être induite par des microorganismes variés, des bactéries à Gram positif comme *Bacillus pumilus*, ou des bactéries à Gram négatif appartenant au genre *Pseudomonas* (*fluorescens*, *putida*, *aeruginosa*), et aux entérobactéries comme *Serratia* (*marcesens*, *plymuthica*) (Jourdan et al., 2008).

Par ailleurs, de nombreuses bactéries sont capables d'améliorer la santé des plantes en limitant la croissance saprophyte des microorganismes phytopathogènes. Certaines sont utilisées en agriculture comme agents de lutte biologique (**Bloemberg et Lugtenberg, 2001 ; Whipps, 2001**).

L'objectif de ce travail est d'apporter un plus dans la lutte biologique par la mise en évidence de bactéries bénéfiques pour les plantes. En évaluant leurs effets sur la croissance des agents pathogènes.

Ce document comporte :

1) Une étude bibliographique qui s'attache à définir et présenter :

- Les pathologies des cultures (les pathogènes fongiques et pathogènes bactériens).

2) Une étude bibliographique qui s'attache à définir et présenter :

- Généralité et définition sur la lutte biologique et leurs objectifs

- Utilisation des microorganismes telluriques (rhizosphérique)

- Les bactéries du genre *Pseudomonas* et *Serratia* et leurs effets sur les phytopathogènes

3) Une méthodologie (Matériel & méthodes) relative à la microbiologie, la physiologie et à la biochimie des agents antagonistes et les agents pathogènes (bactéries et champignons), aux différents tests caractéristiques, à l'étude de l'interaction antibactériennes et antifongiques.

4) Une présentation des résultats obtenus divisés en quatre parties. La première expose les caractéristiques microbiologiques, physiologiques et biochimiques pour l'identification des souches bactériennes (antagonistes et pathogènes) isolées. Dans la deuxième partie sont rapportés les différents résultats de test de confrontation, la recherche de l'activité antibactérienne. La troisième partie est consacrée à la présentation des résultats des tests macroscopiques et microscopique pour l'identification des souches fongiques. La quatrième partie est consacrée à la présentation des résultats relatifs à l'étude de l'activité antifongique.

4) Enfin, la dernière partie permet de conclure sur les différents points abordés, tant d'un point de vue microbiologique et biochimique que d'un point de vue lutte biologique.

A decorative graphic of a scroll with a blue border and grey shading at the corners, containing the chapter title.

Chapitre 01

Revue Bibliographique

I. Pathologies des cultures :

I.1. Les champignons phytopathogènes

Les maladies dites fongiques (causées par les champignons) sont les plus fréquentes, une infection fongique est souvent causée par des spores qui y ont germé puis ont pénétré les tissus de la plante par le biais des stomates, des blessures ou parfois même directement à travers la peau de la plante. Les filaments mycéliens se développent dans les tissus, en tirent les éléments nutritifs et ils y exsudent des substances toxiques pour la plante (**Naika et al., 2005**).

I.1.1. *Fusarium sp* :

Décrit par Link en 1809 (**Booth, 1984**), le genre *Fusarium* est bien connu pour son rôle important en phytopathologie, ce dernier regroupe un grand nombre d'espèces (**Messiaen et Cassini, 1968**) présentant une spécificité parasitaire pour une large gamme de plantes hôtes (**Ozenda, 1990**) et responsables des maladies connues sous le terme de fusarioses telles que le flétrissement vasculaire ou la pourriture racinaire et du collet (**Lepoivre, 2003**).

Bien que la forme parfaite de certains d'entre eux est connue et lui permettant de faire partie de la division des Ascomycota (**Leslie et Summerell, 2006**), la forme imparfaite existe encore pour d'autres. Ces derniers appartiennent à la division des Deuteromycota, classe des Hyphomycètes, ordre des Tuberculariales, famille des Tuberculariaceae (**Lepoivre, 2003**).

Ainsi, la classification originelle des *Fusarium* est comme pour tous les champignons, basée essentiellement sur les critères morphologiques (pigmentation, aspect du mycélium, présence ou absence des spores, taille, forme, nombre de cloisons, ...) (**Bouhot, 1981**).

Le *Fusarium* se multiplie par voie végétative ou par l'intermédiaire de spores asexuées. Cette forme imparfaite (anamorphe) est caractérisée par un mycélium septé et ramifié (**Belabid, 2003**). Le *Fusarium* produit trois types de spores des microconidies unicellulaires ou bicellulaires arrondies ou ellipsoïdales, des macroconidies pluricellulaires en forme de croissant et des chlamydospores arrondies d'une ou deux cellules, entourées d'une paroi épaisse plus ou moins pigmentée, en position terminale ou intercalaire des hyphes mycéliens, représentant ainsi les spores de résistance du champignon (**Nelson et al., 1983 ; Booth, 1971 ; Llorens et al., 2006**). La présence ou l'absence de macro et microconidies, de chlamydospores ainsi que la couleur et la forme de *Fusarium* sont les caractères de classification utilisés couramment pour l'identification des espèces du genre *Fusarium* (**Nasraoui, 2000**).

Les espèces de *Fusarium* provoquent des maladies qui entraînent des pertes économiquement importantes comme le flétrissement vasculaire ou la pourriture racinaire et du collet chez des plantes cultivées aux champs et en serres (Fravel *et al.*, 2003).

L'espèce *Fusarium oxysporum* peut infecter un grand nombre de plantes, souvent de façon très spécifique. Plus de 120 formes spéciales et races ont été ainsi identifiées, basées sur leur spécificité d'hôtes (O'Donnell *et al.*, 2015), parmi lesquelles les formes spéciales *albedinis*, *lycopersici* et *ciceris* qui sont responsables, respectivement, de la fusariose vasculaire du palmier dattier, de la tomate et du pois chiche (Benzohra *et al.*, 2015 ; El Komy *et al.*, 2015 ; Jimenez-Díaz *et al.*, 2015).

Ce champignon dévastateur est avant tout inféodé au système racinaire de la plante de tomate, sur lequel il provoque, dans un premier temps, de nombreuses lésions brun rougeâtres humides, évoluant rapidement en pourriture suivit d'un développement d'un chancre brun sur seul côté de la tige et du collet en forme d'une flamme (figure 1). Suit à ces altérations, des symptômes de flétrissements et de jaunissement apparaissent à la périphérie du limbe des vieilles feuilles, suivit de la nécrose des pétioles et de la chute des feuilles. Certaines plantes affectées précocement voient leur croissance réduite (Blancard, 1997).



Figure.1 : Les symptômes de la pourriture racinaire de la plante de tomate (*Fusarium* crown and root rot), (a) Chancre brun en forme de flamme se développant sur un seul côté du collet et de la tige, (b) Système racinaire réduit, brun et pourri, vaisseaux brun chocolat dans les parties basses de la tige, (c) Brunissement des racines, de leur cylindre central et des vaisseaux situés au niveau du pivot et du collet malades (Blancard, 2013).

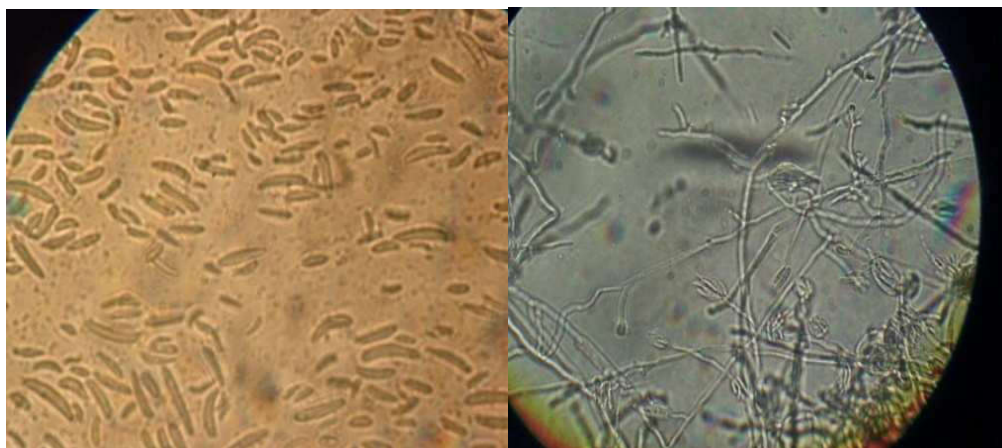


Figure. 2 : Aspect microscopique de *Fusarium oxysporum* sp (Abdelkader, 2012)

Fusarium roseum est un agent pathogène des plantes qui a besoin d'au moins 24 heures on température maintenue au-dessus de 18° C à infecter l'hôte (Booth ,1997) Sur certains milieux de culture, *Fusarium roseum* devient rouge ; il secrète des substances ou bien des colorants, qui n'est pas commun chez toutes les espèces de *Fusarium* (Kendall, 2008).

Fusarium roseum pousse bien sur la gélose de pomme de terre (PDA) avec une vitesse de croissance importante en donnant des colonies de couleurs allant du blanc vers le rose. Il est capable de produire des macroconidies et des microconidies (figure 4), environ 4 par 14µm (Deshpande et Koppikar, 1999). La fonte des semis (figure 3) est causée par plusieurs organismes parmi eux *Fusarium roseum*. Bien des plantules ne lèvent pas ou lèvent, mais paraissent jaunes et comportent de la pourriture brune ou brun-rouge à la base de leur tige (Maaro, 2009).



Figure. 3 : Progression de la pourriture des semences (Bouneghou, 2011)



Figure. 4 : *Fusarium roseum* Détail de spores asexuées (conidies), pluricellulaires observées au microscope optique (Bouneghou, 2011)

I.1.2. *Alternaria sp* :

Les *Alternaria* sont des champignons fréquents dans notre environnement. Ils appartiennent aux moisissures atmosphériques. Ils peuvent être isolés de végétaux très divers. *Alternaria* comprend près de 275 espèces (**Simmons, 2007**) avec des modes de vie saprophytes et phytopathogènes qui peuvent affecter les cultures sur champ ou les produits végétaux pendant la récolte et post-récolte (**Logrieco et al., 2009**). Autant que parasites de faiblesse, les *Alternaria* sont capables de mener une existence saprophytique pendant des périodes plus ou moins longues. Certains, tels qu'*A. chartarum*, *A. consortiale*, *A. tenuis*, etc., ont un habitat le plus souvent saprophytique et se rencontrent couramment sur des débris organiques ou les végétaux morts. Quelques espèces, comme *A. solani*, *A. dauci et ses formes*, *A. linicola*, *A. zinniae*, etc., vivent au contraire à l'état de parasites sur des plantes encore apparemment vigoureuses (**Messiaen et al., 1991**). Ce sont des champignons mésophiles, leurs activités prédominantes disparaissent lorsque la température s'élève (**Botton et al., 1990**).

Les membres du genre *Alternaria* possèdent des conidies septées avec cloisons transversales et longitudinales (figure 6), les cellules sont multi nucléées (pluricellulaires) de couleur foncée généralement piriformes ou ovotides de tailles variables selon les espèces (**Rotem, 1994**). Elles possèdent un pigment de type mélanine qui leur servent de protection contre des conditions environnementales défavorables, y compris la résistance aux microbes et enzymes hydrolytiques (**Rotem, 1994**). Les champignons du genre *Alternaria* sont des Deuteromycètes. Cette classe renferme tous les champignons à mycélium cloisonné dont la forme de reproduction est généralement inconnue mais possèdent un mode de multiplication asexuée, par conidies (**Ellis, 1971 ; Simmons, 1986 ; Erikson et Hawksworth, 1991**).

Alternaria alternata est un champignon filamenteux cosmopolite ubiquiste communément isolé à partir de plantes, de sols, de nourriture corrompue ainsi que de l'air ambiant des habitations (**Criquet et al., 2008**).

Cette espèce a été isolée de substrats et habitats divers, entre autres :

-audiovisuel ; bois ; caoutchouc ; matières synthétiques ; papier ; plantes ; produits alimentaires (fruits, légumes, céréales, noix...) ; sol ; textile (coton, jute, laine).

Alternaria alternata est également très fréquent. Sa croissance a été mise en évidence sur de nombreux substrats. Plus de 50 % des prélèvements de poussières de matelas de logements humides en contiennent (**Botton et al, 1990**)

L'alternariose Provoquée par *Alternaria alternata* ; La maladie (figure 5) provoque surtout des dégâts en climat continental, chaud et sec, mais est accentuée en culture irriguée. L'alternariose est favorisée par la sénescence des plantes et des conditions climatiques bien précises :

- température élevée (20-25°C) et rosée pendant la nuit pour permettre l'infection,
- alternance de périodes humides et ensoleillées pour la formation des conidies et la sporulation. La dispersion des spores est assurée par le vent et les éclaboussures de pluie (**Kwon-Chung et Bennett. 1992**).

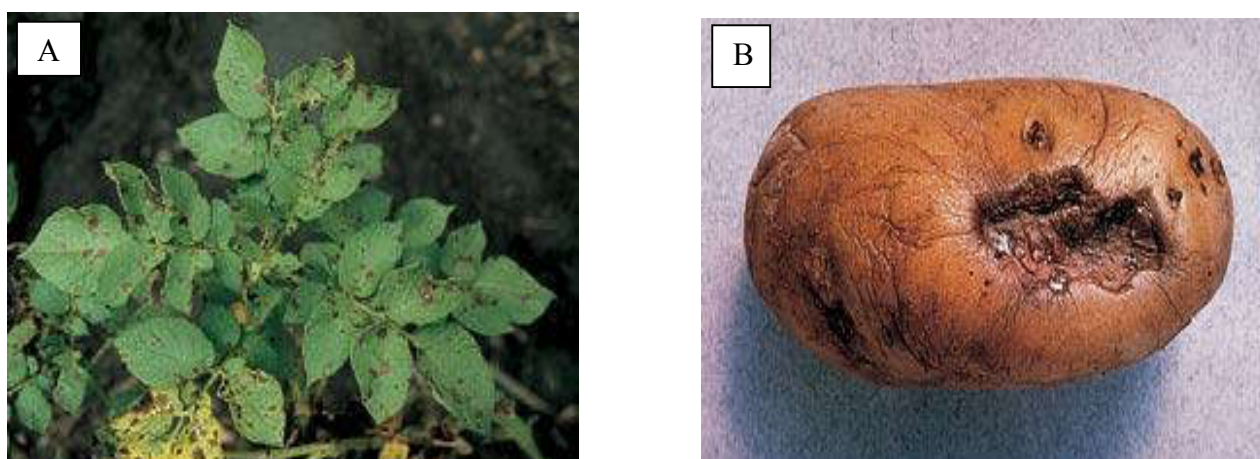


Figure. 5 : (A) *Alternaria alternata* sur feuilles (B) *Alternaria alternata* sur tubercule (**Bouneghou, 2011**)



Figure. 6 : Spores d'*Alternaria alternata* (**Criquet et al.,2008**)

I.1.3. *Aspergillus sp* :

Les *Aspergillus* sont fréquents dans la nature. Ils vivent en saprophytes dans le sol Mais aussi à sa surface et sur les végétaux. A la faveur de courants d'air, les spores d'*Aspergillus* sont véhiculées et peuvent se déposer sur des substrats divers. On peut isoler des *Aspergillus* à l'extérieur dans l'atmosphère, mais aussi à l'intérieur des habitations, sur les vêtements **(Vaubourdolle, 2007)**. Les champignons du genre *Aspergillus* ont été décrits pour la première fois en 1729. Ce sont des champignons saprophytes, c'est-à-dire qui tirent leur nourriture de substances organiques en décomposition. Ce sont des moisissures à filaments hyalins, cloisonnés, et ils Sont haploïdes. Le genre *Aspergillus* comprend aujourd'hui 185 espèces, dont une vingtaine est retrouvée en pathologie humaine **(Badillet et al., 1987)**. Les *Aspergillus* sont ubiquistes, et en région tempérée plus particulièrement à la fin de l'été, en automne et en hiver. Ces champignons ont un métabolisme aérobie. De plus ils participent au recyclage du carbone et de l'azote de l'environnement. Ils sont thermophiles (certaines espèces peuvent survivre à des températures (certaines espèces peuvent de 70°C) et ne requièrent pas de nutriments spécifiques **(Quatresous, 2011)**.

De nombreux *Aspergillus* noirs ont été isolés du monde entier. *A. niger* est un champignon filamenteux (figure 8) qui se développe en aérobiose sur la matière organique. Dans la nature, on le trouve dans le sol et de la litière, dans le compost et le matériel végétal en décomposition (figure 7). *A. niger* est capable de croître dans une température de 6 - 47°C avec une température relativement élevée avec un optimum de 35 à 37°C. La limite d'activité de l'eau (Water activity : WA) pour la croissance est 0,88 est relativement élevée comparativement aux autres espèces, *A. niger*, peut pousser sur une très large gamme de pH : 1,4 - 9,8. Ces capacités et l'abondante production de conidies, qui sont distribués par l'intermédiaire de l'air, garantissent l'occurrence omniprésente de l'espèce, avec une fréquence plus élevée aux lieux chauds et humides **(Schuster et al., 2002)**.



Figure. 7 : Symptômes de la pourriture des grains de maïs causée par (*Aspergillus Niger*) (Photo : Iowa State University)

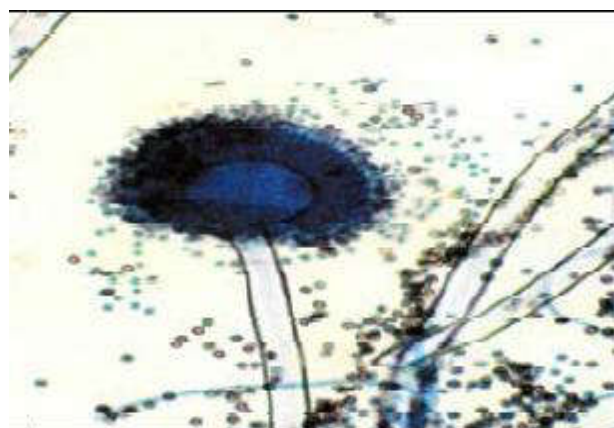


Figure. 8 : Aspect microscopique d'*Aspergillus niger* (G X40) (Malloch, 1997 ; Chabasse *et al.*, 2002)

I.2. Les bactéries phytopathogènes :

I.2.1. Le genre *Erwinia* :

En 1920, en honneur du phytopathologiste Erwin F. Smith, Winslow classa ces bactéries pectinolytiques dans le genre *Erwinia*. Ce genre comprend deux groupes d'espèces morphologiquement similaires mais présentant de nettes différences d'expression du pouvoir pathogène et de caractéristiques biochimiques. Il renferme d'une part l'espèce type *Erwinia amylovora* agent causal du feu bactérien et d'autre part les *Erwinia* pectinolytiques responsables de la pourriture molle des tubercules de pomme de terre (Perombelon et Kelman, 1980 ; Toth et Birch, 2005).

❖ *Erwinia amylovora* :

E. amylovora a été la première bactérie identifiée comme pathogène des plantes et la première à être disséminée par des insectes (Baker, 1971 ; Malnoy *et al.*, 2012 ; Thomson, 2000). De plus, c'est la seule bactérie capable d'induire le feu bactérien (Eastgate, 2000).

Erwinia amylovora est une bactérie Gram-négative, facultativement anaérobie et pathogène, appartenant à la famille des entérobactéries, à la division des protéobactéries et à la subdivision. Les cellules sont en forme de tige, d'environ $0,3 \mu\text{m} \times 1-3 \mu\text{m}$ en taille, non sporulées et produisent une capsule d'exopolysaccharide. Ils sont mobiles par flagelle péritriches et sa mobilité a été associée à une chimiotaxie spécifique, soit les conditions optimales de 20°C et un

pH de 6,8 (**Raymundo et Ries, 1981, 1980**). Bien que *E. amylovora* soit capable de croître entre 3-5°C et 37°C, la température optimale est de 25-37°C (**Paulin, 2000**).

Contrairement à la plupart des bactéries pathogènes des plantes qui induisent la nécrose, *E. amylovora* peut se déplacer rapidement et largement à partir du point d'infection. La capacité du pathogène à se propager et à survivre dans les tissus de l'hôte est également remarquable (**Thomson, 2000**). *E. amylovora* est considérée comme une bactérie de quarantaine, classée comme un organisme réglementé dans l'Union européenne (**Gottsberger, 2010 ; Vrancken et al., 2013**).

On a suggéré que la capsule d'exopolysaccharide d'*E. amylovora* joue un rôle clé dans sa pathogénicité, en passant par le système de défense de la plante, en perturbant et en obstruant le système vasculaire de la plante, et en protégeant les bactéries contre la perte d'eau et d'éléments nutritifs en conditions sèches. **Koczan et al (2009)** ont découvert que les exopolysaccharide d'*E. amylovora* sont également impliqués dans la formation du biofilm, ce qui permet aux bactéries de s'attacher à plusieurs surfaces et les unes aux autres (**Koczan et al., 2009**).

Le développement des symptômes du feu bactérien (figure 9) semble cyclique par nature parce qu'il suit le développement saisonnier de la plante hôte. *E. amylovora* passe l'hiver dans les chancres sur les rameaux, branches ou troncs qui se sont formés sur des arbres hôtes malades au cours des années précédentes, fournissant ainsi l'inoculum pour la saison suivante. Les chancres sont des zones latérales décolorées ou enfoncées dans l'écorce qui, au moment de l'écorçage, présentent souvent des tissus rouge-orange et humides dans le parenchyme cortical. Au printemps, lorsque le temps est suffisamment chaud et humide et que les arbres reprennent leur croissance, le pathogène devient actif dans les marges des chancres (**Thomson, 2000**).

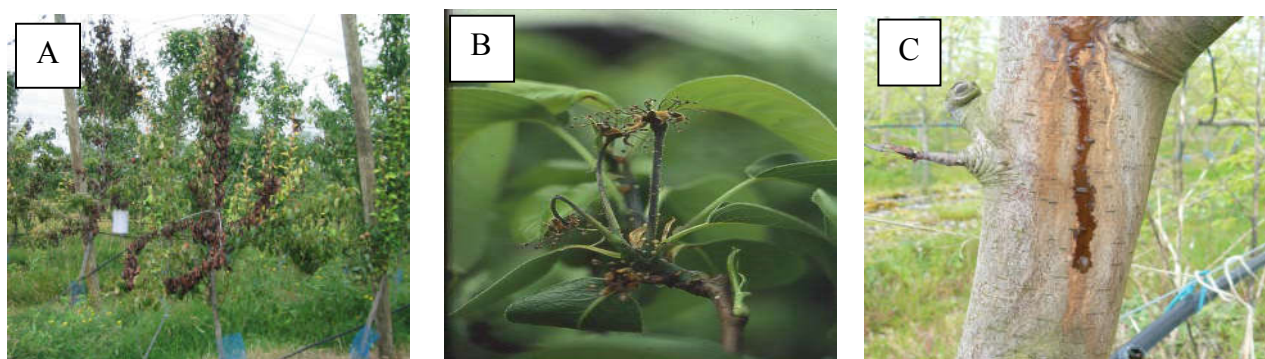


Figure. 9 : Symptômes du feu bactérien sur poirier, (A) nécroses sur pousses, (B) nécroses et exsudat sur fleurs, (C) exsudat sur tronc (**Delaunay-Cesbron, 2009**)

❖ ***Erwinia carotovora (Pectobacterium carotovorum) :***

Erwinia carotovora (Ec) ou *Pectobacterium carotovorum (Pc)* est une bactérie phytopathogène qui appartient à la famille des *Enterobacteriacées*. Elle provoque la pourriture molle de nombreux fruits ou légumes (dont la pomme de terre) (figure 10). Cette bactérie ne survit pas dans la terre et utilise un vecteur insecte pour se propager d'une plante à une autre. Cette bactérie entraîne le développement d'une pourriture molle des tubercules. Les attaques précoces du parasite peuvent faire pourrir les tubercules-mères en terre et provoquer des manques à la levée ; ces tubercules contaminés assurent l'essentiel des contaminations mais le développement de la maladie dépend largement des facteurs climatiques. En outre, Il peut y avoir une sensibilité variétale à la bactérie (**Toth et al., 2003**). L'entérobactérie *Pc* est une bactérie opportuniste possédant les mêmes caractéristiques qu'*Ec* et est apte à affecter un large éventail d'hôtes dans de très vastes aires géographiques, autant dans les zones tropicales que dans celles tempérées. Cette espèce est en fait divisée en deux sous-espèces qui sont :

➤ ***Erwinia carotovora subsp carotovora (Ecc)***

Bactérie psychrotrophe se développant à des températures s'allongeant de 20-30°C (**Perombelon, 2002**). Pourtant sur gélose nutritive ou en bouillon nutritif, la croissance de cette bactérie s'arrête à des températures supérieures à 36°C (**Perombelon et Kelman, 1980**). Elle est fréquemment isolée à partir des pourritures humides des organismes de réserve et des pourritures aériennes des tiges (**Toth et al., 2003**).

➤ ***Erwinia carotovora subsp atroseptica (Eca)***

Cette sous-espèce se trouve toujours en étroite liaison avec les symptômes de la jambe noire (figure 11), principalement dans les zones tempérées à climat frais et humide (**Toth et al., 2003 ; Hélias et al., 2008**). Bien que ces deux bactéries appartiennent à la même espèce et pouvant causer la même maladie, *Eca* possède des caractéristiques propres les distinguant des *Ecc*, telles son incapacité à croître à une température de l'ordre de 37°C, sa production de substances réductrices à partir du saccharose, des acides à partir du maltose et de l' α -méthylglucoside (**Bradbury, 1986**).



Figure. 10 : Pourriture molle et humide causée par *Pectobacterium sp* (Hélias, 2008)



Figure. 11 : Symptômes de la jambe noire sur la partie aérienne du plant de pomme de terre (Hélias, 2008).

A decorative graphic of a scroll with a blue outline and grey shading, positioned behind the text. The scroll is partially unrolled, with the top edge curving upwards and the bottom edge curving downwards.

Chapitre II

La Lutte Biologique

I. Concepts de la lutte biologique

I.1. Généralité :

Plusieurs définitions de la lutte biologique ont été proposées mais aucune n'est adoptée par tous les acteurs concernés. La lutte biologique est définie comme « l'utilisation d'organismes vivants, ou des produits de leurs gènes, pour limiter ou supprimer les activités et les populations de pathogènes » (**Fravel, 2005 ; Paulitz et Bélanger, 2001**).

En fait, elle peut se faire par utilisation des microorganismes entomopathogènes ou pathogènes de mauvaises herbes ou encore antagonistes d'autres organismes phytopathogènes. Ces microorganismes jouent un rôle important dans la protection de la plante (**Benizri *et al.*, 2001**).

L'application des agents de lutte biologique sur les cultures présentes plusieurs avantages, les plus importants sont l'absence d'effets secondaires nocifs (absence des résidus chimiques, de pollution chimique) et de danger pour l'environnement ou sur les cultures, car les biopesticides sont spécifiques à l'espèce-cible (**Meyer, 2002**).

I.2 Définition :

Il n'existe pas de définition unique et acceptée de la lutte biologique. En pathologie végétale, la lutte biologique s'applique à l'utilisation d'antagonistes microbiens pour supprimer les maladies ainsi qu'à l'utilisation de pathogènes spécifiques à l'hôte pour contrôler les populations des pathogènes. L'organisme qui supprime le ravageur ou le pathogène est appelé agent de lutte biologique (**Pal et Gardener, 2006**).

Selon Garrette (1965), la lutte biologique peut être définie comme « toute condition en vertu de laquelle une pratique par laquelle la survie ou l'activité d'un agent pathogène est réduite par l'Agence d'un autre organisme vivant (sauf par l'homme lui-même) avec le résultat il y a une réduction dans l'incidence de la maladie causée par des agents pathogènes » (**Garrette, 1965**).

Tel que défini par l'Académie nationale des sciences, et compte tenu des développements biotechnologiques modernes, la lutte biologique se réfère à l'utilisation d'organismes naturels ou modifiés, de gènes ou de produits génétiques pour réduire les effets des organismes indésirables et pour favoriser les organismes souhaitables tels que les cultures, les arbres, les animaux et les insectes et les micro-organismes bénéfiques (**Thomashow et Weller, 1996**).

Plus précisément, la lutte biologique fait référence à l'utilisation ponctuelle d'organismes vivants introduits ou résidants, autres que les plantes hôtes résistantes aux maladies, pour

supprimer les activités et les populations d'un ou de plusieurs agents pathogènes végétaux (**Pal et Gardener, 2006**). L'agent de lutte biologique idéal (BCA) devrait avoir les caractéristiques suivantes (**Wilson et Wisniewski, 1994**) :

- Résistance au pesticide le plus fréquemment utilisé, et compatibilité avec d'autres traitements.
- stabilité génétique.
- efficacité à faible concentration et contre un large éventail d'agents pathogènes sur une variété d'hôtes.
- exigences nutritionnelles simples.
- survie dans des conditions environnementales défavorables.
- croissance sur substrat bon marché dans les fermenteurs.
- absence de pathogénicité pour les plantes et absence de production de métabolites potentiellement toxiques pour l'homme.

L'utilisation réussie du biocontrôle nécessite une meilleure compréhension de la biologie de la maladie et de son antagoniste, ainsi que de la physiologie des plantes hôtes et de sa culture.

I.3. Objectifs :

Le but de la lutte biologique est de proposer des méthodes utilisant l'introduction volontaire par l'homme de prédateurs, de parasites ou de microorganismes pour réduire ou supprimer des espèces considérées comme nuisibles. En effet, en milieu naturel, chaque espèce vivante a un ou plusieurs ennemis ou compétiteurs naturels qui contribuent à maintenir cette espèce à des niveaux de population en équilibre relativement stable (**Lydie, 2010**).

La lutte biologique repose sur le postulat qu'une espèce envahissante se multiplie sans limite dans une aire d'introduction quand elle ne rencontre pas les ennemis naturels (prédateurs, parasites, pathogènes) présents dans son milieu d'origine. C'est la théorie du relâchement écologique (en anglais ecological release). L'utilisation d'une méthode de lutte biologique ne cherche pas à parvenir à une éradication totale de l'espèce envahissante (espèce cible) mais son objectif est d'en réduire suffisamment et durablement les effectifs pour l'amener en dessous d'un seuil de nuisibilité, écologiquement et/ou économiquement acceptable. L'objectif principal est donc de rétablir un équilibre durable entre l'agent de lutte et l'espèce cible. Le point le plus important est la sélection d'agents de lutte biologique hautement spécifiques de l'espèce cible

pour qu'ils ne s'attaquent pas à d'autres espèces et ne deviennent pas à leur tour des espèces envahissantes nuisibles (Lydie, 2010).

II. Les principales méthodes de lutte biologique :

D'une manière générale, quatre grandes catégories de méthodes de lutte biologique ont été définies (Eilenberg *et al.*, 2001) :

— Classique ou par acclimatation : consiste à introduire des organismes exotiques (non indigènes = allochtones) dans un territoire avec l'espoir qu'ils s'y établissent pour lutter de manière durable contre des organismes exotiques nuisibles ;

— Néoclassique : consiste à introduire des organismes exotiques pour lutter contre des organismes indigènes (autochtones) ;

— Inoculative ou inondative : ces méthodes consistent à augmenter des populations d'organismes indigènes par lâchers, soit dans le but qu'ils se multiplient rapidement et contrôlent les organismes cibles (inoculative) soit de les lâcher en nombre suffisant pour qu'ils contrôlent directement les cibles (inondative). Ce type de lutte n'est pas forcément durable mais vise surtout à protéger une culture pendant une période donnée (période de végétation, ou de fructification par exemple) ;

Un programme de recherche en lutte biologique se déroule en plusieurs étapes (Cronk et Fuller, 1995)

- identifier l'aire d'origine de l'espèce envahissante (espèce cible) ;
- étudier l'écologie de l'espèce cible dans son aire d'origine ;
- rechercher et identifier les ennemis de l'espèce cible dans son aire d'origine ;
- obtenir les autorisations pour collecter et importer ces ennemis naturels ;
- cultiver ou élever ces ennemis naturels dans un environnement sécurisé (laboratoire de quarantaine) ;
- effectuer tous les tests nécessaires : viabilité, efficacité, spécificité (innocuité pour d'autres espèces). Cette phase nécessite souvent plusieurs années d'études ;
- faire approuver l'introduction des agents de lutte sélectionnés par un comité d'experts composé de scientifiques, de gestionnaires et d'agents des services gouvernementaux (environnement, agriculture, santé...) ;

- introduire les agents de lutte biologique sélectionnés dans la zone où on veut contrôler l'espèce cible. Un plan d'introduction (lieux, dates, quantités) est établi afin de maximiser les chances d'établissement de l'agent de lutte ;

- effectuer un suivi sur le terrain afin d'évaluer la réussite de l'introduction, et de l'acclimatation mais aussi l'impact des agents de lutte sur une durée de cinq à dix ans.

III. Les acteurs de la lutte biologique :

Les acteurs principaux de la lutte biologique sont de deux types : les « cibles » qui sont les organismes dont on veut limiter les populations et les « agents de lutte », généralement appelés auxiliaires, qui sont des organismes différents, agresseurs ou concurrents des cibles. La plupart des auxiliaires utilisés en lutte biologique sont des microorganismes : virus, champignons, bactéries et protozoaires. Il s'agit alors de lutte microbiologique. Dans la lutte microbiologique, le taux de mortalité obtenu est fortement dépendant des conditions environnementales ce qui peut en rendre l'utilisation délicate et contraignante (**Lydie, 2010**).

IV. La lutte microbiologique :

IV. 1. L'utilisation des microorganismes :

De nombreuses recherches ont montré que la densité, la diversité et l'activité des microorganismes sont fortement élevées à proximité de la racine étant donné que c'est dans cette zone que se manifeste l'effet rhizosphère (**Hamdan, 2010**).

Parmi les microorganismes couramment rencontrés dans la rhizosphère se trouvent les bactéries dont la densité peut aller jusqu'à 109 par gramme de sol (**Balasubramanian et Rangaswami, 1978**), les champignons microscopiques environ 105 par gramme de sol (**Morel, 1996 ; Soufiane, 1998**), les virus, les algues, les protozoaires, et un groupe très particulier qui est constitué d'actinomycètes ou bactéries filamenteuses dont la densité peut atteindre jusqu'à 107 par gramme de sol (**Iwai et Takashi, 1992; Soufiane, 1998**).

IV.2. Mécanismes d'action des microorganismes :

Les mécanismes par lesquels les agents de lutte biologique peuvent prodiguer leur effet protecteur sont multiples et peuvent varier pour un microorganisme donné en fonction du pathosystème (couple hôte végétal/pathogène) (**Van Den Broek et al., 2003 ; Bloemberg et al., 2001**).

Parmi les effets directs sur l'agent pathogène l'antibiose est probablement le plus connu, il s'agit du mécanisme par lequel une souche antagoniste inhibe le développement d'une souche cible grâce à la production de métabolites secondaire toxique. Les substances toxiques sont susceptibles de diffuser dans le milieu. Qui signifie que l'effet d'un microorganisme agissant par antibiose ne nécessite pas la juxtaposition des deux microorganismes (**Alabouvette et Cordier, 2012**).

Un autre mode d'action d'antagonisme directe des agents de protection biologique, le phénomène d'hyperparasitisme est le seul qui soit propre aux agents microbiens. Il est associé le plus souvent à la production d'enzymes capables de dégrader les parois cellulaires des agents pathogènes (chitinases, béta1-3 glucanase,) (**De Boer et al., 1998 ; Fernandes, 2006**).

Dans le même contexte, le troisième mode d'action est la compétition pour le carbone, l'azote et autres facteurs de croissance en même temps que la complétion pour l'espace et les sites spécifiques d'infection peuvent être utilisées par les agents de lutte biologiques contre les agents phytopathogènes (**Vinal et al., 2008**). L'efficacité liée à un tel mécanisme repose sur l'exclusion des agents pathogènes, en particuliers ceux dont les spores ont besoin de source nutritive exogènes pour germer (**Elad, 2000**).

Par exemple, la compétition pour le fer entre la bactérie auxiliaire *Pseudomonas spp.* Et des bactéries ou champignons pathogènes (**Fernandes, 2006**). Outre ces mécanismes d'antagonisme direct, certaines souches microbiennes influencent avantageusement l'hôte végétal par la stimulation directe de la croissance (fixation de l'azote, solubilisation de phosphate, et production des phytohormones) ou/et en le protégeant contre l'infection par des phytopathogènes.

En raison de l'effet global qu'elles procurent, ces souches sont désignées également sous le terme de rhizobactéries promotrices de la croissance des plantes ou Plant Growth Promoting Rhizobacteria (PGPRs) (**Mercado-Blanco et Bakker, 2007**). Ce type de mécanisme est connu chez certains *Trichoderma*, *Pytiumoligandrum* et deux bactéries, *Pseudomonas* et *Bacillus*spp. (**El-Tarabily et al., 1997 ; Fernandes, 2006**).

IV.2.1. Utilisation des bactéries contre champignons phytopathogènes :

Plusieurs auteurs ont montré l'importance de l'activité antibiotique des bactéries dans la limitation de la gravité des maladies d'origine tellurique (**Howell et Stipanovic 1979 ; Papavizas et Lumsden, 1980 ; Sneh et al., 1984 ; Weller et Cook, 1986 ; Altindag et al.,**

2006). La lutte biologique est mieux contrôlée via un antagoniste bactérien, qui va interagir directement avec l'agent pathogène et/ou indirectement c'est à dire avec la plante-hôte (Tomashow, 1996 ; Benhamou *et al.*, 2002).

Plusieurs genres bactériens sont des agents de biocontrôle antifongique (Mcloughlin *et al.*, 1992 ; Duijff *et al.*, 1993 ; Vicedo *et al.*, 1993 ; Korsten *et al.*, 1997 ; Ramamoorthy *et al.*, 2001 ; Esitken *et al.*, 2002 ; Badji *et al.*, 2005). Les bactéries les plus utilisées sont : *Pseudomonas fluorescens*, *Pseudomonas putida*, *Entinia herbicola*, *Bacillus subtilis* et *Enterobacter cloacae*.

IV.2.3. Utilisation des bactéries contre bactéries phytopathogènes :

Certaines souches de PGPR (figure 12) peuvent protéger les plantes d'une façon indirecte par stimulation de mécanismes de défense inductible dans la plante en rendant l'hôte beaucoup plus résistante aux futures agressions des agents pathogènes. Ce phénomène a été nommé « résistance systémique induite » (ISR Induced Systemic Resistance) (Van Loon *et al.*, 1997) et sert à protéger les plantes contre des attaques subséquentes des virus, bactéries et champignons pathogènes. La résistance systémique peut être induite par des microorganismes variés, des bactéries à Gram positif comme *Bacillus pumilus*, ou des bactéries à Gram négatif appartenant au genre *Pseudomonas* (*fluorescens*, *putida*, *aeruginosa*), et aux entérobactéries comme *Serratia* (*marcesens*, *plymuthica*) ou *Pantoea agglomerans* (Jourdan *et al.*, 2008).

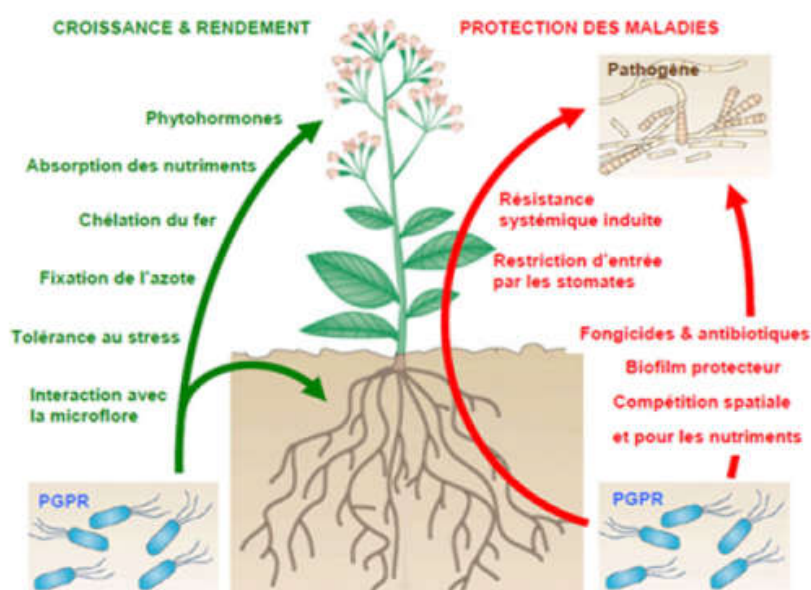


Figure. 12 : Mécanismes d'action des Rhizobactéries (Azrou et Guettafi, 2014)

Il existe plusieurs mécanismes impliqués dans la lutte biologique contre les maladies bactériennes végétales, par lesquels un micro-organisme peut limiter la croissance d'un autre : antibiose, compétition pour l'espace et des ressources limitées, induction de la résistance de l'hôte, formation de biofilm, interaction directe entre l'antagoniste et le pathogène (**Whipps, 2001**).

Les antibiotiques produits par les microorganismes sont très divers dans leur structure moléculaire et leur mode d'action. Habituellement, le même micro-organisme peut produire plusieurs antibiotiques. Un exemple est *P. fluorescens* qui produit plusieurs composés ayant une activité inhibitrice contre différents pathogènes du sol (**Keel et al., 1989**).

Une stratégie idéale de biocontrôle introduit les antagonistes seulement quand et où ils sont nécessaires ou les plus efficaces, et minimise l'application inutile d'inoculum à des non cibles (**Bonaterre et al., 2003**).

IV.2.4. Les bactéries du genre *Pseudomonas* :

❖ Caractéristiques du 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 ; Palleroni et Moore, 2004**).

Les pseudomonas sont parmi les bactéries les plus importantes dans la rhizosphère (**Misko et Germida, 2002**), sont des bacilles à Gram négatif de 0,5-1,3 μm de diamètre (**Eyquem et al., 2000**). Le genre *Pseudomonas* a été décrit en 1894 (**Migula, 1894**), englobe des bactéries ubiquitaires possédant une grande diversité, incluant des espèces saprophytes et parasites (**Lefrère et Rouger, 2000 ; Choudhary et al., 2009**). Ces bactéries se caractérisent par un métabolisme aérobie strict, certaines souches ont une respiration anaérobie avec le nitrate comme accepteur terminal d'électrons et/ou l'arginine. Les pseudomonas sont mobiles grâce à un ou plusieurs flagelles polaires (**Eyquem et al., 2000 ; Haas et Défago, 2005**), sont rarement immobiles et sont non sporulés. La plupart des *Pseudomonas* se cultivent à 30 °C et se caractérisent par une croissance lente à 4 °C (**Eyquem et al., 2000**).

❖ *Pseudomonas fluorescens* :

Pseudomonas fluorescens est une bactérie gram-négative, fermentant le glucose mais pas le lactose, oxydase positive en forme de bâtonnets avec des flagelles polaires qui lui assurent la mobilité. C'est une bactérie ubiquitaire rencontrée dans les sols, sur les racines des végétaux, sur les plantes, ainsi que dans les eaux douces et marines (Charan, Reddy *et al.*, 2011 ; Wong, Levi *et al.*, 2011). Il appartient à la classe des Gammaproteobacteria, famille des Pseudomonadacea et au genre *Pseudomonas*. La fluorescence est due à la production d'un pigment fluorescent jaune-vert appelé pyoverdine soluble dans l'eau et insoluble dans le chloroforme (Paulsen, Press *et al.*, 2005 ; Wong, Levi *et al.*, 2011 ; Gao, Yin *et al.*, 2012 ; Trögl, Chauhan *et al.*, 2012). Sa température de croissance optimale se situe entre 25 et 30°C.

❖ Applications de *Pseudomonas fluorescens*

Pseudomonas fluorescens a plusieurs applications, les plus connues concernent l'agriculture où il est utilisé en lutte biologique et comme stimulateur de croissance des plantes PGPB (Plant Grown Promoting Bacteria) (Ongena *et al.*, 2000 ; Ongena *et al.*, 2005 ; Russo *et al.*, 2005 ; Couillerot *et al.*, 2009 ; Anita et Samiyappan, 2012 ; Gao *et al.*, 2012). *Pseudomonas fluorescens* combat plusieurs infections des plantes, leurs modes d'action dans la suppression des maladies des plantes incluent les sidérophores pour la compétition du fer disponible, l'antibiose, la production d'enzymes lytiques et le Système de Résistance Induit (ISR) (Ongena *et al.*, 1999, Ongena *et al.*, 2005 ; Paulsen *et al.*, 2005, Russo *et al.*, 2005 ; Bakker *et al.*, 2007 ; Anita et Samiyappan, 2012). Il est également utilisé comme catalyseur dans la réaction de transestérification de l'huile de *Jatropha* pour la production de biodiesel (Devanesan *et al.*, 2007). *Pseudomonas fluorescens* joue aussi un rôle dans la protection de l'environnement par la dégradation des hydrocarbures et d'autres types de polluants (Lemire *et al.*, 2010 ; Pandey et Upadhyay, 2010 ; Moneke *et al.*, 2010).

IV.2.5. Les bactéries du genre *Serratia* :

Les *Serratia* sont des bactéries de l'environnement présentes sur le sol et sur les plantes. Sont les entérobactéries les plus résistantes aux agents physiques et chimiques. Elles peuvent survivre des mois dans l'eau distillée et se multiplier dans des solutions antiseptiques. Elles se multiplient bien à + 4 °C. Les infections hospitalières peuvent être en relation avec des

antiseptiques ou des flacons contaminés, mais la transmission manuportée semble être plus fréquente (Flandrois., 1997 ; Maza *et al.*, 2004).

Neuf espèces sont reconnues : *S. marcescens*, *S. liquefaciens*, *S. plymuthica*, *S. rubidaea*, *S. odorifera*, *S. ficaria*, *S. grimesii*, *S. proteomaculans* et *S. entomphila* (Carbonelle *et al.*, 1987).

❖ ***Serratia plymuthica* :**

Le genre *Serratia* comprend différentes espèces, comme *S. marcescens*, qui est fréquemment impliqué dans les infections humaines et animales, et *S. marcescens. plymuthica* est un bâtonnet saprophyte fermentatif, non mobile, à gram-négatif, qui produit un pigment rouge, classé comme une cause rare d'infection humaine (Reina *et al.*, 1992 ; Carrero *et al.*, 1995) et animale (Nieto *et al.*, 1990 ; Austin et Stobie 1992). *S. plymuthica* est présent dans le sol (Kalbe *et al.* 1996), et a été isolé à partir de différents types d'aliments (Lopez Sabater *et al.*, 1996 ; Lyhs *et al.*, 1998). La plupart des souches de *S. plymuthica* décrites jusqu'à présent ont été isolées à partir d'eau douce et de poissons, ce qui suggère qu'il pourrait s'agir d'un pathogène opportuniste potentiel pour les animaux et les humains (Nieto *et al.*, 1990).

Cependant, *S. plymuthica* est le plus souvent associé aux plantes. Cet organisme a été isolé dans la rhizosphère de l'herbe (Alstrom et Gerhardson, 1987), du blé (Alstrom et Gerhardson, 1988), du maïs (Lucon et Melo, 2000), du colza (Kalbe *et al.*, 1996), du raisin (Chernin *et al.*, 1995), du melon (Kamensky *et al.*, 2003), de l'oignon (Park et Shen, 2002), de la tomate (Frommel *et al.*, 1991). Et comme endophyte dans la rhizosphère de la pomme de terre (Berg *et al.*, 2005). Il a été trouvé sur les parties comestibles de l'oignon vert, de la carotte et de la laitue (Grimont *et al.*, 1981) sur la phyllosphère du blé de printemps (Legard *et al.*, 1994), et comme contaminant dans une chaîne de transformation de légumes crus (Van houdt *et al.*, 2005)

A decorative graphic of a scroll with a blue outline and grey shading on the top and bottom edges, framing the text.

Chapitre III

Matériel Et Méthodes

1. Lieu d'étude :

Ce travail a été réalisé au laboratoire de microbiologie à l'université de 8 mai 1945, Guelma. Durant la période allant du décembre jusqu'au avril.

2. Souches bactériennes :

2.1. Présentation des souches bactériennes antagonistes :

Nous avons utilisé 17 souches bactériennes, 10 souches de *pseudomonas*, 5 souches de *serratia*, 2 souches d'*Erwinia* (*amylovora* et *carotovora*) (tableau 1).

Tableau 1 : Répartition des souches étudiées.

Famille	Espèces	Nombre de souche	Code de l'espèce
<i>Entérobactériaceae</i>	<i>Serratia plymuthica</i>	5	SOL, MAI, MI, M3, A
<i>Entérobactériaceae</i>	<i>Erwinia amylovora</i>	1	1430
	<i>Erwinia carotovora</i>	1	194
<i>Pseudomonadaceae</i>	<i>Pseudomonas fluorescens</i>	10	NA, NB, NC, ND, NE, NF, NG, NH, NI, NK

2.2 Origine des souches :

Les souches ont été isolées et purifiées au sein du laboratoire de SRPV Oran de la manière suivante :

Les souches de *Serratia plymuthica* : isolées à partir du sol et rhizosphère de pomme de terre des régions regroupées dans le tableau 2 :

Tableau 2 : Origine des souches de *Serratia plymuthica*

Souches	Région	Année
SOL	Sidi Adjel Mostaganem	2013
MAI	Mascara	2013
M1, M3	Mascara	2015
A	Relizane	2015

Les souches du *Pseudomonas fluorescence* ont été isolées à partir de la rhizosphère de néflier dans la région d'Oran durant année 2016.

NB : on note que les souches ont subit différents tests d'identification génétique et moléculaire au sein du laboratoire IVIA Valencia, Espagne.

2.3 Isolement et purification :

L'ensemencement des souches a été réalisé sur les milieux solides (King B, LPGA, LEVANE, LB) et incubé à 25°C pendant 48 heures.

La purification des souches bactériennes est procédée par repiquage successif sur les mêmes milieux. Le repiquage se poursuit jusqu'à l'obtention d'une culture homogène où toutes les colonies sont identiques entre elles et identique au type de bactéries initialement ciblées, cette partie de la méthode a été réalisé au sein de laboratoire de SRPV Oran.

2.3.1 Les milieux de cultures :

- **Milieux solides :** LPGA, King B, LEVANE, LB
- **Milieu liquide :** LB

2.4. Identification de bactéries utilisées (test de confirmation) :

Après l'obtention de la souche bactérienne pure à étudier, L'identification des bactéries se fait suivant une clé dichotomique qui va des caractères les plus vastes aux plus pointus pour aboutir à une espèce bactérienne donnée.

2.4.1. Caractérisations morphologiques

Cette étape a pour but de vérifier la pureté des souches. Elle constitue une première orientation en fonction de la morphologie (macroscopique et microscopique).

2.4.1.1. Aspect macroscopique (colonies)

Après incubation, le premier critère d'identification sur lequel on se base est celle de l'aspect macroscopique des colonies vu à l'œil nue, que ça soit taille, forme du relief (bombée, semi bombée, plate), couleur, aspect (collant, filamenteux...), odeur, transparence (opaque, translucide), allure des contours (régulier, dentelés), pigmentation, et aspect de la surface (lisse ou rugueuse) (figure 13).

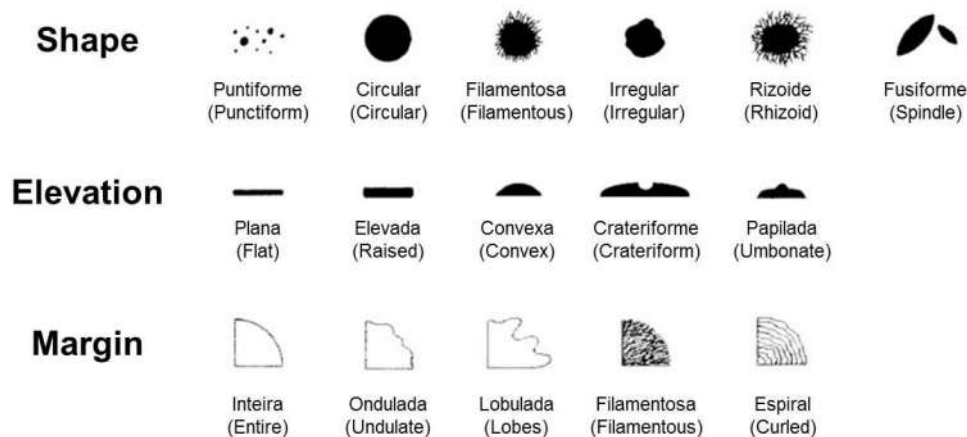


Figure. 13 : les caractéristiques morphologiques des colonies bactériennes [1].

2.4.1.2. Aspect microscopique :

• Coloration de Gram

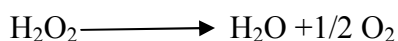
Les lames ayant servi à l'état frais ont été fixées à la chaleur. Le frottis préparé a été recouvert de violet de gentiane et laissé pendant une minute. L'eau a été ajoutée pour éliminer l'excès de colorant en veillant à ne pas détacher le frottis. Après, le frottis a été recouvert de quelques gouttes de Lugol pendant 30 s, puis rincé à l'eau. L'alcool 70° a été ensuite ajouté au frottis goutte à goutte jusqu'à ce que le violet de gentiane disparaisse. Enfin, la fuchsine a été ajoutée au frottis puis laissé pendant 1 minute. La lame a été ensuite rincée à l'eau et séchée à l'air. Après avoir recouvert le frottis d'huile à immersion, la lame a été montée sur la platine puis l'objectif X100 choisi pour effectuer les observations. L'observation a consisté à noter la forme des cellules (forme longue ou forme sphérique) et à noter la coloration des cellules. Les cellules colorées en roses ou rouges sont considérées comme des bactéries à Gram négatives et les bactéries colorées en violettes ou bleues sont des bactéries à Gram positives (**Madani, 2003**).

2.4.2. Caractérisations biochimiques

2.4.2.1. Recherche de la catalase

La catalase a la propriété de décomposer l'eau oxygénée avec dégagement d'oxygène. C'est l'action directe de l'enzyme qui est mise en évidence dans la masse bactérienne.

On prend une goutte d'eau oxygénée (H₂O₂) à 10 volumes qu'on dépose sur une lame avec une colonie bien distincte de culture jeune de 24 h, le dégagement immédiat de bulles d'oxygène exprime la présence d'une catalase (**Garnier et Denis, 2007**).



2.4.2.2 Recherche d'oxydase

La recherche de la cytochrome-oxydase a été effectuée à l'aide de disques « Ox » dont la zone réactionnelle est composée d'un papier filtre imprégné de N, N-diméthyl-1,4-phénylène diamine-dichlorure.

A partir d'un milieu solide, une partie de la colonie a été déposée sur un disque oxydase placé sur une lame, à l'aide d'une pipette Pasteur boutonnée. La présence d'une cytochrome-oxydase se traduit, en 20 à 60 secondes, par l'apparition d'une coloration rouge virant rapidement au violet très foncé, alors que résultat négative ; le disque reste incolore (**Joffin et Leyral, 2006**).

2.4.2.3 Production de pigment :

Sur le milieu King B et sous les rayons ultraviolet les colonies d'*Erwinia* ne sont pas fluorescentes par rapport au *Pseudomonas fluorescense* par exemple (**Helias et al., 1998 ; Baghaee-Ravari et al., 2011**).

2.4.2.4 Test de mise en évidence de l'activité levane sucrase :

Une colonie bactérienne est ensemencée sous forme de stries sur une boîte de Pétri contenant un milieu Levane solide, puis incubée pendant 48 heures à 25°C. L'apparition d'une culture abondante, bombé, blanche, brillante et très muqueuse après 01 à 02 jours à 25 ± 03°C indique une activité Levane sucrase (test positif). En l'absence de ces caractéristiques le test est jugé négatif (**Lelliott et Stead, 1987**).

2.4.2.5 la galerie classique :

❖ Réalisation de l'inoculum :

Deux ou trois colonies ont été prises à partir de la gélose LB ou la gélose LPGA. Puis elles sont mises dans 10 ml d'eau stérile et mélangées à l'aide de la pipette pasteur menée d'une poire.

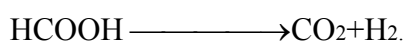
❖ Milieu Citrate de Simmons :

Une colonie bactérienne est ensemencée par strie sur la pente gélosée contenant le milieu citrate de Simmons et incubée à une température de à 25 ± 03°C pendant 24 heures. Les bactéries « citrate positives » poussent sur le milieu de Simmons en provoquant une alcalinisation du milieu qui se traduit par un virage au bleu de la coloration du tube. Les bactéries « citrate négatives » ne croissent pas sur le milieu (**Schaad et al., 2001**).

❖ Milieu Mannitol Mobilité Nitrate :

C'est une gélose molle conditionnée en tubes qui permet d'étudier la fermentation du mannitol et la mobilité des bactéries.

L'ensemencement a été réalisé par piqûre centrale jusqu'au fond des tubes à l'aide d'une pipette Pasteur. La fermentation du mannitol se matérialise par un virage du milieu au jaune.



Les bactéries mobiles diffusent à partir de la ligne d'ensemencement, créant un trouble dans le milieu alors que les bactéries immobiles poussent uniquement le long de la strie d'ensemencement (**Gerhardt *et al.*, 1994**).

2.4.2.6 La galerie API 20E Biomérieux :

Les autres tests biochimiques : recherche de la β -galactosidase (ONPG), de l'ornithine décarboxylase (ODC), de la lysine décarboxylase (LDC) et de l'arginine dihydrolase (ADH), production d'H₂S, utilisation du citrate, production d'indole et réaction de Voges-Proskauer, liquéfaction de la gélatine et la dégradation des sucres ont été réalisés en utilisant la plaque API 20^E Biomérieux.

Les galeries Api 20^E (figure 14) ont permis de réaliser ces différents tests selon les recommandations du fabricant (Biomérieux, France). L'introduction de la suspension bactérienne dans la cupule dissout les substrats déshydratés.

Une galerie se compose de 20 microtubes contenant des substrats déshydratés pour réaliser les 20 tests biochimiques miniaturisés. Les microtubes sont inoculés avec la suspension bactérienne à identifier. Les réactions produites durant la période d'incubation se traduisent par des virages colorés spontanés ou révélés par l'addition de réactifs. La lecture de ces réactions se fait à l'aide du Tableau de Lecture et l'identification est obtenue à l'aide du Catalogue Analytique ou d'un logiciel d'identification (**Biomérieux, 2006**).

Le principe a consisté à introduire la suspension bactérienne dans chaque cupule à l'aide d'une pipette Pasteur stérile, pointe appuyée à l'intérieur et sur le côté afin d'éviter la formation de bulles. Les tests d'urée et d'O.N.P.G sont des tests à réactions spontanées alors que les tests d'indole et d'acétoïne nécessitent l'addition de réactifs après incubation.

La lecture de ces réactions se fait à l'aide du Tableau de Lecture et l'identification est obtenue à l'aide du Catalogue Analytique ou d'un logiciel d'identification.

Au-delà des notions de classification, l'identification repose sur le profil biochimique de la bactérie.

Au niveau du laboratoire les étapes suivantes ont été suivies :

• **Préparation de la galerie :**

Réunir fond et couvercle d'une boîte d'incubation et répartir de l'eau dans les alvéoles pour créer une atmosphère humide, ensuite déposer stérilement la galerie dans la boîte d'incubation.

• **Préparation de l'inoculum :**

A partir d'une culture pure jeune de 18 à 24 heures, préparer une suspension bactérienne ayant une concentration de 5×10^8 UFC/ml dans 5 ml d'eau distillée stérile, il faut bien mélanger la suspension bactérienne au vortex 5-10 secondes pour l'homogénéiser, cette suspension doit être utilisée extemporanément.

• **Inoculation de la galerie :**

Déposer soigneusement 150 µl de la suspension bactérienne dans chaque cupule de la galerie en utilisant un embout stérile, ajouter de nouveau 150 µl de la suspension bactérienne aux cupules (citrate), VP (pyruvate de sodium) et GEL (gélatine) afin d'obtenir un volume final de 300 µl par puits, après l'inoculation, recouvrir les cupules ADH (arginine déshydrolase), LDC (lysine déshydrolase), ODC (ornithine décarboxylase), H₂S (sulfure d'hydrogène) et URE(uréase) d'huile végétale (huile de paraffine) afin créer une anaérobiose, la galerie est incubée dans une chambre humide à 30°C pour 18 à 24 heures. Après la durée d'incubation, la lecture de la galerie a été faite pour l'ensemble des micro-tubes sauf pour les micro-tubes VP, TDA (tryptophane désaminase) et IND (indole) dont la lecture n'a été faite qu'après l'addition des réactifs nécessaires de la façon suivante :

□ TDA : une goutte de chlorure ferrique (10%) a été additionnée. La lecture de la réaction se fait immédiatement.

□ IND : la lecture de la réaction se fait aussi immédiatement après l'ajout d'une goutte du réactif de James.

- Le test d'urée est considéré comme positif si la cupule vire au rouge. Si la cupule reste jaune la réaction est considérée comme négative.
- le test d'O.N.P.G. est positif s'il y a apparition de couleur jaune dans la cupule. Si la cupule est incolore, la réaction est négative.
- Si l'ajout d'une goutte de réactif JAMES ne fait pas virer la coloration incolore en rose, le test indole est négatif.
- Test acétoïne ou réaction de Voges-Proskauer (VP) : Si après ajout de VP1 et VP2, il y a apparition de coloration rose ou rouge au bout de 15 min, la souche testée produit de l'acétoïne. (Clark et Lubs, 1915).



Figure. 14 : La galerie 20^E (photo personnelle)

3- Tests de confrontations :

3.1. Recherche de l'activité antibactérienne

L'effet bactéricide ou bactériostatique de l'agent antibactérien sur les bactéries pathogènes a été déterminé par différentes méthodes.

3.1.1 Méthode de diffusion sur disque :

Le protocole suivi est celui de **Kirby et Bauer (1966)** avec une légère modification, (au lieu d'utiliser les disques d'antibiotique nous avons utilisé des disques imbibés dans milieu liquide LB qui contient les bactéries antagonistes) :

-Faire la croissance des bactéries antagonistes dans le milieu LB liquide et faire incubation 48h à 25°C.

-Préparer une suspension bactérienne de la bactérie pathogène de l'ordre de 10⁸ UFC, à partir d'une culture âgée de 48h, ensuite ensemercer à l'aide d'écouvillon sur toutes la surfaces de la boîte et laisser sécher pendant 5 mn :

-Imbibe bien le disque de papier buvard ou wattman stérile de 6 mm de diamètre dans la solution bactérienne antagoniste, ensuite déposé sur un tapis bactérien sur la gélose nutritive (LPGA).

-Après une incubation de 24 et 48 heures à 25°C, il est peut-être possible d'apercevoir des zones d'inhibition (absence de croissance) à l'allons tour des disques. Selon le diamètre de ces zones, il est possible d'évaluer à quel point la bactérie est sensible ou résistante à la solution contenue dans le disque.

3.1.2 Technique des cylindres d'agar et choix du milieu optimal pour les activités antimicrobiennes

L'activité antibactérienne du composé brut a été testée par la méthode des cylindres d'agar décrite ci-dessous :

Les souches de *Pseudomonas* et *Serratia* sont ensemencée sur milieu LB afin d'obtenir un tapis et l'incubation dure 48 heures) à une température de 25°C.

Des cylindres d'agar d'environ 6 mm de diamètre ont été prélevés à l'aide de l'extrémité plate d'une pipette Pasteur stérile à partir de la gélose LB des colonies âgées de 48h, où les souches inhibitrices (*pseudomonas* et *Serratia*) étaient ensemencées, puis, ces cylindres ont été déposés sur les boites de Pétri contenant une gélose LB préalablement ensemencée par les bactéries pathogènes (EC194 et EA1430).

Les boites ont été ensuite incubées à la température adéquate pour chaque type des bactéries (25° C). Test pendant 48 heures. Les diamètres des zones d'inhibition ont été mesurés par suite (**Tortorano et al., 1979, Hosny et al., 2011**).

4. Souches fongiques :

Les souches des champignons utilisées dans notre travail sont représenter dans le tableau 3 :

Tableau 3 : Répartition des souches fongiques

Genre	Espèce	Nombre de souche
<i>Fusarium sp</i>	<i>Fusarium roseum</i>	1
	<i>Fusarium sp</i>	1
<i>Aspergillus sp</i>	<i>Aspergillus niger</i>	1
<i>Alternaria sp</i>	<i>Alternaria sp</i>	1

Les isolats fongiques utilisés dans cette étude se subdivisent en 02 groupes en fonction de leurs origines :

- Le champignons *Aspergillus niger* isolé l'année 2015/2016, et conservé à + 4°C, fourni par madame Alloui N, enseignante phytopathologiste, à la faculté SNV et STU de l'université 08 mai 1945 de Guelma.

- Les autres champignons ont été isolés au cours de l'année pédagogique 2016/2017, dans la région de Oran par monsieur Benada M, enseignant microbiologiste, à la faculté SNV et STU de l'université 08 mai 1945 de Guelma.

4.1. Purification des souches fongique :

4.1.1. Repiquage successif

Après l'incubation des souches isolées, les filaments mycéliens se développent autour des petits fragments de racines, collets et tiges et à la surface du milieu contenant du sol rhizosphérique sont repiqués successivement dans des boîtes de Pétri contenant du milieu PDA jusqu'à l'obtention de culture pure. Afin de s'assurer de l'état de pureté des colonies, des cultures monospores sont effectuées pour chaque isolat obtenu (**Rappily, 1968 ; Zerrouk, 1994**).

4.1.2. Culture monospore

L'obtention d'une culture pure s'effectue par la culture monospore (figure 15) (**Booth, 1971**). Les souches à monosporer sont repiquées dans des boites de Pétri contenant le milieu PDA et incubées pendant 2-3 jours à 25°C.

Après incubation, un fragment de la périphérie de la boîte est prélevé et puis mis dans un tube contenant 9 ml d'eau distillée stérile et qui après agitation, il permet d'obtenir une

suspension sporale. A partir de cette dernière, des prélèvements successifs de 1 ml sont introduits dans des tubes contenant 9 ml d'eau distillée stérile jusqu'à l'obtention de la dilution 10^{-4} . A partir des deux dernières dilutions (10^{-3} et 10^{-4}), 1 ml est prélevé encore et puis étalé à l'aide d'un étaloir coudé sur milieu contenant agar seulement (quantité d'eau distillée + 4 % agar).

À l'aide d'une loupe binoculaire et après 5-6 jours d'incubation à 25°C, les spores en germination sont repérées et délimitées, puis aseptiquement prélevées (3 à 4 spores) et déposées dans une autre boîte de Pétri contenant du milieu PDA (Buxton, 1954 ; Henni, 1994), et mises à incuber à 25°C pendant 4-5 jours.

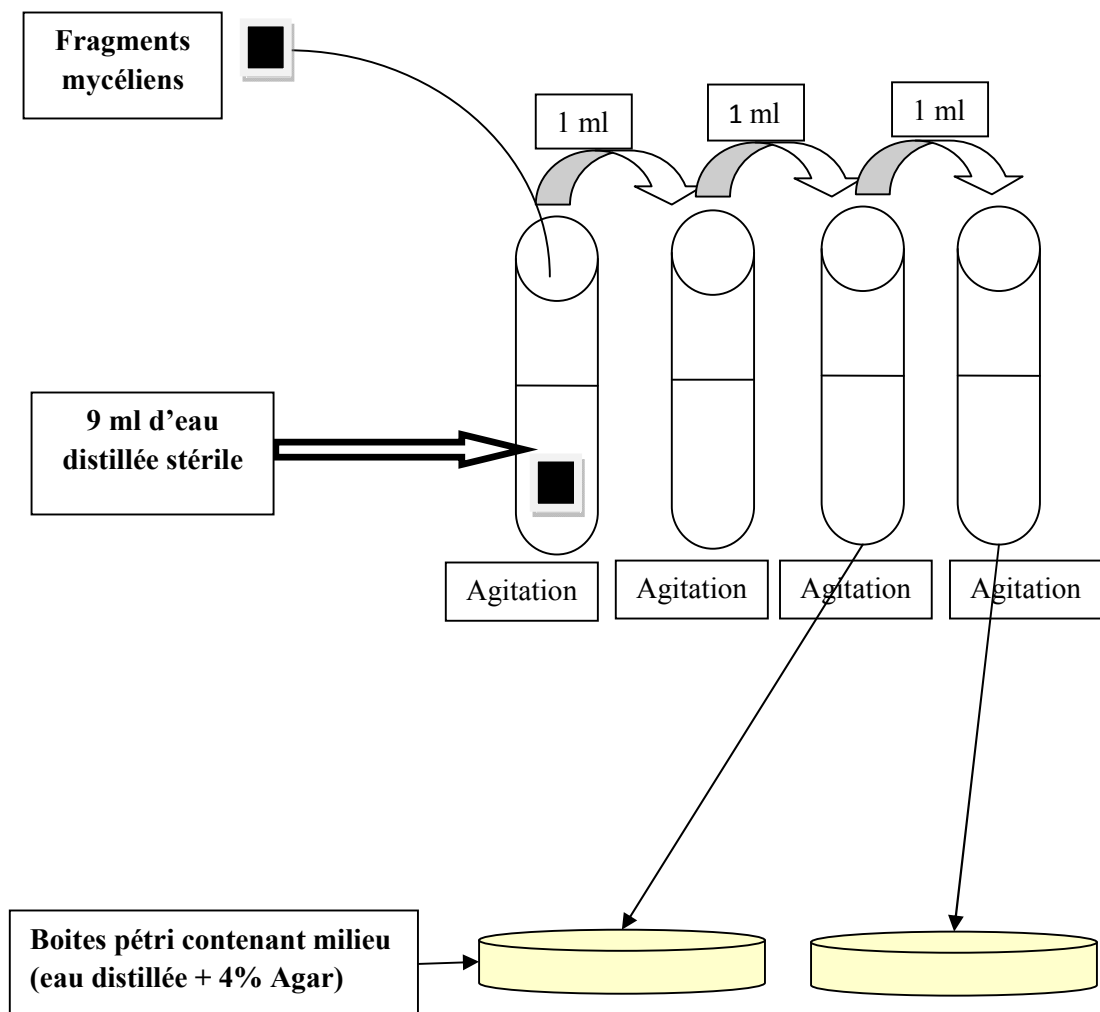


Figure. 15 : les différentes étapes de culture monospore

4.2. Caractérisation des souches fongiques

Après une période de 2 à 3 jours de croissance sur le milieu PDA, une masse fongique caractéristique des agents pathogènes (*Fusarium sp*, *Alternaria sp*, *Aspegillus niger*) se développent à la surface de la boîte de Pétri. Des observations à la loupe binoculaire et au microscope optique ont été réalisées, dans le but de confirmer les caractéristiques de l'espèce.

L'identification des genres fongiques repose sur des critères morphologiques :

- **Aspect macroscopique** du mycélium (aspect, couleur, le relief, la taille et odeur des colonies, ainsi les structures de fructification).
- **Aspect microscopique** des structures reproductrices (le thalle, les spores, aspect des spores, modes de formation des conidies, mode de groupement des conidies, mode d'implantation des cellules conidiogènes, présence de structures protectrices issues de la reproduction asexuée ou sexuée, présence des chlamydo-spores). Dans ce cas-là on doit préparer une lame et cela de manière suivante :

1- Mettre une goutte d'eau sur une lame, prendre un petit morceau de champignon et l'écraser bien en mettre une lamelle, ensuite faire une observation microscopique X40.

2- Mettre du scotch sur champignon ensuite le mettre sur la lame et faire observation microscopique.

4.3 Effet antifongique des souches bactérienne :

4.3.1 La confrontation directe

Cette technique a été réalisé selon la méthode de (**Doguiet, 2010**), avec quelques modifications, et elle consiste à ensemencer les souches de *Pseudomonas* et *Serratia*, sur le milieu PDA, en deux à quatre stries parallèles de 2 cm et l'incubée à 25°C pendant 48h. Sur le même milieu, et après 48h, on dépose un disque gélosé de la souche fongique âgée de 3-4 jours au centre de la boîte de Pétri et on incube à 25°C pendant 2 jours. Pour déterminer l'influence des souches (antagonistes) *Pseudomonas* et *Serratia*, la croissance radiale des souches fongiques a été mesurée tous les jours dans deux directions perpendiculaires. Les expériences ont été réalisées en 2 répétitions et comparées avec des témoins (seul le champignon dans la boîte de Pétri). L'inhibition de la croissance fongique par rapport au témoin ne contenant que le mycélium fongique est calculé en utilisant la formule ci-après, (**Trivedi et al., 2008**) :

$$TI = [R1 - R2 / R1] \times 100$$

TI= Taux d'inhibitions de la croissance fongique

R1 = la croissance radiale du champignon témoin

R2 = la croissance radiale du champignon avec bactérie

4.3.2 Méthode de diffusion sur disque

Le protocole suivi est celui de **Kirby et Bauer (1966)** avec une légère modification, (au lieu d'utiliser les disques d'antibiotique nous avons utilisé des disques imbibés dans milieu liquide LB qui contient les bactéries antagonistes), c'est-à-dire, la solution de milieu LB est déposée à l'aide d'une pipette sur un disque de papier buvard ou wattman stérile de 6 mm de diamètre. Le disque imbibé de la suspension bactérienne est ensuite déposé sur un tapis fongique sur la gélose nutritive (PDA)ensemencée de suspension fongique par écouvillonnage. Après une incubation de 24 et 48 heures à 25°C, il est peut-être possible d'apercevoir des zones claires (absences de croissance) au pourtour des disques. Selon le diamètre de ces zones, il est possible d'évaluer à quel point le champignon est sensible ou résistant à la solution contenue dans le disque.

4.3.3 Technique des cylindres d'agar

L'activité antifongique du composé brut a été testée par la méthode des cylindres d'agar décrite ci-dessous :

Les souches de *Pseudomonas* et *Serratia* sont ensemencées sur milieu LB afin d'obtenir un tapis et l'incubation dure 72 heures) à une température de 25°C.

Des cylindres d'agar d'environ 6 mm de diamètre ont été prélevés à l'aide de l'extrémité plate d'une pipette Pasteur stérile à partir de la gélose LB, où les souches inhibitrices (*Pseudomonas* et *Serratia*) étaient ensemencées, puis, ces cylindres ont été déposés sur les boîtes de Pétri contenant une gélose PDA préalablement ensemencée par les champignons pathogènes (*Fusarium sp*, *Fusarium roseum*, *Alternaria sp*, *Aspergillus niger*).

Les boîtes ont été ensuite incubées à la température adéquate pour chaque type des champignons test pendant 48 heures. Les diamètres des zones d'inhibition ont été mesurés par suite (**Tortorano et al., 1979 ; Hosny et al., 2011**).

5. Analyse statistique :

Les analyses statistiques ont été conduites à l'aide des tests paramétriques et non paramétriques :

Les tests paramétriques : nous avons utilisé le test t de Student pour échantillons appariés, lorsque la comparaison de la variance entre deux échantillons est non significative ($p > 0,05$) (test de Levene) ;

Les tests non paramétriques : lorsque la comparaison de la variance de plusieurs échantillons ($K > 2$) est significative ($p < 0,05$). Le test de Wilcoxon a été utilisé pour les comparaisons entre deux échantillons appariés. Ainsi, le test de Fredman pour la comparaison entre plusieurs échantillons appariés, suivi par le test Post Hoc de Nemenyi.

Une différence entre les résultats a été considérée comme significative pour une valeur de $p < 0,05$. Ces analyses ont été réalisées par le logiciel XLSTAT.

A decorative graphic of a scroll with a blue outline and grey shading, framing the text. The scroll is oriented vertically, with the top edge on the left and the bottom edge on the right. The text is centered within the scroll.

Chapitre IV

Résultats Et Discussion

1. Test de confirmation des souches bactériennes :

1.1 Les caractérisations morphologiques

1.1.1 Aspect macroscopique

Notre étude s'est portée sur un ensemble de 17 souches bactériennes, les cultures sur les différents milieux solide (LB, LPGA, King B, Levane), les colonies présentant l'aspect macroscopique caractéristiques du genre *Erwinia* ont été prélevées (figure 17), deux espèces étudié *Erwinia amylovora* nommée (1430), *Erwinia carotovora* nommée (194), et dix souches de genre *Pseudomonas* (*Pseudomonas fluorescens*) nommées (NA, NB, NC, ND, NE, NF, NG, NH, NI, NK) (figure 16), cinq souches de genre *Serratia* (*Serratia plymuthica*) nommées (SOL, MAI, MI, M3, A).

D'après la morphologie macroscopique des colonies, les résultats des tests Levane et King B ont été montrés dans les tableau suivant (tableau 4, 5, 6) selon l'aspect des colonies.

Tableau 4 : Morphologie des colonies de (*Erwinia*, *Pseudomonas*, *Serratia*) sur milieu King B

Caractéristiques Souches	Forme	Diamètre (mm)	Elévation	Couleur	Texture	Opacité	Pigment
<i>Erwinia amylovora</i>	Circulaire et irrégulière	3-6 mm	Etaler	Blanche	Brillante avec un anneau central dense	Semi-translucide	Non fluorescente
<i>Erwinia carotovora</i>	Bords réguliers	2 à 8 mm	Bombé et semi bombé	Crème-blanchâtre	Lisse à humide	Irisé et semi translucide	Non fluorescente
<i>Pseudomonas fluorescens</i>	Rondes et irrégulières	4-6 mm	Bombé et plate	Crème-blanchâtre	Lisse brillante et rugueuse	Translucide et opaque	Jaune-vert fluorescent soluble
<i>Serratia plymuthica</i>	Rondes et irrégulières	2-4 mm	Plate à bombé	Blanche-blanchâtre	Lisse	Semi-Translucide	Non fluorescentes

Tableau 5 : Morphologie des colonies sur milieu Levane.

Caractéristiques Souches	Forme	Diamètre (mm)	Elévation	Couleur	Texture	Opacité	Pigment
<i>Erwinia amylovora</i>	Circulaire	3-6 mm	Bombé	Blanchâtre	Lisse et muqueuse (Brillante)	Semi-Translucide	Non fluorescente
<i>Erwinia carotovora</i>	Circulaire et bords réguliers	2 à 8 mm	Bombé	Blanchâtre	Lisse à humide (Brillante)	Semi-Translucide	Non fluorescente
<i>Pseudomonas fluorescens</i>	Rondes et irrégulières	4-6 mm	Plate et bombé	Crème-blanchâtre	Lisse brillante et rugueuse	Translucide et opaque	Non fluorescente
<i>Serratia plymuthica</i>	Rondes et Irrégulières	2-4 mm	Plate et bombé	Blanche	Lisse et brillante	Translucide	Non fluorescentes

Tableau 6 : Morphologie des colonies sur milieu LB, LPGA.

Caractéristiques Souches	Forme	Diamètre (mm)	Elévation	Couleur	Texture	Opacité	Pigment
<i>Erwinia amylovora</i>	Circulaire	3-6 mm	Etaler et Plate	Blanchâtre	Lisse et muqueuse	Opaque	Non fluorescente
<i>Erwinia carotovora</i>	Circulaire et bords réguliers	2 à 8 mm	Plate	Blanchâtre	Lisse et muqueuse	Opaque	Non fluorescente
<i>Pseudomonas fluorescens</i>	Rondes et irrégulières	4-6 mm	Plate	Crème-beige	Lisse brillante	Semi-Translucide	Non fluorescente
<i>Serratia plymuthica</i>	Rondes et Irrégulières	2-4 mm	Plate	Crème-beige	Lisse	Semi-Translucide	Non fluorescentes



Figure. 16 : Aspect macroscopique des colonies sur les différents milieux utilisés (photos personnelle)

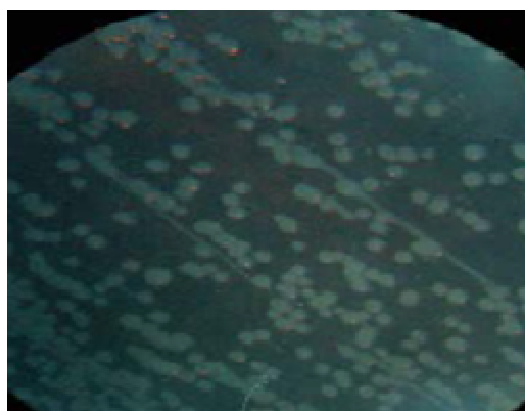


Figure. 17 : Colonies typiques d'*Erwinia carotovora* isolées sur milieu LPGA observées à la loupe binoculaire (photo personnelle)

NB : la croissance des souches bactériennes dans les milieux Levane et King B plus rapide que les autres milieux LB et LPGA.

1.1.2 Aspect microscopique :

➤ Coloration de Gram

La coloration de Gram montre que tous les isolats sont de Gram négatif et de forme bacilles et coccobacilles isolées ou regroupés en paire ou en chaînettes (tableau 7) (figure 18).

Tableau 7 : Résultats de coloration de Gram

Souches	Test	Couleur	Forme	Gram	Regroupement
194		Rose	Bacilles à coccobacilles	Négatif (-)	Isolés ou en chaînettes
1430		Rose	Bacilles à coccobacilles	Négatif (-)	Isolés et en amas
NA, NB, NC, ND, NE, NF, NG, NH, NI, NK		Rose	Coccobacilles	Négatif (-)	En chaînettes
SOL, MAI, MI, M3, A		Rose	Coccobacilles	Négatif (-)	En chaînettes

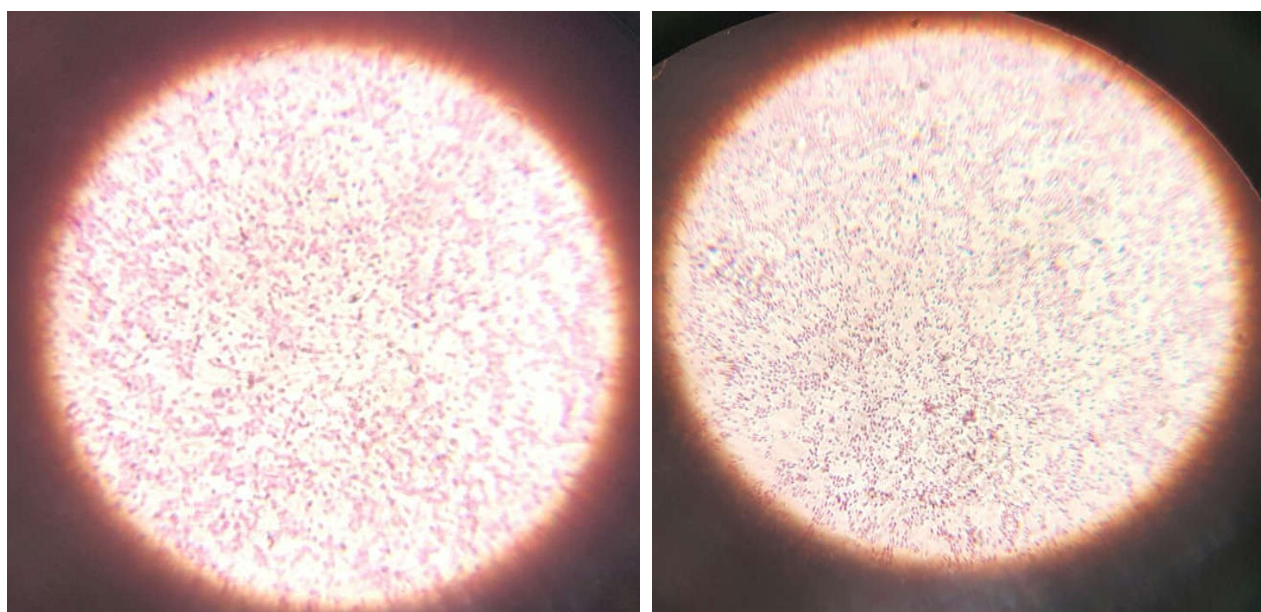


Figure. 18 : Observation au microscope optique et à l'immersion (G x1000). Les souches révélant la couleur rose des Gram négatif (-) (photos personnelle)

1.2. Caractéristiques biochimiques

1.2.1 Test catalase

Concernant le test de la catalase, Toutes les entérobactéries que nous avons analysées sont des catalases positives et de même pour le genre *Pseudomonas*, dont la présence de la catalase se matérialise par la production de bulles (tableau 8).

1.2.2 Test oxydase

La réaction positive s'est traduite par l'apparition d'une coloration violette à l'endroit où la colonie a été déposée soit immédiatement, soit quelques secondes après. Les résultats obtenus étaient les suivants (tableau 8) :

Les entérobactéries étaient dépourvues d'oxydase et il n'y a pas eu de coloration, donc elles sont oxydase négative. Par contre le genre *Pseudomonas* s'est révélé oxydase positive (figure19).

Tableau 8 : Résultats des test catalase et test oxydase

Souches	Test	Test catalase	Test oxydase
Les entérobactéries <i>(Serratia plymuthica)</i>	SOL, MAI, MI, M3, A	Positives (+)	Négatives (-)
Les entérobactéries <i>(Erwinia sp)</i>	- <i>Erwinia amylovora</i> (1430) - <i>Erwinia carotovora</i> (194)	Positives (+)	Négatives (-)
Pseudomonas <i>(Pseudomonas fluorescens)</i>	NA, NB, NC, ND, NE, NF, NG, NH, NI, NK	Positives (+)	Positives (+)

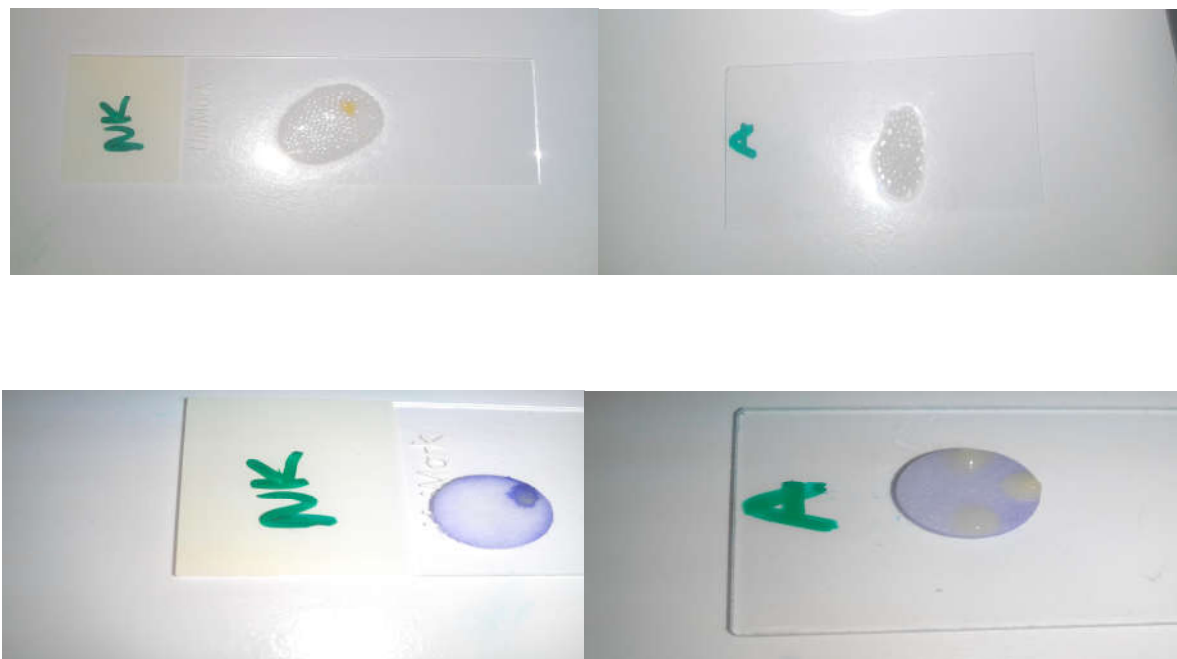


Figure. 19 : Test catalase et test d'oxydase (Test catalase positif (+), formation des bulles)
(Test oxydase positif (+), apparition d'une couleur violette) (photos personnelle)

1.2.3. La galerie classique :

1.2.3.1 Utilisation de citrate

Le milieu de citrate de Simmons est un milieu synthétique où la seule source de carbone est le citrate. Seules les bactéries autotrophes sont capables de croître en présence de citrate comme seule source de carbone et d'alcaliniser le milieu, notons que le citrate est le premier composé du cycle de Krebs ; s'il est utilisé, il y a croissance et le milieu s'alcalinise et cela se traduit par le virage de couleur du vert en bleu (figure 20)

Les souches d'*Erwinia amylovora* (1430) et *Erwinia carotovora* (194) n'utilisent pas le citrate comme seule source de carbone, par contre les souches de *Serratia plymuthica* (SOL, MAI, MI, A) utilisent le citrate comme seule source de carbone et entraînent une alcalinisation du milieu, d'où le virage du vert au bleu (figure 20)

1.2.3.2 Le milieu mannitol-mobilité

C'est une gélose molle conditionnée en tubes et qui permet d'étudier la fermentation du mannitol et la mobilité des germes. Les souches de *Serratia plymuthica* (SOL, MAI, MI, M3) et

la souche d'*Erwinia carotovora* (194) et *Erwinia amylovora* (1430) ont fermenté le mannitol dont la fermentation de ce dernier a été matérialisée par un virage du milieu au jaune (tableau 9).

En ce qui concerne la mobilité les bactéries mobiles ont diffusé à partir de la ligne verticale d'ensemencement en créant un trouble, et nous avons les 3 espèces utilisés : *Serratia plymuthica*, *Erwinia amylovora*, *Erwinia carotovora* (figure 20).

Tableau 9 : Résultats des tests de la galerie classique (citrate de Simmons et Mannitol-mobilité)

Souches \ Test		Citrate de Simmons	Mannitol-mobilité	
			Mannitol	Mobilité
Les entérobactéries (<i>Serratia plymuthica</i>)	SOL, MAI, MI, A	Positif (+)	Positif (+)	Positif (+)
Les entérobactéries (<i>Erwinia</i> sp)	- <i>Erwinia amylovora</i> (1430)	Négatif (-)	Positif (+)	Positif (+)
	- <i>Erwinia carotovora</i> (194)	Négatif (-)	Positif (+)	Positif (+)

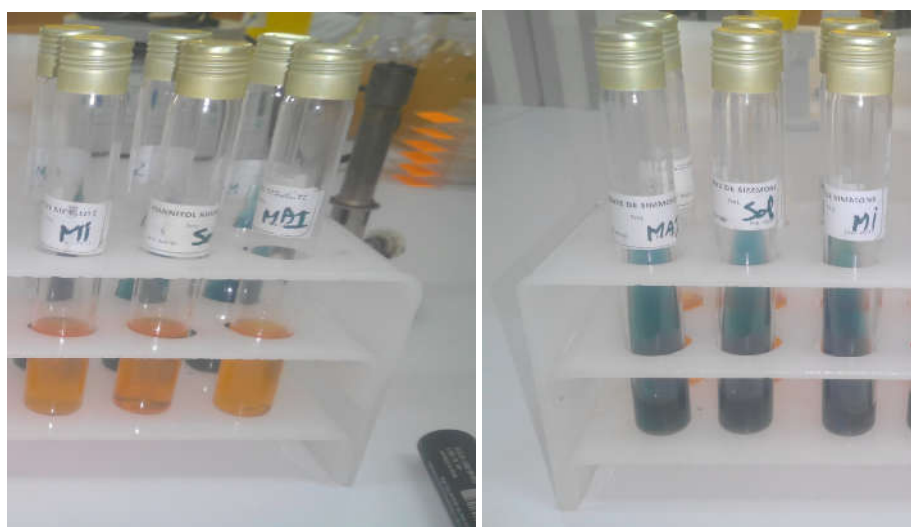


Figure. 20 : Tests citrate de Simmons et Mannitol mobilité

1.2.4. Identification par la galerie 20E

Les galeries API 20E sont des galeries de 20 microtubes prêts à l'emploi permettant de réaliser 23 tests biochimiques afin d'identifier des bacilles Gram – appartenant à la famille des Enterobacteriaceae. Les suspensions bactériennes des différents isolats ont été introduites dans les microtubes des galeries et incubées à 25°C pendant 24 heures. La lecture des différentes galeries. Tous les isolats testés ont donné des codes différents entre eux, Comme on peut le constater, le test par galerie API20E a produit 06 codes différents pour les 6 souches testées (SOL, MAI, MI, A) et (194 et 1430) pour les résultats des isolats (voir tableau 10) (figure 21).

Tableau 10 : Résultats du test des galeries API 20E

Isolats (souches)	Numéro
SOL, MAI, MI, A	1007563
194	6326573
1430	6736773



Figure. 21 : Résultat de la plaque galerie 20^E (photo personnelle)

2. Le matériel fongique :

2.1. Purification et identification des isolats


Après repiquage successive et culture monospore on a obtenue des cultures pures d'*Aspergillus niger* et *Fusarium roseum* et *Fusarium sp* et *Alternaria sp*, d'où les spores ont donné naissance à un clone homogène du champignon.


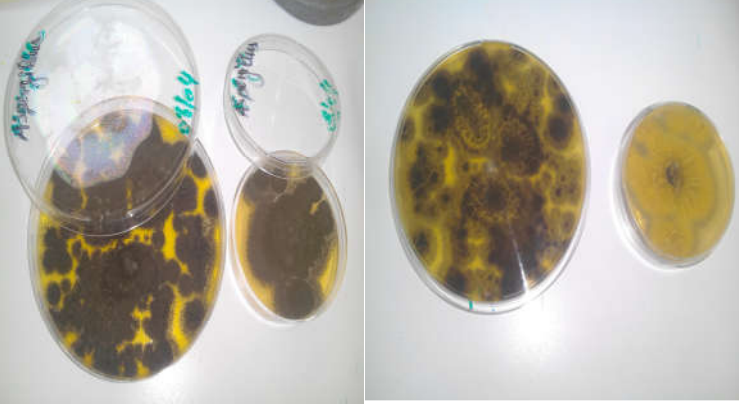

L'identification des genres fongiques a été réalisée selon les clés de détermination de (Zillinsky, 1983 ; Botton *et al.*, 1990 ; Lepoivre, 2003 ; Nasraoui, 2006) en se basant sur les caractères macroscopiques des colonies (aspect, couleur, odeur, forme, contour, etc.) et sur les caractères microscopiques du mycélium et des conidies ou spores (cloisonnement du mycélium, forme des spores et conidies, forme des organes de fructification, etc.).

2.1.1. Etude macroscopique

Cette étude nous a permis de distinguer 4 colonies de champignons. Les caractères macroscopiques des différentes souches sont étudiés sur les quatre milieux PDA et Sabouraud, les plus communément utilisé à cet effet (Botton *et al*, 1990). Le (Tableau 11) résume l'aspect du mycélium des souches isolées, la consistance des colonies, la couleur du revers de la boite ainsi que la présence ou l'absence de pigments caractéristiques de chaque souche.

Tableau 11 : Observations macroscopiques des différents isolats pathogènes obtenus (photos personnelle)

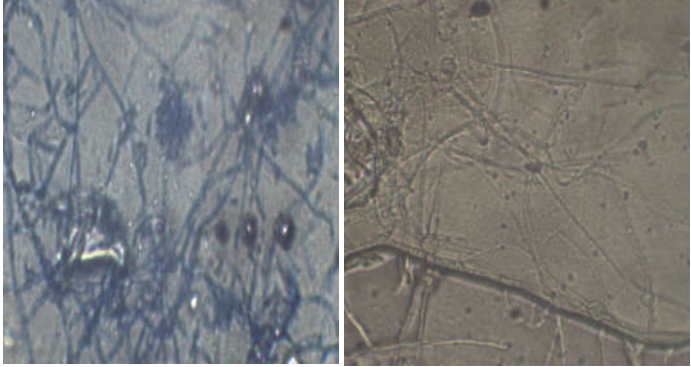
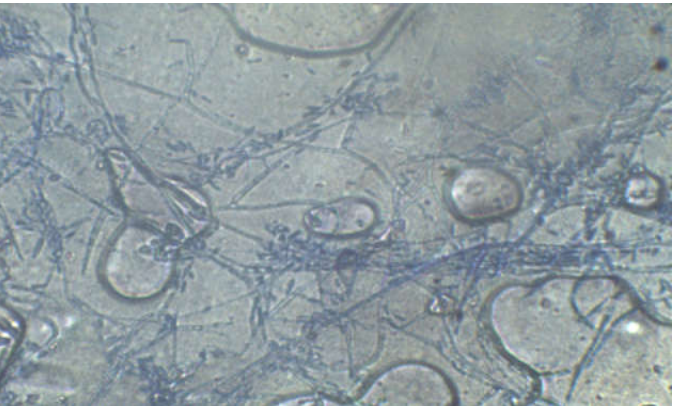

Souches	Observation macroscopique	Caractères macroscopiques
<i>Fusarium roseum</i>		<ul style="list-style-type: none"> -colonie laineuse blanche à bordure rouge. -revers rouge

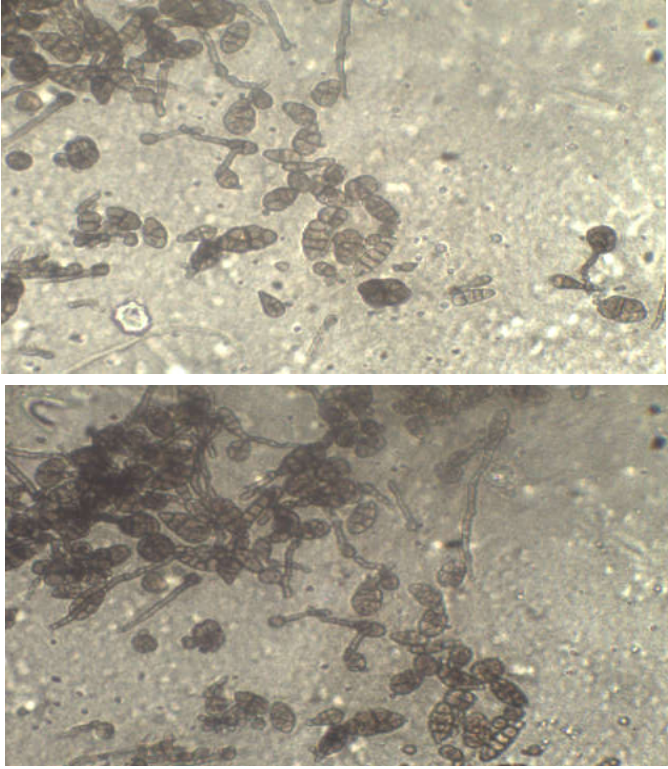
<i>Fusarium sp</i>		<ul style="list-style-type: none"> -Colonie aplatie blanche, violette au centre. - revers incolore violet au centre. -bordures irrégulières
<i>Aspergillus niger</i>		<ul style="list-style-type: none"> -Noire brunâtre foncée ou noire -aspect laineuse à poudreuse -revers pas de pigment -Bordures irrégulières
<i>Alternaria sp</i>		<ul style="list-style-type: none"> -cotonneux avec un périphérique légèrement compact -grise foncé avec un fond noirâtre -bordures irrégulières légèrement compacte de couleur foncé -envers de colonies noirâtre

2.1.2. Etude microscopique

L'étude microscopique porte sur l'observation des structures caractéristiques des 4 souches fongiques (Conidiophores, conidies et mycélium) 04 espèces des champignons sont mis en évidence sur le tableau 12.

Tableau 12 : Etude Microscopique des souches fongiques isolées à partir de microscope optique (G X40) (photos personnelle)

Souches	Observation microscopique	Description
<i>Fusarium roseum</i>		<ul style="list-style-type: none"> -Macroconidies fusiformes cloisonnées -Les microconidies sont dispersées parmi le mycélium (elles sont de petite taille par rapport aux macroconidies) -Phialides cylindriques solitaires ou groupées.
<i>Fusarium sp</i>		<ul style="list-style-type: none"> -filament septé -conidies fusiformes et cloisonnées - absence de chlamydospores - Phialides cylindriques solitaires ou groupées
<i>Aspergillus niger</i>		<ul style="list-style-type: none"> -Thalle à mycélium cloisonné portant de nombreux -conidiophores dressés, non ramifiés, terminés en vésicules -Masse conidienne rayonnante, les conidies en chaînes unicellulaires

<p><i>Alternaria sp</i></p>		<ul style="list-style-type: none"> - hyphes septés -filaments sont pigmentés en brun. -Les conidiophores sont cloisonnés, brunes, pluricellulaires -d'aspect piriforme ou ovoïde avec une partie basale arrondie et une extrémité apicale allongée en bec plus ou moins important
-----------------------------	---	---

D'après l'étude macroscopique et microscopique des souches fongiques, les résultats montrent que le genre *Fusarium sp* c'est l'espèce de *Fusarium oxysporum*, et pour le genre *Alternaria sp* l'espèce et *Alternaria alternata*.

3. Test de confrontation :

La recherche de nouveaux agents de lutte biologique pour inhiber le développement des phytopathogènes est devenue une priorité majeure en raison des préoccupations environnementales. Dans les trois dernières décennies, nous avons assisté à un développement de ce domaine (**Islam et Hossain, 2013**). Les antagonistes bactériens ont reçu beaucoup d'attention en raison de leur capacité à contrôler les différentes classes d'agents pathogènes des plantes à travers plusieurs modes d'action, et la possibilité d'une utilisation combinée avec d'autres méthodes de contrôle (**Vitullo et al., 2012**).

3.1. Recherche de l'activité antibactérienne

Les 15 isolats (*Pseudomonas fluorescens* et *Serratia plymuthica*) sélectionnés ont été confrontés à 2 bactéries phytopathogènes (*Erwinia amylovora* et *Erwinia carotovora*) Après 48 h d'incubation à 25°C, les taux (diamètres) d'inhibition de la croissance bactériennes sont calculées. Les résultats obtenus sont présentés dans les figures 22 (1,2), figure 23 (1,2)

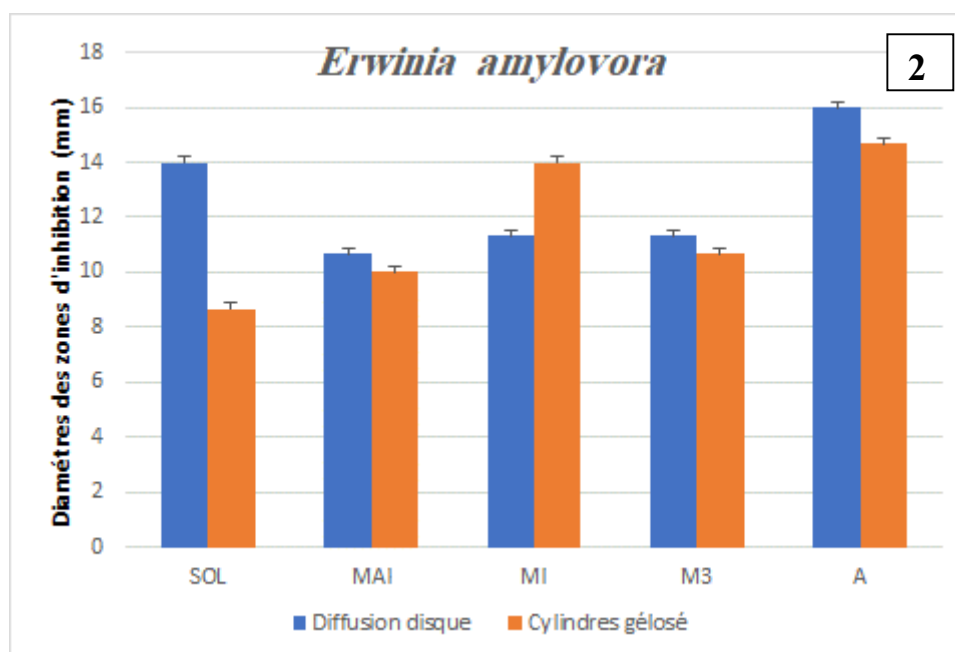
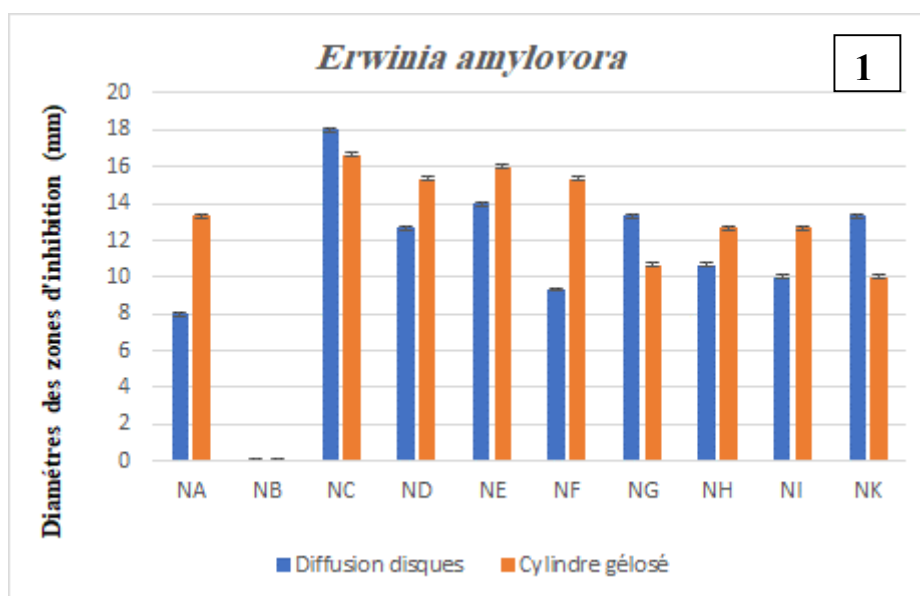


Figure.22 : Les taux d'inhibitions de la croissance d'*Erwinia amylovora* par les 15 isolats antagonistes (1), (2)

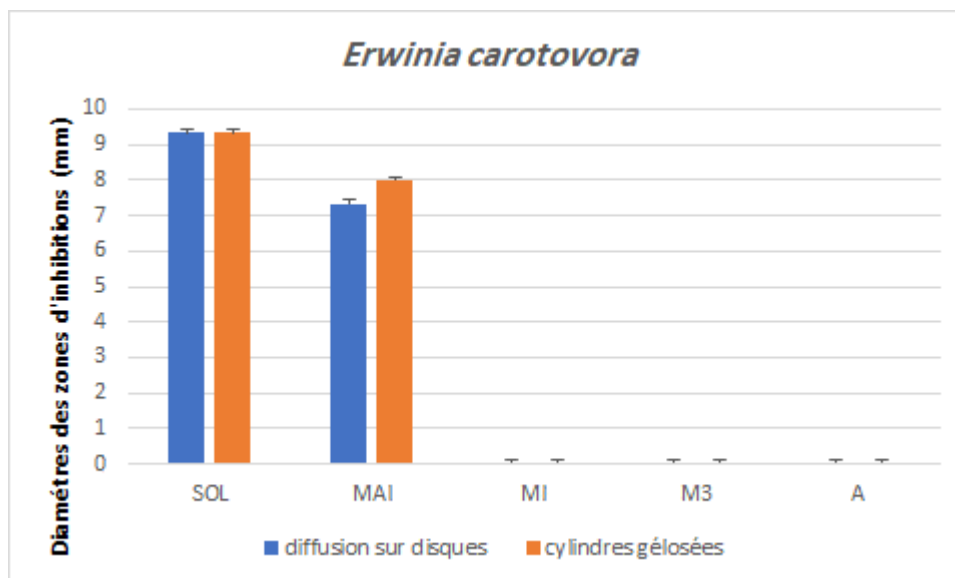


Figure.23 : : Les taux d'inhibitions de la croissance de la souche *Erwinia carotovora* par les souches de *Serratia plymuthica*

Les résultats indiqués dans le tableau 1 (Annexe II) montrent une différence significative ($P = 0.001 \leq 0,05$) sur la croissance remarquable d'*Erwinia amylovora* et *Erwinia carotovora* par *Pseudomonas fluorescens* et *Serratia plymuthica*.

Les résultats montrent que la souche *Erwinia amylovora* inhibé par toutes les souches bactériennes utilisées sur le test (*Pseudomonas fluorescens* et *Serratia plymuthica*) sauf une seule souche de *Pseudomonas fluorescens* NB, les plus grandes zones d'inhibitions étant de 16.66 mm pour la souche (NC) et 14.66 mm pour la souche (A) pour la méthode des cylindres gélosés et de 13.33 mm pour les souches (NG et NK) et 16 mm pour la souche (A) pour la méthode de diffusion sur disques (figures 24 et 25).

Par contre, la souche d'*Erwinia carotovora* (194) elle est sensible seulement pour les 2 souches de *Serratia plymuthica* (SOL et MAI) avec un diamètre de 9.33 mm pour la souche (SOL) et 7.33 mm pour la souche (MAI) pour la méthode de diffusion sur disques, pour la méthode des cylindres gélosés un diamètre de 9.33 mm pour la souche (SOL) et 8 mm pour la souche (MAI). L'activité inhibitrice pour les autres souches bactériennes n'était pas observée (figure 25).

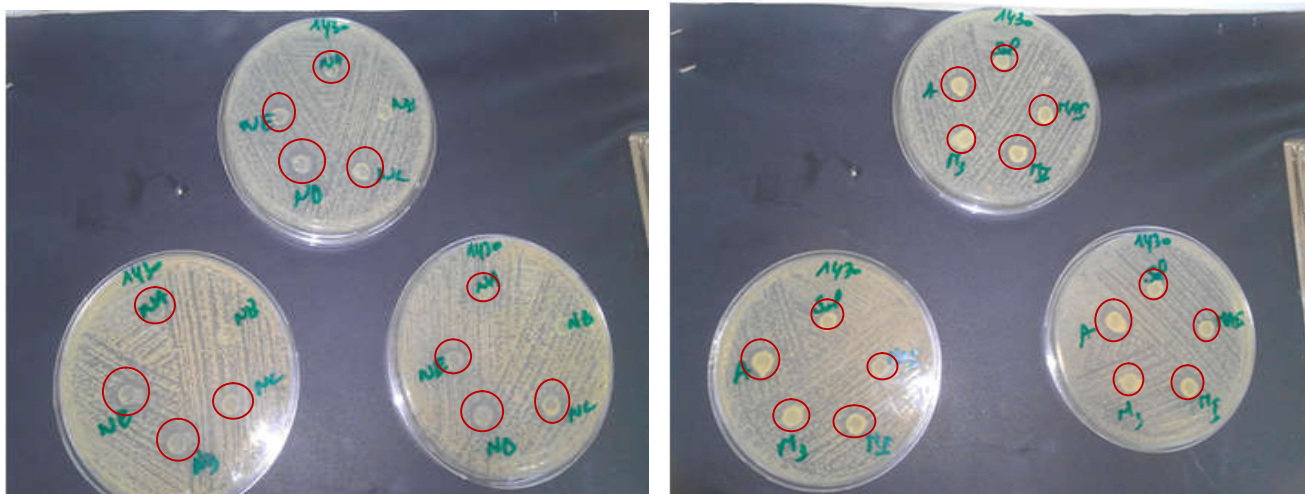


Figure.24 : Influence de *Pseudomonas fluorescens* sur la croissance d'*Erwinia amylovora* (1430)

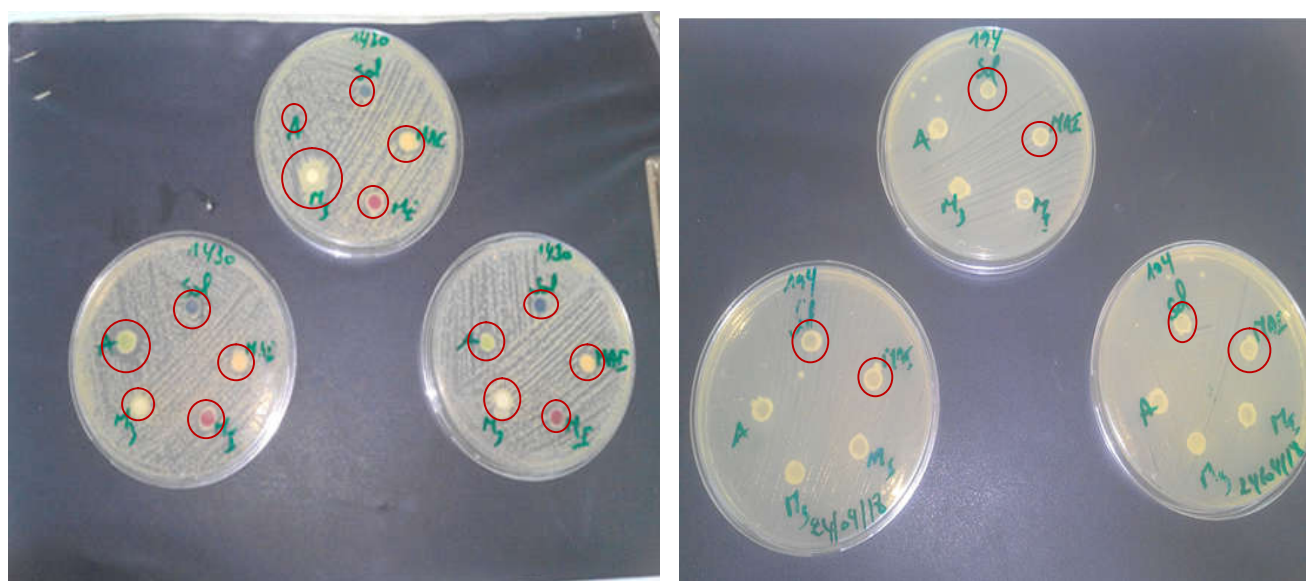


Figure.25 : Influence de *Serratia plymuthica* sur la croissance d'*Erwinia amylovora* (1430) et *Erwinia carotovora* (194), par les 2 méthodes utilisées

3.2. Recherche de l'activité antifongique

3.2.1. Confrontation directe

Les souches de *Pseudomonas fluorescens* et *Serratia plymuthica* a été confrontée avec trois souches fongiques pathogènes (*Fusarium roseum*, *Alternaria alternata*, *Aspergillus niger*) sur milieu PDA.

Les figures (26), (27) et (28) illustrent la capacité des souches *Pseudomonas fluorescens* et *Serratia plymuthica* à inhiber la croissance mycélienne des trois souches de moisissures pathogènes. Cette inhibition se traduit par la réduction du diamètre des colonies de *Fusarium roseum*, *Alternaria alternata*, *Aspergillus niger* par rapport au témoin.

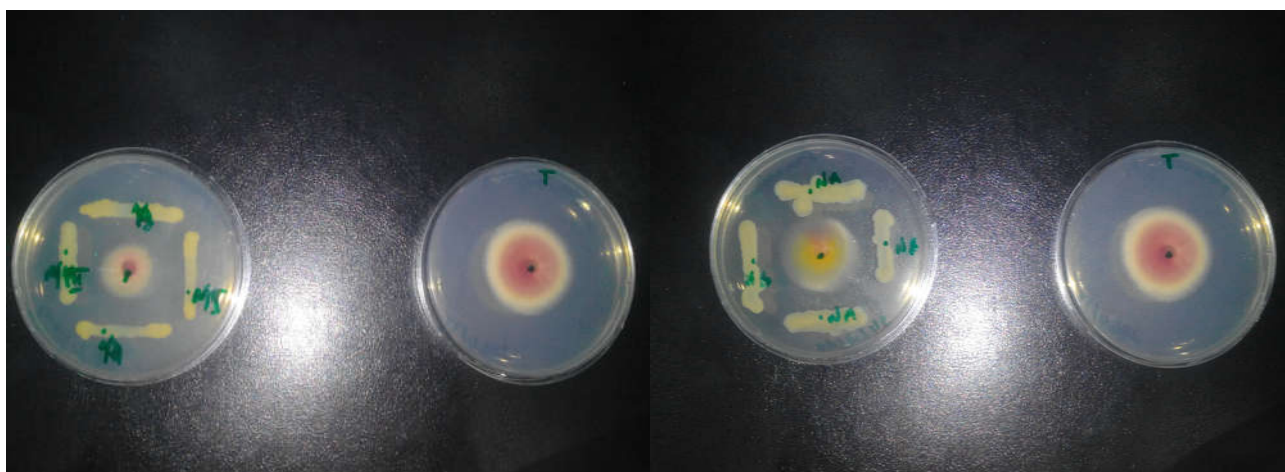


Figure.26 : Croissance de *Fusarium roseum*. En absence et en présence des souches de *Pseudomonas fluorescens* et *Serratia plymuthica* (photo personnelle)

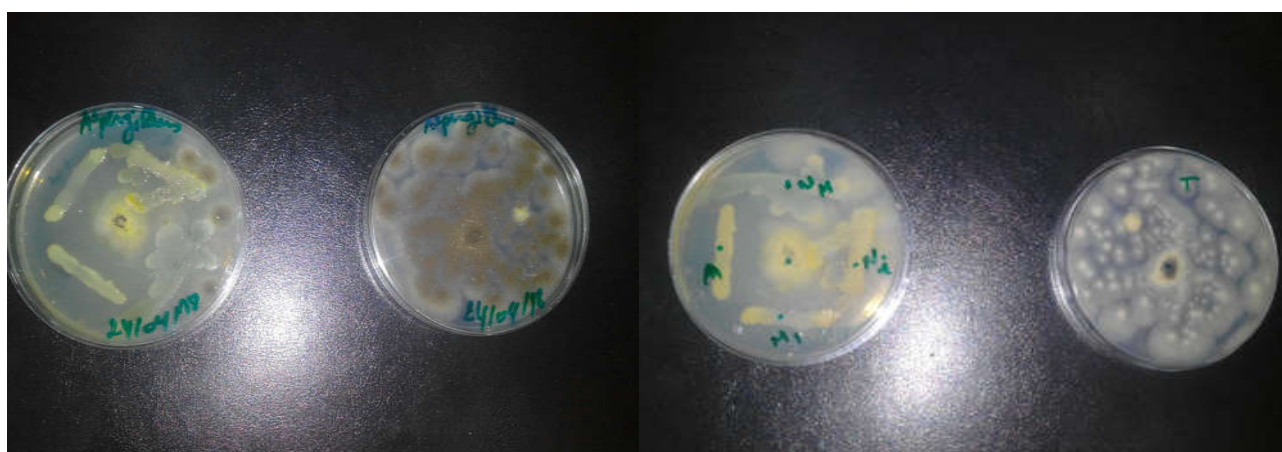


Figure.27 : Croissance d'*Aspergillus niger*. En absence et en présence des souches de *Pseudomonas fluorescens* et *Serratia plymuthica* (photos personnelle)



Figure.28 : Croissance d'*Alternaria alternata*. En absence et en présence des souches de *Serratia plymuthica* (photo personnelle)

La croissance de certaine souche (*Fusarium roseum* et *Alternaria alternata*) est très lente dans le cas de confrontation directe, ceci signifie que l'antagoniste montre une capacité d'arrêter le développement du parasite avec formation d'une zone d'inhibition entre les colonies confrontées avec une largeur variable selon l'isolat.

Les résultats de cet essai indiquent que le développement des champignons phytopathogènes semble être entravé par les souches antagonistes, à l'exception d'*Aspergillus niger* qui a montré pratiquement la même vitesse de croissance avec et sans traitement par les souches antagonistes sauf quelques souches. Concernant les autres espèces, les valeurs de croissance mycélienne journalière de ceux-ci sont moins importantes en présence des souches de *Pseudomonas fluorescens* et *Serratia plymuthica*.

D'après la figure (29), on remarque que le meilleur taux d'inhibition est celui de *pseudomonas fluorescens* la souche (NI) sur *Fusarium roseum* (79%), suivi d'*Alternaria alternata* par la souche (NK) d'un pourcentage (68%), Le pourcentage d'inhibition d'*Aspergillus niger* par la souche de *Pseudomonas fluorescens* (NA) est (41%).

On remarque aussi que le meilleur taux d'inhibition est celui de *Serratia plymuthica* la souche (A) sur *Aspergillus niger* (82%), suivi de *Fusarium roseum* par la souche (MI) d'un pourcentage (63%), Le pourcentage d'inhibition d'*Alternaria solani* par la souche (MI) est (54%).

Les résultats des taux d'inhibition montrent que les souches antagonistes utilisées soient les souches de *Pseudomonas fluorescens* ou *Serratia plymuthica* ont un pouvoir inhibiteur sur les souches fongiques et la croissance mycéliennes qui se diffère d'une espèce à l'autre (figure 29).

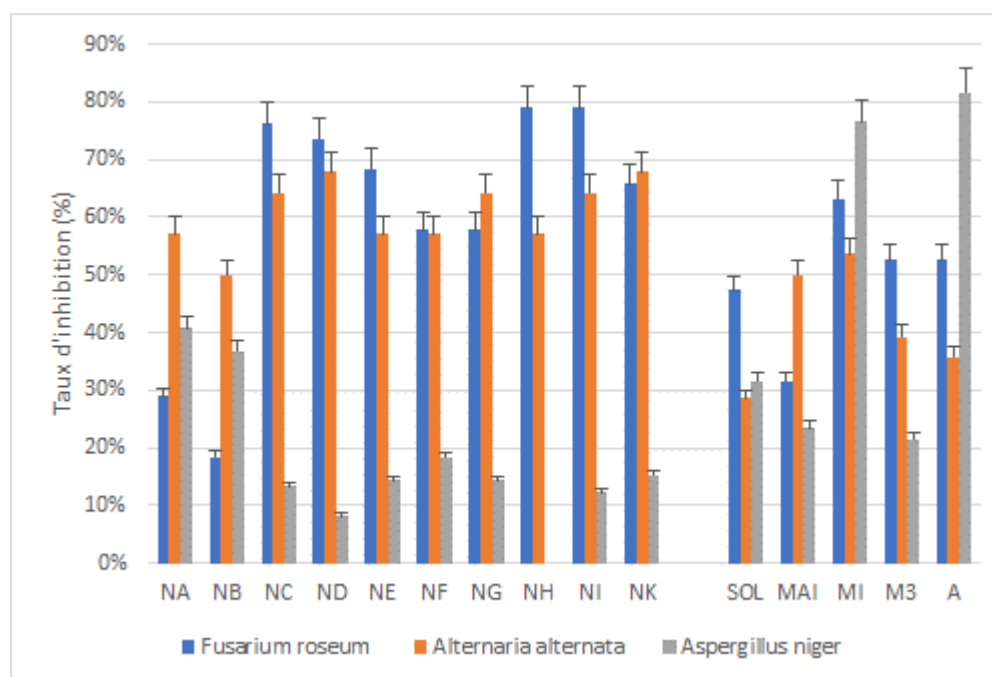


Figure.29 : Pourcentage d'inhibition de la croissance mycélienne des champignons Phytopathogènes par *Pseudomonas fluorescens* et *Serratia plymuthica*

Selon les résultats obtenus (Annexe I) (tableau 2) nous pouvons dire que la confrontation par les bactéries antagonistes a un effet statistiquement significatif sur les taux d'inhibitions par l'utilisation de la méthode directe de confrontation puisque la valeur p est inférieure à (<0.05). Cela veut dire qu'il existerait qu'une seule différence entre les taux d'inhibitions en fonction des agents antagonistes utilisés dans le test ce qui confirme l'hypothèse que les isolats pathogènes sont tous sensibles.

3.2.2 Méthodes de diffusion sur disques et technique de cylindre d'agar :

La production de métabolites antifongiques par les souches de *Pseudomonas fluorescens* et *Serratia plymuthica* est mise en évidence par la technique des cylindres d'agar et la méthode de diffusion sur disques en utilisant le milieu PDA.

Après incubation, la présence des zones d'inhibition indique un résultat positif. Cette zone est observée autour des disques des souches antagonistes, ce qui signifie que ces bactéries produisent des molécules antifongiques capables de stopper la croissance des champignons tests.

Le diamètre d'inhibition est mesuré par une règle graduée. L'absence de zones d'inhibition claires autour des disques d'agar, indique un résultat négatif.

Pour la méthode de diffusion sur disques, les résultats de 10 souches de *Pseudomonas* et 5 souches de *Serratia* montrent des résultats positifs et des résultats négatifs vis-à-vis d'au moins une souche test utilisée. Les deux souches NA et NB sont actives sur les quatre champignons (*Fusarium roseum*, *Fusarium oxysporum*, *Alternaria alternata*, *Aspergillus niger*). Cependant, que *Alternaria alternata* est le plus sensible avec un diamètre de 17 mm pour NA et 18 mm pour NB, suivi *Fusarium roseum* avec un diamètre de 14 mm pour NA et 12 mm pour NB, *Fusarium oxysporum* 10 mm pour NA et 12 mm pour NB, *Aspergillus niger* 8 mm pour NA et 11 mm pour NB.

Pour la méthode des cylindres gélosés les deux souches de *Pseudomonas fluorescens* NA et NB sont active uniquement pour *Fusarium roseum* par un diamètre de 16 mm pour (NA et NB), pour *Alternaria alternata* un diamètre de 16 mm pour NA et 20 mm pour NB, et ne sont pas active pour les autres champignons (*Fusarium oxysporum*, *Aspergillus niger*), les taux (ou les diamètres) des zones d'inhibitions des souches fongique confrontées au NA et NB sont indiqués dans la figure 30.

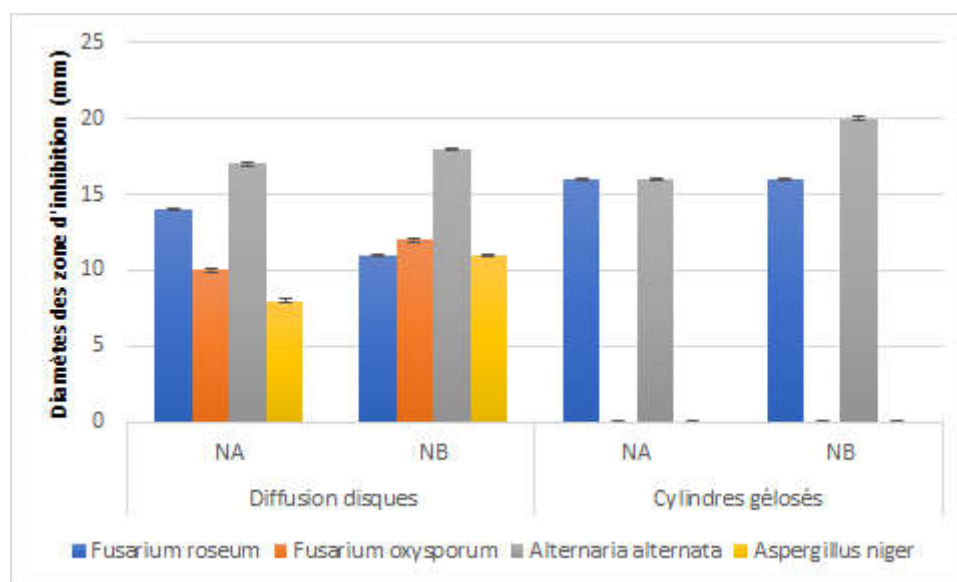


Figure.30 : Représentation graphique des taux d'inhibitions des champignons par les souches de *Pseudomonas fluorescens* NA et NB.

Les résultats de la méthode de diffusion sur disque représentés dans la figure 31 montrent que la souche NC a un pouvoir inhibiteur uniquement sur *Aspergillus niger* avec un diamètre de 7 mm, par contre aux autres souches fongiques elle n'a pas un pouvoir inhibiteur, au contraire les résultats de la méthode de cylindres gélosés montrent que la souche NC a un pouvoir inhibiteur seulement sur la souche d'*Alternaria alternata* avec un diamètre de 14 mm, et aucun pouvoir inhibiteur pour les autres souches fongiques.

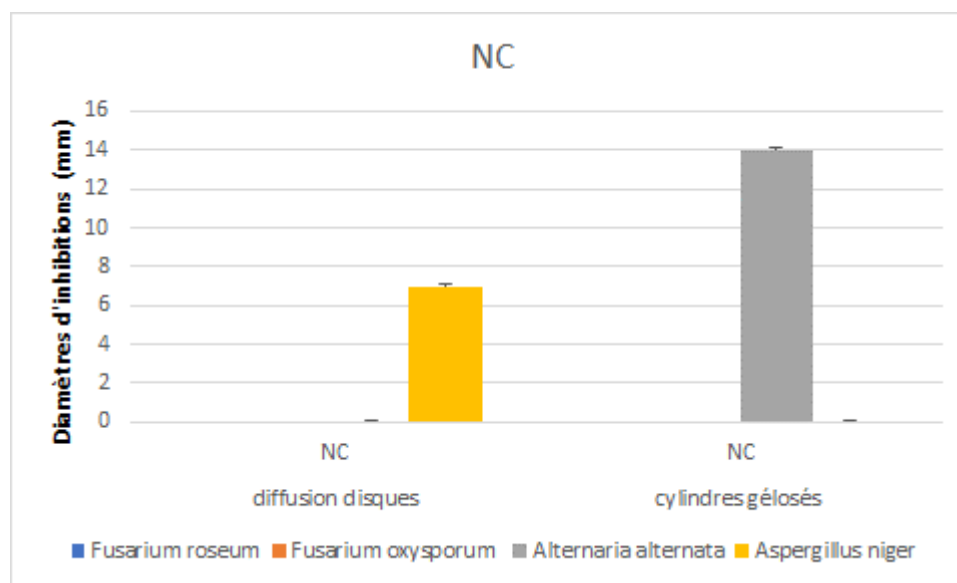


Figure. 31 : Représentation graphique des taux d'inhibitions des champignons par la souche de *Pseudomonas fluorescens* NC.

Pour les souches ND, NE, NF, NG, NH, NI et NK (figure 32) en utilisant la méthode de diffusion sur disques montrent une absence de zone d'inhibition pour certains champignons. La souche ND est active uniquement sur *Fusarium oxysporum* avec un diamètre de 8 mm, et sur *Aspergillus niger* avec un diamètre de 7 mm, et aucun effet inhibiteur pour *Fusarium roseum* et *Alternaria alternata*. Pour les souches NE et NG qui sont actives sur *Fusarium roseum* et *Aspergillus niger* uniquement, avec un diamètre d'inhibition respectivement 16 mm et 10 mm pour NE et 13 mm et 09 mm pour la souche NG. Pour les souches NF, NH, NK aucun pouvoir inhibiteur sur les souches fongique, en exception sur *Aspergillus niger* avec des diamètres respectivement de 8 mm, 9 mm et 10 mm. Pour la souche NI a donné un diamètre de 16 mm sur *Fusarium roseum*, 10 mm sur *Fusarium oxysporum* et 11 mm pour *Aspergillus niger* (figure 33) et aucun effet sur *Alternaria alternata*.

Pour la méthode des cylindres gélosés (figure 32), la souche NC active uniquement sur *Alternaria alternata* avec un diamètre de 14 mm, les souches ND, NF, NH, NK, démontrent une nulle formation de la zone d'inhibition pour toute les souches fongique (*Fusarium roseum*, *Fusarium oxysporum*, *Alternaria alternata*, *Aspergillus niger*), pour NE, NG et NI ont un pouvoir inhibiteur seulement pour *Fusarium roseum* avec les diamètres suivant (10 mm pour NE, 14mm pour NG et NI)

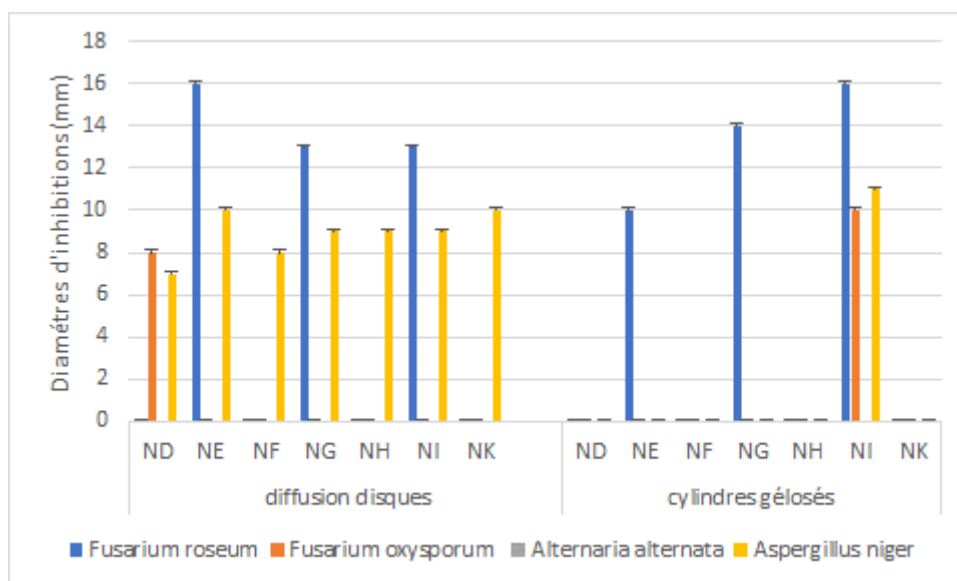


Figure. 32 : Représentation graphique des taux d'inhibitions des champignons par les souches de *Pseudomonas fluorescens*.



Figure. 33 : Résultats de test de confrontation sur *Aspergillus niger* par les souches de *Pseudomonas fluorescens*

L'analyse des résultats relatifs (Figure 34) à la croissance chez quatre souches fongiques étudiés soumis à l'action des 5 souches sélectionnées de *Serratia plymuthica*, selon la méthode de diffusion sur disques ont montré un effet antagoniste contre les 4 souches fongiques, il s'agit de MAI, SOL, MI, M3, A, pour *Fusarium roseum* est sensible uniquement pour les 2 souches SOL et MAI avec des diamètres (15 et 13 mm), pour les autres souches, *Fusarium oxysporum* les souches SOL et MAI ont marquées des diamètres de 11 et 13 mm, pour les autres souches, *Fusarium oxysporum* les souches SOL et MAI ont marquées des diamètres de 11 mm, les souches MI et A ont marquées des diamètres de 14 mm et la souche M3 un diamètre de 13 mm, *Alternaria alternata* le diamètre le plus élevé est de la souche A avec un diamètre de 28 mm, suivi diamètre de 25 mm pour la souche MI et 22 mm pour SOL, 9 mm pour MAI et pour la souche M3 aucun effet inhibiteur marqué, pour *Aspergillus niger* a marqué un effet inhibiteur pour toute les souches de *Serratia plymuthica*, le diamètre plus élevé est de la souche A (19 mm), suivi 17 mm pour la souche MI, 11 mm pour SOL, 10 mm pour MAI et 8 mm pour la souche M3.

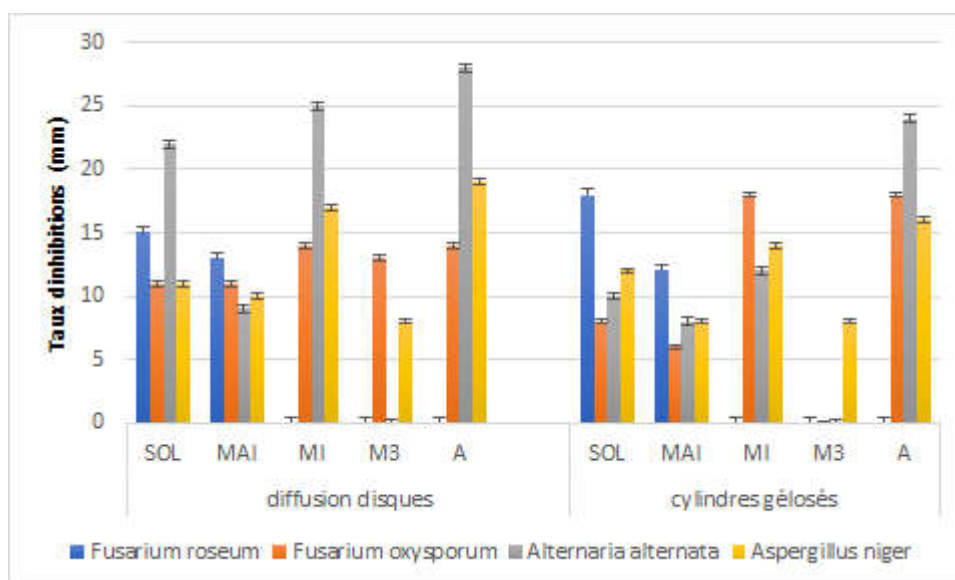


Figure. 34 : Représentation graphique des taux d'inhibitions des champignons par les souches de *Serratia plymuthica*.

Parmi tous les 5 isolats de *Serratia plymuthica*, on a retenu seulement deux souches qui représentent une activité contre les quatre agents pathogènes *Fusarium roseum*, *Fusarium oxysporum*, *Alternaria alternata* et *Aspergillus Niger* (SOL, MAI) et les autres souches (MI, A) représentent une activité uniquement contre *Fusarium oxysporum*, *Alternaria alternata*, *Aspergillus niger* et pour la souche (M3) a une activité contre *Aspergillus niger* seulement. Selon la méthode appliquée technique des cylindres gélés. L'action antagoniste se traduit par une faible croissance mycélienne pour *Fusarium oxysporum* et *Aspergillus niger*. Le taux d'inhibition

de la croissance mycélienne des agents pathogènes varie d'un isolat à un autre et cela, quelle que soit la technique utilisée (technique des cylindres gélosés).

Pour l'agent *Fusarium roseum* les deux souches (SOL et MAI) représentent respectivement les diamètres (18 et 12 mm), pour l'agent *Fusarium oxysporum* (SOL et MAI) représentent un diamètre de (8 et 6 mm), pour l'agent *Alternaria alternata* les souches (SOL et MAI) représentent des diamètres (10 et 8 mm), pour *Aspergillus niger* (SOL et MAI) représentent les diamètres (12 et 8 mm). Pour les autres souches de *Serratia*, les souches MI et A représentent des diamètres plus élevés que les autres souches utilisées, le diamètre le plus élevé est 24 mm pour la souche A contre l'agent *Alternaria alternata*, suivi un diamètre de 18 mm pour la souche MI et A contre *Fusarium oxysporum* et 16 mm pour la souche A contre *Aspergillus niger* (figures 35 et 36)



Figure. 35 : Résultats de test de confrontation sur *Aspergillus niger* par les souches de *Serratia plymuthica* (Photos personnelle)



Figure. 36 : Résultats de test de confrontation sur *Alternaria alternata* et *Fusarium oxysporum* par les souches de *Serratia plymuthica* (Photos personnelle)

Discussion :

Les zones d'inhibition observées entre les bactéries et l'agent pathogène, peuvent être dues à l'effet de substances inhibitrices diffusibles produites par les bactéries provoquant l'inhibition de la croissance mycélienne de l'agent pathogène.

Les résultats dans *Erwinia amylovora* sont positifs presque avec toutes les souches de *Pseudomonas fluorescens* et *Serratia plymuthica* et cela les mêmes résultats ont été trouvés par les travaux de **Jabrane et al. (2002)** qui ont montré que la souche J7 de *Serratia plumythica* a une activité contre nombreuse souches d'*Erwinia amylovora*.

Les résultats dans *Erwinia carotovora* est négatifs avec toutes les souches de pseudomonas. D'après **Xu, G-W et Gross. (1986)** les améliorations dans la lutte biologique contre *Erwinia carotovora* peuvent être obtenues en sélectionnant des souches de *Pseudomonas fluorescens* plus antagonistes de *Erwinia carotovora. subsp. Carotovora*, il serait également nécessaire de maintenir des populations plus élevées de *Pseudomonas*, il reste donc un certain nombre de défis à relever pour mettre au point un système de lutte biologique efficace contre *E. carotovora*, pour ce faire, il faudra élucider les facteurs environnementaux qui influencent la croissance et la survie des *Pseudomonas* et les mécanismes de base qui sous-tendent leur interaction antagoniste avec *Erwinia carotovora*.

La production de métabolites antifongiques, en particulier les antibiotiques, joue un rôle important dans la suppression des champignons. Une autre possibilité est que les isolats bactériens appauvrissent le milieu de culture et inhibent ainsi la croissance du champignon (**Jamalizadeh, 2008**). En effet, **Islam et Hossain (2013)** disent que la compétition entre les bactéries et les phytopathogènes a longtemps été considéré comme un moyen important pour éliminer les maladies des plantes. Selon **O'sullivan et O'gara (1992)**, la production de sidérophores par les bactéries rend le fer non disponible pour les champignons pathogènes.

Nous avons supposé que ces phénomènes : pathogénicité, stimulation et suppression sont dus à l'excrétion dans le milieu extracellulaire de métabolites secondaires. La plupart des bactéries Gram négatives secrètent des protéines dans le milieu extracellulaire (**Degroot, 1991**). Les souches de *Pseudomonas*, quant à elles secrètent 2 types de métabolites secondaires potentiellement cytotoxiques, il s'agit de phénazines et de protéases (**Levy, 1992**). Il est actuellement admis que les *Pseudomonas* fluorescentes douée d'une activité suppressive vis-à-vis

des champignons phytopathogènes sont connues en partie pour leur action sécrétoire de substances antifongiques (**James et Gutterson, 1986 ; Vincent *et al* ; 1991**).

Les résultats dans *Fusarium oxysporum* sont positifs avec les souches de *Pseudomonas fluorescens* plus particulièrement les souches (NA, NB, ND, NI) et cela est les mêmes résultats ont été trouvés par les travaux de (**Mezaache, 1997**) et (**Mezaache, 2012**). Les résultats apportent que les *Pseudomonas spp. fluorescens* possèdent un énorme potentiel d'amélioration des rendement des cultures, mais le succès de leur exploration reste limité au niveau des champs. Ceci est en partie dû à l'incompréhension de la dynamique des populations au niveau de leur environnement. Si ces *Pseudomonas* sont des PGPR, il est crucial de comprendre comment ces inoculas compétent avec les populations indigènes rhizosphérique. L'introduction de ces bactéries échoue le plus souvent, car ces organismes ne peuvent pas recoloniser les racines, ou encore colonisent les racines, mais sont incapable de produire les métabolites impliqués dans le biocontrôle dans la nouvelle niche. Et aussi les mêmes résultats ont été trouvés par **Sageera. S *et al.* (2012)**.

Les résultats dans *Alternaria alternata* sont positifs pour quelques souches de *Pseudomonas fluorescens* (NA, NB, NC, ND), ces conclusions renforcent celles d'autres auteurs qui montrent que certains isolats des *Pseudomonas fluorescens* ont une activité inhibitrice sur *Alternaria alternata* (**Renga ramanujam et Kulothungan, 2011**) et (**Renga ramanujam et al., 2011**).

Les résultats dans *Aspergillus niger* sont positifs pour toutes les souches de *Pseudomonas fluorescens* concernant la méthode de diffusion sur disques, et cela est les mêmes résultats ont été trouvés par les travaux **Sageera. S *et al.* (2012)**. Les résultats montrent que les souches de *Pseudomonas fluorescens* ont un effet antifongique pour *Aspergillus niger*.



Conclusion

Conclusion :

L'effet des bactéries antagonistes sur les bactéries et champignons phytopathogènes a montré existence d'une inhibition de croissance bien claire, variable d'une souche a l'autre et d'un pathogène a l'autre.

En effet, d'après les résultats d'affiliation, la souche pathogène appartient à espèce de *Fusarium* c'est (*Fusarium oxysporum*) et la souche pathogène du genre *Alternaria sp* c'est *Alternaria alternata*

La lutte biologique contre ces phytopathogènes, est mise en évidence en utilisant 15 souches des bactéries telluriques, 10 souches de *Pseudomonas fluorescens* et 5 souches de *Serratia plymuthica*.

L'effet de l'activité antagoniste des souches de *Pseudomonas fluorescens* et *Serratia plymuthica* contre les 2 espèces d'*Erwinia*, a été étudié selon deux méthodes, confrontation par la méthode de diffusion sur disques et méthode des cylindres gélosées.

Les résultats d'activité antibactérienne montrent que la souche d'*Erwinia amylovora* a été inhibé presque par toute les souches antagonistes (*Pseudomonas* et *Serratia*) avec des diamètres varient de 8 à 16 mm, par contre la souche d'*Erwinia carotovora* a été inhiber uniquement par les 2 souches de *Serratia plymuthica* (SOL et MAI) avec des diamètres varient de 7 à 9 mm.

Les résultats de la confrontation directe sur les 3 champignons pathogènes (*Fusarium roseum*, *Alternaria alternata*, *Aspergillus niger*) montrent des pourcentages d'inhibitions varient de 41% à 82% selon les espèces pathogènes et antagonistes testées, alors que les résultats de la confrontation de deux autres méthodes (diffusion sur disque et cylindres gélosés) sur *Fusarium roseum*, *Fusarium oxysporum*, *Alternaria alternata* et *Aspergillus niger* montrent des diamètres varient de 7 à 20mm. Sachant que les souches SOL et MAI de *Serratia plymuthica* ont des effets inhibiteurs sur la croissance de toutes les souches des champignons pathogènes utilisées.

Perspective :

Utilisation des résultats de ce travail in vitro et faire des essais in vivo sur des fruits immatures ou sur petite plantule pour voir l'effet de ces bactéries antagonistes sur les agents pathogènes, pour savoir s'il existe toujours une inhibition de croissance.



Résumé

Résumé

La présente étude a été effectuée dans le but de lutter contre les agents phytopathogènes (bactériens et fongiques), 2 bactéries phytopathogènes, 4 champignons phytopathogènes. L'identification des souches a été effectuée selon les caractères macroscopique et microscopique et des tests biochimiques pour l'identification des bactéries,

Activité antibactérienne à montre qu'*Erwinia carotovora* a été inhibé que par des souches de *Serratia plymuthica* SOL et MAI, alors qu'*Erwinia amylovora* a été inhibé presque par toutes les souches de *Pseudomonas* et *Serratia*, avec une différence de diamètre d'inhibition de la croissance des pathogènes d'une souche antagoniste à l'autre.

Activité antifongique à montre qu'il y a une différence de la croissance entre différentes souches antagonistes, sur différentes espèces fongiques selon différentes méthodes, avec résultat meilleur en utilisant la méthode de confrontation directe par rapport à la méthode de diffusion sur disque et des cylindres gélosées. Sachant que les souches SOL et MAI de *Serratia Plymuthica* ont des effets inhibiteurs sur toutes les souches de champignons pathogène utilise.

Mots-clés : lutte biologique, activité antagoniste, bactéries phytopathogènes, champignons phytopathogènes, croissance, confrontation

Abstract

This study was conducted to control phytopathogenic agents (bacterial and fungal), 2 phytopathogenic bacteria, 4 phytopathogenic fungi. Strain identification was performed according to macroscopic and microscopic characteristics and biochemical tests for bacterial identification,

Antibacterial activity showed that *Erwinia carotovora* was inhibited only by strains of *Serratia plymuthica* SOL and MAI, while *Erwinia amylovora* was inhibited almost by all strains of *Pseudomonas* and *Serratia*, with a difference in pathogen growth inhibition diameter from one antagonistic strain to the other.

Antifungal activity shows that there is a difference in growth between different antagonist strains, on different fungal species according to different methods, with better result using the direct confrontation method compared to the diffusion method on disk and agar cylinders. Knowing that the SOL and MAI strains of *Serratia plymuthica* have inhibitory effects on all strains of pathogenic fungi used.

Keywords : biological control, antagonistic activity, phytopathogenic bacteria, phytopathogenic fungi, growth, confrontation

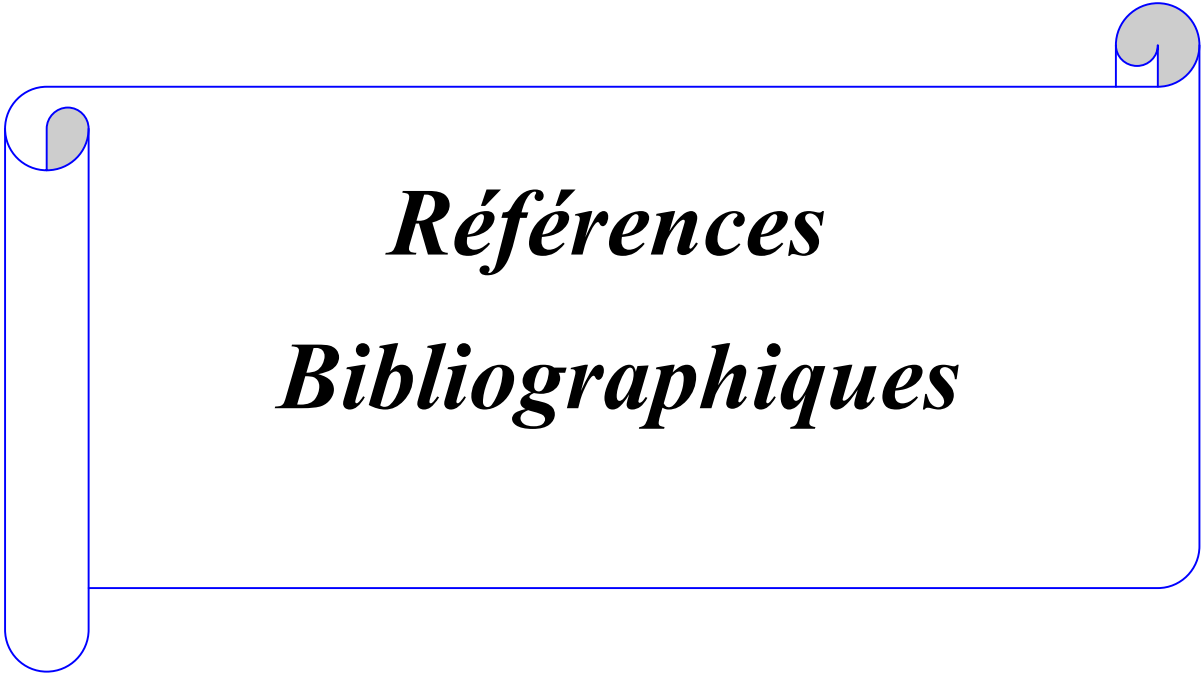
الملخص:

وقد أجريت هذه الدراسة من أجل مكافحة مسببات الأمراض النباتية (البكتيرية والفطرية)، 2 البكتيريا الممرضة للنبات، 4 الفطريات الممرضة للنبات. تم تحديد هوية السلالات وفقاً للشخصيات المجهرية والمجهريّة والاختبارات البيوكيميائية لتحديد البكتيريا.

يظهر النشاط المضاد للبكتيريا أن *Erwinia carotovora* تم تثبيطه فقط من خلال سلالات *Serratia plymuthica* و *SOL* و *MAI* ، في حين تم تثبيط *Erwinia amylovora* تقريباً بجميع سلالات *Pseudomonas* و *Serratia* ، مع وجود فرق في قطر تثبيط نمو مسببات الأمراض من سلالة مناهضة إلى أخرى.

يظهر النشاط المضاد للفطريات أن هناك فرقا في النمو بين سلالات مختلفة مضادة ، على أنواع فطرية مختلفة وفقاً لأساليب مختلفة ، مع نتيجة أفضل باستخدام طريقة المقارنة المباشرة مع طريقة نشر القرص والتكتلات . مع العلم أن سلالات *SOL* و *MAI* من *Serratia Plymuthica* لها أثر كبح على جميع سلالات الفطريات المسببة للأمراض المستخدمة.

الكلمات المفتاحية: مكافحة الحيوية، النشاط العدائي ، البكتيريا النباتية ، الفطريات النباتية ، النمو ، المواجهة

A decorative scroll graphic with a blue outline and grey shading on the rolled-up ends, containing the title text.

***Références
Bibliographiques***

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

A

- **Abdelkader Fahima.** Etude comparative de l'infection des sols par quelques champignons pathogènes en conditions de semis direct et de travail conventionnel, Production Végétale et Agriculture de Conservation, mémoire de magister, ferhat abbas., **2012**, Setif.
- **Alabouvette C., et Cordier C.** Les Trichoderma, trois fois bénéfiques ? Bio protecteurs, bio-fertilisants, bio-stimulant ? Un peu des trois, mais gare aux généralisations. Phytoma, **2012**, 652 : 17-21. And deoxynivalenol accumulation in wheat. International journal of Food Microbiology, 119, 126-130. Angeles, 93-114.
- **Alstrom S, Gerhardson B.** Characteristics of a *Serratia plymuthica* isolate from plant rhizospheres. Plant and Soil, **1987**, 103, 185–9.
- **Altindag, M., Sahin, M., Esitken, A., Ercisli, S., Guleryuz, M., Donmez, M.F., Sahin, F.** Biological control of brown rot (*Monilia laxa* Ehr.) on apricot (*Prunus armeniaca* L. cv. *Hacihaliloglu*) by *Bacillus*, *Burkholderia*, and *Pseudomonas* application under in vitro and in vivo conditions. Biological Control, **2006**, 38, pp. 369-372.
- **ANITA, B. et Samiyappan, R.** Induction of systemic resistance in rice by *Pseudomonas fluorescens* against rice root knot nematode *Meloidogyne graminicola*. Journal of Biopesticides., **2012**, vol. 5, no 53, p. 2012.
- **Anne Kendall A. (2008).** Request Authorship Credit. Article publié sur : www.mushroomobserver.org/observer/show/1199
- **-Astrom B, Gerhardson B.** Differential reactions of wheat and pea genotypes to root inoculation with growth-affecting rhizosphere bacteria. Plant and Soil, **1988**, 109, 263 9.
- **Austin B, Stobie M.** Recovery of *Serratia plymuthica* and presumptive *Pseudomonas pseudoalkaligenes* from skin lesion in rainbow-trout, *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum), otherwise infected with enteric redmouth. Journal of Fish Diseases., **1992**, 15, 541–3.
- **Azrou silia et Guettafi Narimane.** Recherche de caractères d'intérêt agricole chez certaines bactéries rhizosphériques, Biotechnologie Microbienne, mémoire de master, Université Abderrahmane Mira de Bejaia, **2014**.

B

- **Badillet, G., Bievre, C., et Gueho, E.** Champignons contaminants des cultures. *Champignons opportunistes. Atlas clinique et biologique. Varia.*, **1987**, vol. 2, p. 132-216.
- **Badji, B., Riba, A., Mathieu, F., Lebrihi, A., Sabaou, N.** Activité antifongique d'une souche d'*Actinomyces* d'origine saharienne sur divers champignons pathogènes et toxigènes. Journal de Mycologie Médicale., **2005**, 15, pp.211-219.
- **Baghaee-Ravari, Sareh, Rahimian, Heshmat, Shams-bakhsh, Masoud, et al.** Characterization of *Pectobacterium* species from Iran using biochemical and molecular methods. European Journal of Plant Pathology., **2011**, 129, 3, p. 413-425.
- **Baker, E.F.** Fire blight of pome fruits : The genesis of the concept that bacteria can be pathogenic to plants. *Hilgardia.*, **1971**, 40, 603–633.
- **Bakker, Peter AHM, Corné MJ Pieterse, and L. C. Van Loon.** Induced Systemic Resistance by Fluorescent *Pseudomonas* spp. *Amer. Phytopat. Soc.*, **2007**, 97, 239-243.
- **Balasubramanian, A., Rangaswami, G.** Influence of seed and root exudations on the rhizosphere effect in *Sorghum vulgare* and *Crotalaria juncea*. *Folia microbiologica.*, 1978, 23(6), 481-488.
- **Bauer, A.W and Kirby, W. ().** Antibiotic susceptibility testing by a standardized single disk method. *Am. J. Clin Pathol.*, **1966**, 45, 493-496.
- **Belabid, L.** La Fusariose vasculaire de la lentille (*Lens culinaris* Med.) dans le nord-ouest algérien. Morphologie et diversité génétique chez *Fusarium oxysporum* (Schlecht.) Emend. S. &

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- H. f. sp. lentis (Vasud. & Srini.) en relation avec la répartition géographique et le pouvoir pathogène., 2003. Thèse de doctorat. Thèse de Doctorat. Université d'Oran
- **Benhamou, N., Garand, C., Goulet, A.** Ability of Nonpathogenic *Fusarium oxysporum* Strain F047 to Induce Resistance against *Pythium ultimum* Infection in Cucumber. Applied and Environmental Microbiology, 2002, 68(8), p. 4044-4060.
 - **Benizri E., Baudoin E., Di Battista-Leboeuf C., et Guckert A.** Des bactéries pour la santé des plantes. Biofutur, 2001, 210 :52-56.
 - **Benlamoudi Wiam.** Essai de lutte biologique in vitro contre quelques maladies fongiques de la tomate dans la région d'Oued Righ par l'utilisation de souches autochtones de *Trichoderma harzianum* Persoon (1794), Phytoprotection et Environnement, Mémoire master académique, université kasdi merbah, 2016, ouargla
 - **Benzohra I.E., Megateli M. and Berdja R.** Bayoud disease of date palm in Algeria, History, epidemiology and integrated disease management., 2015, 14(7), 542-550.
 - **Berg G, Krechel A, Ditz M, Sikora RA, Ulrich A, Hallmann J.** Endophytic and ectophytic potato-associated bacterial communities differ in structure and antagonistic function against plant pathogenic fungi. FEMS Microbiology Ecology, 2005, 51, 215–29.
 - **Biomérieux, 2006.** Applications Bio Pharmaceutiques. Http : www.biomerieux.fr/servlet/srt/srt/bio/france/dyn
 - **Blancard D.** Les maladies de la tomate : Observer, identifier, lutter. *Station de Phytopathologie Végétale*, 1997, 12, 170- 179
 - **Blancard, D. 2013.** <http://ephytia.inra.fr/fr/C>
 - **Bloemberg G.V., et Lugtenberg, B.J.J.** Molecular basis of plant growth, 2001.
 - **Bonatterra, A., Mari, M., Casalini, L., Montesinos, E.** Biological control of *Monilinia laxa* and *Rhizopus stolonifer* in postharvest of stone fruit by *Pantoea agglomerans* EPS125 and putative mechanisms of antagonism. Int. J. Food Microbiol, 2003, 84, 93–104.
 - **Booth, C.** The genus *Fusarium*. Commonwealth Agricultural Bureaux. England, 1971.
 - **Booth, C.** *Fusarium*. Laboratory guide to the identification of the major species. Commonwealth Mycological Institute., 1997, Kew, Surrey, England.
 - **Booth, C.** The *Fusarium* problem : Historical, economic and taxonomic aspects. In The applied Mycology of Fusarium, Moss, M.O. and Smith, J. E. Ed. Cambridge University Press, 1984, 1-13.
 - **Bossis, E., Lemanceau, P., Latour, X. and Gardan, L.** The taxonomy of *Pseudomonas fluorescens* and *Pseudomonas putida*. current status and need for revision. Agronomie., 2000, 20, 51-63.
 - **Botton, B., Breton, A., Fèvre, M., Gauthier, S., Guy, P., Larpent, J P., Reymond, P., Anglier. J., Vayssier, Y., Veau, P.** Moisissures utiles et nuisibles, Importance, industrielle, Ed. Masson, Paris, 1990.
 - **Bouneghou samia.** L'effet inhibiteur de *Pythium sp* sur la croissance mycélienne de *Fusarium roseum* et d'*Alternaria alternata*, mémoire master, Biotechnologie des Mycètes, fermentation et production des substances fongiques, Université Mentouri Constantine, 2011.
 - **Bouhot, D.** Some aspects of the pathogenic potential in forme speciales and races of *Fusarium oxysporum* on Cucurbitaceae. In : *Fusarium. Diseases, biology, and taxonomy*, (P.E. Nelson, T.A. Toussoun and R.J. Cook, editors). The Pennsylvania State University Press, 1981, 318- 326.
 - **Bradbury, John F.** Guide to plant pathogenic bacteria. CAB international., 1986.
 - **Buxton, E. W.** Heterokaryosis and variability in *Fusarium. oxysporum.f. sp. gladioli* J Gem, Micro, 1954, 10, 71-78.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

C

- **Carbonnelle, B., Denis, F., et Marmonier, A. Pinon G. 8 Vargues R.** Bactériologie médicale. Techniques usuelles. SIMEP., 1987, Paris, 15.
- **Carrero P, Garrote JA, Pacheco S, Garcia AI, Gil R, Carbajosa SG.** Report of 6 cases of human infection by *Serratia plymuthica*. *Journal of Clinical Microbiology* 1995, 33. 275–6.
- **Chabasse D., Bouchara J.P., De Gentile L., Brun S., Cimen B., Penn P.** Les moisissures d'intérêt médical. Cahier de formation biologie médicale. Edition Bioforma. Paris., 2002, P. 11-109.
- **Charan, A. R., V. P. Reddy, P. N. Reddy, S. S. Reddy and S. Sivaramakrishnan,** Assessment of genetic diversity in *Pseudomonas fluorescens* using PCR-based methods. *Biorem. Biodiv. Bioav.*, 2011. 5, 10-16.
- **Chernin L, Ismailov Z, Haran S, Chet I.** Chitinolytic bacteria *Enterobacter agglomerans* antagonistic to fungal plant pathogens. *Applied and Environmental Microbiology*, 1995, 61,1720–6.
- **Choudhary D.K., Prakash A., Wray V., and Johri B.N.** Insights of the fluorescent pseudomonads in plant growth regulation. *Current Science*, 2009, 97, (2), PPI 70-179.
- **Clark W et Lubs H.** The identification of bacteria of the colony aerogenes family by use of indicators. *Journal of Infectious Diseases.*, 1915, 17, 160-173.
- **Couillerot, O., C. Prigent-Combaret, J. Caballero-Mellado and Y. Moëgne-Loccoz.** *Pseudomonas fluorescens* and closely-related fluorescent pseudomonads as biocontrol agents of soil-borne phytopathogens. *Let. Appl.Microbiol.*, 2009, 48, 505-512.
- **Criquet S. and Calvert V.** IMEP UMR CNRS 6116. Planche Tp mycologie publié sur internet en 2008.
- **Cronck QCB., Fuller JL.** *Plant Invaders. The threat to natural ecosystem.* Chapman et Hall London, 1995.

D

- **De Boer W., Gunnewiek P.J.A.K., Lafeber P., Janse J.D., Spit B.E., Woldendorp, J.W.** Anti-fungal properties of chitinolytic dune soil bacteria. *Soil Biol*, 1998.
- **DeGroot,A, Filloux A and Tommassen J.** Conservation of xcp genes, involved in the two step protein secretion process, in different *Pseudomonas* species and other gram negative bacteria. *MOL.GEN.GENET*, 1991, 229, 278-284.
- **De La Maza, Luis M., Pezlo, Marie T., Shigei, Janet T., et al.** *Color atlas of medical bacteriology.* ASM Press, 2013.
- **Delaunay-Cesbron Sophie.** Interaction entre des mutants *hrp* d'*Erwinia amylovora*, agent du feu bactérien, le parent pathogène et la plante hôte : recherche de mécanismes modulant la compatibilité, *Biologie cellulaire et moléculaire végétale.* Thèse de doctorat. Université d'Angers, 2009, p. 83.
- **Delaunay-Cesbron.** Interaction entre des mutants *hrp* d'*Erwinia amylovora*, Agent du feu bactérien, le parent pathogène et la plante hôte : recherche de mécanismes modulant la compatibilité. *Biologie cellulaire et moléculaire végétale.* À Angers : Université d'Angers, 2009, p. 83.
- **Deshpande S. D., and. Koppikar G.V.** A study of mycotic keratitis in Mumbai. *Indian J Pathol Microbiol.*, 1999, 42, 81-7.
- **Devanesan, M. G., T. Viruthagiri and N. Sugumar.** Transesterification of *Jatropha* oil using immobilized *Pseudomonas fluorescens*. *Afr. J. Biotechnol.*, 2007, 6, 2497-2501.
- **Doguiet K. D. D.** Biocontrôle des moisissures du genre *Fusarium* productrices de fumonisines par sélection de bactéries lactiques autochtones de maïs, Thèse de doctorat., 2010, P177.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- **Duijff, B.J., Meijer, J.W., Bakker, P.A.H.M., Schippers, B.** Siderophore-mediated competition for iron and induced resistance in the suppression of *Fusarium* Wilt of camation by *fluorescent Pseudomonas* spp. *Neth. J. Pathol.*, **1993**, 99, pp.277-289.

E

- **Eastgate, J.A.** *Erwinia amylovora*, the molecular basis of fireblight disease. *Mol. Plant Pathol.*, **2000**, 1, 325–329.
- **Eilenberg J., Hajek A., Lomer C.** Suggestions for unifying the terminomogy in biological control, *Biocontrol*, **2001**, 46.
- **El Komy M.H., Saleh A.A., Eranthodi A., and Molan, Y.Y.** Characterization of novel *Trichoderma asperellum* isolates to select effective biocontrol agents against tomato *Fusarium* wilt. *Plant Pathology Journal.*, **2015**, 31, 50–60.
- **Elad Y.** Biological control of foliar pathogens by means of *Trichoderma harzianum* and potential modes of action. *Crop Prot.*, **2000**, 19, 709–714.
- **Ellis, M. B.** Dematiaceous hyphomycetes. *Kew*, **1971**, 608pp.
- **El-Tarabily K.A, Hardy G.E., Sivasithamparam K., Kurtboke I.D.** Microbiological differences between limed and unlimed soils and their relationship with cavity spot disease of carrots (*Daucus carota*L.) caused by *Pythium coloratum* in Western Australia. *Plant and Soil*, **1996**, 183.
- **Emholt, S.** Side effects of propiconazole (tilt 250 ECTM) on non-target soil fungi in a field trial compared with natural stress effects. *Microbial Ecology.*, **1991**, 22, 99-108.1
- **Erikson, O E. Ilawksworth, DJ.** Outline of the ascomycetes. *Syst. Ascomycet*, **1991**, 9, 39- 271.
- **Esitken, A., Karlidag, H., Ercisli, S., Sahin, F.** Effects of foliar application of *Bacillus subtilis* Osu-142 on the yield, growth and control of shot-hole disease (*Coryneum* blight) of apricot. *Gartenbauwissenschaft*, **2002**, 67, pp. 139-142.
- **Eyquem A., Alouf J., Montagnier L.** *Traité de microbiologie clinique : Deuxièmes mises à jour et compléments.* Piccin Nouva Libraria, Italie, **2000**, 238 p.

F

- **FAO.** L'actualité agricole en Méditerranée. Ed. CIHEAM, **2009**, 33.
- **Fernandes B.** Lutte biologique. *PHM-revue Horticole*, **2006**, p465, 31-34.
- **Flandrois JP.** *Bactériologie Médicale.* Presses universitaires de Lyon, **1997**, 309p
- **Fravel D. R.** Commercialization and implementation of biocontrol. *Annu. Rev.fusariose des céréales en Algérie.* INPV Institut National de la Protection des végétaux, **2005**.
- **Frommel MI, Pazos GS, Nowak J.** Plant-growth stimulation and biocontrol of *Fusarium* wilt (*Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici*) by co-inoculation of tomato seeds with *Serratia plymuthica* and *Pseudomonas* sp. *Fitopatologia*, **1991**, 26, 66–73.

G

- **Gao, G., D. Yin, Y. Chen, F. Xia, J. Yang, Q. Li and W. Wang.** Effect of Biocontrol Agent *Pseudomonas fluorescens* 2P24 on Soil Fungal Community in Cucumber Rhizosphere Using T-RFLP and DGGE. *Soil Fungal Com. Cucum. Rhizos*, **2012**, 7, 1-9.
- **Garnier F, Denis F.** *Bactériologie médicale : Techniques usuelles : Cocci à Gram positif.* Masson., **2007**, Chapitre 29, 251, 254
- **Garrette, S.D.** Towards the biological control of soil- borne plant pathogens, in: Baker, K.F., Snyder, W.C. (Eds.), *Ecology of Soil-Borne Plant Pathogens.* Univ. Calif. Press, Los Angeles, **1965**, p. 4–17.
- **Gerhardt P., Murray R. G. E., Wood W.A. and Krieg N.R.** *Methods for General and Molecular Bacteriology.* Washington DC, **1994**, ASM, USA.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- **Giller, K. E., Beare, M. H, Lavelle P., Izac A. M. N., Swift, M. J.** Agricultural, soil biodiversity and agroecosystem function. *Applied Soil Ecology*, **1997**, 1 3-16.
- **Gottsberger, R.A.** Development and evaluation of a real-time PCR assay targeting chromosomal DNA of *Erwinia amylovora*. *Lett. Appl. Microbiol.* 2010, 51, 285–292.
- **Grimont F, Grimont, PAD.** The genus *Serratia*. In: Balowes A, Truper HG, Dworkin M, Harder W, Schleifer KH, editors. *The Prokaryotes: A Handbook on the Biology of Bacteria: Ecophysiology, Isolation, Identification, Applications*. 2nd ed. Springer, New York, USA, **1992**, p. 2822–48.

H

- **Haas D., Défago G.** Biological control of soil-borne pathogens by *fluorescent pseudomonads*. *Nature Review of Microbiology*, **2005**, 3, pp 307-319.
- **Hamdan L.** Caractérisation de la communauté fongique, **2010**.
- **Hélias V.** *Pectobacterium spp et Dickeya spp* de la pomme de terre, nouvelle nomenclature pour *Erwinia spp.*, symptomatologie, épidémiologie et prophylaxie. *Cahiers Agricultures*, **2008**, 17, 349-54.
- **Helias, V., Le Roux, A.C., Bertheau, Y., Andrivon, D., Gauthier, J.P., and Jouan, B.** Characterisation of *Erwinia carotovora* subspecies and detection of *Erwinia carotovora subsp. atroseptica* in potato plants, soil and water extracts with PCR-based
- **Hélias, V., LeRoux, A.C., Bertheau, Y., Andrivon, D., Gauthier, J. P., & Jouan, B.** Characterization of *Erwinia carotovora* subspecies and detection of *Erwinia carotovora* subspecies *atroseptica* in potato plants, soil and water extracts with PCR-based methods. *European Journal of Plant Pathology*, **1998**, 104, 685–699.
- **Henni, JE. Boisson, C. Geiger, JP.** Variabilité de la morphologie chez *Fusarium oxysporum f.sp lycopersici*. Thèse de Doctorat en science de la nature (Phytopathologie), *Phytopath mediterr.*, **1994**, 51-58
- **Hosny A.D., Hosni Sheir D. and Eldewany A.** Production of Antimicrobial Agent from Marine Bacteria Isolated from Mediterranean. *Australian Journal Basic and Applied Sciences*, **2011**, 5, 121-128.
- **Howell, C.R., Stipanovic, R.D.** Control of *Rhizoctonia solani* on cotton seedlings With *Pseudomonas fluorescens* and With an antibiotic produced by the bacterium. *Phytopathology*, **1979**, 69, pp.480-482.
- **Huang, J.K., Hu, R.F., Rozelle, S., Pray, C.** Insect resistant GM rice in farmers' fields: Assessing productivity and health effects in China. *Science*, **2005**, 308, 688-690.

I

- **Ishii, H.** Impact of fungicide resistance in plant pathogens on crop disease control and agricultural environment. *Japan Agricultural Research Quarterly*, **2006**, 40, 205-211.
- **Islam M. T et Hossain M.M.** Biological Control of Perono sporomycete Phytopathogen by Bacterial Antagonist. Maheshwari D.K. (eds.), *Bacteria in Agrobiolgy: Disease Management*, **2013**, p. 176-218
- **Iwai Y., and Takahashi Y.** Selection of microbial sources of bioactive compounds" in « The search for bioactive compounds from microorganisms », SpringerVerlag, New York, (Ed.), **1992**, 281 -302.

J

- **Jabrane A, Sabri A, Compere P, Jacques P, Vandenberghe I, Van Beeumen J, and Thonart P.** Characterization of *Serracin p*, a phage-tail-like bacteriocin, and its activity against *Erwinia amylovora*, the fire blight pathogen. Centre Wallon de Biologie Industrielle, Service de Technologie Microbienne, Université de Liège, Sart-Tilman, BE-4000., **2002**, 68, 11.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- **Jamalizadeh M, Etebarien HR, Alizadeh A et Aminian H.** Biological control of gray mould on apple fruits by *Bacillus licheniformis* (EN 74-1). *Phytoparasitica*. **2008**, 36, 23-29.
- **James, D.W. and Gutterson, N.I.** Multiple antibiotics produced by *Pseudomonas fluorescens* HV37a and their differential regulation by glucose. *Appl. Environ. Microbiol.*, **1986**, 52, 1183–1198.
- **Jiménez-Díaz R.M, Castillo P, Jiménez-Gasco M.d.M, Landa B., Navas-Cortés J.A.** Fusarium wilt of chickpeas: Biology, ecology and management, *Crop Protection*, 2015. <http://dx.doi.org/10.1016/j.cropro.2015.02.023>
- **Joffin J.N. and Leyral G.** *Microbiologie Technique. Tome 1, dictionnaire des techniques.* Académie de bordeaux et crdp d'Aquitaine, **2006**, France.
- **Jourdan E, Ongena M et Thonar P.** Caractéristiques moléculaires de l'immunité des plantes induite par les rhizobactéries non pathogènes. *Biotechnol. Agron. Soc. Environ.*, **2008**, 4, 437-449.

K

- **Kalbe C, Marten P, Berg G.** Strains of the genus *Serratia* as beneficial rhizobacteria of oilseed rape with antifungal properties. *Microbiological Research*, **1996**, 151, 433–9.
- **Kamensky M, Ovdais M, Chet I, Chernin L.** Soil-borne strain IC14 of *Serratia plymuthica* with multiple mechanisms of antifungal activity provides biocontrol of *Botrytis cinerea* and *Sclerotinia sclerotiorum* diseases. *Soil Biology and Biochemistry*, **2003**, 35, 323–31.
- **Keel, C., Voisard, C., Berling, C.H., Kahr, G., Defago, G.** Iron sufficiency, a prerequisite for the suppression of tobacco black root rot by *Pseudomonas fluorescens* strain CHAO under gnotobiotic conditions. *Phytopathology*, **1989**, 79, pp.584-589.
- **Koczan, J.M., McGrath, M.J., Zhao, Y., Sundin, G.W.** Contribution of *Erwinia amylovora* exopolysaccharides amylovoran and levan to biofilm formation. Implications in pathogenicity. *Phytopathology*, **2009**, 99, 1237–1244.
- **Korsten, L., De Villiers, E.E., Wehner, F.C., Kotze, J.M.** Field sprays of *Bacillus subtilis* and fungicides for control of preharvest fruit disease of avocado in South Africa. *Plant. Dis.*, **1997**, 81, pp.455-459.
- **Kwon-Chung, K.J. and Bennett J.E.** *Medical Mycology.* Lea & Febiger, Philadelphia and London, **1992**, p. 524-559.

L

- **Lefrère J.J., et Rouger P.** *Transfusion sanguine : Une approche sécuritaire.* John Libbey Eurotext, France, **2000**, pp. 175-177.
- **Legard DE, McQuilken MP, Whipps JM, Fenlon JS, Fermor TR, Thompson IP, et al.** Studies of seasonal changes in the microbial populations on the phyllosphere of spring wheat as a prelude to the release of a genetically modified microorganism. *Agriculture, Ecosystems & Environment*, **1994**, 50, 87–101.
- **Lelliott, R.A. & Stead, D.E.** *Methods for the diagnosis of bacterial diseases of plants.* Blackwell Scientific Publications, **1987**, Volume 2. Oxford (GB).
- **Lemanceau P, Bauer P, Kraemer S, Briat J.F.** Iron dynamics in the rhizosphere as a case study for analyzing interactions between soils, plants and microbes. *Plant Soil*, **2009**, 321, pp 513-535.
- **Lemire, J., R. Mailloux, C. Auger, D. Whalen and V. D. Appanna.** *Pseudomonas fluorescens* orchestrates a fine metabolic-balancing act to counter aluminium toxicity. *Environ. Microbiol.*, **2010**, 12, 1384-1390.
- **Lepoivre, P.** *Phytopathologie ; bases moléculaires de biologie des pathosystèmes et fondement des stratégies de lutte.* De Boeck & Presses Agronomiques de Gembloux (Eds.), Brussels, Belgium, **2003**, 149-167.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- **Leslie J.F., Summerell B.A.** The Fusarium Laboratory Manual ; Blackwell Publishing : Oxford, UK. Ltd, Iowa.p, **2006**, p. 109.
- **Leslie, JF. Summerell, BA.** The Flaw-iron Laboratory Manual, Blackwell Publishing, **2006**.
- **Levy,E, Eyal,Z, Chet,I , and Hochman,A.** Resistance mechanisms of *Septoria tritici* to antifungal products of *Pseudomonas* .PHY. MOL. PLA.PATH., **1992**, 40, 163-171.
- **Llorens A., Hinojo M.J, Mateo R., Gonzalez-Jaeén M., Valle-Algarra F.M., Logrieco A., Jiménez M.** Characterization of Fusarium spp isolates by PCR-RFLP analysis of the intergenic spacer region of the rRNA gene (rDNA). Int J Food Microbiol, **2006**, 106(3), 297-306.
- **Logreico A. Moretti, A. Solfrizzo, M.** Alternaria toxins and plant diseases : an overview of origin, occurrence and risks. World Mycotoxin Journal., **2009**, 2 (2), 129-140.
- **Llorens, A., Hinojo, M. J., Mateo, R., et al.** Characterization of Fusarium spp. isolates by PCR-RFLP analysis of the intergenic spacer region of the rRNA gene (rDNA). International journal of food microbiology, **2006**, vol. 106, n° 3, p. 297-306
- **Lopez-Sabater EI, Rodríguez-Jerez JJ, Roig-Sagués AX, Mora-Ventura MT.** Bacteriological quality of tuna fish (*Thunnus thynnus*) destined for canning; effect of tuna handling on presence of histidine decarboxylase bacteria and histamine level. In : Ingkaninun P, Poomises P, editors. Proceedings of the 11th International Symposium of the World Association of Veterinary Food Hygienists, Bangkok, Thailand, **1993**, p. 366–9.
- **Lucon CMM, Melo IS.** Effect of seed bacterization on the development of maize plants and Fusarium moniliforme control. Fitopatologia Brasileira, **2000**, 25, 529–37.
- **Lydie S.** La lutte biologique" vers de nouveaux équilibre écologique", *Educagri Quae* : Paris, 2010, 321p.
- **Lyhs U, Bjorkroth J, Hyytia E, Korkeala H.** The spoilage flora of vacuum-packaged, sodium nitrite or potassium nitrate treated, cold-smoked rainbow trout stored at 4 degrees C or 8 degrees C. International Journal of Food Microbiology, **1998**, 45, 135–42.

M

- **Maaaro.** Publication n°811. Maladies des céréales. Le personnel du Maaaro, **2009**.
- **Madani, Kaivon.** Dr. Hans Christian Joachim Gram : inventor of the Gram stain. Primary Care Update for OB/GYNS, **2003**, vol. 10, no 5, p. 235-237. doi:[http://dx.doi.org/10.1016/S1068-607X\(03\)00055-6](http://dx.doi.org/10.1016/S1068-607X(03)00055-6).
- **Malloch D.** Moulds isolation, cultivation and identification. University of Toronto,1997. Http://www.Botany.utoronto.ca/researchlabs/malloch/moulds/html.
- **Malnoy, M., Martens, S., Norelli, J.L., Barny, M.-A., Sundin, G.W., Smits, T.H.M., Duffy, B.** Fire Blight, Applied Genomic Insights of the Pathogen and Host. Annu. Rev. Phytopathol, **2012**, 50, 475–494.
- **Maza ML, Pezzlo TT, Peterson ME, Shigei TJ.** Color Atlas of Medical Bacteriology. ASM Press, Washington, **2004**, 316p.
- **Mazurier, S., Corberand, T., Lemanceau, P. et Raaijmakers, J.M.** Phenazine antibiotics produced by fluorescent pseudomonads contribute to natural soil suppressiveness to *Fusarium* wilt. ISME Journal, **2009**, 3:977-991.
- **McLoughlin, T.J., Quinn, J.P., Bettermann, A., Bookland, R.** *Pseudomonas cepacia* suppression of sunflower Wilt fungus and role of antifungal compounds in controlling the disease. Appl. Environ. Microbiol., **1992**, 58, pp. 1760-1763
- **Mercado-Blanco J., et Bakker P.A.H.M.** Interactions between plants and beneficial *Pseudomonas* spp : exploiting bacterial traits for crop protection. Antonie Van Leeuwenhoek, **2007**, 92, 367-389.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- **Messiaen, CM. Blancard, D. Rouxel, F. Lafon, R.** Les maladies des plantes maraicheres, INRA Paris, **1991**, 552pp
- **Meyer J.Y.** La lutte biologique contre les espèces introduites envahissantes : solution miracle ou méthode risquée ? Fiche technique. **2002**, 16.
- **Mezaache Samia.** Etude des Propriétés suppressives d'une souche de *Pseudomonas* isolée de la rhizosphère de la pomme de terre sur la croissance de deux bactéries et de deux champignons phytopathogènes. Biologie cellulaire et moléculaire : Université Abou Bakr Belkaid -Tlemcen, **1997**, 89p.
- **Mezaache Samia.** Localisation des déterminants de la suppression de quelques souches de *pseudomonas* isolées de la rhizosphère de la pomme de terre. Microbiologie : Université Ferhat Abbas Sétif, **2012**, 141p.
- **Migula W.** Über ein neues System der Bakterien. Arbeiten aus dem baktriologischen Institut der technischen Hochschule zu Karlsruhe, **1894**, 1, pp 235-238.
- **Misko, A.L. and Germida, J.J.** Taxonomic and functional diversity of pseudomonads isolated from the roots of field-grown canola. *FEMS Microbiol. Ecol*, **2002**, 42 : 399-407.
- **Moneke, A. N., G. N. Okpala and C. U. Anyanwu.** Biodegradation of glyphosate herbicide in vitro using bacterial isolates from four rice fields. *Afr. J. Biotechnol*, **2010**, 9, 4067-4074.

N

- **Naika, S. De Jeud, JVL. De Jeffau, M. Hilmi, M. Vandam, B.** La culture de tomate, production, transformation et commercialisation. Ed. Wageningen, Pays-Bas, **2005**, p.105.
- **Nasraoui, B.** Les champignons parasites des plantes cultivées, biologie, systématique, pathologie, maladies. Centre de publication universaire. Tunisie, **2006**, p. 456.
- **Nasraoui, Bouzid.** Champignons mitosporés Dans : Introduction à la phytomycologie : morphologie, biologie et systématique appliquée aux champignons phytopathogènes. Tunis, Tunisie, Centre de publication universitaire, **2000**, p.155-183.
- **Nelson, PE. Toussoun, TA. Marasas, WFO.** *Fusarium* species. An Illustrated Manual for Identification. Pennsylvania State University Press, University Park, PA. **1983**.
- **Nieto TP, Lopez LR, Santos Y, Nunez S, Toranzo AE.** Isolation of *Serratia plymuthica* as an opportunistic pathogen in rainbow-trout. *Journal of Fish Diseases* **1990**,13, 175–7.

O

- **O'Donnell K., Ward T.J., Robert V.A.R.G., Crous P.W., Geiser D.M., and Kang S.** DNA sequence-based identification of *Fusarium*. Current status and future directions. *Phytoparasitica*, **2015**, 43, 583-595.
- **O'sullivan D.J et O'gara F.** Traits of Fluorescent *Pseudomonas spp.* Involved in Suppression of Plant Root Pathogens. *Microbiological Reviews.*, **1992**, p.662-676.
- **Ongena, M., E. Jourdan, M. Schäfer, C. Kech, H. Budzikiewicz, A. Luxen and P. Thonart.** Isolation of an N-alkylated Benzylamine Derivative from *Pseudomonas putida* BTP1 as Elicitor of Induced Systemic Resistance in Bean. *Amer. Phytopat.*, **2005**. 18, 562–569.
- **Ongena, M., F. Daayf, P. Jacques, P. Thonart, N. Benhamou, T. C. Paulitz and R. R. Bélanger.** Systemic induction of phytoalexins in cucumber in response to treatments with *fluorescent pseudomonads*. *Plant Pathol*, **2000**, 49, 523-530.
- **Ongena, M., F. Daayf, P. Jacques, P. Thonart, N. Benhamou, T. C. Paulitz, P. Cornélis, N. Koedam and R. R. Bélanger.** Protection of cucumber against *Pythium* root rot by fluorescent pseudomonads: predominant role of induced resistance over siderophores and antibiosis. *Plant Pathol*, **1999**, 48, 66-76.
- **Ozenda, P.** Les organismes végétaux, tome I : Végétaux inférieurs, Masson, **1990**, p.220.

P

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- **Pal, K.K., Gardener, B.M.** Biological Control of Plant Pathogens. Plant Heal. Instr, **2006**, 1–25.
- **Palleroni, Norberto J. et Moore, Edward RB.** Taxonomy of pseudomonads: experimental approaches. In "Pseudomonas", vol. 1. Ramos, J. L. (Eds). Kluwer Academic/Plenum Publishers, New York, Etats-Unis, **2004**, p. 3-44.
- **Pandey, B. V. and R. S. Upadhyay.** *Pseudomonas fluorescens* can be used for bioremediation of textile effluent Direct Orange-102. Trop. Ecolo, **2010**, 51, 397-403.
- **Papavizas, B.C., Lumsden, R.D.** Biological control of soil-borne fungal propagules. Ann. Rev. Phytopathol., **1980**, 18, pp.389-413.
- **Park C, Shen S.** Biocontrol of phytophthora blight of pepper employing *Serratia plymuthica* A21–4 and effect of soil population of *Phytophthora capsici* on the root colonization of the antagonistic bacteria. Bulletin OILB/SROP, **2002**, 25, 327–30.
- **Paulin, Jean-Pierre, et al.** *Erwinia amylovora*, general characteristics, biochemistry and serology. Fire blight. The disease and its causative agent, *Erwinia amylovora*, **2000**, p. 87-116.
- **Paulitz T.C., et Bélanger R.R.** Biological control in greenhouse systems. *Annu.* **2001**.
- **Paulsen, I. T., C. M. Press, J. Ravel, D. Y. Kobayashi, G. S. Myers et al.:** Complete genome sequence of the plant commensal *Pseudomonas fluorescens* Pf-5. Nat. Biotechnol. **2005**, 23, 873-885.
- **Pérombelon, M.C.M.** Potato diseases caused by soft rot erwinias: an overview of pathogenesis. Plant Pathology, **2002**, 51, 1-12.
- **Perombelon, M.C.M., and Kelman, A.** Ecology of the Soft Rot Erwinias. Annual Review of Phytopathology, **1980**, 18, 361-387

Q

- **Quatresous N.** Aspergillose humaine. Épidémiologie, diagnostic biologique, contrôle. Thèse de Doctorat, Université de Limoges, **2011**, Limoges.

R

- **Ramamoorthy, V., Viswanathan, R., Raguchander, T., Prakasam, V., Samiyappan, R.** Induction of systemic resistance by plant growth promoting rhizobacteria in crop plants against pests and diseases. Crop Prot. **2001**, 20, pp. 1-11.
- **Rapilly, F.** Les Techniques de mycologie en pathologie végétale. Annales des Epiphytes, vol. 19. Institut National de la Recherche Agronomique, **1968**, Paris, p. 102.
- **Raymundo, A., Ries, S.** Motility of *Erwinia amylovora*. Phytopathology, 1981, 71, 45–49.
- **Raymundo, A.K., Ries, S.M.** Chemotaxis of *Erwinia amylovora*. Phytopathology, **1980**, 70, 1066–1069.
- **Reina J, Borrell N, Llompart I.** Community-acquired bacteremia caused by *Serratia plymuthica* case report and review of the literature. Diagnostic Microbiology and Infectious Disease, 1992, 15, 449–52.
- **Renga Ramanujam, J. and Kulothungan. S.** *Pseudomonas fluorescens* economically and ecologically farmer friendly biofertilizer and biocontrol agent. J.C.M.R., **2011**, 1(1), 107-113.
- **Renga Ramanujam, J. and Kulothungan, S.** A novel approach to intrude secondary metabolites of *Pseudomonas fluorescens* as a biocontrol substance against *Alternaria alternata*. IUP Journal of Biotechnology, **2011**, 5(4), 20-27.
- **Renga Ramanujam, J., Kulothungan, S., Anitha, S. and Deepa, K.** A study on compatibility of *Pseudomonas fluorescens* L. and *Parthenium hysterophorus* L. as a biocontrol agent to leaf spot by *Alternaria alternata* f.sp. *lycopercisi* in tomato. South Asian Journal of Biological Sciences, **2011**, 1(2), 71-86.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- **Russo, A., M. Basaglia, S. Casella and M. P. Nuti**, *Pseudomonas fluorescens* 134 as a Biological Control Agent (BCA) Model in Cell Immobilization Technology. *Biotechnol. Prog.*, **2005**, 21, 309-314.

S

- **Sageera Showkat, Imtiyaz Murtaza, Omi Laila and Arif Ali**. Biological Control of *Fusarium Oxysporum* and *Aspergillus Sp.* By *Pseudomonas Fluorescens* Isolated From Wheat Rhizosphere Soil Of Kashmir. Amia Millia Islamia, Department of Biosciences, New-Delhi, 110025, India., 2012, p.24-32
- **Schaad, N. W., Jones, J. B. & Chun, W.** Laboratoiy Guide for Identification of Plant Pathogenic Bacteria. APS Press. **2001**, Third edition 373p. St Paul, Minnesota (US).
- **Schuster E., Dunn-Coleman N., Frisvad J C., Van dijk P. W. M.** On the safety of *Aspergillus niger* – a review. *Appl Microbiol Biotechnol*, **2002**, 59,426–435.
- **Schuster E., Dunn-Coleman N., Frisvad J.C. et Van Dijck P.W.M.** On the safety of *Aspergillus niger* - a review. *Appl Microbiol Biotechnol*, **2002**, 59, 426–435.
- **Simmons, EG.** Alternaria terms and variations. (22- 26). *Mycotaxon.* (Pleospora/ Stemphylium and Lewia/Alternaria)., **1986**, 25 : 287-308.
- **Simmons, EG.** Alternaria. An Identification Manual. : CBS Biodiversity Series No. 6. CBS Fungal Biodiversity Centre, Utrecht, the Netherlands., **2007**, 775 pp.
- **Sneh, B., Dupler, M., Elard, Y., Baker, R.** Chlamydospore germination of *Fusarium oxysporum* f.sp. cucumerinum as affected by fluorescent and lytic bacteria from *Fusarium* suppressive soil. *Phytopathology*, **1984**, 74, pp. II 15-1124.
- **Soufiane B.** Isolement à partir de la rhizosphère des conifères de bactéries et d'Actinomycetes antagonistes aux champignons phytopathogènes. Quebec : Université Laval., **1998**, 60.

T

- **Thomashow, L.S., Weller, D.M.** Current concepts in the use of introduced bacteria for biological disease control., in : Stacey, G., Keen, N.T. (Eds.), *Plant Microbe Interactions*. Champman Hall, New York, USA, **1996**, pp. 187–235.
- **Thomson SV.** Epidemiology of fire blight. In : Vanneste JL (ed) *Fire blight : the disease and its causative agent, Erwinia amylovora*. CAB International, Wallingford, **2000**, p 9- 36.
- **Tortorano A.M., Cabrini E. and Viviani M.A.** Sensibilité *in vitro* des levures à cinq antibiotiques. Comparaison de deux méthodes C.M.I. en gélose et méthode des disques. *Bulletin de la Société Française de la Mycologie Médicale*, **1979**, 8, 69-74.
- **Toth, I.K., and Birch, P.R.J.** Rotting softly and stealthily. *Current Opinion in PlantBiology*, **2005**, 8, 424-429.
- **Toth, I.K., Bell, K.S., Holeva, M.C., and Birch, P.R.J.** Soft rot erwinia : from genes to genomes. *Molecular Plant Pathology*, **2003**, 4, 17-30.
- **Trivedi, P. Pand, A.** In vitro evaluation of antagonistic properties of *Pseudomonas comigata*. *Microbiological Research.*, **2008**, (163), 329-336.
- **Trögl, J., A. Chauhan, S. Ripp, A. C. Layton, G. Kuncová and G. S. Sayler.** *Pseudomonas fluorescens* HK44. Lessons Learned from a Model Whole-Cell Bioreporter with a Broad Application History. *Sensors*, **2012**, 12, 1544-1571.

V

- **Van den Broek D., Chin-A-Woeng T.F.C., Eijkemans K., Mulders,I.H.M., Bloemberg G.V., and Lugtenberg B.J.J.** Biocontrol traits of *Pseudomonas* spp are regulated by phase variation. *Mol. Plant–Microbe Interact*, **2003**, 16, 1003–1012.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- **Van Houdt R, Moons P, Jansen A, Vanoirbeek K, Michiels CW.** Genotypic and phenotypic characterization of a biofilmforming *Serratia plymuthica* isolate from a raw vegetable processing line. *FEMS Microbiology Letters*, **2005**, 246, 265–72.
- **Van Loon, L.C.** Induced resistance in plants and the role of pathogenesis-related proteins. *Eur. J. Plant Pathol.*, **1997**, 753–765.
- **Van Loon, L.C.** Plant responses to plant growth-promoting rhizobacteria. *European Journal of Plant Pathology.*, **2007**, **119**, 243-254.
- **Vaubourdolle M.** Infectiologie. 3e Ed, le moniteur internat, paris. 2007, 436p.
- **Vicedo, B., Penalver, R., Asins, M.J., Lopez, M.M.** Biological control of *Agrobacterium tumefaciens* colonization and pAgK 84 transfers With *Agrobacterium radiobacter* K84 and the tra mutant strain RI 026. *Appl. Environ. Microbiol.*, **1993**, 59, pp.309-315.
- **Vinale F., Sivasithamparam K., et Ghisalberti E. L.** *Trichoderma*-plant-pathogen interactions. *Soil Biology and Biochemistry*, **2008**, 40, 1-10.
- **Vincent, M.A., Harrison, LA., Brackin, J.M., Kovacevich, P.A., Mukerji, P. Weller, D.A., Pierson, L.S.** Genetic analysis of the antifungal activity of a soil borne *Pseudomonas aureofaciens* *applied Environ. Microbiol.*, **1991**, 57, 2928-2934.
- **Vitullo D, Di Pietro A, Romano A, Lanzotti V et Lima G.** Role of new bacterial surfactins in the antifungal interaction between *Bacillus amyloliquefaciens* and *Fusarium oxysporum*. *Plant Pathology*, **2012**, 61, 689-699.
- **Vrancken, K., Holtappels, M., Schoofs, H., Deckers, T., Valcke, R.** Pathogenicity and infection strategies of the fire blight pathogen *Erwinia amylovora* in Rosaceae: State of the art. *Microbiology*, **2013**, 159, 823–832.

W

- **Weller, D.M., Cook, R.** Increased growth of wheat by seed treatment With *fluorescent Pseudomonas* and implication of *Pythium* control. *Can. J. Plant. Pathol.*, **1986**, 8, pp.328-344.
- **Whipps JM.** Microbial Interaction and Biocontrol in the Rhizosphere. *Journal of Experimental Botany*, **2001**, 52, 487-511.
- **Wilson, C.L., Wisniewski, M.E.** Biological control of postharvest diseases: Theory and Practice. CRC Press, Boca Raton, USA, **1994**.
- **Wong, W., K. Levi, B. Baddal, J. Turton and T. C. Boswell.** Spread of *Pseudomonas fluorescens* Due to Contaminated Drinking Water in a Bone Marrow Transplant Unit. *J. Clin. Microbiol.*, **2011**, 49, 2093–2096.

Z

- **Zillinsky, F.J. (1983).** Maladies communes des céréales à paille. Guide d'identification.

Site web

[1] : <https://www.biomedicinapadrao.com.br/2013/08/descricao-morfologica-de-colonias-em.html> (consulté le 8.04.2018)



Annexes

Annexes

Annexe I

- **Préparation des milieux de cultures utilisés**

- ❖ **Milieu PDA : (Potato Dextrose Agar)**

- P : pomme de terre200g.
- D: D- Glucose 15 g.
- A: Agar- Agar..... 18 g.
- Eau distillée..... 1000 mL.
- stérilisation à l'autoclave 121°C

- ❖ **Milieu LPGA : (milieu sélectif à base de Peptone – Extrait de levure peptone-agar).**

- L : Extrait de levure 5 g.
- P: Peptone 5 g.
- G: Glucose..... 10 g.
- A: Agar- Agar..... 20 g.
- Eau distillée..... 1000 mL

- ❖ **King B :**

- Peptone dite "B"20 g.
- Glycérol.....10 ml.
- Hydrogénophosphate de potassium1,5 g.
- Sulfate de magnésium heptahydraté..... 1,5 g
- Agar purifié.....20g.
- pH7,2.
- Eau distillée..... 1000 mL.

- ❖ **Milieu LB solide :**

- Trypton : 10 g
- Extrait de levure : 5 g
- NaCl (sel de cuisine):..... 5 g
- Agar :20 g
- Eau distillée.....1000 mL

Annexes

❖ Milieu LB liquide :

- Trypton :..... 10 g
- Extrait de levure :..... 5 g
- NaCl (sel de cuisine):..... 5 g
- Eau distillée.....1000 mL

❖ Milieu Levane :

- Extrait de levure.....2 g
- Bactopeptone (Difco).....5g
- Saccharose.....50g
- Chlorure de sodium.....5g
- Agar bactériologique.....20g

NB : Après autoclavage à une température 121°C pendant environ 20 minutes, le milieu est laissé à refroidir suffisamment pour pouvoir le couler en boîtes de Petri.

Annexes

Annexe II

Tableau 1 : Effet des bactéries antagonistes sur la croissance d'*Erwinia amylovora* et *Erwinia carotovora* selon les 2 méthodes utilisées

	<i>Erwinia carotovora</i> 194 ($\mu \pm \sigma$) (mm)	<i>Erwinia amylovora</i> 1430 ($\mu \pm \sigma$) (mm)	<i>p</i>
Méthode Cylindre gélosée	1,15 ^a ±3,06	12,04 ^b ±4,14	0,001
Méthode de Diffusion sur disque	1,111 ^a ±2,956	11,511 ^b ±4,105	0,001

Tableau 2 : Effet des bactéries antagonistes sur la croissance des quatre champignons pathogènes par la méthode directe de confrontation

	<i>Fusarium roseum</i> ($\mu \pm \sigma$) (mm)	<i>Alternaria alternata</i> ($\mu \pm \sigma$) (mm)	<i>Aspergillus niger</i> ($\mu \pm \sigma$) (mm)	<i>p</i>
Méthode directe	16,400 ^a ± 7,119	12,800 ^a ±3,321	71,067 ^b ±22,843	0,0001

NB : Les lettres différentes dans une même lignes correspondent à une signification ($p < 0,05$) selon le test de de Wilcoxon ou selon le test de Friedman.