

REPUBLIQUE ALGERIENNE DEMOCRATIQUE ET POPULAIRE

MINISTERE DE L'ENSEIGNEMENT SUPERIEUR ET DE LA
RECHERCHE SCIENTIFIQUE

UNIVERSITE MOULOUD MAMMERI DE TIZI-OUZOU

FACULTE DES SCIENCES BIOLOGIQUES ET DES SCIENCES AGRONOMIQUES

Département d'Agronomie



Mémoire de fin d'études

En vue de l'obtention du diplôme De Master

Spécialité : Protection Des Plantes Cultivées

Thème

**Activités antagonistes *in vitro* de deux souches de
Pseudomonas spp fluorescens vis -à-vis des
fusarioses vasculaires.**

Présenté par

Dirigé par

M^{elle} ABDALLAH Karima.

M^{me} DAHOUMANE-LARBAOUI A.

M^{elle} KACI Noura

Devant le jury

Présidente : M^{me} MESSOUS-ALKAMA N.

M.C.A UMMTO

Examinatrice : M^{elle} CHOUGAR S.

M.C.A UMMTO

Examinatrice : M^{me} KHELFANE-GOUCHEM K

M.C.A UMMTO

Promotion 2014/2015

REMERCIEMENTS

Au nom de dieu, le clément et le miséricordieux

Nous tenons à présenter notre profondes reconnaissances et nos remerciements à :

M^{me}. DAHOUMANE-LARBAOUI A. Maitre Assistante A à l'UMMTO, pour avoir dirigé, ce travail.

M^{me} MESSOUS-ALKAMA N. Maitre de conférences A à l'UMMTO pour avoir fait l'honneur d'être la présidente du Jury.

M^{elle} CHOUGAR S, Maitre Assistante A à l'UMMTO pour avoir accepté de faire partie du jury, pour son aide, son soutien, ses conseils et ces encouragements.

M^{me} MEDJOUB-BENSAAD F. Professeur à l'UMMTO, la responsable du master de protection des plantes cultivées qui nous a tout le temps ouvert les portes de son laboratoire et pour ces conseils précieux.

M^{me} GOUCEM-KHELFEN K. Maitre de conférences B à l'UMMTO d'avoir accepté d'examiner notre travail.

M^r MEZANI S .Doctorant à l'UMMTO pour son aide et aussi ces conseils.

M^{elle} GUENDOUI S, BOUANEM M. Ingénieurs au laboratoire de Microbiologie de département biologie, qui nous ont vraiment aidés lors de la pratique.

Mr BENSIDHOU M. Doctorant à l'UMMTO pour ces encouragements.

DÉDICACE

JE DÉDIÉ CE TRAVAIL À

LA MÉMOIRE DE MON CHER PÈRE

MA CHÈRE MAMAN, LUMIÈRE DE MA VIE.

MES CHERS FRÈRES ET SŒURS

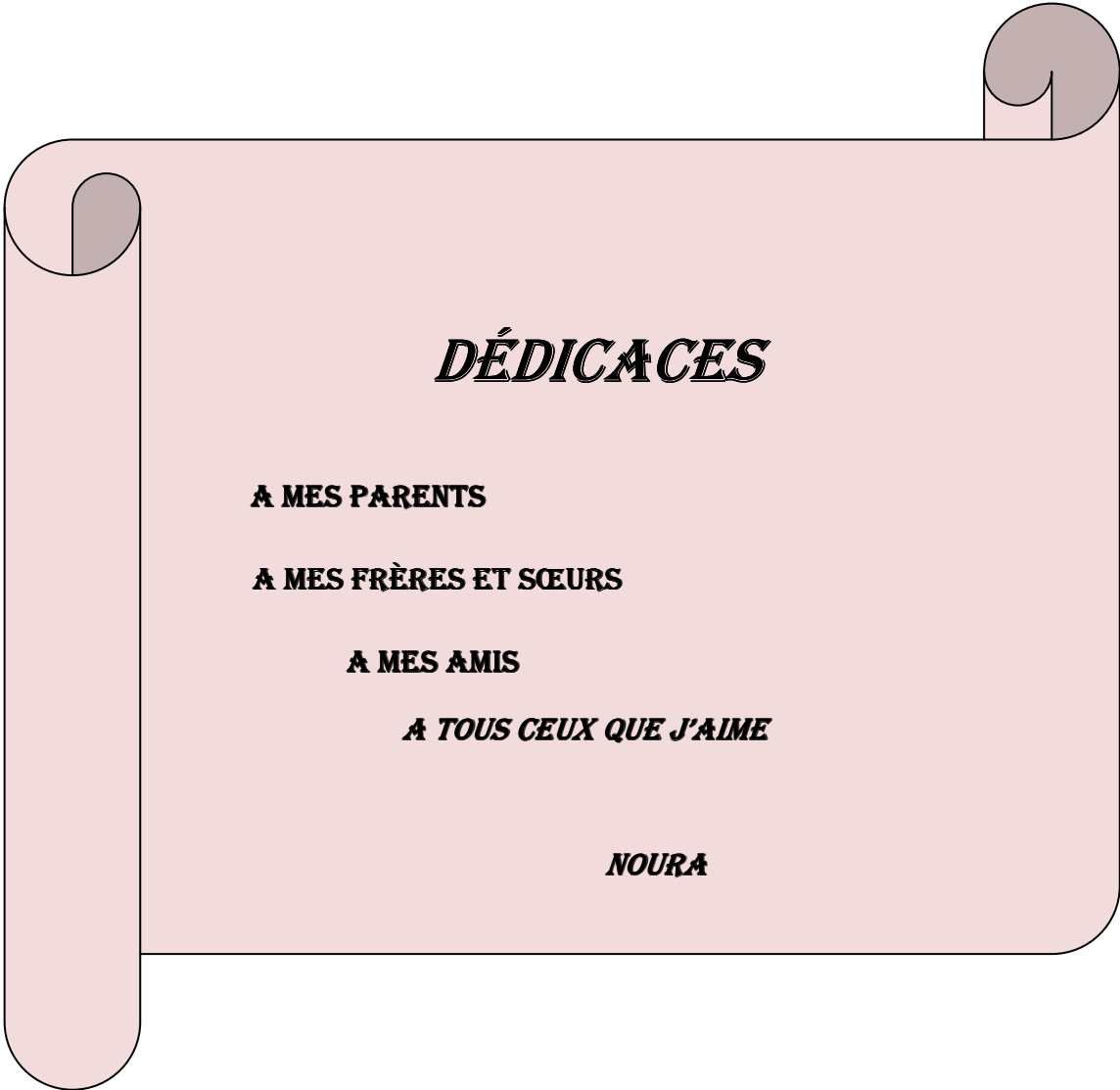
MES CHÈRES AMIES (AMEL, KAHINA, SARAH ET SIHAM)

MON CHER AMI HILAL

MES PETITS POUSSINS : LOTFI, IMAD, SAID ET KENZA

NOURA ET SA FAMILLE.

KARIMA

A pink scroll-shaped background with a dark pink border. The scroll is unrolled in the center, with the top and bottom edges curling upwards. The text is centered on the unrolled portion.

DÉDICACES

A MES PARENTS

A MES FRÈRES ET SŒURS

A MES AMIS

A TOUS CEUX QUE J'AIME

NOURA

Liste des figures

Figure 01 : Symptômes de Bayoud sur des pieds de palmier dattier (Lepoivre, 2007).....	5
Figure 02: Jaunissement et flétrissement du au <i>Fusarium oxysporum lycopersici</i> sur les feuilles et la tige de la tomate (Anonyme, 2013).....	8
Figure 03 : Symptômes de <i>Fusarium graminearum</i> sur les grains et les épis de blé (Arvalis, 2013).....	10
Figure 04 : Marché mondial des biopesticides microbiens en 2005 (Thakore, 2006).....	15
Figure 05: Photo de genre <i>Pseudomonas</i> (Anonyme, 2014).....	17
Figure 06 : Prélèvement des disques mycéliens (Originale, 2015).....	36
Figure 07: Méthodes d'ensemencement des souches A: méthode des spots; B méthodes des traits.....	36
Figure 08: Souches bactériennes isolées de la rhizosphère de cèdre (Originale, 2015).....	38
Figure 09 : Aspect des souches bactériennes A8 et CH3 observée à l'œil nu (Originale, 2015).....	39
Figure 10 : Production de pigment fluorescent par les souches A8 et CH3 (Originale, 2015).....	40
Figure 11 : La galerie biochimique classique réalisées pour les souches A8 et CH3 (Originale, 2015).....	42
Figure 12 : Hydrolyse d'esculine par la souche CH3 (Originale, 2015).	42
Figure 13 : Hydrolyse d'esculine par la souche CH3 (Originale, 2015).	42
Figure 14: Test de catalase positive des souches CH3 et A8 (Original, 2015).	42
Figure 15 : Isolats fongiques sur milieu PDA (Foa, Fol et Fog) (Originale, 2015).....	44

Figure 16 : Les isolats fongiques Fog, Fol et Foa témoinsensemencés sur les milieux KB et PDA (Originale, 2015).....	45
Figure 17: Activité antagoniste des souches A8, CH3 vis-à-vis des trois champignons Foa, Fog et Fol sur le milieu King B (Originale, 2015).....	45
Figure 18 : Taux d'inhibition d'A 8 et CH3 dans le milieu King B par la méthode des traits.....	48
Figure 19 : Taux d'inhibition de A8 et CH3 dans le milieu King B par la méthode des spots.....	49
Figure 20 : Taux d'inhibition de A8 et CH3 sur le milieu King B obtenu par la méthode des traits.....	50
Figure 21 : Taux d'inhibition de A8 et CH3 sur le milieu PDA par la méthode des spots.....	51

Liste des tableaux

Tableau I: Rhizobactéries induisant l'ISR dans divers pathosystèmes (Ongena et Thonart, 2006).....	20
Tableau II: Origine des souches bactériennes utilisées.....	29
Tableau III : Origines des isolats fongiques utilisés dans le test d'antagonisme.....	34
Tableau IV: Caractéristiques biochimiques des souches A8 et CH3.....	42
Tableau V: Taux d'inhibition (%) des souches bactériennes CH3et A8 contre les champignons Foa, Fog et Fol dans le milieu PDA et King B par la méthode des traits et spots.....	49
Tableau VI : Taux d'inhibition sur le milieu PDA.....	47
Tableau X: Analyse de variance pour l'activité antagoniste en fonction des trois facteurs : souches bactériennes, méthode et isolats fongiques.....	51

Sommaire

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

Chapitre I: Aperçu bibliographique sur les Fusarioses vasculaires

Introduction	03
1. Fusariose vasculaire de palmier dattier <i>Fusarium oxysporum spp albidinis</i>	03
1.1. Généralités sur l'agent causal	04
1.2. Symptômes de la maladie	04
1.3. Dissémination	05
1.4. Méthode de lutte	06
2. Fusariose vasculaire de la tomate.....	06
2.1. Généralités sur l'agent causal.....	07
2.2. Symptômes de la maladie.....	07
2.3. Dissémination.....	08
2.4. Méthode de lutte.....	08
3. Fusariose vasculaire du blé	09
3.1. Généralités sur l'agent causal.....	09
3.2. Symptômes de la maladie.....	10
3.3. Dissémination.....	11
3.4. Méthode de lutte.....	11

Chapitre II : Aperçu bibliographique sur la lutte biologique

Introduction	12
1. Définition.....	12
2. Les biopesticides	12
2-1-Avantages des biopesticides	13
2.2. Les différentes catégories des biopesticides	13
2.2.1. Biopesticides végétaux.....	14

2.2.2..Biopesticides Animaux	14
2.1.3. Biopesticides microbiens.....	14
2.3. Marché des biopesticides.....	14
3. Importance des PGPR en lutte biologique.....	15

Chapitre III : Aperçu bibliographique sur les *Pseudomonas*

1. Caractéristiques	16
2. Effets bénéfiques	18
2.1. Effet direct	18
2.1.1. Stimulation de croissance végétale	18
2.1.2. Induction de la résistance des plantes.....	19
2.2. Effet indirect	23
2.2.1. Compétition pour l’espace et les nutriments.....	23
2.2.2. Antibiose.....	23
2.2.3. Modification de l’équilibre microbien.....	24
3. Mécanisme d’action.....	24
3.1. Production des Sidérophores.....	24
3.2. Production des antibiotiques.....	25
3.3. Production des HCN.....	26

Chapitre IV : Matériel et méthodes

Introduction.....	27
1. Isolement des souches des <i>Pseudomonas spp fluorescents</i>	27
1.1. Prélèvement d’échantillons.....	27
1.2. Isolement et purification des souches bactériennes	27
1.3. Identification phénotypique des isolats.....	27
1.3.1. Caractérisation morphologique.....	28
1.3.1.1. Production de pigment fluorescent.....	28
1.3.1.2. Coloration de Gram.....	28
2. L’antagonisme Bactérien <i>in vitro</i>	29
2.1. Souches bactériennes.....	29

2.1.1. Purification des souches bactériennes	29
2.1. 2. Caractérisation des souches bactériennes.....	30
2.1.2.1. Caractérisation morphologique.....	30
2.1.2.1. Production de pigment fluorescent.....	30
2.1.2.2. Test de Gram.....	30
2.1.2.2. Etude biochimique	30
2.2. Isolats cryptogamiques.....	34
2.2.1. Purification des isolats fongiques	34
2.3. Activité antifongique.....	34
2.4. Les analyses statistiques.....	34

Chapitre V : Résultat et Discussion

1. Résultats.....	37
1.1. Isolement des souches bactériennes	38
1.2. Activité antagoniste <i>in vitro</i>	39
1.3. Effet de milieu de culture sur l'activité antifongique.....	46
1.4. Analyses statistiques	51
2. Discussion	55
Conclusion.....	59
Références bibliographiques.....	61

Annexes

Les plantes constituent la majorité des ressources énergétique dont dépendent les hommes et les animaux. Malheureusement, lorsqu'une plante est atteinte d'une maladie, sa croissance, sa fertilité et sa productivité sont affectées, des symptômes se développent, tout ou une partie de l'organisme peut mourir. Les agents responsables des maladies des plantes sont très similaires à ceux rencontrés chez l'homme et les animaux, ils peuvent être biologiques ou physiques (Beniziri et *al.*, 2011).

En agriculture, les maladies fongiques sont l'une des contraintes les plus importantes pour la production. Parmi ces maladies, les trachéomycoses et particulièrement les fusarioses vasculaires qui provoquent généralement un flétrissement des organes en entraînant un dépérissement progressif conduisant à la mort des plantes (Messiaen et *al.*, 1990). Les dégâts provoqués par ces maladies sont importants et peuvent engendrer des pertes appréciables.

Les fusarioses vasculaires sont provoquées par le champignon *Fusarium oxysporum* présent dans de nombreux sols et occupent 40% à 70% de la flore fusarienne tellurique. Il y a un niveau de spécificité élevé entre la plante hôte susceptible et les souches pathogènes de *Fusarium oxysporum*. Parmi les fusarioses vasculaires les plus redoutables, celles affectant la tomate, le blé et le palmier dattier. La fusariose vasculaire de la tomate causée par *Fusarium oxysporum lycopersici* se caractérise particulièrement par des flétrissements unilatéraux et /ou généralisés conduisant à l'obstruction des systèmes vasculaires et la mortalité des plantes atteints. La fusariose du blé, causé par *Fusarium oxysporum graminearum* affecte les rendements et déprécie la qualité du grain et le rend impropre à la consommation humaine et animale, suite à la production des mycotoxines par ce champignon. La fusariose du palmier dattier, est une trachéomycose qui continue à sévir dans les palmerais algériennes provoquant la disparition de milliers de palmiers chaque année.

Pour dispenser les attaques de ces agents pathogènes, les agriculteurs font appel à l'application abusive des pesticides. Ces produits chimiques sont considérés comme l'arme la plus efficace pour faire face à ces problèmes, mais ces substances ont des conséquences néfastes sur l'environnement, le déséquilibre écologique et l'apparition des mécanismes de résistance chez le pathogène (Thakore, 2006).

Vu les inconvénients de la lutte chimique, le recours à la protection biologique constitue une des solutions alternatives qui permettra de lutter contre les agents phytopathogènes, tout en diminuant l'emploi des produits chimiques.

La lutte biologique par introduction des microorganismes antagonistes s'avère une voie très prometteuse dans le contrôle de plusieurs maladies de plantes d'origine tellurique (Bouzerda *et al.*, 2003 ; Mercado-Blanco *et al.*, 2004 ; Boudyach, 2004 ; Taqarort *et al.*, 2008 ; Abo-Elyousr *et al.*, 2009 ; Liu *et al.*, 2009; Gandhi et Saravanakumar, 2009 ; Validov *et al.*, 2005, 2007 et 2009 ; Amkraz *et al.*, 2010 ; Anitha et Andrés, 2011 ; Talibi *et al.*, 2011).

Les PGPR (Plant Growth Promoting Rhizobacteria) constituent les bactéries rhizosphériques les plus utilisés en lutte biologique. Ce groupe possède des propriétés intéressantes, en assurant une protection relative des systèmes racinaires contre de nombreux pathogènes telluriques, tout en stimulant la promotion de la croissance de la plante (Suslow et Schroth, 1982).

Parmi ces PGPR, les *Pseudomonas spp fluorescents* font l'objet d'une attention particulière. Leur utilisation dans l'agriculture en tant que biofertilisants offre un bon rendement, même dans des conditions sévères (Ali *et al.*, 2009). Elles sont connues comme promotrices de la nutrition et la croissance des plantes par la solubilisation des minéraux, comme le phosphore ou par la production de sidérophores. Elles peuvent modifier la morphologie et la physiologie racinaire par la production de régulateurs de croissance comme les auxines. Elles peuvent également augmenter le niveau de résistance des plantes aux maladies diverses, grâce à leur activité antagoniste vis-à-vis de pathogènes (Ongena *et al.*, 2000 ; Van der Heijden *et al.*, 2009).

L'objectif de notre travail, consiste à effectuer une sélection de nouvelles souches de *Pseudomonas spp fluorescents* en réalisant des isolements à partir de la rhizosphère du cèdre de la région de Blida.

Egalement, à partir d'un matériel biologique étudié précédemment (Kaci-Moussa et Zarrouki, 2013), des essais *in vitro* sur l'évaluation de leurs potentialités antagonistes ont été réalisés vis-à-vis de trois isolats fongiques *Fusarium oxysporum albedinis*, *Fusarium oxysporum lycopersici* et *Fusarium oxysporum graminearum*.

Ce document est scindé en six chapitres structurés comme suit: les chapitres I, II et III rappellent une synthèse bibliographique sur les agents causals de la maladie de la fusariose de la tomate, du blé et palmier dattier, suivis par la lutte biologique et des généralités sur les *Pseudomonas spp fluorescents*. Le quatrième chapitre présentera le matériel utilisé et les méthodes retenues, le cinquième chapitre sera consacré à la présentation et l'analyse des résultats, le dernier chapitre discutera les résultats obtenus. Ce présent travail sera clos par une conclusion générale, suivi de quelques perspectives de recherche.

Chapitre I

Généralités sur les fusarioses vasculaires

La fusariose vasculaire est l'une des maladies d'origine tellurique les plus répandues, dont les incidences sur les cultures sont très graves (Nelson et al 1983). C'est une trachéomycose provoquée par un champignon imparfait, *Fusarium oxysporum* appartenant au genre *Fusarium* et qui tire son nom du latin *fusum* car ses spores sont en forme de fusus. *Fusarium oxysporum* se distingue des autres espèces de *Fusarium* par la production abondante de microconidies, rassemblées en fausse tête à partir de monophialides courtes (Katans, 1995).

La fusariose vasculaire sévit dans plusieurs pays répartis sur tous les continents et mêmes dans les régions où les conditions climatiques sont rudes, comme les déserts (Katans, 1995) ou les régions tempérées froides (Nelson et al, 1983).

De nombreuses formes spéciales de *Fusarium oxysporum* attaquent un grand nombre de plantes (Agrioss, 2005), spécifiquement des cultures vivrières (bananier, concombre, lentille, melon, palmier dattier, pois, tomate, etc) ornementales (œillets, cyclamens, etc) ou industrielles (coton, lin, etc.). Également Henni (1998) a rapporté que dans le bassin méditerranéen, la fusariose vasculaire atteint de nombreuses cultures maraîchères, notamment les Solanacées, les Cucurbitacées, les Palmacées et certaines cultures comme le coton.

Les espèces de *Fusarium oxysporum* se caractérisent par une large gamme de plantes hôtes et la plupart des souches pathogènes de *F. oxysporum* envahissent le système vasculaire de ces plantes et présentent une spécificité parasitaire, c'est-à-dire que l'espèce ne peut attaquer qu'un hôte déterminé (Nelson et al., 1983).

En général, ces formes spéciales se transmettent par les semences, le sol, le transport de rejets ou de fragments de plantes infectées, comme dans le cas du palmier dattier par exemple (Djerbi, 1982).

1. Fusariose vasculaire du palmier dattier (Bayoud)

Le palmier dattier (*Phoenix dactylifera* L, 1753) est une monocotylédone pérenne de la famille des Arécacées, adaptée à la vie dans les zones arides à conditions climatiques sévères. Cet arbre est d'une importance capitale dans la vie économique et sociale des populations sahariennes (Mezaache, 2012).

Durant les dernières années, la production des dattes a connu une diminution notable due surtout à la maladie de Bayoud causée par un champignon tellurique *Fusarium oxysporum* f.sp. *albedinis*. Cette maladie est la plus destructive et la plus menaçante dans l'Afrique du nord. Elle est répandue surtout au Maroc et dans une grande partie des palmeraies de l'Algérie (Djerbi, 1982).

Le Bayoud fut signalé pour la première fois en Algérie à Béni Ounif en 1898. Il s'est propagé par la suite dans la plupart des palmeraies de l'Ouest algérien et a atteint en 1949, la région de M'Zab (Mezaache, 2012). Plus de 3 millions d'arbres ont été détruits à cause de la maladie de Bayoud, particulièrement dans les régions de Tidikelt, de Touat et du M'Zab (Brochard et Dubost, 1970 ; Dubost, 1972)

1.1. L'agent causal du Bayoud

Le *Fusarium oxysporum* f.sp. *albedinis* (Foa), appartient au phylum des Deutéromycètes (champignons imparfaits). Ces formes imparfaites sont caractérisées par un mycélium septé et des conidies généralement unicellulaires situées sur des conidiospores; elles sont classées dans le groupe des Moniliales (Lepoivre, 2003).

L'hôte principal est le palmier dattier (*Phoenix dactylifera* L), cependant le Foa attaque également le palmier canarien (*Phoenix canariensis*). Ce champignon a été aussi isolé à partir de certaines plantes cultivées sous les arbres du palmier dattier, c'est l'exemple du henné (*Lawsonia inermis*), de la luzerne (*Medicago* sp.) et du trèfle (*Trifolium* sp) (Djerbi et al., 1985). Ces plantes qui sont des porteurs sains, ne montrent pas de symptômes de la maladie mais peuvent la transmettre à des palmiers sensibles (Djerbi et al., 1986).

Ce champignon est très inégalement réparti dans le sol, il a été isolé entre 0 et 30 cm de profondeur dans les sols des palmeraies infectées mais parfois il peut descendre jusqu'à 1 m (Tantaoui, 1989). Concernant les conditions thermiques de culture du Foa, Elle se situe entre 21°C et 27°C et au-delà de 40°C le champignon ne se développe pas (Bounaga, 1975).

1.2. Symptômes

Le premier symptôme externe de la maladie, apparaît sur une ou plusieurs feuilles de la couronne du milieu. La feuille affectée flétrit d'une manière caractéristique, les pennes d'un côté deviennent blanches depuis la base vers le sommet de la feuille, puis depuis le haut vers la base de l'autre côté de la feuille (Messiaen et al., 1993). Ce symptôme est à l'origine du nom de la maladie, bayoud dérivant du mot arabe « abyed » qui veut dire blanc et de la forme

spéciale albedinis du *Fusarium oxysporum* responsable de la maladie, tiré du latin *albus* (blanc)(Figure n°01).

Pendant ce blanchissement, la face dorsale du rachis devient brune, correspondant au passage du mycélium dans les faisceaux vasculaires du rachis. Ensuite, la feuille, ressemblant à une plume mouillée, pend le long du tronc. Ce processus peut prendre quelques jours à plusieurs semaines (Djerbi, 1986).

Le palmier meurt à partir de 6 mois à 2 ans après l'apparition des premiers symptômes, et ceci dépend des cultivars et des conditions de culture (Djerbi, 1982). Les symptômes de la maladie de Bayoud n'ont pas été jusqu'ici signalés dans les fleurs ou les fruits (Koulla et Saaidi, 1985).



Figure n° 01 : Symptômes de Bayoud sur des pieds de palmier dattier (Lepoivre, 2007)

1.3. Dissémination

La propagation de la maladie se fait de différentes manières, par des rejets infectés, par le sol contaminé, par les plantes porteuses du champignon (henné, luzerne, etc.), par les tissus infectés (en particulier des morceaux de rachis infectés) et par l'eau d'irrigation. La maladie peut aussi se transmettre par contact entre les racines infectées et saines (Bouizgarne et *al.* , 2004).

Les mêmes auteurs rajoutent que l'ampleur de propagation de la maladie varie selon les conditions culturelles (irrigation abondante, fertilisation, etc) et la température.

1-4-Méthode de lutte

La lutte contre la maladie de Bayoud est un défi qui a longtemps préoccupé les agriculteurs des zones du sud. Ils ont tenté, en vain, différentes méthodes traditionnelles allant jusqu'à brûler les arbres infectés. La meilleure solution consiste à protéger les champs sains en empêchant leur contamination par la maladie (Djerbi et *al.*, 1982).

Les techniques culturales et notamment les plantations alternant les cultivars sensibles et résistants sont susceptibles de limiter la progression de la contamination, mais elles ne permettent pas de la stopper (Jeunot, 2005).

L'utilisation des produits chimiques (des fumigants comme le bromure de méthyle ou des pesticides tel que, le Bénomyle) pour lutter contre le Foa dans les champs apparaît contraignante et inefficace car le champignon peut atteindre de grandes profondeurs dans le sol sous forme de chlamydospores s'échappant ainsi au traitement chimique (Djerbi, 1982). Il est à signaler que les fongicides sont des produits coûteux et polluants de l'environnement, et leur application dans les oasis sahariens et les écosystèmes fragiles, risquerait d'avoir des conséquences néfastes sur leur équilibre écologique. (Nash, 1978).

La méthode qui semble efficace et prometteuse est la lutte génétique consistant à sélectionner les variétés résistantes au Bayoud. Cette procédure est malheureusement accompagnée de facteurs génétiques défavorables à la qualité (Louvet et Toutain, 1974; Djerbi et *al.*, 1986).

2.Fusariose vasculaire de la tomate

La tomate *Lycopersicon esculentum* Mill est une plante herbacée appartenant à la famille des Solanacées, elle est généralement cultivée comme plante annuelle et peut atteindre une hauteur de deux mètres (Chaux et Foury, 1994). Elle est l'un des fruits-légumes le plus cultivé au monde pour son utilisation dans de nombreux mets. C'est aussi un produit agricole riche en éléments nutritifs, notamment le lycopène, dont des études épidémiologiques ont montré qu'il pourrait lutter contre l'apparition de certaines maladies dégénératives telles que le cancer de la prostate (Liu et *al.*, 2009).

La culture de la tomate est la plus répandue dans le monde après la pomme de terre (Arbaoui, 1984). En Algérie, elle occupe une place privilégiée dans le secteur maraîcher

(Ferrero, 2009.).La production de la tomate en Algérie est de 7.9 millions de tonnes en 2012 et elle est cultivée sur une surface de 32500 ha (Anonyme1, 2013).

En dépit de son importance, la culture de la tomate souffre de plusieurs problèmes aussi bien sur le plan agronomique que commercial. De point de vue agronomique, les problèmes phytosanitaires occupent la première place (Adam, 2008). De la levée et pratiquement jusqu'à la récolte, les cultures de la tomate sont sujettes à de nombreuses maladies causés par divers agent pathogènes tels que les virus, bactéries, les champignons, les nématodes, et les insectes etc (Causse, 2000).

La tomate est sujette à deux maladies fusariennes; la flétrissure fusarienne classique (*Fusarium wilt*) causée par *Fusarium oxysporum f.sp lycopersici* (Fol). La pourriture des racines et du collet (*Fusarium and root rot*) causée par *Fusarium oxysporum f.sp.radicis-lycopersici* (Katan et al., 1997).

Ces champignons sont capables d'envahir l'ensemble du système vasculaire de la plante, provoquant ainsi son obstruction et par la suite l'affaiblissement de la plante qui finit par mourir (Snissi et al., 2006).

2.1. Agent causal

Le *Fusarium oxysporum lycopersici* (Fol) appartient à l'ordre des Hyphales, il se situe dans le groupe des Deutéromycètes (Agrioss, 2005), la sous-classe des Hyphomycètes et à la famille des Tuberculariacées ; il fait partie de la section Elegans (Messiaen et Cassini, 1968; Booth, 1971; Nelson et al., 1983).

Ce champignon produit trois types de spores asexuelles les microconidies uni ou bicellulaires, seules présentes dans la plante-hôte; Les macroconidies en forme de croissant, comprenant trois à cinq cellules, formées sur des débris de plantes mortes; les chlamydospores, formées à partir de Mycélium ou de macroconidies, représentant les spores de résistance du champignon (Agrioss, 2005).

3.2. Symptômes

Ce champignon provoque un flétrissement rapide (parfois en une journée) des jeunes plantules .Sur les plantes plus âgées, les premiers symptômes visibles sont le flétrissement des feuilles qui se fait progressivement de bas en haut ce qui fait que ceux de la base de la plante sont déjà mortes .Lorsque la plante possède plusieurs branches, le flétrissement se manifeste

d'abord sur une seule branche, souvent sur le côté qui correspond aux racines atteintes. Un jaunissement peut parfois précéder le flétrissement (Amkraz et *al.*, 2010). (Figure n° 02) .

En coupe, la base de la tige montre des vaisseaux bruns à noirâtres (conséquence de l'activité des substances phénoliques) localisés sur un secteur du côté des racines atteintes ou bien répartis sur toute la section (Kraft et *al.*, 1994).



Figure n°02:Jaunissement et flétrissement du au *Fusarium oxysporum lycopersici* sur les feuilles et la tige de la tomate (Anonyme, 2013)

3.3. Dissémination

La dissémination du champignon se fait au niveau du sol par les eaux de ruissellement, le vent ou les éclaboussures ou les importations dans l'exploitation de terreux ou de plants contaminés .Ce champignon semble plus agressif sur des cultures ayant connu un stress abiotique (excès d'eau ou température trop faible) (Agrios, 2005) .

3.4. Méthode de lutte

Plusieurs méthodes de lutte sont préconisées pour faire face à la flétrissure fusarienne; les méthodes culturales consistent à éviter les conditions qui favorisent la maladie soit: un sol léger et acide, un manque d'azote et de calcium, des températures élevées et un manque de lumière en intensité et en temps (Benchabane, 2005).

Barna et *al.* (1983), soulignent l'importance de maintenir une fertilisation azotée élevée surtout sous forme de nitrates (fumier), afin de produire de pousses jeunes. Ces mêmes auteurs rajoutent que la méthode la plus courante est de chauler afin de maintenir le PH entre 6,4 et 7.

Toutefois, Djerbi (1986) annonce qu'une rotation de la récolte de 4 à 5 années diminue la densité de l'inoculum dans le sol mais sans freiner complètement la maladie.

En outre, une méthode de lutte physique a été mise en pratique par Arbaoui (1984), qui consiste à traiter à l'eau chaude de 48-49°C des racines, pendant 30 secondes avant la transplantation au moins de 48 heures.

3. Fusariose vasculaire de blé

Le blé est une plante herbacée annuelle, monocotylédone. C'est la deuxième plante cultivée au monde en termes de quantités (653 millions de tonnes en 2010), derrière le maïs (826 millions de tonnes), et la première en termes d'échanges commerciaux (125 millions de tonnes échangées en 2010) (FAO, 2011).

Les maladies fongiques sont l'une des contraintes les plus importantes pour la production de blé. Parmi ces maladies, on retrouve un cas particulier : la fusariose, qui affecte les rendements mais aussi la qualité sanitaire de la récolte par la présence des toxines dans les grains. Cette maladie endémique est provoquée par un complexe d'espèces de champignons phytopathogènes, le « complexe fusarien » à large spectre d'hôtes (Leplat, 2012).

La fusariose de l'épi a été décrite pour la première fois par W.G. Smith en 1884 et nommée « gale du blé » (wheat scab), terme modifié en 1920 par Atanasoff en « maladie de *Fusarium* », « *Fusarium* blight », puis « fusariose » par Douin en 1926 (Leonard et Bushnell, 2003).

L'espèce principale responsable de la fusariose des épis est incluse dans le genre *Fusarium* présenté précédemment, c'est *F. graminearum* (Pereyra et *al.*, 2004 ; Xu et Gross, 2009).

3.1. Agent causal

Le *Fusarium graminearum* Schwabe est l'agent principal responsable de la fusariose du blé, mais environ une vingtaine d'espèces appartenant au genre *Fusarium* et une appartenant au genre *Microdochium* peuvent être impliquées dans le complexe provoquant cette maladie (Ueno, 1977).

Les dégâts causés par *Fusarium graminearum* sur le plan économique, agronomique et sa répercussion sur la santé publique ont une incidence à l'échelle planétaire (Tanaka et *al.*,

1988) . Sa survie sur les résidus peut atteindre plus de 2 ans après récolte ce qui les classe en « source à long terme ». Lorsque les résidus restent en surface, la survie de l'inoculum est plus longue (Pereyra, 2004).

Le *Fusarium graminearum* produit de nombreuses mycotoxines, dont les trichothécènes, qui déprécient la qualité du grain le rendent même impropre à la consommation humaine ou animale (Ueno, 1977).

Ce champignon peut se comporter comme saprophyte sur des déchets végétaux. Il peut également provoquer diverses pathologies sur d'autre céréales (orge, maïs, riz) mais aussi sur d'autres plantes de grande culture comme le soja ou encore le coton (Desjardins, 2003).

4.2. Symptômes

La fusariose des céréales se manifeste à différentes étapes de la croissance des végétaux. Pour le blé, un brunissement du col de l'épi peut apparaître dès l'épiaison, avec parfois progression des symptômes sur le rachis en cours de remplissage des grains. (Leonard et Bushnell, 2003).

Les symptômes observés sur ces grains sont très divers. Lorsque l'attaque a lieu avant la formation des grains, ceux-ci seront très atteints voir absents (Bai et Shaner, 1994), ils sont plus petits et présentent une coloration blanche ou rose, correspondant au développement mycélien avec un aspect rugueux, ridé, galeux et sont souvent liés à de fortes concentrations en toxines ; des taches noires sont également remarquables autour de l'embryon (Christ *et al.*, 2011). Lorsque l'attaque est tardive, les grains ont un volume normal mais sont susceptibles de contenir des toxines (Desjardins, 2003). A partir de cela, le stade de développement du grain apparait clairement important dans l'impact de la maladie sur la récolte (Jeunot, 2005)(Figure n°03).



Figure n° 03 : Symptômes de *Fusarium graminearum* sur les grains et les épis de blé (Arvalis, 2013)

4.3. Dissémination

L'étude bibliographique montre l'importance des résidus de culture dans la survie de *F. graminearum*, ainsi que dans l'apparition de la maladie sur les épis. D'après Leplat (2012), la survie, la production et la dissémination de l'inoculum sont en outre fortement dépendantes des conditions pédoclimatiques.

Cependant lorsque les ascospores sont entraînées par le vent, elles peuvent être dispersées sur de plus longues distances. Un élément contaminant peut être détecté à plusieurs kilomètres de distance de sa source de production (Desjardins, 2003).

Les agents contaminants peuvent également être dispersés par les insectes. Ces derniers constituent une source de dissémination qui peut être très importante, surtout dans les pays chauds. Plusieurs types d'insectes attaquent la plante et prédisposent celle-ci à une infection par des champignons avant que l'épi ne se forme. C'est le cas des pucerons et des asticots (Leonard et Bushnell, 2003).

D'une manière générale, les ascospores semblent être les éléments contaminants les plus prolifiques dans la fusariose des épis, ce qui explique que les *Fusarium graminearum*, dont la forme sexuée est connue, soient les plus virulents dans la fusariose des épis (Christ et *al.*, 2011).

3.4. Méthodes de lutte

En raison de la présence des spores infectieuses de *F. graminearum* dans des déchets végétaux au niveau des champs, il convient donc de ne pas les réutiliser pour fumer les cultures (Miller, 2002)

Par ailleurs, Leplat (2012), annonce qu'au niveau du semis, il est recommandé de semer le blé dans un sol bien travaillé. Idéalement le sol doit favoriser une germination et une levée rapide. De cette manière la jeune plante peut être plus robuste pour faire face à une infection.

La lutte chimique contre les agents pathogènes du genre *Fusarium* rencontre un succès très mitigé. De même, on suppose que l'emploi d'herbicides permet de diminuer la charge d'inoculum présent sur les adventices et transmissible au blé. Une irrigation excessive accroît la sévérité de la fusariose de l'épi du blé (Tech, 1987),

Chapitre II

Lutte biologique

Introduction

La lutte contre les ravageurs en agriculture biologique est basée avant tout sur une compréhension approfondie et une gestion intelligente du système agricole pour que les espèces nuisibles aient de la difficulté à trouver leurs hôtes et à s'y installer et que les auxiliaires soient en nombre suffisant, pour maintenir la pression phytosanitaire en dessous d'un seuil économique critique. Pour ce faire, la phytoprotection en Agriculture biologique est basée sur deux fondements: la biodiversité et la prévention (Thakore, 2006).

L'agriculture biologique, de cette manière, dispose en théorie d'une gamme de technologies plutôt modernes pouvant remplacer le recours à des produits de synthèse pour lutter contre les ennemis des cultures, comme des variétés résistantes aux maladies et l'utilisation d'antagonistes dans la lutte contre les ravageurs et les maladies (Adam, 2008).

1. Définition de la lutte biologique

Le terme "lutte biologique" recouvre différents concepts selon les disciplines impliquées dans la protection des cultures (Nordlund, 1996).

Le même auteur signale qu'il existe de nombreuses définitions de la lutte biologique mais nous nous en tiendrons à une définition générale, telle que celle proposée par Van « La lutte biologique est un processus agissant au niveau des populations et par lequel la densité de population d'une espèce est abaissée par l'effet d'une autre espèce qui agit par prédation, parasitisme, pathogénéicité ou compétition ».

Elle est donc l'utilisation d'organismes vivants dans le but de limiter la pullulation et/ou la nocivité des divers ennemis des cultures « rongeurs, insectes, nématodes, maladies des plantes et mauvaises herbes » (Philippe et *al.*, 2013; Jeunot, 2005).

Plusieurs avantages ont été contribués dans la lutte biologique. Du point de vue environnemental, elle permet l'amélioration de la qualité de vie et de la santé des travailleurs agricoles, donc diminution des risques de contamination des produits (pas de résidus chimiques), ainsi que le maintien de la biodiversité des biotopes. Elle diminue les risques de pollution grâce à la dégradation rapide des biopesticides.

2. Les Biopesticides

Les biopesticides ou agents de lutte biologique peuvent être définis comme des produits phytosanitaires dont le principe actif est un organisme vivant ou l'un de ses dérivés. Ils peuvent donc être constitués d'organismes (plantes, insectes, nématodes) ou de micro-

organismes (bactéries, levures, champignons, virus) exerçant une activité protectrice sur les plantes vis-à-vis d'agents phytopathogènes, mais aussi de substances d'origine naturelle telles que des extraits végétaux, phéromones, etc (Thakore, 2006).

2-1-Avantages des biopesticides

Les biopesticides offrent de nombreux avantages .Leur nature permet l'utilisation aussi bien en agriculture biologique, qu'en agriculture conventionnelle.

Ils sont souvent efficaces en faibles quantités et leurs activités protectrices peuvent relever de mécanismes multiples et déclenchent donc, rarement des phénomènes de résistance chez le pathogène à cause d'une faible pression de sélection. En outre, ils peuvent compléter les pesticides conventionnels une fois utilisés dans les programmes intégrés de la gestion des parasites (Fravel, 2005; Thakore, 2006). Par exemple, l'intégration du contrôle biologique avec des fongicides, les pratiques culturales, et d'autres mesures peuvent contribuer au contrôle de la rouille sur la tomate (Lourenco Junior et *al.*, 2006).

Les biopesticides peuvent donc être complémentaires au traitement chimique, mais peuvent aussi être utilisés dans des situations pour lesquelles aucune solution de contrôle utilisant des produits de synthèse, n'est actuellement disponible (Ji et *al.*, 2006; Lee et *al.*, 2006; Saravanakumar et *al.*, 2007).

Ces produits ont été développés pour contrôler de multiples maladies sur divers céréales, légumes, fruits et fleurs (Paulitz et Bélanger, 2001; Fravel, 2005); il a été récemment mis en évidence que certains micro-organismes endophytes et/ou certaines rhizobactéries favorisant la croissance des plantes (Plant Growth Promoting Rhizobacteria ou PGPR) peuvent conférer à certaines cultures une tolérance aux stress abiotiques comme la sécheresse (Compant et *al.*, 2010 Wang et *al.*,2012).

2.2. Les différentes catégories de biopesticides

Les produits considérés comme des biopesticides par les agences de réglementation européennes et mondiales sont d'origines diverses. Ils peuvent être classés en trois grandes catégories, selon leur nature : les biopesticides végétaux, les biopesticides animaux et les biopesticides microbiens (Leong et *al.*, 1986).

2.2.1. Biopesticides végétaux

Les plantes produisent des substances actives ayant des propriétés insecticides, aseptiques ou encore régulatrices de la croissance des plantes et des insectes.

Le biopesticide d'origine végétale le plus utilisé est l'huile de neem, un insecticide extrait des graines d'*Azadirachta indica* (Schmutterer, 1990).

2.2.2. Biopesticides animaux

Les biopesticides d'origine animale sont des prédateurs, des parasites, ou des molécules dérivées d'animaux, souvent d'invertébrés comme les venins d'araignées, des scorpions, des hormones d'insectes, des phéromones (Thakore, 2006). Par exemple, les coccinelles (insecte auxiliaire le plus connu) ou les acariens qui utilisent la prédation pour se nourrir de certains insectes ravageurs des plantes.

2.2.3. Biopesticides microbiens

Les biopesticides microbiens comprennent les bactéries, champignons, oomycètes, virus et protozoaires. L'efficacité d'un nombre important d'entre eux repose sur des substances actives dérivées des micro-organismes. Ce sont en principe ces substances actives qui agissent contre le bio-agresseur, plutôt que le micro-organisme lui-même (Philippe et al., 2013).

Certains biopesticides microbiens présentent des bénéfices supplémentaires à leur rôle de protection. Les champignons du genre *Trichoderma* ont la particularité de faciliter l'absorption d'éléments nutritifs du sol par les plantes (Harman et al., 2004).

L'utilisation des bactéries pour l'amélioration du rendement et la protection des cultures a été initiée depuis le début du siècle dernier. Dès le milieu des années 60, plusieurs applications expérimentales ont été rapportées (Well, 1988).

3. Marché des biopesticides

L'utilisation des biopesticides a longtemps été cantonnée à l'agriculture biologique. Selon Fravel (2005), le marché mondial des pesticides était évalué en 1995 à environ \$29 milliards USD dont \$388 millions pour les biopesticides.

Au cours des dernières années, le marché des pesticides synthétiques avait diminué grâce au développement des biopesticides et des récoltes génétiquement modifiées. Les biopesticides représentent 2.5% (672 millions \$ en 2005) des ventes de produits phytosanitaires (26 milliards \$), alors qu'il était seulement de 0.2% en 2000 (Thakore, 2006).

Les fournisseurs des biopesticides sont principalement des petites et moyennes entreprises qui ont des difficultés compréhensibles à développer de nouveaux produits et à commercialiser pleinement ceux déjà existants (Farm Chemical International, 2010).

La majorité des biopesticides commercialisés est d'origine microbienne (Rosas-Garcia, 2009). Parmi les biopesticides microbiens, les produits à base de bactéries, ils représentent 74% du marché mondial (Figure n° 04) (Fravel, 2005). *Bacillus thuringiensis* est considérée comme la bactérie la plus importante et la plus largement répandue, elle domine le marché des biopesticides microbiens (70%) (Thakore, 2006).

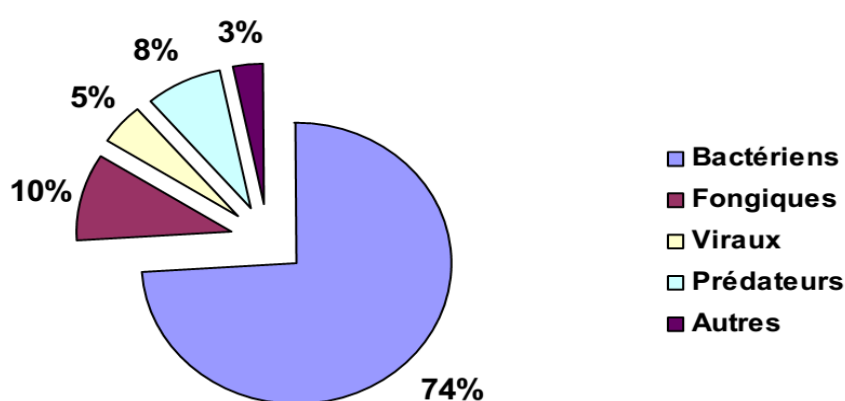


Figure n° 04 : Marché mondial des biopesticides microbiens en 2005
(Thakore, 2006)

4. Importance des PGPR en lutte biologique

Dans le sol, l'activité microbienne est intense en particulier dans la zone sous l'influence des racines, la rhizosphère, qui contient plus d'un million de microorganismes par gramme de sol.

Les micro-organismes trouvent en effet dans ce milieu des substrats énergétiques libérés par les racines et nécessaires à leur métabolisme : sucres, acides aminés, acides organiques, hormones.

Certains de ces micro-organismes, principalement des bactéries, sont capables de coloniser efficacement les systèmes racinaires et influencent de manière bénéfique la plante en stimulant sa croissance et/ou en la protégeant contre des infections par des agents phytopathogènes. Ces bactéries de la rhizosphère sont alors reprises sous le terme PGPR (Plant Growth-Promoting Rhizobacteria) synonyme de Rhizobactérie promotrice de la

croissance végétale. Plusieurs auteurs ont montré l'importance de l'activité antibiotique des PGPR dans la limitation de la gravité des maladies d'origine telluriques (Phillipe *et al.*, 2013). la réduction de la maladie peut être associée à une colonisation importante des racines par les bactéries bénéfiques, ce qui réduit le nombre de sites habitables pour les micro-organismes pathogènes et par conséquent, leur croissance (Reyes *et al.*, 2004).

La plupart des souches bactériennes exploitées comme biopesticides appartiennent aux genres *Agrobacterium*, *Bacillus* et *Pseudomonas* (Haas et Defago, 2005). Ils ont la capacité de produire de nombreux antibiotiques, et ils sont faciles à cultiver *in vitro* ou à manipuler en laboratoire. De plus, les bacilles offrent un avantage par rapport aux autres bactéries en raison de leur capacité à former des endospores résistantes au changement des conditions du milieu avantage aussi pour la formulation du produit (Raaijmakers *et al.*, 2002).

Différentes espèces de *Pseudomonas* spp. fluorescents ont été rapportées à la fois comme PGPR (Plant Growth Promoting Rhizobactéria) et comme souches de biocontrôle des champignons phytopathogènes (de Salmone *et al.*, 2001), grâce à ces caractéristiques intrinsèques qui les rendent particulièrement intéressantes pour une utilisation comme agents de lutte biologique.

Chapitre III

Généralités sur les Pseudomonas

1. Caractéristiques

Parmi les rhizobactéries non symbiotiques, les *Pseudomonas spp fluorescents* font l'objet d'une attention particulière. Découvert et classé en 1894 par Migula comme suit;

Règne: *Bactéria*

Division: *Proteobacteria*

Ordre: *Pseudomonales*

Famille: *Pseudomonaceae*

Genre: *Pseudomonas*

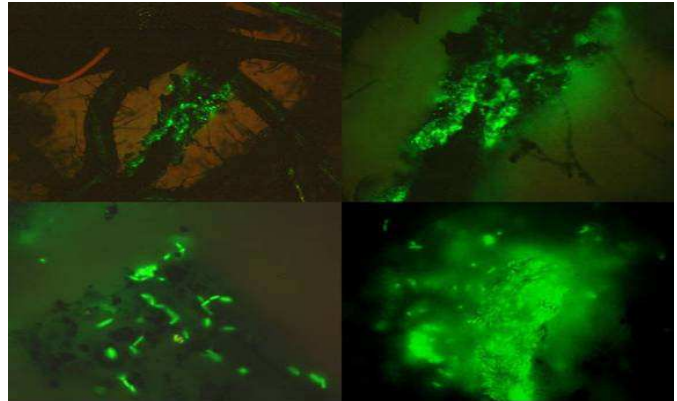


Figure n°05: Photo de genre *Pseudomonas* (Anonyme, 2013)

Les différentes espèces de *Pseudomonas* sont divisées en cinq groupes selon leur ARNr. Les espèces de groupe *Pseudomonas spp fluorescents*, sont certainement les plus étudiées. Les espèces appartiennent à ce groupe sont, *Pseudomonas aeruginosa* espèce pathogène pour l'homme, *P. syringae*, espèce phytopathogène et *P. fluorescens*, *P. putida*, et *P. chlororaphis* (= *Pseudomonas aerufaciens*) rassemblent des espèces saprophytes (Höfte et Altier, 2010).

Les *Pseudomonas fluorescens* sont des bacilles Gram négatifs typiques à de 0,5 à 1 mm de diamètre sur 1,5 à 5mm de long, chimio-hétérotrophes mobiles avec un flagelle polaire et sont regroupés au sein d'un même groupe d'homologie asporulées (Bell Perkins et Lynch, 2002) et elles apparaissent dans la plupart du temps isolés ou en diplobacille (Bossis et *al.*, 2000). Ce sont des aérobies obligatoires, à l'exception de certaines qui peuvent utiliser le NO comme accepteur d'électrons.

Les *Pseudomonas spp. fluorescents* forment un groupe diversifié de bactéries qui peuvent généralement être distinguées visuellement des autres *Pseudomonas* par leur aptitude à produire de pigments jaune vert solubles dans l'eau qui sont les pyoverdines (sidérophore) produites dans des milieux pauvres en fer (Palleroni et Migula., 1984).

Les mêmes auteurs signalent que Les sidérophores sont sécrétés dans le milieu externe pour chélater et piéger le fer et le ramener à l'intérieure de la cellule.

Un nombre important d'espèces de plantes peut assimiler les complexes Fe^{3+} -sidérophores bactériens (Loper, 1988; Bitter et al., 1991).

Ces bactéries ont la capacité de dégrader des composés complexes tels que les protéines et les polysaccharides complexes comme l'amidon, et la cellulose (Palleroni et Mulagi, 1984). De nombreux isolats de *Pseudomonas fluorescens* et *Pseudomonas putida* ont été cités comme souches capables de dégrader des molécules aromatiques plus ou moins complexes (Campbell et al., 1995; Latour et al., 1996).

Les *Pseudomonas spp. fluorescens* saprophytes sont les habitants types des sols agricoles et la rhizosphère des plantes, elles sont impliquées dans de nombreuses interactions avec les plantes. Dans certains cas, elles représentent plus de 60% de la microflore bactérienne totale du sol (Digat et Gardan, 1987).

Les *Pseudomonas spp. fluorescens* sont connues pour leur aptitude d'adhésion aux particules du sol et au rhizoplane (Weger et al., 1994), produisent des antibiotiques (Garbaye, 1994 ; Natsch et al., 1994), et des enzymes hydrolytiques (Lim et al., 1991; Neilsen et al., 1998).

Elles ont une grande capacité à coloniser les racines et à y maintenir une forte densité de population remarquable. Cette grande rhizocompétence vient de leur taux de croissance plus élevé que celui de la plupart des autres bactéries ; et de leur capacité à utiliser une gamme de substrats très large, souvent issus des exsudats racinaires, comme source d'azote ou de carbone (Haas et Keel, 2003).

Les mêmes auteurs rajoutent qu'en plus, elles sont très faciles à isoler et à cultiver au laboratoire et se prêtent aisément aux manipulations génétiques.

Actuellement les *Pseudomonas spp. fluorescens* font partie d'un groupe bactérien nommé P.G.P.R (Plant Growth Promoting Rhizobactérie synonyme de Rhizobactéries promotrices de la croissance des plantes) et possèdent des propriétés prometteuses dont les actions de biocontrôle des maladies des plantes causées par des agents pathogènes (Wang et al., 2012).

2. Effets bénéfiques

Les *Pseudomonas spp fluorescents* sont des bactéries ubiquistes particulièrement abondantes dans les sols, les eaux et souvent pathogènes des animaux et des végétaux. Elles possèdent plusieurs caractéristiques intrinsèques qui les rendent particulièrement intéressantes pour une utilisation comme agents de lutte biologique, elles sont responsable de la suppression des maladies fongiques dans les cultures (Haas et Keel, 2003) et stimulent la croissance des plantes comme le riz, le blé (Weller et Cook, 1983), la pomme de terre (Kloepper et al., 1980), la canne à sucre (Suslow et Schroth, 1982), le coton (Howell et Stipanovic, 1980) et le manioc (Hernandez et al., 1986).

Les *Pseudomonas* sont capables d'induire une résistance systémique contre un pathogène donné, et porte le nom d'ISR (Matiru et Dakora, 2004). Il est également reconnu que des bactéries de la mycorrhizosphère, encore appelées bactéries auxiliaires de la mycorhization, stimulent sélectivement l'établissement de la symbiose ectomycorhizienne (Garbaye, 1994).

Différents mécanismes ont été avancés pour expliquer les effets bénéfiques de *Pseudomonas spp. Fluorescents*. Ces bactéries s'attachent d'abord à la racine et sont donc distribuées de façon passive. Puis elles se multiplient et colonisent de façon active la rhizosphère (Lemanceau, 1992).

Deux catégories d'effets bénéfiques des rhizobactéries sur les plantes peuvent être distinguées (Van der Heijden et al., 2009): (I) les effets directs via les organismes microbiens associés à la racine qui mettent en place des relations mutualistes avec les plantes et (II) les effets indirects via l'action des microorganismes vivant librement dans la rhizosphère qui modifient les taux d'approvisionnement en éléments nutritifs et la répartition des ressources.

2.1. Effets directes

2.1.1 Stimulation de la croissance végétale

Les *Pseudomonas spp. fluorescents* stimulent et améliorent la germination des graines et la levée des plantes particulièrement dans des conditions environnementales défavorables à leur germination (Compant et al., 2005; Haas et Déffago, 2005). Chez plusieurs espèces végétales surtout les espèces herbacées après leur bactérisation, la vitesse de levée a été accru (Digat et al., 1990; Matiru et Dakora, 2004; Sharma et al., 2007; Wang et al., 2012). Ainsi Biswas et al. 2000 ont montré que le taux de germination des graines de colza semées dans un sol froid

et battant, pouvait être significativement augmenté grâce à l'inoculation par certaines souches bactériennes.

Digat *et al.*, (1990) ont montré que certaines souches de *Pseudomonas* peuvent stimuler significativement la germination de graines de tomate même lorsque les conditions d'environnement ne semblent pas être favorables.

La stimulation de la croissance des plantes bactérisées peut être dû à la synthèse microbienne de substance de croissance analogues aux phytohormones (Persello-Cartieaux *et al.*, 2003; Remans *et al.*, 2007).

Il existe cinq catégories des régulateurs de cette croissance végétale : les auxines, les gibbérellines, les cytokinines, l'éthylène et l'acide abscissique (Zahir *et al.*, 2004). L'acide indole-3-acétique est la phytohormone la plus répandue, il joue un rôle très important dans l'élongation des racines et dans la prolifération des poils absorbants (Spaepen *et al.*, 2007).

Il est produit par un grand nombre de bactéries tels *Azospirillum brasilense*, *Pseudomonas*, *Xantomonas*, *Rhizobium*, *Enterobacter cloacae* (Karnwal, 2009) *Aeromonas veronii*, *Alcaligenes piechaudii*, *Rhizobium leguminosarum*, *Bradyrhizobium* spp, *Agrobacterium* spp et *Comamonas* *dovorans* spp (Wang *et al.*, 2002).

Pour les cytokinines et les gibbérellines sont impliquées dans la modification de la morphologie des plantes et dans la stimulation de développement de la partie aérienne (Van Loon, 2007). Ces régulateurs élicitent les réactions de défenses des espèces végétales, de par leur forte affinité pour le fer, elles limitent la croissance saprophyte de certains microorganismes phytopathogènes (Lemanceau *et al.*, 2009).

2.1.2. Induction de la résistance des plantes

Les microorganismes pathogènes sont connus pour leur pouvoir d'induire chez les plantes des mécanismes de défense, par l'intermédiaire de la résistance systémique acquise (SAR) qui protège les plantes contre les attaques ultérieures d'autres pathogènes. Ainsi que certaines bactéries peuvent avoir un effet protecteur en induisant elles aussi des mécanismes de défense des plantes via la résistance systémique induite (ISR: induction systémique résistance), leur permettant de mieux se protéger contre l'attaque éventuelle de pathogènes (Van Loon, 2007).

L'induction de la résistance systémique chez les plantes est un processus leur permettant la stimulation de leurs facultés et aptitudes induisant l'activation et le renforcement des niveaux

de résistance à l'encontre des agressions biotiques et abiotiques. Les rhizobactéries bénéfiques du groupe des *Pseudomonas* spp. fluorescents peuvent induire ce type de réaction en synthétisant dans la rhizosphère quelques métabolites du métabolisme bactérien secondaire.

De nombreux travaux ont rapportés l'implication active des PGPR, particulièrement *Pseudomonas fluorescens*, *Pseudomonas putida* et *Pseudomonas aeruginosa*, dans l'induction systémique de la résistance (ISR) chez divers espèces végétales (Bakker et al., 2007). Pour Andrés et al (2011), l'augmentation de la résistance des plantes de haricot au *Fusarium solani* grâce à l'inoculation d'une souche de *Pseudomonas putida* serait liée à leur plus grande teneur en lignine.

D'autres travaux portant sur des modèles d'étude différents qui ont mis en évidence la plus grande résistance naturelle des plantes bactérisées par certaines souches de *Pseudomonas*. Ainsi, la souche bactérienne CHAO provoque une augmentation du chevelu racinaire et la résistance naturelle au *Thielaviopsis basicola* des plantes de tabac bactérisées (Voisard et al, 1989). Un autre exemple, celui de l'application combinée d'une souche particulière de *Pseudomonas* sur les graines, les racines, le sol et sur les feuilles a augmenté la durabilité de l'ISR chez le riz contre la maladie causée par *Rhizoctonia solani*, Ce phénomène a été aussi occasionnellement observé sur d'autres plantes comme le café, le thé (Saravanakumar et al., 2007).

Tableau I: Rhizobactéries induisant l'ISR dans divers pathosystèmes (Ongena et Thonart, 2006).

genre	souche	Pathosystème (plante hôte/pathogène)	Référence
Gram négatives			
<i>Pseudomonas fluorescens</i>	89-B-61	Tomate/ <i>Phytophthora infestans</i>	(Yan <i>et al.</i> 2002)
		Tomate/cucumber mosaic virus	(Raupach <i>et al.</i> 1996)
		Tabac/ <i>Peronospora tabacina</i>	(Zhang <i>et al.</i> 2002)
		<i>Arabidopsis</i> / <i>Pseudomonas syringae</i>	(Ryu <i>et al.</i> 2003)
		Concombre/ Scarabée du concombre	(Zehnder <i>et al.</i> 2001)
<i>P. fluorescens</i>	63-28	Concombre/ <i>P. aphanidermatum</i>	(Chen 1999; 2000)
<i>P. fluorescens</i>	CHAO	<i>Arabidopsis</i> / <i>Peronospora parasitica</i>	(Iavicoli <i>et al.</i> 2003)
		Tabac/Tobacco necrosis virus	(Maurhofer <i>et al.</i> 1994; 1998)
<i>P. fluorescens</i>	WCS417r	Tomate/ <i>Meloidogyne javanica</i>	(Siddiqui et Shaukat 2003)
		Oeillet/ <i>F. oxysporum</i>	(Van Peer <i>et al.</i> 1991; Van Peer et Schippers 1992)
			(Steijl <i>et al.</i> 1999)
		<i>Arabidopsis</i> / <i>F. oxysporum</i>	(Pieterse <i>et al.</i> 1996)
		<i>Arabidopsis</i> / <i>Pseudomonas syringae</i>	(Van Wees <i>et al.</i> 1997; Pieterse <i>et al.</i> 1998; Ton <i>et al.</i> 2002a)
		Tomate/ <i>Fusarium oxysporum</i>	(Duijff <i>et al.</i> 1997)
		Radis/ <i>Alternaria brassicicola</i>	(Hoffland <i>et al.</i> 1996)
		Radis/ <i>Fusarium oxysporum</i>	(Hoffland <i>et al.</i> 1996; Leeman <i>et al.</i> 1996)
<i>P. fluorescens</i>	WCS374r	Radis/ <i>Pseudomonas syringae</i>	(Hoffland <i>et al.</i> 1996)
		Radis/ <i>F. oxysporum</i>	(Leeman <i>et al.</i> 1995a; 1995b; 1996)
<i>P. fluorescens</i>	C15	<i>Arabidopsis</i> / <i>Pseudomonas syringae</i>	(Hase <i>et al.</i> 2003)
<i>P. fluorescens</i>	S97	Concombre/ <i>aphanidermatum</i>	(Zhou et Paulitz 1994)
<i>P. fluorescens</i>	EP 1	Haricot/ <i>Pseudomonas syringae</i>	(Alstr.m 1991)
<i>P. fluorescens</i>	PF1	Canne à sucre/ <i>Colletotrichum falcatum</i>	(Viswanathan et Samiyappan 2002a; 2002b)
		Riz/ <i>Rhizoctonia solani</i>	(Nandakumar <i>et al.</i> 2001)
		Canne à sucre / <i>Colletotrichum falcatum</i>	(Viswanathan et Samiyappan 2002a; 2002b)
<i>P. fluorescens</i>	7-14	Thé/ <i>Exobasidium vexans</i>	(Saravanakumar <i>et al.</i> 2007)
		Riz/ <i>Magnaporthe grisea</i>	(Krishnamurthy et Gnanamanickam 1998)
<i>P. fluorescens</i>	WR8-3, WR9	Pastèque/ <i>Didymella byroniae</i>	(Lee <i>et al.</i> 2001)
<i>P. fluorescens</i>	A506	Pomme/ <i>Erwinia amylovora</i>	(Momol <i>et al.</i> 1999)
<i>P. fluorescens</i>	sp.	Betterave/ <i>Heterodera schachtii</i>	(Oostendorp et Sikora 1990)
<i>P. fluorescens</i>	sp.	Tomate/ <i>Meloidogyne incognita</i>	(Santhi et Sivakumar 1995)
<i>P. putida</i>	BTP1	Concombre/ <i>P. aphanidermatum</i>	(Ongena <i>et al.</i> 1999; 2000)
		Concombre/ <i>C. lagenarium</i>	(Ongena <i>et al.</i> 2007b)
		Haricot/ <i>Botrytis cinerea</i>	(Ongena <i>et al.</i> 2004; 2005c)

genre	souche	Pathosystème (plante hôte/pathogène)	Référence
<i>P. putida</i>	WCS358	Arabidopsis/ <i>Pseudomonas syringae</i>	(Van Wees <i>et al.</i> 1997; Meziane <i>et al.</i> 2005)
		Arabidopsis/ <i>F. oxysporum</i>	(Van Wees <i>et al.</i> 1997; Meziane <i>et al.</i> 2005)
		Haricot/ <i>Botrytis cinerea</i>	(Meziane <i>et al.</i> 2005)
		Tomate/ <i>Botrytis cinerea</i>	(Meziane <i>et al.</i> 2005)
	KKM1	Canne à sucre/ <i>Colletotrichum falcatum</i>	(Viswanathan et Samiyappan 2002a; 2002b)
	89-B-27	Concombre/ <i>C. orbiculare</i>	(Wei <i>et al.</i> 1991)
		Concombre / <i>Pseudomonas syringae</i>	(Liu <i>et al.</i> 1995a)
		Concombre / <i>Fusarium oxysporum</i>	(Liu <i>et al.</i> 1995b)
	WR9-16	Pastèque/ <i>Didymella byroniae</i>	(Lee <i>et al.</i> 2001)
	V14i	Riz/ <i>Magnaporthe grisea</i>	(Krishnamurthy et Gnanamanickam 1998)
<i>P. aeruginosa</i>	7NSK2	Haricot/ <i>Botrytis cinerea</i>	(De Meyer et Höfte 1997; De Meyer <i>et al.</i> 1999b)
		Haricot/ <i>C. lindemthianum</i>	(Bigirimana et Höfte 2002)
		Tabac/Tobacco mosaic virus	(De Meyer <i>et al.</i> 1999a)
		Tomate/ <i>Botrytis cinerea</i>	(Audenaert <i>et al.</i> 2002)
		Riz/ <i>Magnaporthe grisea</i>	(De Vleeschauwer <i>et al.</i> 2006)
<i>Serratia marcescens</i>	90-166	Concombre/ <i>Colletotrichum orbiculare</i>	(Press <i>et al.</i> 2001)
		Concombre/ <i>Pseudomonas syringae</i>	(Press <i>et al.</i> 1997)
		Concombre/ <i>Fusarium oxysporum</i>	(Liu <i>et al.</i> 1995b)
		Tabac/ <i>Peronospora tabacina</i>	(Zhang <i>et al.</i> 2002)
		Arabidopsis/ <i>Pseudomonas syringae</i>	(Ryu <i>et al.</i> 2003)
		Concombre/ Scarabée de concombre	(Zehnder <i>et al.</i> 2001)
		Loblolly pine/ <i>Cronartium quercum</i>	(Enebak et Carey 2000)
		Tomate/cucumber mosaic virus	(Raupach <i>et al.</i> 1996)
<i>Serratia plymuthica</i>	RIGC4	Tomate/ <i>Fusarium oxysporum</i>	(Benhamou et Bélanger 1998)
	2-67	Concombre/ <i>C. orbiculare</i>	(Wei <i>et al.</i> 1991)
<i>Pantoea agglomerans</i>	E278Ar	Radis/ <i>Xanthomonas campestris</i>	(Han <i>et al.</i> 2000)
	C9-1	Pomme/ <i>Erwinia amylovora</i>	(Momol <i>et al.</i> 1999)
<i>Kluyvera cryocrescens</i>	IN 114	Tomate/Cucumber mosaic cucumovirus	(Zehnder <i>et al.</i> 2000)
<i>Flavomonas oryzae</i>	INR-5	Concombre/ Scarabée de concombre	(Zehnder <i>et al.</i> 2001)
<i>Rhizobium elti</i>	G12	Pomme de terre/Potato cyst nematode	(Reitz <i>et al.</i> 2002)
<i>Agrobacterium radiobacter</i>	G12	Pomme de terre/Potato cyst nematode	(Hasky-Günther <i>et al.</i> 1998)
Gram-positives			
<i>Bacillus</i> spp.		Radis/ <i>Xanthomonas campestris</i>	(Krause <i>et al.</i> 2003)
		Tomate/cucumber mosaic virus	(Murphy <i>et al.</i> 2003)

2.2. Effets indirects

Kloepper et Schroth (1981) ont été les premiers à mettre en évidence l'effet bénéfique indirect d'une souche de *Pseudomonas fluorescens* sur la croissance des plantes, en effet ces effets bénéfiques des rhizobactéries sont liés à leur position stratégique à l'interface sol – racine.

2.2.1. Compétition pour l'espace et les nutriments

Les interactions microbiennes sont conditionnées par la nature et l'intensité de la compétition entre microorganismes (Lepoivre, 2003). Cette compétition peut s'instaurer pour l'espace et pour les nutriments. Les *Pseudomonas* spp fluorescents antagonistes participent à ces 2 types de compétition.

Le même auteur rajoute que même si le rôle de la compétition pour l'espace ne peut être complètement exclu; la compétition pour les éléments nutritifs entre en jeu lorsqu'il y a simultanément consommation du même composé par plusieurs microorganisme. Dans certains cas, les rhizobactéries(PGPR) à croissance rapide peuvent éliminer les pathogènes fongiques par une compétition pour le carbone et les sources d'énergie (Kamilova *et al.*, 2009).

Les sidérophores de bactéries rhizosphériques peuvent influencer directement l'alimentation de la plante en fer, comme ils peuvent le rendre ainsi non disponible pour les champignons pathogènes (O'sullivan et O'gara, 1992). Ils jouent également le rôle de chélateurs de métaux rhizosphériques ayant une faible disponibilité pour les plantes, tels le Zn et Pb (Lemanceau *et al.*, 1988). Un nombre important d'espèces de plantes peuvent assimiler les complexes Fe^{3+} sidérophore bactériens (Loper, 1988; Bitter *et al.*, 1991).

2.2.2. Antibiose

L'antibiose est le mode d'action le plus étudié chez les agents de protection biologique, Il consiste en une inhibition directe de la croissance du pathogène via la production de métabolites aux propriétés antifongiques et/ou antibiotiques (Défago, 1993 ; Haas et Défago, 2005).

Les souches de *Pseudomonas* produisent une variété de métabolites antifongiques puissante impliquée dans le biocontrôle, par exemple l'acide cyanhydrique (HCN), la viscosamide, la pyrolutérine, le 2,4-diacetylphloroglucinol (DAPG), la pyrrolnitrine, les

phénazines, les butyrolactones, les tensines et les tropolones (Defago, 1993; Haas et Defago 2005).

Certaines souches de PGPR ont la capacité de dégrader les parois cellulaires fongiques à travers la production d'enzymes hydrolytiques tels β -1,3-glucanase, exo- et endo-polygalacturonases, pectinolyases, cellulases et chitinases (Whippes et Lumsden, 2001).

2.2.3. Modification de l'équilibre microbien

La microflore rhizosphérique est naturellement constituée d'un assemblage complexe de microorganismes procaryotes et eucaryotes, dont la croissance, la santé des plantes et leur diversité sont influencées par la diversité des populations des microorganismes présents dans la rhizosphère (Lemanceau, 1992; Whipps, 2001 ; Weller et *al.*, 2002 ; Van der Heijdenet *al.*, 2008)

Parmi cette microflore les *Pseudomonas fluorescents* qui ont une grande compétence rhizosphérique, qui est défini par la capacité d'une souche à se distribuer le long des racines de la plante hôte, à se multiplier et à survivre pendant plusieurs semaines (Weller ., 1988).

3. Mécanismes d'actions

3.1. Production de Sidérophores

Les sidérophores sont des molécules de faible poids moléculaire (Leong, 1986; Weller , 1988) de 500 à 1000 Daltons (Leong 1986) ayant la capacité de fixer les ions Fe^{3+} (Leong, 1986; Weller et *al.*, 1988; O'ssullivan et al, 1990; Smirnov, 1990) avec une très haute affinité (Leong,1986).

Kloeppers et *al.*, (1980) ont été les premiers à démontrer l'importance de la production de sidérophores dans le mécanisme de biocontrôle. La suppression par les sidérophores est plus élevée dans les sols acides (Weller et *al.*, 1988). Si bien que dans les sols alcalins contrairement aux sols acides, la compétition pour le Fer (Fe_3) a été proposée comme un mécanisme de suppression de plusieurs champignons tel que *Fusarium oxysporum* par la production de sidérophores par les *Pseudomonas fluorescents spp* (Elad, 1985 et Baker, Leong, 1986).

Par ailleurs plusieurs études ont montré que la production de sidérophores par les *Pseudomonas spp. fluorescents* bénéfiques est en partie responsable de l'augmentation de la

croissance des plantes. Ils ont une activité bactériostatique contre *Erwinia carotovora* affectant la pomme de terre et réduisant la population fongique sur le rhizoplan de la pomme de terre (Leong, 1986; Weller, 1988).

En effet, tous les sidérophores ne présentent pas la même affinité pour le fer (Fe^{+++}). Ainsi les *Pseudomonas fluorescens* produisent des sidérophores appelés pyoverdine ou pseudobactine qui forment avec le fer (Fe^{+++}) un complexe (ferripyoverdine ou ferripseudobactine), dont la constante de stabilité est égale environ 10 à 32 (Teintze et al., 1981).

Par contre les fusarinines, sidérophores produits par les *Fusarium spp* (Emery, 1965; Lemanceau et al., 1986), forment avec le fer (Fe^{+++}) un complexe dont la constante de stabilité est estimée de 10 à 29 (Scher et Baker, 1982). De ce fait, les *Pseudomonas spp* fluorescents sont plus aptes à mobiliser le fer que les *Fusarium* (Lemanceau et al., 1988).

Il a été signalé que malgré que la production des sidérophores soit un mécanisme important pour l'activité des PGPR, elle est rarement essentielle dans le biocontrôle (Ongena et al., 2000; Meziane et al., 2005). Ainsi qu'un grand nombre de facteurs environnementaux (pH, température et la source de carbone) influence la production des sidérophores (Duffy et Défago, 1993).

3.2. Production des antibiotiques

La production des antibiotiques chez les *Pseudomonas* est décrite comme un important mode d'action dans la suppression des maladies par antibiose (Haas et Défago, 2005). La colonisation efficace des racines par des PGPR est un événement essentiel pour l'expression optimale de l'activité de biocontrôle agissant par compétition pour le substrat ou antibiose (Lemanceau et al., 1986). Les antibiotiques produits par les différents PGPR possèdent un large spectre d'activité (Fernando et al., 2005).

Parmi les antibiotiques produits par les rhizobactéries de genre *Pseudomonas* on cite : 2,4 diacéthylephoroglucinol (DAPG), les Phénazines (PHZ), Pyolutéorine (PLT), les Pyrrolnitrine (PRN) ect... (Allaire, 2005).

La pyrrolnitrine (3-chloro -4-(2'- nitro-3'- chlorophenyl)-pyrrole) est un antibiotique qui inhibe la croissance des champignons en bloquant le système respiratoire (Arima et al., 2002). En outre, la production de cet antibiotique par *Pseudomonas fluorescens* et *Bacillus cepacia*

est impliquée dans le contrôle de certains agents pathogènes de plantes comme *Rhizoctonia solani*, *Verticillium dahliae* et *Fusarium oxysporum* (Allaire, 2005).

Il a été par ailleurs démontré que les produits potentiellement sécrétés par les souches de *Pseudomonas* sont cytotoxique, on retrouve entre autres les phénazines et les protéases. En effet, les antibiotiques jouent un rôle majeur dans la suppression des agents pathogènes par les bactéries (Weller, 1988).

3.3. Production d'HCN

Chez les procaryotes, la production d'acide cyanhydrique (HCN) qui est un métabolite secondaire (Askeland et Morisson, 1983), semble confiné aux protéobactérie et elle a été mise en évidence chez plusieurs souches de *Pseudomonas* spp. fluorescents.

Cette production d'HCN au niveau de l'adaptation à la rhizosphère peut être avantageuse pour acquérir des nutriments. Elle peut aussi contribuer à l'acquisition de certains ions métalliques en formant des complexes avec ceux-ci. De plus, en culture *in vitro*, la production de HCN peut même inhiber la croissance de plusieurs champignons phytopathogènes via la phase gazeuse (Blummer et Hass., 2000).

Selon Voisard et al (1989), la production d'acide cyanhydrique (HCN) par la souche *Pseudomonas fluorescens* CHA5 est nécessaire à la protection de la plante vis-à-vis de l'agent de pourritures noir du tabac. Ce mécanisme est de moindre importance pour la souche CHA77 (Haas et al., 1991). L'HCN produit dans la rhizosphère activerait des réactions de défense de la plante ce qui correspond à un mécanisme direct de protection avec la souche *Pseudomonas fluorescens* W163 qui révèle une agression notable de la maladie (Haas et Keel., 2003).

Chapitre IV

Matériel et Méthodes

Introduction

Les *Pseudomonas*, principalement l'espèce *P. fluorescens*, sont connus depuis longtemps pour leur aptitude à réduire l'incidence des maladies racinaires dans certains champs, ainsi qu'à inhiber la croissance d'un grand nombre d'agents phytopathogènes *in vitro*. Cette capacité d'inhibition peut se faire selon plusieurs mécanismes incluant la production d'une large gamme de métabolites antagonistes.

1. Isolement de souches des *Pseudomonas spp fluorescents*

1.1. Prélèvement d'échantillons

Les prélèvements ont été effectués en 2013 à partir de la rhizosphère du cèdre au niveau de la région de Chréa wilaya de Blida à une profondeur de 20 à 30 cm .A fin d'isoler des souches de pseudomonas spp fluorecents.

1.2. Isolement et purification des souches bactériennes

L'isolement des bactéries appartenant aux *Pseudomonas* du sol rhizosphérique a été effectué par la méthode des suspensions-dilutions avec trois répétitions.

La méthode consiste à récupérer 10 g du sol qui seront mélangés à 100 ml d'eau distillée stérile. La suspension est bien agité; c'est la dilution 10^{-1} . Une série de dilution est réalisée à partir de cette dernière jusqu'à avoir la dilution 10^{-7} .

Ensuite, les dilutions de 10^{-3} , 10^{-5} et 10^{-7} sontensemencées sur le milieu King B(KB) coulé sur des boîtes de Pétri avec trois répétition pour chaque dilution. Les boîtes sont incubées à une température de $25^{\circ}\text{C} \pm 2$ pendant 24 à 48 heures.

La purification des souches bactériennes s'effectue par un repiquage successif des isolats sur le milieu King B et l'incubation se fait à une température $25^{\circ}\text{C} \pm 2$.

1.3. Identification phénotypique des isolats

L'identification préliminaire des espèces de *Pseudomonas* produisant le pigment fluorescent, est essentiellement basée sur les caractéristiques morphologiques (morphologie macroscopique), la coloration de Gram (caractérisation microscopique), la mobilité, la recherche de la catalase et de l'oxydase, voie d'utilisation du glucose, ainsi que

l'étude des caractéristiques physiologiques et biochimiques décrite par Holt et *al.* (1994) et Bossis et *al.* (2000).

1.3.1. Caractérisation morphologique

La caractérisation morphologique repose principalement sur la couleur, l'aspect, la forme, la dimension des colonies bactériennes ainsi que leur élévation, obtenues après leurs ensemencement sur le milieu King B et incubation à une température $25^{\circ}\text{C} \pm 2$ pendant 24 h (King et *al.*, 1954)(Ann I).

1.3.1.1. Production de pigment fluorescent

La crème bactérienne âgée de 24 h est ensemencée sur le milieu gélosé B de King en boîte de Pétri pendant 24 à 96 h d'incubation à $25^{\circ}\text{C} \pm 2$. La réponse positive se traduit par la diffusion du pigment fluorescent dans le milieu gélosé

L'observation du pigment fluorescent se fait à l'œil nu ou sous la lumière ultraviolette.

1.3.1.2. Coloration de Gram

La coloration de Gram a été réalisée selon deux méthodes; la méthode classique décrite par Hildebrand et *al.*, (1988) et l'autre méthode décrite par Suslow et Schroth., (1982)

La méthode classique de Gram est effectuée en plusieurs étapes:

- ✓ Pour la préparation de frottis bactérien une crème bactérienne âgée de 24 h est déposée dans une goutte d'eau stérile sur une lame bien propre et bien étalée. Ce frottis est ensuite séché et fixé par la chaleur au dessus de la flamme de bec Bunsen.
- ✓ La coloration consiste à faire agir successivement sur le frottis le colorant violet de gentiane pendant une minute, suivi par une application d'une solution lugol (iode – iodurée), nous réaliserons un rinçage à l'eau et la décoloration est faite par l'alcool jusqu'à la disparition de la couleur violette. Après un lavage abondant à l'eau une coloration secondaire est faite par la fuchsine basique puis réaliser un autre rinçage sous l'eau et sécher le frottis au dessus de la flamme du bec Bunsen.
- ✓ L'observation se fait au microscope photonique par un ajout d'une goutte d'huile à immersion au grossissement 1000.

- ✓ La lecture se base sur la coloration que les bactéries prennent : rose pour les négatives et violet pour les positives.

La méthode décrite par Suslow et Shcroth., (1982) consiste à mettre en contact une crème bactérienne âgée de 24 h avec 2 à 3 gouttes d'une solution d'hydroxyde de potassium (KOH) à 3%. En cas de formation d'un filet visqueux, il s'agit de bactérie Gram négatif.

2. L'antagonisme microbien in vitro

2.1. Souches bactériennes

Après l'opération de l'isolement des échantillons, l'évaluation des propriétés antagonistes est la seconde étape de la sélection d'un agent de lutte biologique, elle repose sur l'antagonisme révélé *in vitro* ou sur la capacité de la souche à protéger *in situ* les organes inoculés par le pathogène en conditions contrôlées (Lepoivre, 2003).

Les souches bactériennes de *Pseudomonas fluorescens* (A8 et CH3) utilisées dans cette étude, font partie de la collection microbienne du laboratoire de microbiologie qui sont prélevés en 2013 par Kaci-Moussa et Zerrouki (Département d'Agronomie à l'université Mouloud Mammeri) (Tab II).

Tableau II: Origine des souches bactériennes utilisées.

Souche Bactérienne	Origine
A ₈	Pépinière chêne liège de Skikda
CH ₃	Forêt chêne liège de Yakourene

Ces souches sont utilisées pour évaluer leurs activités antagonistes vis-à-vis de trois isolats fongiques *Fusarium oxysporum albedinis*, *Fusarium oxysporum lycopersici* et *Fusarium oxysporum graminearum*.

2.1.1. Purification des souches bactériennes

La vérification de la pureté des souches bactériennes (A₈ et CH₃) a été réalisée après une série de repiquage successif de chaque souche sur milieu B de King(KB).

Après 24 h d'incubation à 25°C ± 2 des souches pures sont obtenues.

2.1.2. Caractérisation des souches bactériennes

2.1.2.1 Caractérisation morphologique

L'étude macroscopique révélera le diamètre, l'aspect, la couleur, le contour et l'élévation des colonies bactériennes. Alors que l'étude microscopique par l'intermédiaire de la coloration de Gram, nous permettra d'examiner la forme, le mode d'association et le résultat de coloration de Gram des bactéries.

a. Production de pigment fluorescent

Une crème bactérienne des deux souches utilisées (A8 et CH3) âgées de 24 h est ensemencée sur le milieu KB. Après 24 à 96 h d'incubation à une température $25 \pm 2^\circ\text{C}$. L'apparition de la couleur jaune verdâtre conforte la production de pigment par les deux souches A8 et CH3.

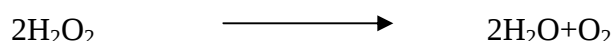
b. Test de Gram

Le test de Gram est réalisé selon deux techniques; la classique (la coloration de Gram) et celle de KOH.

2.1.2.2 Etude biochimique

a. Recherche de Catalase

La technique de catalase est définie par Steard et *al.*, (1987) qui consiste à instiller des gouttes de l'eau oxygénée (2 à 3) à 10 volumes sur une crème bactérienne jeune faite à partir d'une culture de 24 heures sur une lame propre et sèche. Une importante dégradation gazeuse traduit la présence d'une catalase selon la réaction suivante :



b. Recherche de l'oxydase

Le test oxydase est à la base de l'identification des bactéries Gram négatives. Il permet de mettre en évidence une enzyme: la phénylène diamine oxydase des bactéries cultivées sur milieu gélosé. Il consiste à déposer un disque oxydase sur une colonie bactérienne âgée de 24 h.

La lecture des résultats sera immédiate et une réaction positive se traduit par un virage de la couleur en bleu au bout de quelques secondes.

c. Test Mannitol et Mobilité

Le milieu utilisé est Mannitol-Mobilité (Ann I), il permet de mettre en évidence l'utilisation de mannitol comme source de carbone, ainsi que la mobilité des souches bactériennes.

Cette technique consiste à ensemencer sur le milieu Mannitol–Mobilité les souches âgées de 24 h par une pique centrale (Gardan et Luisetti, 1981) à l'aide d'une pipette pasteur. L'incubation est réalisée à une température de $25 \pm 2^{\circ}\text{C}$.

L'apparition d'une coloration jaune correspond au Mannitol positive. Le développement des bactéries dans toute la gélose signifie qu'elles sont mobiles.

d. Recherche de Nitrate réductase

La réduction des nitrates a été testée selon la méthode décrite par Roussel Delif et *al.* (2005). La technique consiste à inoculer une suspension bactérienne de 24 h dans des tubes de Bouillon nitraté (Ann I), puis les incubés pendant 24 h à une température de $25 \pm 2^{\circ}\text{C}$.

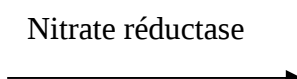
La mise en évidence des nitrites dans le milieu se fait grâce à la technique de Khan qui utilise les réactifs de Geless Ilosway :

- ✓ Réactif A: Acide sulfanilique en milieu acétique.
- ✓ Réactif B: Naphtylamine en milieu acétique.

Cette méthode consiste à ajouter à la surface de milieu 3 gouttes du réactif A puis 3 gouttes du réactif B et homogénéiser le mélange.

En cas de présence de nitrite il y aura apparition d'une couleur rose, donc la bactérie possède une nitrate réductase qui effectue la réaction. Si la coloration ne change pas cela signifie l'absence de nitrite; alors on ajoute de la poudre de Zinc qui réduit les nitrates en nitrites:

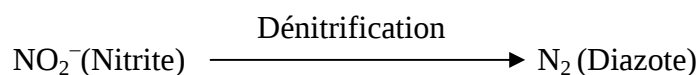
- coloration rose: le Zinc réduit les nitrates en nitrite c'est à dire que la bactérie ne possède pas la nitrate réductase selon la réaction suivante:



NO_3^- (Nitrite)

NO_2^- (Nitrite)

- pas de coloration: les nitrites ont été transformés par la bactérie puis la dénitrification a permis l'obtention de diazote. La réaction est fortement positive, c'est-à-dire la bactérie possède le nitrate réductase.



e. Utilisation de Citrate de Simmons

L'utilisation du milieu citrate de Simmons (Annexes I) a pour but de déterminer la capacité des souches bactériennes à utiliser le citrate comme une seule source de carbone.

Cette technique consiste à ensemencer en stries longitudinales le milieu (qui se présente en pente) à partir de la suspension bactérienne âgée de 24 h. L'incubation se fait à $25 \pm 2^\circ\text{C}$ pendant 24 heures. Les bactéries citrate(+) donnent une culture abondante et se traduit par le virage de l'indicateur du vert au bleu (Larpen, 1975).

f. Fermentation / oxydation.

La fermentation ou l'oxydation des sucres (glucose, lactose) est recherchée sur le milieu d'identification Mevag (Annexes I), en ensemencant abondamment une suspension bactérienne âgée de 24h par une piqure centrale sur le milieu Mevag confectionné en deux tubes à essai, puis on ajoute à l'un de ses tubes une mince couche de la vaseline.

Le virage de la couleur au jaune dans les deux tubes indique que la bactérie utilise la voie fermentative. Si le virage de la couleur au jaune est uniquement dans le tube qui ne contient pas de la vaseline donc la bactérie utilise la voie oxydative.

g. Hydrolyse de la Gélatine

Une crème bactérienne de 24 h est ensemencée par une piqure centrale au niveau de culot dans des tubes à essai contenant le milieu gélatine (Gardan et Luisetti, 1981) (Ann I) puis incubé à une température $25^\circ\text{C} \pm 2$ pendant 2 à 3 jours .

Après l'incubation on place les tubes 10 mn à une température de 6°C pour la favorisation de la reprise de gel avec une comparaison à des tubes témoins sans ensemencement de la bactérie .Si le milieu se solidifie, la bactérie n'hydrolyse pas la gélatine, donc elle ne synthétise pas la gélatinase.

h. Hydrolyse de l'esculine

La technique s'agit d'ensemencer en strie sur le milieu esculine (Ann I) (Gardan et Luisetti, 1981) coulé dans des boîtes de Pétri des cultures bactériennes de 24 heures.

L'incubation se fait à $25 \pm 2^\circ\text{C}$ pendant un à trois jours et la lecture se base sur l'apparition d'une couleur noir dans le milieu qui indique la dégradation de l'esculine.

i. Production de Levane sucrase

Hildebrand et *al.* (1988) ont décrit la méthode de recherche de Levane sucrase. Cette méthode consiste à ensemencer sur milieu gélosé Levane (Gardan et Luisetti, 1981) (Ann I) une culture bactérienne jeune puis incuber à $25^\circ\text{C} \pm 2$ durant 2 à trois jours. L'apparition d'une culture bombée et brillante, signifie la présence de levane sucrase.

j. Recherche de l'Uréase, de la TDA et de l'Indole

Ce teste permet de la mise en évidence des enzymes: l'uréase qui hydrolyse l'urée en CO_2 et NH_3 et le tryptophane désaminase (TDA) qui transforme le tryptophane en acide indole pyruvique par désamination.

Il consiste d'introduire la suspension bactérienne âgée de 24 heures dans des tubes contenant le milieu urée tryptophane (Fergusor) et incuber pendant 24 heures à $25 \pm 2^\circ\text{C}$.

Les bactéries uréase(+) se traduit par l'apparition d'une couleur rouge violacé et la formation d'un anneau rouge signifie la dégradation de l'indole par la bactérie donc indole(+). Pour la TDA l'apparition d'un précipité signifie que c'est TDA(+).

k. Caractères RM et VP

Les caractères Rouge de Méthyle(RM) et Voges Proskauer (VP) sont étudiés dans le milieu Clark et Lubs (Ann I). La méthode consiste à ensemencer deux tubes contenant de milieux Clark et Lubs avec une suspension des deux souches bactériennes jeunes (A8 et CH3), puis les incubé à une température de 37°C pendant 24 h.

Un prélèvement de milieux incubé dans d'autres tubes à essai a été réalisé; l'un sert au test RM par introduction de 2 gouttes de solution de rouge de méthyle à 2.5% dans l'alcool et l'autre tube pour la réaction de VP, qui met en évidence l'acétoine par un ajout de 0.5ml

de solution d' α -naphtol et 1ml de solution de soude de potasse caustique dilué (16%), puis on agite légèrement et laisser pendant 10mn.

Pour le RM la lecture se fait immédiatement et l'apparition d'une teinte rouge indique que la bactérie est RM(+). L'apparition d'une teinte rouge ou rose signifie que la bactérie VP(+).

2.2. Isolats fongiques

Les isolats fongiques testés *in vitro* sont: le *Fusarium oxysporum f.sp lycopersici*(Fol) agent causant la fusariose vasculaire de la tomate, le *Fusarium oxysporum albedinis*(Foa) responsable de Bayoud et *Fusarium oxysporum graminearum* provoquant la fusariose de blé (Fog) (Tableau 03).

Tableau III: Origines des isolats fongiques utilisés dans le test d'antagonisme

Isolats fongiques	Plante hôte	Provenance
<i>Fusarium oxysporum f.sp lycopersici</i>	tomate	Université LAGHOUAT
<i>Fusarium oxysporum f.sp albedinis</i>	Palmier dattier	
<i>Fusarium graminearum</i>	Blé	

2.2.1. Purification des isolats fongiques

La purification des isolats fongiques est assurée par des repiquages successifs de chaque isolat sur le milieu PDA (Annexes n°02).

Un disque de 3 mm de diamètre de chaque mycélium est prélevé à partir d'une culture fongique à l'aide d'une pipette Pasteur, puis placé au centre de la boîte de Pétri contenant le milieu PDA (Potato Dextrose Agar). L'incubation est effectuée à 25° C $\pm$ 2 pendant 7 à 10 jours.

2.3. Activité antifongique

Le test d'antagonisme est effectué pour vérifier l'existence d'une éventuelle action inhibitrice des souches de *Pseudomonas fluorescens* (A8 et CH3) vis-à-vis des trois

champignons: *Fusarium oxysporu albedinis* (Foa), *Fusarium oxysporum lycopersici*(Fol), *Fusarium oxysporum graminearum*(Fog).

Ce test est réalisé sur des milieux de culture solides PDA et King B (Annexes I) selon la méthode décrite par Vincent et *al.* (1991).

Un disque de chaque mycélium est prélevé à partir d'une culture fraîche de 7 jours (Figure 06), puis placé au centre de la boîte de Pétri contenant le milieu PDA et sur boîte contenant le milieu KB. Les bactéries isolées âgée de 24 h sont déposées par deux méthodes (Figure 07), la méthode des spots et la méthode des traits. Le témoin est inoculé uniquement par le champignon à tester. Les boîtes sont incubées à $25\pm 2^{\circ}\text{C}$ pendant 10 jours.

Cinq répétition sont réalisées pour chaque méthode pour les trois champignons.



Figure 06 : Prélèvement des disques mycéliens (Originale, 2015).

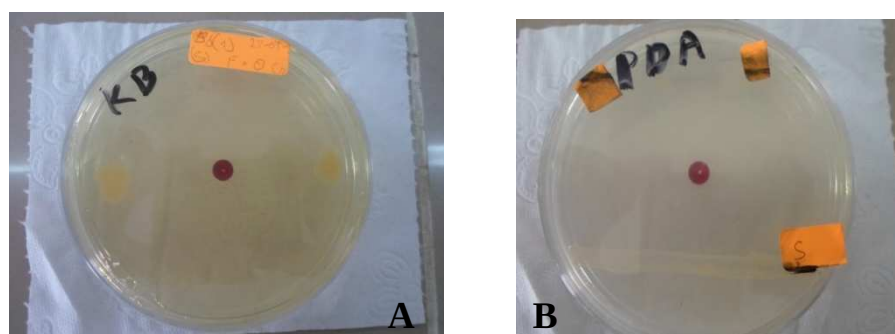


Figure 07: Méthodes d'ensemencement des souches A:méthode des spots; B méthode des traits (Originale, 2015).

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

mycélium fongique est alors mesurée et elle est comparée au témoin ne contenant que le mycélium fongique.

La lecture des résultats consiste à mesurer la distance parcourue le champignon en direction de l'antagonisme bactérien (souche de *Pseudomonas*). Le pourcentage d'inhibition est calculé selon (Wang et Hsio., 2002) et (Trivedi et Pandey., 2008) comme suit:

$$(\%) \text{ inhibition} = (R_{\text{témoin}} - R_{\text{test}}) / R_{\text{témoin}} \times 100$$

- ✓ $R_{\text{témoin}}$: distance de la croissance radiale max du champignon témoin.
- ✓ R_{test} : distance radiale de croissance du champignon avec présence de la souche bactérienne.

NB: on peut parler d'inhibition que lorsque (%) inhibition est supérieur à 20%.

II.4. Les analyses statistiques

Les résultats sont traités par analyse de variance (ANOVA) complété par un test de comparaison par paires de Newman-Keuls avec un risque α de 5% à l'aide de logiciel STAT BOX version 6,3.

Lorsque la probabilité (P) est:

$p > 0.05$: les variables ne montrent aucune différence significative.

$P < 0.05$: les variables montrent une différence significative.

$P < 0.01$: les variables montrent une différence hautement significative.

$P < 0.001$: les variables montrent une différence très hautement significative.

C'est dans les cas où les différences s'avèrent significative, que nous faisons appel au test de NEWMAN et KEULS au seuil de 5% afin de déterminer les groupes homogènes.

Chapitre V

Résultats et discussion

1. Résultats

1.1. Isolement des souches bactériennes

Les isollements à partir de la rhizosphère du cèdre nous ont permis l'identification de 14 souches dont les caractères macroscopiques sont représentés dans le tableau IV et la Figure 08

Tableau IV: Caractéristiques morphologiques des souches bactériennes isolées de la rhizosphère de cèdre.

Caractéristiques Souche	Taille	forme de bord	Aspect	couleur	élévation	consistance
BL₁	1mm	Ronde	brillante	crème	bombée	Crème
BL₂	2mm	Ronde	Opaque	jaune clair	plate	Crème
BL₃	1mm	Ronde	brillante	crème	plate	Crème
BL₄	2mm	Dentelée	peu brillante	crème	bombée	Crème
BL₅	3mm	Ronde	brillante	crème	bombée	Crème
BL₆	3mm	Ronde	Opaque	blanchâtre	légèrement bombée	Crème
BL₇	1,5mm	Ronde	Opaque	jaune claire	bombée	Crème
BL₈	2mm	Ronde	brillante	Blanchâtre	légèrement bombée	Sèche
BL₉	1mm	Dentelée	brillante	jaune clair	plate	Sèche
BL₁₀	1mm	Ronde	brillante	crème	bombée	Crème
BL₁₁	2mm	Ronde	Opaque	crème	bombée	Sèche
BL₁₂	1mm	Ronde	Opaque	crème	bombée	Crème
BL₁₃	1,5mm	Ronde	brillante	jaune clair	bombée	Crème
BL₁₄	1mm	ronde	brillante	jaune clair	Plate	Crème



Figure 08: Souches bactériennes isolées de la rhizosphère de cèdre (Originale, 2015).

Les résultats obtenus sur le milieu King B après 72 h d'incubation à $25^{\circ}\text{C} \pm 2$ montrent que toutes les souches isolées ne produisent pas de pigment fluorescent sur le milieu gélosé.

Le test de KOH et la coloration de Gram révèlent que toutes les souches bactériennes isolées sont des Gram (+).

1.2. Activité antagoniste in vitro

1.2.1. Caractérisation des isolats bactériens

1.2.1.1. Purification des souches bactériennes

Les repiquages successifs des souches A8 et CH3 sur le milieu King B ont permis de confirmer la pureté de ces bactéries.

1.2.1.2. Caractéristiques des souches bactériennes

- **Caractérisation morphologique**

L'étude macroscopique réalisée à l'œil nu sur milieu King B nous a permis d'observer des petites colonies bombées, de couleur transparente à beige de 0.5 à 1 mm de diamètre, un aspect lisse avec un contour régulier caractérise des deux souches étudiées A8 et CH3 (Figure 09).

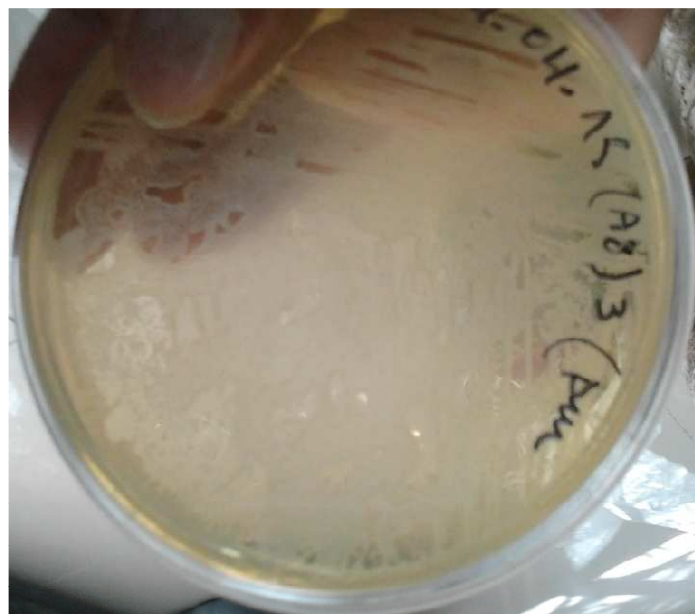


Figure 09 : Aspect des souches bactériennes A8 et CH3 observée à l'œil nu (Originale, 2015).

- **Production de pigment fluorescent**

La production des pigments fluorescents a été nettement observée sur le milieu B de King chez les souches A8 et CH3 qui se traduit par une couleur jaune verdâtre. L'intensité de la fluorescence est variable selon les souches ; elle est très visible pour la souche CH3 (Figure 10).

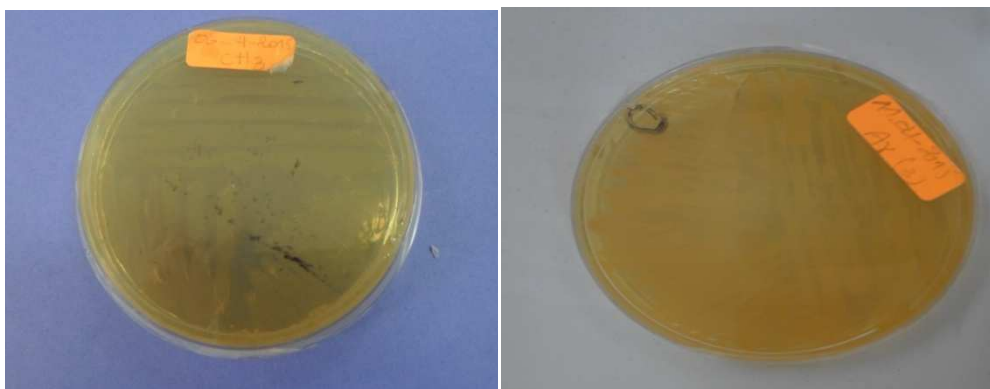


Figure 10: Production de pigment fluorescent par les souches A8 et CH3 (Originale, 2015).

- **Test de Gram**

La coloration de Gram révèle que les souches bactériennes sont des Gram (-). L'observation microscopique a montré des fins bacilles droits, de couleur rose isolées ou groupés en deux.

Egalement, le test de KOH confirme que les deux souches sont des Gram(-) illustré par la formation d'un filet visqueux au contact de la bactérie et le KOH.

1.2.2.3. Etude biochimique

La série de tests biochimiques effectuée pour les deux souches bactériennes A8 et CH3 a révélé les résultats suivants Tableau IV et Figure 11:

Les deux souches présentent des réactions négatives via le Rouge de Méthyle (RM-) et Voges Proskauer (VP-).

Pour le test TSI: en culot il y a pas croissance des souches A8 et CH3, il s'agit de glucose (-). Cependant, un développement bactérien et le changement de la couleur au jaune sont observés au niveau de la pente, cela signifie que ces bactéries sont des lactoses (+) et saccharoses (+).

Les souches étudiées A8 et CH3 transférées sur le milieu Citrate de Simmons ont provoqué un virage de l'indicateur au bleu, cela signifie que les bactéries sont des citrates (+).

Les deux souches bactériennes sont mobiles mais ne dégradent pas le mannitol.

La formation d'un anneau rouge, d'un précipité brun ainsi que l'apparition de couleur violacée sur le milieu urée tryptophane suite à l'ensemencement de la suspension des souches A8 et CH3, démontre que ces bactéries sont indoles (-), TDA(+) et uréase (+).

Le virage de la couleur de tube contenant de la vaseline sur le milieu Mevag signifie que ces souches sont de type aérobie strict.

Les deux souches ne réduisent pas les nitrates en nitrites, cela se traduit par la couleur qui est restée inchangeable sur le milieu boillon nitraté.

L'hydrolyse de l'esculine a été observée chez les deux souches bactériennes mais à une intensité élevée pour la souche CH3, qui se traduit par la coloration noirâtre de milieu esculine (Figure 12).

Pour le levane, la culture CH3 apparaît bombée et brillante cela indique la présence de levane sucrase, contrairement à la souche A8 qui ne présente pas cette enzyme (Figure 13).

En contact des souches bactériennes (A8 et CH3) et de l'eau oxygénée nous avons observé des bulles gazeuses, ce sont des catalase positive (Figure 14).

L'hydrolyse de la gélatine a été observée uniquement pour la souche CH8.

Le test d'oxydase révèle la présence de l'enzyme cytochrome oxydase pour les deux souches.

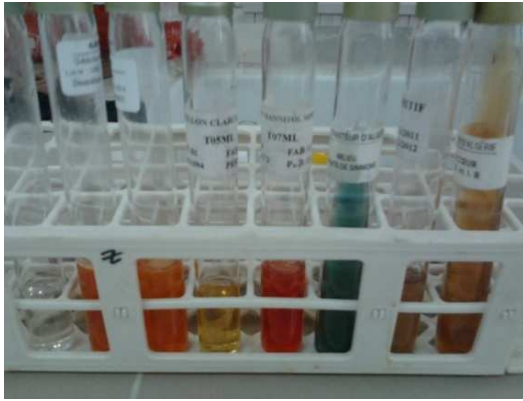


Figure 11 : Galerie biochimique classique réalisées pour les souches A8 et CH3 (Originale, 2015).



Figure 12 : Hydrolyse de levane par la souche CH3 (Originale, 2015).

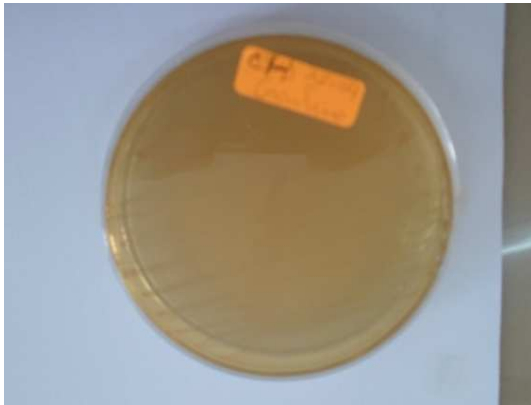


Figure 13 : Hydrolyse d'esculine par la souche CH3 (Originale, 2015).



Figure 14: Test de catalase positive des souches CH3 et A8 (Original, 2015).

Tableau IV: Caractéristiques biochimiques des souches A8 et CH3.

Test \ Souche	A8	CH3
TSI	Glucose- Lactose- Saccharose -	Glucose- Lactose- Saccharose -
Clark et Lubs	RM- VP-	RM- VP-
Mannitol Mobilité	Mannitol- Mobilité+	Mannitol- Mobilité+
Mevag	Aérobie stricte	Aérobie stricte
Citrate De Simmons	+	+
Bouillon nitraté	-	-
Gélatine	+	-
Esculine	++	++
Catalase	+	+
Levane	+	-
Oxydase	+	+
Urée tryptophane TDA	Urée+ TDA+ Indole +	Urée+ TDA+ Indole +

- **(+): réaction positive.**
- **(++): réaction très positive.**
- **(-): réaction négative.**

2. Purification des isolats fongiques

Après 10 jours d'incubation à une température de $25 \pm 2^\circ\text{C}$ nous avons pu obtenir des isolats fongiques purs des champignons Foa, Fol et Fog (Figure 15).



Figure 15 : Isolats fongiques sur milieu PDA (Foa, Fol et Fog) (Originale, 2015).

3. Activité antifongique des souches bactériennes

Les souches A8 et CH3 testées, manifestent une action inhibitrice vis-à-vis des trois isolats de *Fusarium oxysporum albedenis* (Foa), *lycopersici* (Fol), *graminearum* (fog). Le diamètre des colonies mycéliennes de *F. oxysporum* a été réduit en présence des souches antagonistes de *Pseudomonas fluorescens*, comparé au témoin non inoculé.

Les résultats suggèrent que le milieu de culture propice pour les trois champignons est le PDA, néanmoins le Fol est le moins développé dans le milieu King B par rapport au milieu PDA (Figure 16).

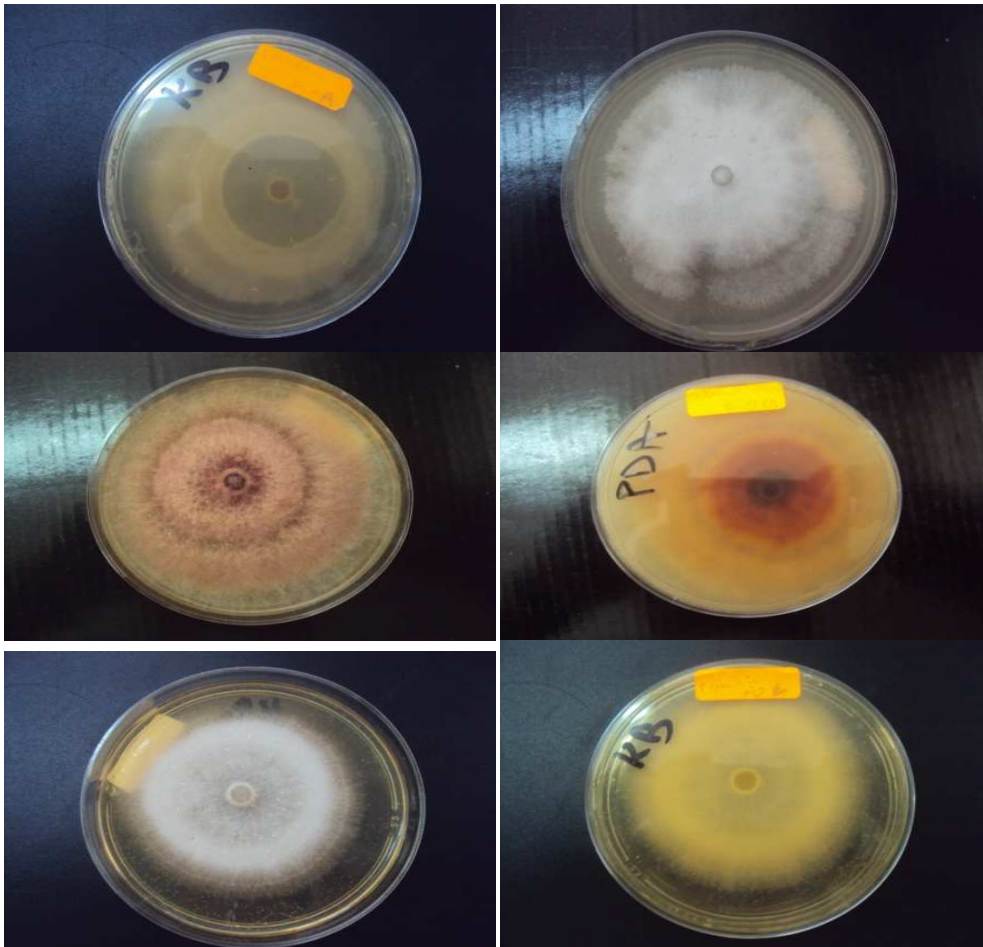


Figure 16 : Les isolats fongiques Fog, Fol et Foa témoinsensemencés sur les milieux KB et PDA (Originale, 2015).

L'inhibition de la croissance mycélienne est variable en fonction des souches bactériennes testées, des isolats fongiques, des milieux de culture et les méthodes utilisées.

3.2.3. Calcul de taux d'inhibition

Seules pour les souches qui présentent un taux d'inhibition $>20\%$, elles sont considérées comme inhibitrices.

Les résultats sont inscrits dans le tableau suivant :

Tableau V : Taux d'inhibition (%) des souches bactériennes CH3et A8 contre les champignons Foa, Fog et Fol dans le milieu PDA et King B par la méthode des trait et spot.

Milieu	King B						Milieu PDA					
Méthodes	Trait			Spot			Trait			Spot		
Souche	Foa	Fog	Fol	Foa	Fog	Fol	Foa	Fog	Fol	Foa	Fog	Fol
A8	42.16	52.61	50.82	57.29	43.38	23.27	2.43	12.5	15.21	19.51	0	15.96
CH3	48.64	62.46	39.67	47.29	39.69	35.08	2.43	11.25	15.21	10.97	0	27.68

Les taux d'inhibition obtenus montrent que les deux souches bactériennes A8 et CH3 sont actives vis-à-vis des trois champignons avec les deux méthodes sur le milieu King B, alors que sur le milieu PDA, seule la souche CH3 est inhibitrice vis-à-vis de Fol par la méthode des spots.

1.3.Effet de milieu de culture sur l'activité antifongique

- **Milieu King**

Sur le milieu King B, les deux souches exercent une activité antagoniste vis-à-vis des trois isolats fongiques Fol, Fog, Fol. Ce résultat se voit clairement sur les boîtes de Petri lors de la comparaison avec le témoin (Figure 17).

Sur ce milieu King B, les deux souches sont considérées comme inhibitrices avec un taux d'inhibition dépassant les 20%.

La variabilité de taux d'inhibition entre les deux méthodes n'est pas importante pour les deux souches bactériennes A8 et CH3 vis-à-vis des isolats fongiques Fol, Fog et Fol.

Les résultats obtenus sur le milieu King B par la méthode des traits et spot sont illustrés respectivement sur les Figures 18 et 19:

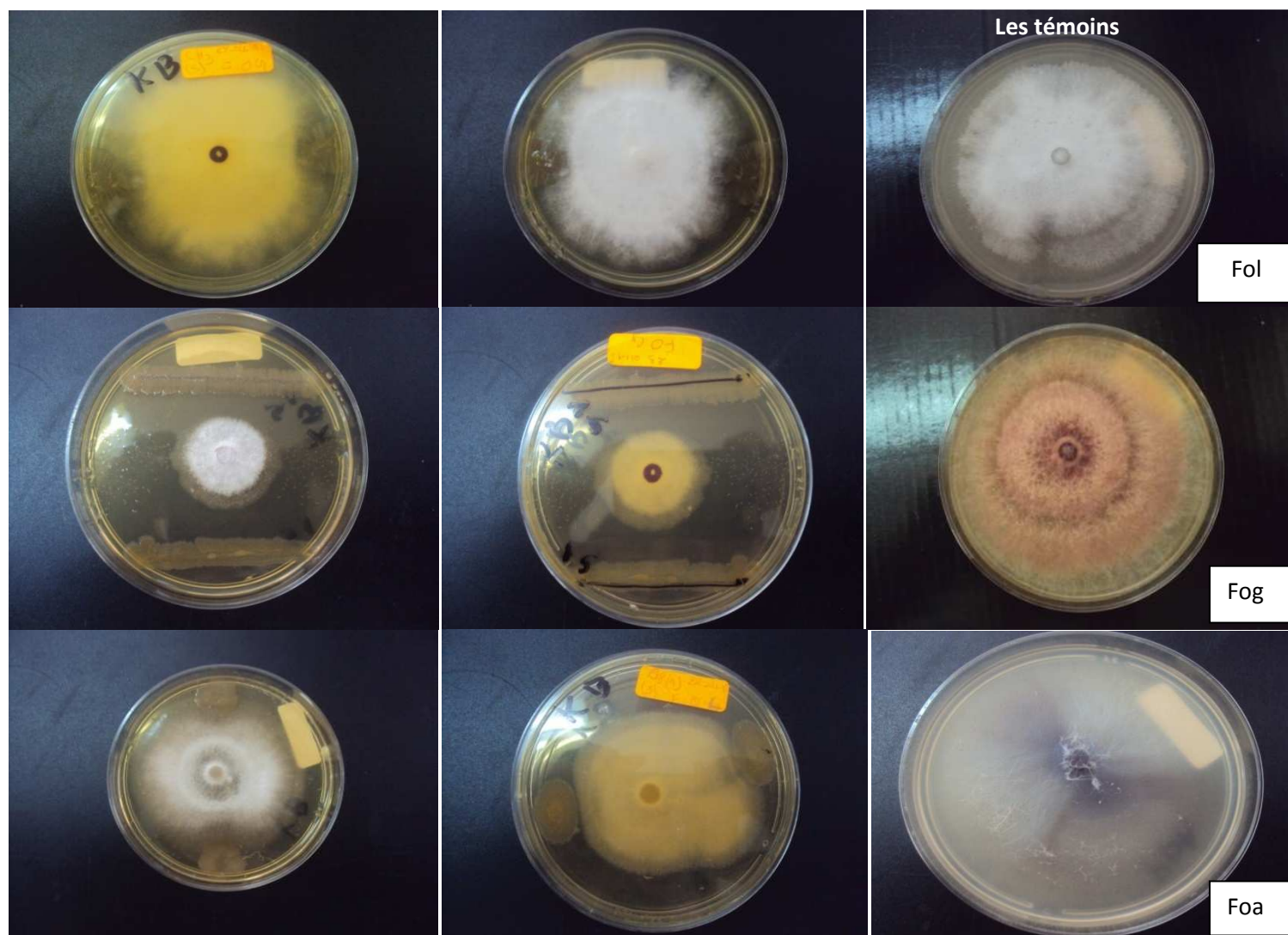


Figure 17: activité antagoniste des souches A8, CH3 vis-à-vis des trois champignons Foa, Fog et Fol sur le milieu King B (Originale, 2015)

Méthode de trait

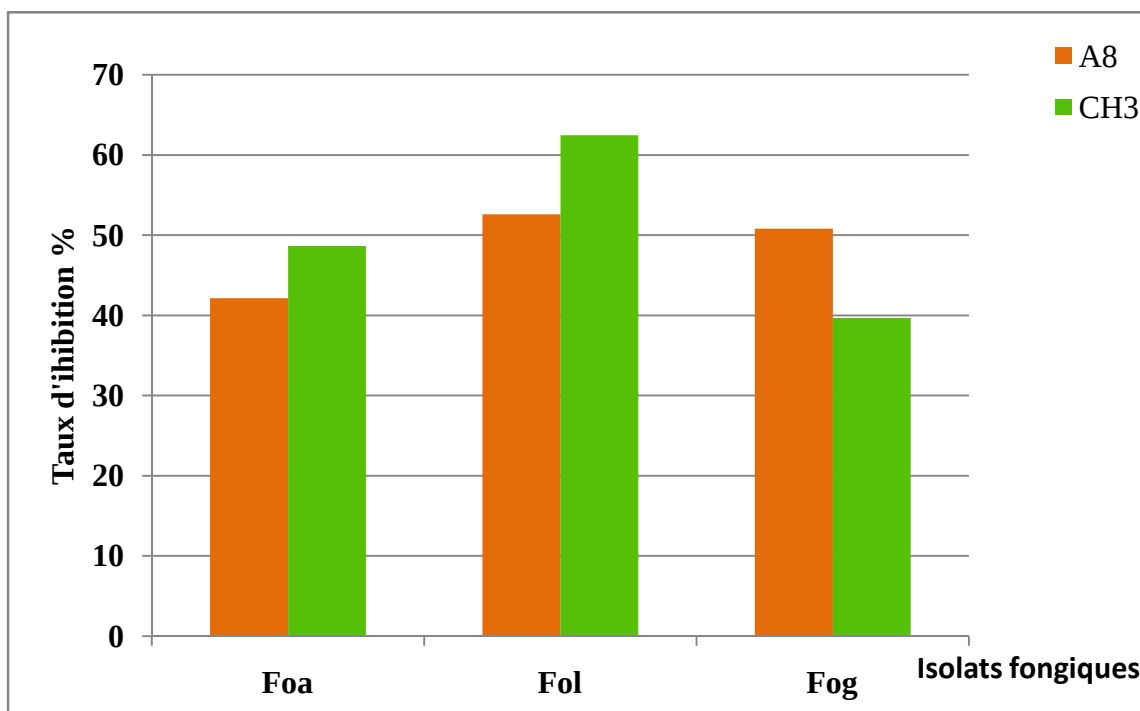


Figure n°18 : Taux d'inhibition d'A 8 et CH3 dans le milieu King B par la méthode des traits.

La lecture de la Figure 18 nous indique que le taux d'inhibition est variable et important pour les deux souches vis-à-vis des trois champignons après utilisation de cette méthode.

Sur le milieu King B le taux d'inhibition le plus élevé est enregistré par la souche CH3 vis-à-vis du champignon Fol avec un taux de 62.46 % et par la souche A8 avec un taux de 52.62% à l'encontre de Fol.

Dans ce milieu le champignon le plus sensible est Fol en présence de CH3 et le plus résistant est Fog avec une valeur de 39.67 %.

D'après ces résultats, la souche CH3 est plus inhibitrice que la souche A8.

- **Méthodes des spots**

Les résultats montrent (Figure 19) que la souche A8 exerce une activité antagoniste élevée vis-à-vis de Foa soit un taux de 57.29 % un faible taux d'inhibition est enregistré par la même souche à l'encontre de Fog soit 23.27%.Donc le Foa est le champignon le plus sensible alors que le Fog est le plus résistant.

Par cette méthode, la souche A8 est plus active par rapport à CH3.

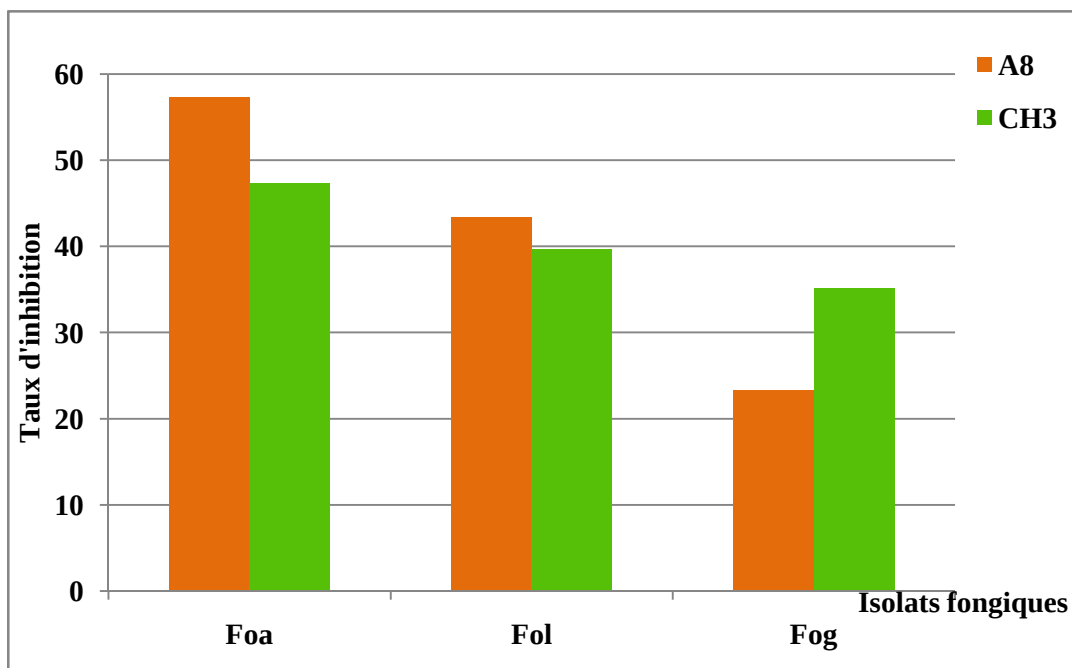


Figure n °19 : Taux d'inhibition de A8 et CH3 dans le milieu King B par la méthode des spots.

- Le milieu PDA**

D'après les résultats obtenus sur le milieu PDA, c'est la souche CH3 qui est considérée comme inhibitrice en présentant un taux d'inhibition supérieur à 20% vis-à-vis de Fol par la méthode des spots (Tableau VI).

Tableau VI : Taux d'inhibition (%) sur le milieu PDA.

Méthodes	Trait			Spot		
Isolats fongique	Foa	Fog	Fol	Foa	Fog	Fol
Souches bactériennes						
A8	2.43	12.5	15.21	19.51	0	15.96
CH3	2.43	11.25	15.21	10.97	0	27.68

Méthode des traits

La figure 20 montre que le taux d'inhibition le plus élevé enregistré par les deux souches est estimé à 15.21%, et ce à l'encontre de Fol.

Ces résultats révèlent que les deux souches bactériennes ne sont pas inhibitrice dans le milieu PDA vis-à-vis des trois champignons *Fusarium oxysporum albedinis*, *Fusarium oxysporum lycopersici* et *Fusarium oxysporum graminearum*.

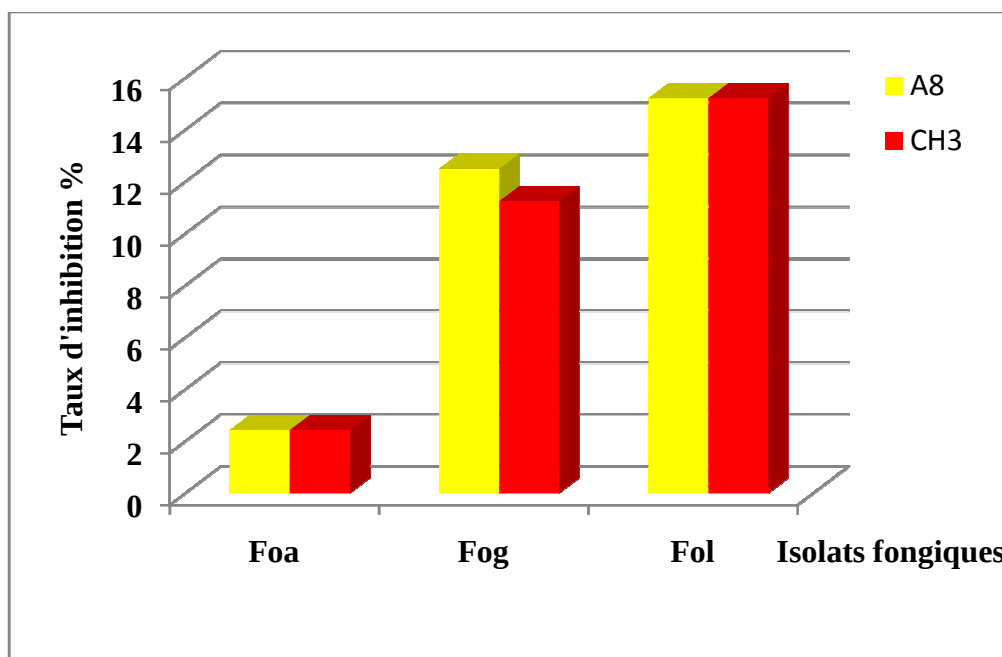


Figure 20 : Taux d'inhibition de A8 et CH3 sur le milieu PDA obtenu par la méthode des traits.

Méthode des spots

La lecture de la Figure 21 montre que le taux d'inhibition est nul pour les deux souches A8 et CH3 vis-à-vis de Fog.

Sur le milieu PDA, nous avons noté que les taux d'inhibition sont assez faibles, par rapport au milieu King B. Par la méthode des spots une valeur maximale de 27.68% a été obtenue par la souche CH3 vis-à-vis de Fol, quant à son effet vis-à-vis de Foa, il est estimé à 19.51%. A l'encontre de Fog les deux souches sont inactives (0%).

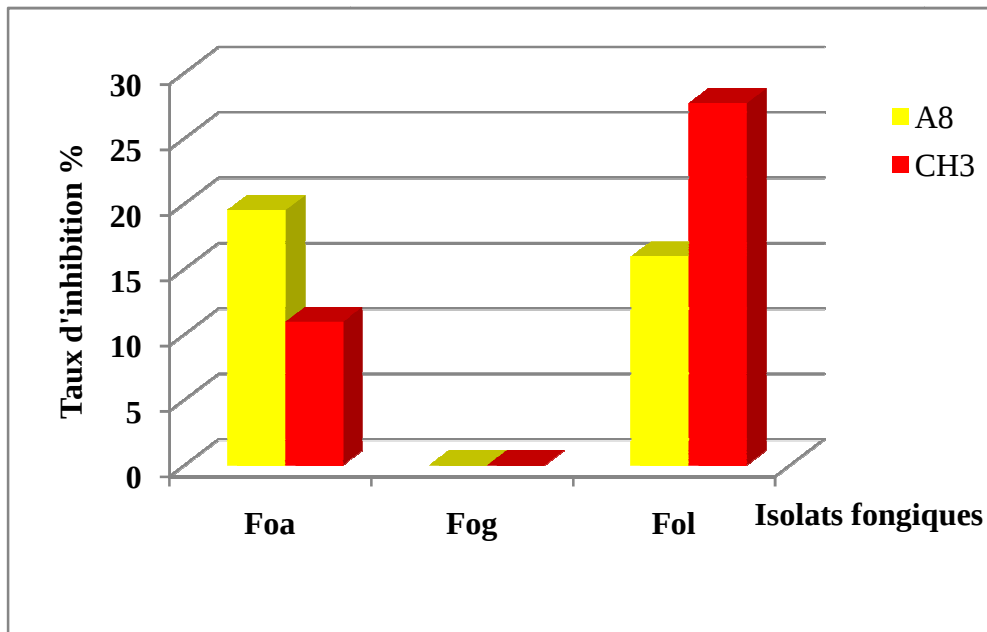


Figure 21: Taux d'inhibition de A8 et CH3 sur le milieu PDA par la méthode des spots.

1.4. Les analyses statistiques

- **Sur le milieu King B**

L'analyse de variance de trois facteurs sur le milieu King B révèle qu'il n'y a pas une différence significative pour les trois facteurs, souche bactérienne ($P=0.819$), méthode ($P=0.364$) et isolats fongiques ($P=0.565$) (Annexe II, Tab VII).

- **Sur le milieu PDA**

L'analyse de variance pour les trois facteurs : souches bactériennes, isolats fongiques et méthodes atteste qu'il n'y a pas une différence significative, les probabilités sont respectivement $P=0.928$, $P=0.119$ et $P=0.469$ (Annexe II, Tab VIII).

- **Pour les quatre facteurs**

L'analyse de variance pour les quatre facteurs : milieu, souches bactériennes, isolats fongiques et la méthode montre qu'il n'y a pas une différence significative pour les quatre facteurs ($P>0.05$). Pour le facteur milieu, le test révèle une différence très hautement significative avec une probabilité $P=0.0005$ ($P<0.001$) (Annexe II, Tab IX).

Pour vérifier l'effet antagoniste des souches bactériennes A8 et CH3 vis-à-vis des trois champignons par les deux méthodes (spots et traits) dans les deux milieux KB et PDA, nous avons étudiés quatre facteurs.

- **Facteur 1 : Souches bactériennes**

Pour vérifier s'il y a une signification dans la différence de l'activité antagoniste des deux souches A8 et CH3, nous avons opté pour le test de l'analyse de la variance avec un risque $\alpha=5\%$.

- **Facteur 2 : Méthode**

Pour vérifier s'il y a une absence ou présence d'une signification quand à l'activité antagoniste des souches A8 et CH3 via la méthode utilisée (spots et traits), nous avons effectué un test d'analyse de variance.

Le test de F (Fisher-Snedecor) a été utilisé dans ce cas.

H_0 : la méthode utilisée n'influence pas sur l'activité antagoniste de A8 et CH3.

L'hypothèse H_0 sera rejetée si $P < 0.05$ et sera acceptée dans le cas contraire.

Après calcul, les résultats obtenus sont :

$$P = 0.38 \quad \alpha = 5\%$$

$P > 0.05$ donc l'hypothèse est acceptée, donc l'activité antagoniste ne dépend pas de la méthode d'ensemencement bactérien.

- **Facteur 3 : Champignon**

Pour vérifier si l'activité antifongique des deux souches bactériennes est variable selon les isolats fongiques utilisés (Foa, Fol et Fog), nous avons opté pour le test de l'analyse de variance avec un seuil $\alpha=5\%$.

Facteur 4 : Milieu

Pour vérifier l'effet de milieu (KB, PDA) sur l'activité antagoniste des souches A8 et CH3 vis-à-vis des champignons (Foa, Fol et Fog), nous avons effectué le test d'analyse de variance.

Le test de NEWMAN et KEULS, au seuil de signification de 5%, classe les deux milieux dans deux groupes différents A et B (Annexe II, Tabl X), où le milieu PDA (Groupe A) est le plus favorable pour la croissance des champignons.

Interaction F 2*3 : méthode*isolats fongiques

Pour vérifier s'il y a une interaction entre la méthode utilisée et les isolats fongiques (Foa, Fol et Fog), nous avons opté pour le test de l'analyse de variance avec un seuil $\alpha=5\%$.

Le test de NEWMAN et KEULS, au seuil de signification de 5%, classe l'effet de la méthode sur le développement des isolats dans le même niveau ce qui prouve que les deux méthodes ont le même effet sur la croissance mycélienne (Annexe II, Tab XI).

Interaction 3*4 : isolats fongique*milieu.

Pour vérifier s'il y a une interaction entre la croissance mycélienne des champignons (Fog, Fol et Foa) et le milieu de culture, nous avons opté pour le test de l'analyse de variance avec un seuil $\alpha=5\%$.

2. Discussion

Les isolements effectués à partir de la rhizosphère du cèdre de la région de Chrea ont permis de sélectionner 14 souches bactériennes dont la caractérisation morphologique, le test de Gram et la production de pigment fluorescent ont permis de révéler que se sont des bactéries Gram (+) et qui n'appartiennent pas au genre *Pseudomonas*.

La difficulté de pouvoir isoler des bactéries du genre *Pseudomonas* à partir de nos échantillons de sol peut être expliqué par la présence abondante de bacillus (bactérie Gram +) caractérisées par leurs capacité à sporuler donc à se conserver assez longtemps. Les *Pseudomonas spp. fluorescens* sont des bactéries asporulantes qui ne résistent pas aux conditions défavorables du milieu, ce qui explique leur absence au niveau du sol testé prélevé et conservé il y'a plus d'une année (2013).

Les résultats obtenus confirment l'appartenance des deux souches CH3 et A8 au genre *Pseudomonas* et nous remarquons que ces souches ont montré une certaine stabilité des caractères cultureux et biochimiques.

La production de pigment fluorescent a été observé chez les deux souches; cette production est une spécificité des *Pseudomonas fluorescens* et qui peuvent généralement être distinguées visuellement des autres *Pseudomonas* par leur aptitude à produire un pigment jaune vert soluble dans l'eau (Palleroni et al., 1973) qui sont les pyoverdines produites dans des milieux pauvres en fer (Palleroni et Migula, 1984).

Le test KOH et la coloration de Gram confirment que les deux souches bactériennes sont Gram(-) négatives. Ces souches utilisent les citrates, hydrolysent l'esculine mais ne dégradent pas le lactose, le saccharose et le mannitol. La souche A8 est capable d'hydrolyser la gélatine et possède la levane sucrase contrairement à la souche CH3. Les deux souches CH3 et A8 sont catalases positive et possèdent le cytochrome oxydase.

Nos résultats correspondent à la définition de Palleroni et Migula (1984) qui rapporte que les *Pseudomonas spp. fluorescens* sont des microorganismes aérobies utilisant l'oxygène comme récepteur final d'électrons. Cette respiration sur O₂ est celle qui présente le rendement énergétique le plus important, suite au potentiel redox élevé de l'oxygène. Elle est caractérisée par des cytochromes oxydases, transporteurs d'électrons terminaux qui réagissent directement avec l'oxygène (Latour et Lemanceau, 1997).

Par ailleurs les *Pseudomonas* saprophytes qui regroupent les espèces *P. chlororaphis*, *P. fluorescens* et *P. putida* sont des Gram négatif à cytochrome oxydase positif. Se sont des microorganismes hétérotrophes qui ont l'aptitude d'utiliser une gamme étendue de composés organique (Latour et Lemanceau, 1997). Contrairement aux espèces oxydase négative qui sont toutes phytopathogènes (Palleroni et Migula, 1984), ces bactéries à cytochrome positif sont ubiquistes, certaines souches présentent un intérêt pour l'agriculture car elles améliorent la croissance et l'état sanitaire des plantes (Lemanceau, 1992).

D'après les résultats obtenus du test d'antagonisme réalisé *in vitro* nous constatons que, les souches bactériennes testées exercent à des degrés variables des effets antagonistes vis-à-vis des trois isolats fongiques utilisés, à savoir Fol, Foa et Fog. Cette variabilité n'est pas spécifique, elle dépend des souches bactériennes qui dépendent elles-mêmes des milieux de cultures, des isolats cryptogamiques et la méthode de l'ensemencement des souches bactériennes (spots et traits).

Les meilleurs taux d'inhibition sont enregistrés sur le milieu B de King qui favorise l'activité inhibitrice des deux souches contre les champignons (Foa, Fog et Fol) et qui est considéré comme sélectif pour les *Pseudomonas spp fluorescents*. Cette activité antifongique pourrait s'associer à l'implication de sidérophores. La diffusion de ses molécules a accentué le déficit en fer au voisinage de la colonie bactérienne, en conduisant à l'inhibition de la croissance mycélienne à sa proximité. Les mêmes résultats sont signalés par Albouvette *et al.* (1998)

Leaong (1986) et Weller(1988) rapportent qu'en fixant les ions Fe III, les sidérophores limiteraient sa disponibilité pour le pathogène et par conséquent la suppression de leur croissance. Les phythopathogènes sont sensibles à la suppression par les sidérophores. De plus Weller et Cook(1983) avaient auparavant rapporté, que malgré l'importance de la production des sidérophores dans le biocontrôle, ce n'est probablement pas le seul mécanisme impliqué dans l'antagonisme.

De plus Sneh et *al.* (1984) ont signalé une corrélation entre l'intensité de la synthèse de sidérophores par *Pseudomonas fluorescens in vitro* et son aptitude à réduire la germination des chlamydospores de *Fusarium* dans le sol.

En plus, de la suppression de *Fusarium oxysporum*, les sidérophores sont aussi suppressifs vis -à -vis de *Gaeumannomyces graminis var. tritici* (Leong, 1986 ; Weller, 1988) et de *Pythium spp* (Weller, 1988).

La différence d'intensité du pouvoir inhibiteur de nos souches (A8 et CH3) pourrait être liée à la nature et la quantité de substances sécrétées. Plusieurs types de pigments sont mentionnés dans la littérature telles que : la pyoverdine (Turfreeijer, 1942 ; Bossier et *al.*, 1988 ; Iswandi,1986,la pseudobactine (Kloepper et *al.*,1980).

Sur le milieu PDA, les taux d'inhibition enregistrés sont nettement inférieurs à ceux obtenus sur milieu King B .Cela peut être expliqué par le fait que les deux souches ne produisent pas suffisamment se pyoverdines (pigment fluorescent) sur ce milieu de culture. Nos résultats concordent avec ceux de Benchabane et *al.* (2000) qui signalent que les milieux PDA et PDA +KB ne favorisant pas la production du pigment fluorescent, les souches bactériennes se caractérisent par des activités antagonistes notables.

Cependant la présence d'activité inhibitrice dans le milieu PDA suggère que l'antagonisme n'est pas dû uniquement à l'action des sidérophores, mais à d'autres mécanismes développés par la bactérie, telle que la compétition pour les éléments nutritifs ou l'antibiose.

Selon plusieurs auteurs les activités antagonistes peuvent être attribuées à la synthèse d'antibiotique et à d'autre type de métabolites secondaires à effet d'antibiose (Digat et Gardan,1987 ; Lemanceau et *al.*,1988 ; Fuchs et Défago, 1991 ; Keel et Défago, 1991 ; Défago, 1993 ; Digat,1992 ; Keel et *al.*,1992 ;Whipps et Lymssen, 2001) et à la compétition pour les nutriments et pour l'espace (Bloemerg et Lugtenberg, 2001 ; Jetyanon et Kloepper, 2002; Persello-Cartieaux et *al.*,2003).

Les métabolites sécrétés par la bactérie peuvent agir sur le champignon phytopathogène comme fongistatique, inhibiteur de la germination, fongicide ou en lysant le mycélium (Gloud, 1990). Selon Vining (1990), la production de ces métabolites secondaires s'effectue durant la phase stationnaire de la bactérie.

Nous avons également remarqué la présence de deux types de zones d'inhibition, celle présentant un aspect net et bien défini ou alors mal délimité et progressif. En effet, la souche bactérienne CH3 forme des zones bien délimitées, alors que la souche A8 induit des zones diffuses. Cette différence peut être expliquée par la qualité des molécules produites dans le milieu et ayant des modes d'action différents vis-à-vis des pathogènes.

Il est à noter que les souches bactériennes A8 et CH3 isolées à partir de la rhizosphère de chêne liège qui sont impliquées contre des champignons affectant différentes plantes (tomate, blé et palmier dattier), nous avons enregistré un effet antagoniste de ces bactéries vis-à-vis de Foa, Fol et Fog. Cependant Haas et Défago (2005) ont rapporté que l'origine rhizosphérique des isolats de *Pseudomonas* ne semble pas jouer un rôle dans leur pouvoir antagoniste *in vitro*. Ainsi, les isolats provenant de la rhizosphère de la pomme de terre ont présenté un antagonisme diversifié vis-à-vis des champignons, affectant d'autres plantes et provenant d'autres biotopes exemple le Foa.

En comparaison avec les résultats des travaux précédents (Kaci-moussa et Zarrouki, 2013), nous avons constaté une variabilité de l'activité antagoniste vis-à-vis de *Fusarium oxysporum albedinis* et *Fusarium oxysporum lycopersici*.

Selon le travail de Fuchs (1994) effectué sur la fusariose vasculaire de la tomate et la pourriture noire des racines de concombre, divers paramètres influencent l'action des antagonistes : le milieu de culture utilisé pour la production de l'inoculant, le moment de l'adjonction et la quantité des antagonistes utilisés et le système de production.

Bien que certains auteurs annoncent qu'il n'y a aucune corrélation entre l'antagonisme *in vitro* et le contrôle des maladies des plantes *in vivo* (Barnett *et al.*, 1999) ; d'autres chercheurs ont montré clairement qu'une zone d'inhibition supérieure ou égale à 13 mm constitue un très bon critère pour l'isolement *in vitro* des bactéries antagonistes (Xu et Gross, 1986 ; Boudyach *et al.*, 2001 ; Boudyach *et al.*, 2004). Selon ce critère, nos souches ne peuvent pas être soumises à la sélection *in vitro* pour être appliqué *in vivo*, puisque les zones d'inhibitions enregistrées sont faibles et inférieures à 13 mm.

Conclusion

Le contrôle biologique des maladies dues à des pathogènes du sol, par l'introduction des microorganismes bénéfiques dans la rhizosphère a été proposé comme une alternative à l'utilisation des substances chimiques. Certaines bactéries associées aux plantes particulièrement les *Pseudomonas* spp. fluorescents sont connus depuis longtemps pour leur aptitude à réduire l'incidence des maladies tellurique dans certains champs, ainsi qu'à inhiber la croissance d'un grand nombre d'agents phytopathogènes *in vitro*.

Les isollements réalisés à partir d'un échantillon de sol rhizosphérique d'une essence forestière (le cèdre) de la région de Chrea, a permis d'identifier quatorze souches, qui sont tous des Gram⁺, donc ces bactéries ne sont pas des *pseudomonas* spp. fluorescents.

La caractérisation morphologique et biochimique a permis de confirmer que les deux souches testées sont du groupe *Pseudomonas* spp. fluorescents, en révélant une certaine stabilité en comparaison avec les résultats trouvés par (Kaci moussa et Zarrouki, 2013).

Les résultats du test d'antagonisme *in vitro*, ont montré des effets antagonistes des souches bactériennes testées (CH3 et A8). Ces dernières sont considérées inhibitrices des agents fongiques *Fusarium oxysporum albedinis*, *Fusarium oxysporum lycopersici* et *Fusarium oxysporum graminearum*. En enregistrant des taux d'inhibition supérieurs ou égaux 20 %.

A travers les résultats obtenus, nous avons remarqué un effet notable du milieu sur l'activité antagoniste des deux souches bactériennes. Ce qui a été confirmé par l'analyse de la variance qui montrent que la probabilité calculée pour le facteur milieu est de $P=0,0005$ nettement inférieure au seuil $\alpha = 0,05$, ce qui signifie qu'il y a une différence hautement significative.

L'activité antagoniste a été plus marquée sur milieu King B avec des taux d'inhibition de 62,46% alors que sur le milieu PDA 27,68%, les souches testées sont moins actives.

Cette activité inhibitrice des souches bactériennes sur milieu King B peut être justifiée par la capacité de ces souches à produire les sidérophores dans un milieu carencé en fer tel que le milieu King B.

Ces mêmes souches ont enregistrées également des activités inhibitrices. Sur milieu PDA, cette activité peut être liée à l'implication d'autres mécanismes à effet toxique tel que la production d'antibiotique ...etc.

L'instabilité dans la reproductibilité des résultats laisse suggérer un complément de test *in vitro* pour mieux sélectionner les souches bénéfiques.

Vu les conditions de notre expérimentation, il est difficile de se prononcer sur les vrais potentialités de chaque souche bactérienne, cependant il est souhaitable et judicieux de les expérimenter dans des conditions variables et plus contrôlées.

Etant donné que la sélection *in vitro*, des souches bénéfiques œuvre dans une perspective de localiser, celles réunissant le maximum de mécanismes d'inhibition des pathogènes, l'antagonisme *in vitro* ne peut pas à lui seul s'imposer comme le critère fondamental de sélection; ceci est dû à l'expression de l'antagonisme qui est variable selon les milieux de culture et les pathogènes ciblés. Il faut approfondir les investigations par d'autres tests et caractérisations, afin de réaliser un criblage efficace permettant la sélection de souches performantes.

Références bibliographiques

ABO-ELYOUSR K. A., HASHEM M ET ALI E. H., 2009. Integrated control of cotton root rot disease by mixing fungal biocontrol agents and resistance inducers. *Crop Protection*, **28(4)** : 295-301.

Adam A., 2008. Elicitation de la résistance systémique induite chez la tomate et le concombre et activation de la voie de la lipoxygénase par des rhizobactéries non-pathogènes. Thèse de Doctorat, Université de Liège. Belgique. 165p.

Agrios G.N., 1988. plant pathology. 3ed. Ed. Academic press. Inc. England, 388P.

ALI S.K ., SANDAHYA M., GROVER N., KISHORE, L.V ET RAO B., VENKATESWARDLU., 2009. *Pseudomonas spp.* strain AKM-P6 enhance of sorghum seedlings to elevated temperatures . *Biol. Fert. Soils*. **46** :45-55.

ALLAIRE M., 2005. Diversité fonctionnelle des *Pseudomonas* producteurs d'antibiotiques dans les rhizosphères de conifères pépinière et en milieu naturel. Thèse de Doctorat . QUEBEC, 32p.

AMKRAZ N., BOUDYACH E. H., BOUBAKER H., BOUIZGARNE B., AIT BEN AOUMAR A., 2010. Screening for *fluorescent pseudomonades*, isolated from the rhizosphere of tomato, for antagonistic activity toward *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*. *World J. Microbiol. Biotechnol.* **26** (6): 1059-1065.

ANCHISI M., GENNARI M., ET MATTA A., 1985. Retardation of Fusarium Wilt symptoms in tomato by pre-and post-inoculation treatments of the roots and aerial parts of the host in hot Water. *Physiological plant pathology*. **26**:175-183.

ANDRÉS J. A., ROVERA M., GUIÑAZÚ L. B., PASTOR N. A., ROSAS S. B., 2011. Role of *Pseudomonas aurantiaca* in Crop Improvement. In *Bacteria in Agrobiology: Plant Growth Responses* (pp. 107-122). Springer Berlin Heidelberg.

ANITHA A., ARUN DAS M., 2011. Activation of rice plant growth against *Rhizoctonia solani* using *Pseudomonas fluorescens*, *Trichoderma* and Salicylic Acid. *Research in Biotechnology*, **2(4)** : 7-12.

ANONYME 01 : www.scienceclarified.com

ANONYME 03: <http://www.arvalisinstitutduvegetal.fr/fr>

ANONYME02 : <http://archive2013.ministère de l'agriculture/économie/algérie/html>.

AQUILONI L., GHERARDI F., 2010. The use of sex pheromones for the control of invasive populations of the crayfish *Procambarus clarkia*: a field study. *Hydrobiologia*, 649, 249-254.

ARBAOUI M., 1984. Essai d'utilisation de vibration électronique et manuelle pour l'élimination de la fécondité de la tomate *lycopersicum esculentum* non chauffée, thèse d'ingénieur en agronomie, INA. 56P.

ARIMA H., ASHIDA H., DANNO G., 2002. Rutin-enhanced antibacterial activities of flavonoids against *Bacillus cereus* and *Salmonella enteritidis*. *Biosci Biotechnol Biochem.* **66**:1009–1014.

ARIMA, H., ASHIDA, H., DANNO, G., 2002. Rutin-enhanced antibacterial activities of flavonoids against *Bacillus cereus* and *Salmonella enteritidis*. *Biosci Biotechnol Biochem.* **66**:1009–1014.

ARMSTRONG G.N., ET ARMSTRONG J.K., 1981. Formae specialis and races of *Fusarium oxysporum* causing wilt diseases, P. 391-399. In P.E.Nelson, T.A.Tousoun, and R.J.Cook(ed), *Fusarium: diseases, biology, and taxonomy* Pennsylvania state university press, University park. associations and DON contamination in commercial winter wheat varieties. *European.*

ARMSTRONG GN ., ARMSRONG J.K., 1981. Formae specialis and races of *Fusarium oxysporum* causing wilt diseases, P. 391-399. In P.E.Nelson, T.A.Tousoun, and R.J.Cook(ed), *Fusarium: diseases, biology, and taxonomy* Pennsylvania state university press, University park. associations and DON contamination in commercial winter wheat varieties. *European.*

ARSENIUK E., FOREMSKA E., GORAL T., CHELKOWSKIJ., 1999. *Fusarium* head blight reactions and accumulation of deoxynivalenol (DON) and some of its derivatives in kernels of wheat, triticale and rye. *Journal of Phytopathology* **147**, 577-590.

ASKELAND R.A., MORISSON S.M., 1983. Cyanide production by *Pseudomonas fluorescens* and *Pseudomonas aeruginosa*. *Appl. Environ. Microbiol.* **45**:1802-1807.

BAHME J.B., SCHORT M.N., 1987. Spatial-temporal colonization of a rhizobacterium organs of potato. *Phytopathology*. **77**:1093-1100.

BAI G., SHANER G., 1994. Scab of wheat: Prospects for control. *Plant Disease* **78**, 760–766.

Bakker P.A.H.M., Ran L.X., Pieterse C.M.J., Van Loon L.C. ,2003. Understanding the involvement of rhizobacteria – mediated induction of systemic resistance in biocontrol of plant diseases. *Can.J.Plant.Pathol.* 25:5-9.

Bakker PAHM., Pieters CMJ., Van Loon L.C., 2007 .Induced systemic resistance by *fluorescent Pseudomonas spp*, *Phytopathology*.N 97:234-243

BAKKER P.A.H.M., LAMERS J.G., BAKKER A .W., MARUGG J.D., WEISKEEB P.J., SCHIPPERS B.,1986.The role of siderophore in potato tuber yeild increase by *Pseudomonas putida* in short of potato.*Neth .J.Plant.Pathol.*92 :249-256.

BAKKER, P.A.H.M.,RAN, L.X.,PIETERSE, C.M.J., VAN LOON, L.C. 2003. Understanding the involvement of rhizobacteria – mediated induction of systemic resistance in biocontrol of plant diseases. *Can.J.Plant.Pathol.* 25:5-9.

BARDAS G. A., LAGOPODI A. L., KADOGLIDOU K ET TZAVELLA-KLONARI K., 2009. Biological control of three *Colletotrichum lindemuthianum* races using *Pseudomonas chlororaphis* PCL1391 and *Pseudomonas fluorescens* WCS365. *Biological Control*, 49(2), 139-145.

BARNA B., SARHAN ART., KIRALY Z., 1983. The influence of nitrogen nutrition on the sensitivity of tomato plants to culture filtrates of *Fusarium* and to Fusaric acid.*physiological plant pathology*. 23,PP-263.

BARNETT S. J., SINGLETON I ET RYDER M., 1999. Spatial variation in population of *Pseudomonas Corrugata* 2140 and *Pseudomonads* on take-all diseased and healthy root systems of wheat. *Soil Biol. Biochem.* 31:633–636.

BATEMAN G. L., 1979. Relationship between *Fusarium nivale* and other microorganisms on see of wheat and badey. *Tram Br. Mycol Soc.* 72 : 245-249.

BAYA B., ERSKINE W., 1988.Diseases of lentil.In :Allen, D.J. ;Lenne, J.J.The Pathology of Food and Pasture Legume.CAB International , pp.423-471.

Becker J.O. et Cook R.J., 1988. Role of siderophores in suppression of *Pythium* species and production of increased-growth response of wheat by *fluorescent Pseudomonads*. *Phytopathol.* 78:778–782.

BELL PERKINS L.J., LYNCH J.M., 2002. Encyclopedia of environmental microbiology, A Wiley-Interscience Publication , Canada .Rhizosphere microbiology In.G.Bitton (ed), 2713-2728

Bell-PERKINS L., J ET J.M. LYNCH., 2002. Rhizosphere microbiology, p. 2713-2728. In G. Bitton (ed.), Encyclopedia of environmental microbiology, A Wiley-Interscience Publication, Canada.

BENCHABANE M., BAKOUR R., TOUA D ET BOUTEKRABT A., 2000. Mise en évidence de l'effet antagoniste de *Pseudomonas fluorescens* vis-à-vis de la fusariose vasculaire de la tomate .Bulletin OEPPL/EPPO.Bulletin **30**, 243-246.

BENCHABANE M., 2005. Caractérisation des effets d'antagoniste microbien et la promotion de la croissance végétale de souches de *Pseudomonas spp.fluorescens* .Thèse Doctorat d'état,FSB-UTHB ,Alger.235pp.

BENZIRI E., BOUDOIN E., DI BATTISTA-LEBOEUF C AND GUCKERT A., 2001. Des bactéries pour la santé des plantes .*Biofutur* Vol.210.52-56.

BISWAS J.C., LADHA J.K., DAZZO F.B ., YANNI Y.G ET ROLFE B.G., 2000 .Rhizobial inoculation influences seedling vigor and yeild of rice .Agron. J.N°92 :880-886.

BITTER W., MARUG L.A., TOMMSEN J. , WEISBEEK P.J., 1991.The ferric – pseudobactine respect Pup a of *Pseudomonas putida* WCS358 :homology to Ton B-dependent *Escherichia coli* receptors and specificity of the protein .Mol.Microbiol.5 :647-655.

BLOEMBERG G. AND LUGTENBERG B., 2001. molecular basis of plant growth promotion and biocontrol by rhizobacteria. *Cur. Opin. Plant Biol.* **4**: 343-350.

BLUMER C., HAAS D., 2000. Mechanism, regulation, and ecological role of bacterial cyanide biosynthesis. *Arch.Microbiol.*173 :170-177.

BOOTH C., 1971. The genus *Fusarium*, P. 237. Commonwealth Mycological institute, Kew, Surrey, England.*Breeding* **116**, 201-220 .

BOSSIER P., HOFTE M., VERSTRAETE W., 1988. Ecologicam significance of siderophores in soil. *Adv. Microb. Ecol.*, 10, PP. 385-414.

BOSSIS E., LEMANCEAU P., LATOUR X ET GARDAN, L., 2000.The taxonomy of *Pseudomonas fluorescens* and *Pseudomonas putida*: current status and need for revision. *Agronomie* .**20**: 51-63.

BOSSIS E., LEMANCEAU P., LATOUR X., GARDAN L., 2000. The taxonomy of *Pseudomonas fluorescens* and *Pseudomonas putida*: current status and need for revision. *Agronomie* .**20**: 51-63.

BOUAMRA, F., 1992.Activité antagoniste chez les *Pseudomonas fluorescens* en lutte biologique vis-à-vis du *Fusarium oxysporum* f sp lycopersici sur tomate cultivée sous serre .Thèse Ing Etat, INES Blida .69p.

BOUDYACH E. H., FATMI M., AKHAYAT O., BENIZRI E., AIT BEN AOUMAR A., 2001. Selection of antagonistic bacteria of *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* and evaluation of their efficiency against bacterial canker of tomato. *Biocontrol. Sci. Tech.* **11**: 141–149.

BOUDYACH E. H., FATMI M., BOUBAKER H., AIT BEN AOUMAR A., AKHAYAT O., 2004. Effectiveness of fluorescent *Pseudomonads* strains HF 22 and HF 142 to control bacterial canker of tomato. *J. Food. Agr. Environ.* 2 (3&4):115-120.

BOUDYAH E. H., 2004. Lutte biologique contre le chancre bactérien de la tomate : sélection des bactéries antagonistes à *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* et évaluation de leur efficacité dans le contrôle du chancre bactérien. Thèse D'état Essciences. Option phytopathologie. Faculté des sciences d'Agadir, Maroc. pp134.

BOUIZGARNE B., BRAULT M., PENNARUN M., RONA J.P., OUHDOUCH Y., EL HADRAMI I ET BOUTEAU F., 2004. Electrophysiological response to fusaric acid of root hairs from seedlings of date palm susceptible and resistant to *Fusarium oxysporum* f. sp. *albedinis*. *J. Phytopathol.* **152**: 321-324.

BOUNAGA N.,1975. Germination de microconidies et macroconidies de *Fusarium oxysporum* f.sp. *albedinis*. Bulletin de la Société d'Histoire Naturelle d'Afrique du Nord, **66** : 39-44.

BOUZERDA L., BOUBAKER H., BOUDYACH E. H., AKHAYAT O ET AIT BEN AOUMAR A., 2003.Selection of antagonistic yeasts to green mold disease of citrus in Morocco. *Journal of Food Agriculture and Environment*, 1, 215-218.

BROCHARD P., DUBOST D., 1970. Progression du bayoud dans la palmeraie d'In salah. *El Awamia.* **35** :143-153..

BULIT J., BOUHOT D., LOUVET J., TOUTAIN G., 1967.Recherches sur les fusarioses. Travaux sur le Bayoud fusariose vasculaire du palmier dattier en Afrique du Nord. *Annales des Epiphyties.* **18** : 213-239.

CAMPBELL J.I.A., JACOBSEN C.S. AND SORENSEN J., 1995. Species variation and plasmid incidence among *fluorescent Pseudomonas* strains isolated from agricultural and industrial soils. *FEMS. Microbiol. Ecol.* 18: 51-62.

Causse, M., Caranta, C., Saliba-Colombani,V., Morreti, A., Damidaux, R ., Rousselle p. 2000. Valorisation des ressources génétique de la tomate par l'utilisation de marqueurs moléculaires. *Cahiers Agricultures* .9:197-210.

CHAUX C ., FOURY C., 1994. Production légumières tome 3, Légumineuses potageres, légumes fruits. Edition Tec & Doc, Paris, Lavoisier, 1994, P. 125-153.

CHRIST DS., GÖDECKE R., VON TIEDEMANN A ET VARRELMANN M., 2011. Pathogenicity, symptom Codyy S., Gross D.C., 1987. Characterization of pyoverdine pss the fluorescent siderophore produced by *Pseudomonas syringae* pv. *syringae*. *APPL.ENV.MICROBIOL.* 53:928-934.

COMPANT S., CLEMENT C ET SESSITSCH A., 2010. Plant growth promoting rhizobacteria in the rhizo and endosphere of plants: their role, colonization, mechanisms involved and prospects for utilization. *Soil Biol. Biochem.* 42: 669-678.

COOK R. J., SITTON J.W ET HAGLUND W.A ., 1987. Increased growth and yield responses of wheat to reductions in the *Pythium* population by soil treatments. *Phytopathology* 77, 1192-1198

Cook T., 1993. The Concept of Archival Fonds and the Post-Custodial Era: Theory, Problems and Solutions. *Archivaria* 35 (Spring 1993), p. 24–37.

COX C.D., RINEHART K.L., MOORE M.L ET COOK J.C., 1981. Pyochelin: novel structure of an iron-chelating growth promoter from *Pseudomonas aeruginosa*. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA.* 78: 302-308.

DE SALAMONE G.I.E., HYNES R.K. ET NELSON L.N., 2001. Cytokinin production by plant growth promoting rhizobacteria and selected mutants. *Can. J. Microbiol.*, 47: 103-113.

DE SOUZA J.T., WELLER D.M. ET RAAIJMAKERS J.M., 2003. Effect of 2, 4 diacetylphloroglucinol on *Pythium*: cellular responses and variation in sensitivity among propagules and species. *Phytopathol.* 93: 966–975.

De Weger L.A., Dekkers L.C., van der Bij A.J. et Lugtenberg B.L.L., 1994. Use of phosphate-reporter bacteria to study phosphate limitation in the rhizosphere and in bulk soil. *Mol. Plant-Microbe Interact.* **7**: 32-38.

DE WEGER L.A., LUGTENBERG J.J. 1990. Plant growth stimulating rhizobacteria. In: Proceedings of the 6th International Symposium on Genetics of Industrial Microorganisms. Heslot, H., Bobichon, L., Durand, G., and Penasse, L., (ed.). Vol.2. société Française de Microbiologie, Paris, pp. 827-837.

DE WEGER, L.A., LUGTENBERG, J.J. 1990. Plant growth stimulating rhizobacteria. In: Proceedings of the 6th International Symposium on Genetics of Industrial Microorganisms. Heslot, H., Bobichon, L., Durand, G., and Penasse, L., (ed.). Vol.2. société Française de Microbiologie, Paris, pp. 827-837.

DEFAGO G., 1993. 2, 4-Diacetylphloroglucinol, a promising compound in biocontrol. *Plant Pathol.* **42**: 311–312.

DÉFAGO G., BERLING C.H ET BURGER U., 1990. Suppression of Black Root Rot of Tobacco and Other Root Diseases by Strains of *Pseudomonas fluorescens*: Potential Applications and Mechanisms. In: Biological Control of Soilborne Plant Pathogens. Hornby D, (ed). Oxon, UK: CAB International, Wellingford, pp. 93–108.

Desjardins A. E., 2003. Annual Review of Phytopathology, Volume 41 , Pages 177-198.

DIGAT B., GARDEN L., 1987. Caractérisation, variabilité et sélection des souches bénéfique de *Pseudomonas fluorescens* et *putida*. *Bull. OEPP/EPPO*. **17** :559-568

DIGAT B., 1983. Modes d'actions et effet des rhizobacteries promotrices de la croissance et du développement des plantes. 24^{eme} colloque de la société française de phytopathologie, Bordeaux. Edit. INRA publ. Coll. INRA. **18**: 239-253.

DIGAT B., 1992. Contrôle biologique et stimulation de la germination par la bactérisation. *Phytoma-D Défense des végétaux* **441**:34-38.

DIGAT B., GAUDILLAT, M ET LARADIE J.M., 1990 .Susceptibility of various tomato and lettuce genotype to plant growth promoting *Pseudomonas* .*Symbiosis*. **N°9** :96-98

DJERBI M., 1982. Bayoud disease in North Africa: history distribution, diagnosis and control. *Date Palm Journal*. **1**: 153-197.

- DUBOST D., 1972.** The Bayoud disease in Algeria, history and diagnosis. In: Proceedings of the First Electrophysiological response to fusaric acid of root hairs from seedlings of date palm susceptible f. sp. *albedinis*, agent causal du Bayoud. Marrakech: Diplôme des Etudes Supérieures, Université de Marrakech, 196 p.
- DUFFY B.K ET G. DÉFAGO ., 1999.** Environemental factors modulating antibiotic and sidérophores biosynthesis by *Pseudomonas fluorescens* biocontrol strains .Appl.Environ. Microbiol.**65** :2429-2438.
- ELAD Y., BAKER R ., 1985.** The role of competition for ion and carbon in suppression of chlamydospore germination of *Fusarium* spp. By *Pseudomonas* spp. phytopathol.**75**-1053-1 059.
- ELAD Y., CHET I ET BAKER R ., 1987 .** Increased growth response of plants induced by rhizobacteria antagonistic to soilborne fungi. Plant Soil **98**, 325-330
- Elliott L.F. Stroo, H.F et Papendick. R.I., 1988 .**Growth, survival and toxin production of root inhibitory *Pseudomonas* crop residues SOIL.BIOL.BIOCHEM.**20**: 201 -207.
- ELLIOTT L.F., FREDERICKSON J.K., 1985.** Effects on winter wheat seedlings growth by toxinproducing rhizobacteria. Plant and Sou. **83**: 399-409.
- EMERY T., 1965.** Isolation, Characterization, and proprieties of fusarinine, a hydroxanic acide-derivative of ornithine .Biochemistry.**4** :1410-1417.
- FARM CHEMICAL INTERNATIONALS, 2010.** Biological pesticide on the rise, www.farmchemicalsinternational.com/uncategorized/biological-pesticides-on-the-rise/, (03.02.14).
- FERNANDEZ M., LOURD M., OUINTEN M., TANTAOUI A., GEIGER JP., 1995** Le Bayoud du palmier dattier, une maladie qui menace la phoeniciculture. Phytoma **469**: 36-39.
- Fernando W.G.D., Ramarathnam R., Akkanas, Krishnamoorthy S ET Savchuk S. C., 2005.** Identification and use of potential bacterial organic antifungal volatiles in biocontrol. Soil Bio.Biochem. **37**: 955–964
- Ferrero M., 2009.** Etude de la variabilité des comportements alimentaires des prédateurs et conséquence pour la lutte biologique. Thèse doctorat. Montpellier SupAgro, 228p.
- Fravel D. R., 2005.** Commercialization and implementation of biocontrol. Annu. Rev. Phytopathol. **43**:337-359.

Fuchs J., Defago G., 1991. Protection of tomatoes against *Fusarium oxysporum* f.sp.*Lycopersici* by combining a non pathogenic *Fusarium* with different bacteria in untread soil. In Plant Growth-Promoting Rhizobacteria Progress d Prospects(eds keel C., Koller B and Defago G.), PP.51-56. Bulletin OILB/SROP XIV/8.

GALLAIS A. ET BANNEROT H., 1992. Amélioration des espèces végétales cultivées objectif et sélection .INRA, Paris.765p.

GANDHI A., SARAVANAKUMAR K., 2009. Studies on shelf life of Azospirillum lipoferum, Bacillus megaterium and Pseudomonas fluorescens in vermicompost carrier. J Phytol.1(2):100-107.

GARBAYE J., 1994. Helper bacteria: a new dimension to the myccorhizal symbiosis. New Phytol. 128: 197-210.

GARDAN L., LUISETTI G., 1981. Méthodes d'isolement et identification des bactéries phytophagènes. Station de pathologie INRA. Angers, 32.

GARDNER J.M., CHANDLER J.L., FELDMAN A.W., 1984 .Growth promotion and inhibition by antibiotic producing *fluorescent Pseudomonads* on citrus roots. Plant Soil .77, 103-119.

GLOUD W. D., 1990. Biological control of plant root diseases by bacteria. In: Nakas, J.P., Hagedorn, C. Biotechnology of plant-microbe interaction. Ed. Mc Graw- Hill, New York, USA, PP. 287-317.

GRAY E.J., SMITH D.L., 2005 .Intracellular and extracellular PGPR:commonalities and distinctions in the plant-bacterium signaling processes.Soil Biol .Biochem.37 :395-412.

HAAS D ., DÉFAGO G., 2005. Biological control of soil-borne pathogens by *fluorescent Pseudomonas*. Nat. Rev. Microbiol. 3: 307–319.

HAAS D., GALIMAND M., GAMPER M ET ZIMMERMANN A., 1990. Arginine network of *Pseudomonas aeruginosa*: Specific and global controls. In: *Pseudomonas* Biotransformations, Pathogenesis, and Evolving Biotechnology (S Silver, AM Chakrabarty, Bglewski, S Kaplan. ed. Am. Soc. Microbiol, Washington, DC, pp. 303-313.

HAAS D., GALIMAND M., GAMPER, M. et ZIMMERMANN A., 1990. Arginine network of *Pseudomonas aeruginosa*: Specific and global controls. In: *Pseudomonas*

Biotransformations, Pathogenesis, and Evolving Biotechnology (S Silver, AM Chakrabarty, Biglewski, S Kaplan, ed), Am. Soc. Microbiol, Washington, DC, pp. 303-313.

HAAS D., KEEL C et LAVILLE J .,1991.Secondry metabolites of *Pseudomonas fluorescents* strain CHA0 involved in the suppression of root diseases.In :Hennecke, H., Verma, D.P.S. Advances in molecular genetics of plant-microbe interactions.Ed. Dordrecht, Kluwer Academic Publishers, pp.450-456.

HAAS D., KEEL C., 2003. Regulation of antibiotic production in rootcolonizing *Pseudomonas* spp. and relevance for biological control of plant disease. *Annu. Rev. Phytopathol.* **41**:117–153.

HAMMER P.E., HILL D .S., LAM S.T., VAN PEE K.H ET LIGON J.M.,1997. Four genes from *Pseudomonas fluorescens* that encode the biosynthesis of pyrrolnitrin. *Appl. Environ. Microbiol.* **63**:2147-2154.

HARMAN G.E., HOWELL C.R., VITERBO A., CHET I ET LORITO M., 2004. Trichoderma species: opportunistic, avirulent plant symbionts. *Nat. Rev. Microbiol.* **2**:43–56.

HENNI J.E., 1989. Morphologie, pouvoir pathogene et diversité génétique chez *Fusarium oxysporum* F .SP.*Lycopersici*. Thèse de doctorat. Université d’Oran, 172p.

HERNANDEZ-LUCAS C., ROYO J., PAZ-ARES J., PONZ F., GARCIA-OLMEDO F ET CARBONERO, P., 1986. Polyadenylation site heterogeneity in mRNA encoding the precursor of the barley toxin a-hordothionin. *FEBS Lett.* **200**: 103-105.

HILDEBRAND D.C., SCHORTH M.N ET SAND D.C.,1988. *Pseudomonas* spp 60-77.In Shaad, N.W.E.D.Laboratory guide for identification of plant pathogène bactéria .2nd .ST. Pael. Minnosota. PPS.

HÖFLE M.G., 1990. Transfer RNAs as genotypic fingerprints of eubacteria. *Arch. Microbiol.* **153**: 299–304.

HÖFTE M., DE VOS P., 2006. Plant pathogenic *Pseudomonas* species. In: Plant-associated bacteria. Part. 3, Gnanamanickam, S.S. (Eds). Springer, Netherlands, pp. 507-533.

HÖFTE M., ALTIER G., 2010. Identification of bacteria by low molecular weight RNA profiles: a new chemotaxonomic approach. *J. Microbiol. Meth.* **8**: 235– 248.

- HÖGBERG P., NORDGREN A., BUCHMANN N., TAYLOR A.F.S., EKBLAD A., HOGBERG M.N., NYBERG G., OTTOSSON-LÖFVENIUS M ET READ D.J., 2001.** Large-scale forest girdling shows that current photosynthesis drives soil respiration. *Nature*. **411**: 789-792.
- HOLT J.G., KRIEG N.R., SNEATH P.H.A., STALEY J.T. AND WILLIAMS S.T., 1994.** Genus *Pseudomonas*. In: Holt, J.G.; Krieg, N.R.; Sneath, P.H.A; Staley, J.T.; Williams, S.T. (Eds) *Bergey's manual of determinative bacteriology*. Microbiol. Meth. **2**:296..
- HOWELL C.R ET STIPANOVIC, R.D., 1980.** Suppression of *Pythium ultimum*-induced damping-off of cotton seedling by *Pseudomonas fluorescens* and its antibiotic, Pyoluteorin. *Phytopathol*. **70**: 712-715.
- ISWANDI A., 1986.** Seed inoculation with *Pseudomonas spp* . thesis submitted in fulfillment of the degree of doctor in agricultural sciences. state University of Gent., 145 p.
- Jetiyanon J., Klopper J.W.,2002.** Mixture of plant growth-promoting rhizobacteria for induction of systemic resistance against multiple plant diseases. *Biol. Control* **24**:285-291.
- JEUNOT B., 2005.** Les fusariotoxines sur les céréales détection, risque et nouvelle réglementation. Thèse Doctorat. NANCY I, 125p.
- JI P., CAMPBELL H.L., KLOEPPER J.W., JONES J.B., SUSLOW T.VET WILSON M. 2006.** Integrated biological control of bacterial speck and spot of tomato under field conditions using foliar biological control agents and plant growth-promoting rhizobacteria. *Biol. Control*. **36**(3):358-367.
- JONES J.B., STALL R.E ET ZITTERT.A., 1991.** Compendium of tomato diseases. American phytopathological society, St Paul, MN. P.15. Jonsthorpe, A., Booth, C. 1983. *Plant pathologist's pocket book*. 2nd. Commonwealth Mycological Institute, Kew, Surrey, England, 439.
- KACI MOUSSA F., ZERROUKI K., 2013.** Identification préliminaire de quelques souches de *Pseudomonas spp.* fluorescents isolées à partir de la rhizosphère de deux essences forestières le chêne liège et le cèdre . Mémoire d'ingénieur d'état en sciences agronomiques . Université de Mouloud Mammeri de Tizi ouzou, 62P.

- KAMILOVA F., VALIDOV S., AZAROVA T., MULDER I ET LUGTENBERG, B., 2009.** Enrichment for enhanced competitive plant root tip colonizers selects for a new class of biocontrol bacteria. *Environ. Microbiol.* 7: 1809-1817.
- KARNWAL A., 2009.** Production of indole acetic acid by fluorescent pseudomonas in the presence of l-tryptophan and rice root exudates. *J. Plant Pathol.* 91 (1): 61-63.
- KATAN T., SHLEVIN E. J.1997.** Sporulation of *Fusarium oxysporum*. *Sp.lycopersici* on stem surfaces of tomato plants and aerial dissemination of inoculums.*Phytopathology*.87: 712-719.
- KEEL C., SCHIUDER U., MAURHOFFER M., VOISARD C., LAVILLE J., BURGERU., DÉFAGO, G., 1992.** Suppression of Root Diseases by *Pseudomonas fluorescens* CHAO: Importance of the Bacterial Secondary Metabolite 2, 4-Diacetylphloroglucinol. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 5(1): 4-13.
- KEEL C.,MAURHOFFER M., OBERLHANSLI T.H., VOISARD C., HAAS, D ET DEFAGO C. 1991.**Role of 2,4- diacetylphloroglucinol in the suppression of take-all of wheat by strain of *Pseudomonas fluorescens*. In: Biotic interactions and soil borne diseases .Rev. Agric. Managed Forest Ecol 23, Elsevier, Amsterdam, 335-338. *Symbiosis* 9:327-341.
- KING E.D., WARD M.K. ET RANEY D.E., 1954.** Two simple media for the demonstration of pyocyanin and fluorescein. *J. Lab. Clin. Med.* 44: 301-307.
- KLOEPPER J. W., LEONG J., LEONG J., TETNTZE M et SCHROTH, M. N. 1980.** *Pseudomonas* siderophore: a mechanisin explaining disease – Suppressive soils. *Curr. Microbiol.*, 4, PP. 327- 330.
- KLOEPPER J.W. ET SCHROTH M.N., 1978.** Plant growth-promoting rhizobacteria on radishes. In: 4 th Int. Conf. Plant Pathogen. Bacteria. Angers France, 2: 879-882.
- KLOEPPER J.W., SCHROTH M.N., 1981** .Plant growth promoting rhizobacteria and plant growth under gnotobiotic conditions .*Phytopathology* .71 :642-664
- KOULLA L., SAAIDI M. 1985.** Etude du rôle des inflorescences et de fruits du palmier dattier dans la dissémination du Bayoud. Séminaire National sur l'Agronomie Saharienne, pp. 67-70. INRA, Marrakech, Morocco . *Lawsonia inermis* et de la luzerne *Medicago sativa* et quelques espèces de palmacées vis-à-vis du *Fusarium oxysporum* f.sp. *albedinis*,

agent causal du Bayoud. Annales de l'Institut National de la Recherche Agronomique de Tunisie, **58** : 1-11.

KRAFT J.M., HAWARE M.P., JJINENEZ-DIAZ R.M., BAYAA B ET HARRABI L., 1994. Screening techniques and sources of resistance to root rots and wilts in cool season food legumes. In: Muelbauer, F.G., Kaiser, W.J. Expanding the production and use of cool season food legumes. Ed. Kluwer academic publishers, Dordrecht. The Netherlands, PP. 268-289.

LARPENT J.P., 1975. Mémento technique de microbiologie. Ed : Perfectionnement industriel des cadres. 14p.

LATERROT H. PHILOUZE J. 1995. Origine et diversité de la tomate. INRA Mensuel, 81, pp.32-36.

LATOUR X., CORBERAND T., LAGUERRE G., ALLARD F ET LEMANCEAU P., 1996. The composition of fluorescent Pseudomonad populations associated with roots is influenced by plant and soil type. Appl. Environ. Microbiol. **62**: 2449-2456.

LATOUR X., DELORME S., MIRLEAU P ET LEMANCEAU P., 2009. Identification of traits implicated in the rhizosphere competence of *fluorescent Pseudomonads*: description of a strategy based on population and model strain studies. In: Sustainable agriculture. Part. 3, Lichtfouse, E., Navarrete, M., Debaeke, D., Souchère, V. and Alberola, C. (Eds). Springer, Netherlands, pp. 285-296.

LATOUR X., LEMANCEAU P., 1997. Carbon and energy metabolism of oxidase-positive saprophytic *fluorescent Pseudomonas* spp. Agronomie. **17**: 427-443.

LEE J.P., LEE S.W., KIM C.S., SON J.H., SONG J.H., LEE K.Y., KIM H.J., JUNG S.J. et MOON, B.J. 2006. Evaluation of formulations of *Bacillus licheniformis* for the biological control of tomato gray mold caused by Botrytis cinerea. Biol. Control. **37**(3):329-337.

LEMANCEAU P., 1992. Beneficial effects of rhizobacteria on plants : exemple of fluorescent *Pseudomonas* spp. Agronomie, **12**: 413-437.

LEMANCEAU P., 1996. The composition of fluorescent pseudomonad populations associated with root is influenced by plant and soil type. Appl. Microbiol. **10** : 369-382.

LEMANCEAU P., ALABOUVETTE C. AND ET COUTEAUDIER Y., 1988. Recherches sur la résistance des sols aux maladies, modification du niveau de réceptivité

d'un sol résistant et d'un sol sensible aux fusarioses vasculaires en réponse à des apports de fer ou de glucose. *Agronomie*, **8**: 155-162.

LEMANCEAU P., ALABOUVETTE C ET MEYER J. M. 1986. Production of fusarinine and iron assimilation by pathogenic and non –pathogenic *Fusarium*. In: *Iron siderophores and plant diseases*. T.R. Swinburn, ed.). Plenum Press, New York, 251-253.

LEMANCEAU P., ALABOUVETTE C., 1993. Suppression of *fusarium* wilts by fluorescent *Pseudomonas*: mechanism and application. *Biocontrol Sciences and Technology* .**3**: 219-234.

LEMANCEAU P., OFFREP., MOUGELC., GAMALEROE., DESSAUX Y., MOENNE-LOCCOZY Et BERTAG., 2009. Microbial ecology of the rhizosphere. In: Microbiological methods for assessing soil quality. Bloem, J., Hopkins, D.W. , Benedetti, A. (eds). CABI publishing, Massachusetts, Cambridge, MA, Etats-Unis, pp. 228-230.

LEONARD K.J., BUSHNELL W.R., 2003. *Fusarium* head blight of wheat and barley. St. Paul, U.S.A.: APS Press.**67**: 502-10.

LEONG J.,1986. Siderophore: Their biochemistry and possible role in the biocontrol of plant pathogens. *Annu. Rev. Phytopathol.* **24**: 187-208.

LEPOIVRE P., 2003. *Phytopathologie*: De Boeck.Ed.482p.

LIM H.S., KIM Y.S. ET KIMS.D., 1991. *Pseudomonas stutzeri* YPL-1 Genetic Transformation and Antifungal Mechanism against *Fusarium solani*, an Agent of Plant Root Rot. *Appl. Environ. Microbiol.* **57**(2): 510-516.

LIU B., QIAO H., HUANG L., BUCHENAUER H., HAN Q., KANG ET ., GONG, Y. 2009. Biological control of take-all in wheat by endophytic *Bacillus subtilis* E1R-j and potential mode of action. *Biological Control*, **49**(3), 277-285

LIU Q., SUZUKI K., NAKAJI S E T SUGAWARA K., 2000. Antioxidant activities of natural 9-cis and synthetic all –trans carotene assessed by human neutrophil chemiluminescence .Ed *Nutrition Research* .300p.

LOPER J.E., 1988. Role of fluorescent siderophore production in biological control of *Pythium ultimum* by a *Pseudomonas fluorescens* strain. *Phytopathol.***78**:166–172.

LOPER J.E., BUYER J.S.,1991.Siderophores in microbial interaction on plant surfaces.*Mol.Plant –Microbe.Interact.***4** :5-13.

LOURENCO JUNIOR V., MAFFIA L.A., ROMEIRO R.D.S. ET MIZUBUTI E.S.G., 2006. Biocontrol of tomato late blight with the combination of epiphytic antagonists and rhizobacteria. *Biol. Control.* 38(3):331-340

LOUVET J, TOUTAIN G. 1973. Recherches sur les fusarioses. VIII-Nouvelles observations sur les palmerais marocaines. *Phytopath Medit*, **31**: 19-27.

LOUVET J., BULIT J., TOUTAIN G., RIEUF P., 1970.Le Bayoud, fusariose vasculaire du palmier dattier, symptômes et nature de la maladie, moyens de lutte. *Al-Awamia.* **35** : 161-182.

LUGTENBERG B.J., CHINA. W.T.F. AND BLOEMBERG G.V., 2002. Microbeplant interactions: principles and mechanisms. *Antonie Van Leeuwenhoek.***81**:373-383.

MARCHAL N., BOURDON J.M., 1982.Les milieux de cultures pour l'isolement et l'identification biochimiques des bactéries. Doin éditeurs, Paris 196.

MATIRU V.N., DAKORA, F.D.2004. Potenteil use of rhizobial bacteria as promoters of plant growth for increased yeild in land races of african cereal crops.*African.J.Biotechnol.* N°3 :1-7.

MATSUBARA T., ZUMFTW. G., 1982. Identification of a copper protein as part of the nitrous oxide-reducing system in nitrite-respiring (denitrifying) pseudomonads. *Arch Microbiol.* **132**: 322-328.

MC LAUGHLIN C. S., VAUGHAN M. H., CAMPBELT L. M., WEI C. M., STAFFORD M. E ET HANSEN E.S., 1977. Inhibition of protein synthesis by trichothecenes. Pages 262-272 In Rodricks J. V Hesseltine C. W. et Mehtman M. A. (eds.), *Mycotoxins in human and animal health.* Pathoto,Publishers Inc., Park Forest South.

MC MULLEN M., JONES R., GALLENBERG D., 1997. Scab of wheat and barley: A Re-emergingMiedaner T, 1997. Breeding wheat and rye for resistance to *Fusarium* diseases. *Plant.* **58** : 1-11.

MERCADO-BLANCO J., RODRIGUEZ-JURADO D., HERVAS A ET JIMENEZ-DIAZ R. M 2004.Suppression of Verticillium wilts in olive planting stocks by root-associated fluorescent Pseudomonas spp. *Biol Control* 30:474–486.

MESSIAEN C.M., BLANCARD D., ROUXEL F. ET LFON R., 1993. les maladies des plantes maraichères. 3^{ème} Ed. INRA, Paris

MESSIAEN C.M., CASSINI R., 1968. Recherches sur les fusarioses IV: La systématique des *Fusarium*. Ann.Epiph., 19, pp.387-454.

MEZIANE H., VAN DER SLUIS I., VAN LOON L., HOFLE M., BAKKER, P.A.H.M., 2005. Determinants of *Pseudomonas putida* WCS358 involved in inducing systemic resistance in plant .Mol.Plant Pathol.6:177-185 .

MILLER J.D., 2002. Aspects of the ecology of *Fusarium* toxins in cereals. Adv. Exp.Med. Biol. 504, 19-27.

NANDAKUMAR R., BABU S., VISWANATHAN R., RAGUCHANDER T ET SAMIYAPPAN R., 2001. Induction of systemic resistance in rice against sheath blight disease by *Pseudomonas fluorescens*. Soil Biol. Biochem. 33(4-5):603-612.

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

NEILANDS J.B., LEONG S.A., 1986. Siderophores in relation in plant growth and disease .Annu Rev Plant Physiol 37:187-208

NELSON PE., TOUSSOUN T.A ET MARASAS W.F.O., 1983. *Fusarium* species. An illustrated Manuel for Identification. Pennsylvania State University Press, University Park, PA. Mol.Plant Pathol.3:165 -185.

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

Nordlund D.A., 1996. Biological control, integrated pest management and conceptual models. Biocontrol News Information. 17 :35-44.

NYABYENDA P., 2006 .Les plantes cultivées en régions tropicales d'altitude d'Afrique. Edit. Gembloux, France, 241p.

O'SULLIVAN D.J., O'GARA F., 1992. Traits of *fluorescents Pseudomonas spp.* involved in suppression of plant root pathogens. Microbiological Society. 85 :1-20

ONGENA M., DAAYF F., JACQUES P., THONART P., BENHAMOU N., PAULITZT C ET VBELANGER., R. R , 2000. Systemic induction of phytoalexins in cucumber in response to treatments with fluorescent *Pseudomonads*. *Plant Pathol.* 49(4):523-530.

ONGENA M., THONART P., 2006. Resistance Induced in Plants by Non-pathogenic Microorganisms: Elicitation and Defense Responses. In *Floriculture, Ornamental and Plant Biotechnology: advances and topical issues*, edited by A. Jaime and T. d. Silva. Japan: GlobalScience Books. 49(5):523-530.

O'SULLIVAN D.J MORRIS J., O'GARA F., 1990. Identification of an additional ferricsiderophore uptake gene clustered with receptor, biosynthesis, and fur-like regulatory genes in fluorescent *Pseudomonas* sp. strain M114. *APPL. ENV. MICROBIOL.* 56: 2056-2064.

OUBRICH M., 1986. Preliminary results of selection of high-quality Bayoud-resistant clones among natural date palm population in Morocco. In: *Proceedings of the Second Symposium on the Date Palm, Saudi Arabia*, pp. 383-399.

PALLERONI N.J., 1992. Present situation of the taxonomy of the aerobic *Pseudomonads*. In: Galli, E., Silver, S., Wiltholt, B. (Eds.), *Pseudomonas: Molecular Biology and Biotechnology*. American Society for Microbiology, Washington, DC, pp. 105–1105.

PALLERONI N.J., MIGULA N., 1984. In : Krieg, N.R., Holt, J.G.(Eds), *Bergey's Manuel of systematic Bacteriology* , vol.I.Williams and Wilkins Co, Bltimore, USA :141-171.

PARRY D.W., JENKINSON P ET MCLEOD L., 1995. Fusarium ear blight (scab) in small-graincereals - a review. *Plant Pathol.* 44, 207-238.

PAULITZ T.C., BELANGER R.R., 2001. Biological control in green house systems. *Annu. Rev. Phytopathol.* 39:103-133.

PEREYRA S.A., DILL-MACKY R., SIMS A.L., 2004. Survival and Inoculum Production of *Gibberella zeae* in Wheat Residue. *Plant Disease.* 88:724-730.

PERSELLO-CARTIEAUX F., NUSSAUMEL ET ROBAGLIA, C. 2003. Tless from underground : Molcular plant-rhizobacteria interaction .*Plant Cell Environ.* 26 :189-199.

PHILIPPE J., DERVAL J ET KRIER F., 2013. Les biopesticides, compléments et alternatives aux produits phyto-sanitaires chimiques (synthèse bibliographique). *Biotechnol. Argon*, 220-232.

POWELL K.A., A.R. JUTUM., 1993. Technical and commercial aspects of biocontrol products. *Pest. Sci.* **37**:315-21.

RAAIJMAKERS J.M., VLAMI M ET DE SOUZA J.T., 2002. Antibiotic production by bacterial biocontrol agents. *Antonie van Leeuwenhoek*. **81**(1-4):537-547.

REMANS R., CROONENBORGH A., TORRES R., MICHIELS J ET VANDERLEYDEN J., 2007. Effects of plant growth promoting rhizobacteria on nodulation of *Lotus vulgaris* L. are dependent on plant P nutrition. *Eur. J. Plant Pathol.* **119** :341-351.

REYES M.E.Q., ROHRBACH K.G. ET PAULLR.E., 2004. Microbial antagonists control postharvest black rot of pineapple fruit. *Postharvest Biol. Technol.* **33**(2):193-203.

RIBA G., SILVY C., 1993. La lutte biologique et les biopesticides pp.49-64. Dans *La lutte biologique. Dossier de la cellule environnement N° 5*. *Pest. Sci.* **37**:315-21

ROSAS-GARCIA N.M., 2009. Biopesticide production from *Bacillus thuringiensis*: a environmentally friendly alternative. *Recent Pat. Biotechnol.*, **3**(1), 28-36

ROUSSEL-DELIF L., TARNAWSKI S., HAMELIN J., PHILIPPOT L., ARAGNO M ET FROMIN N., 2005. Frequency and diversity of nitrate reductase genes among nitrate dissimilating *Pseudomonas* in the rhizosphere of perennial grasses grown in field conditions. *Microb. Ecol.* **49**: 63-72.

ROUXEL F., ALABOUVETTE C., ET LOUVET J., 1979. Recherches sur la résistance des sols aux maladies. IV : Mise en évidence du rôle des *Fusarium* autochtones dans la résistance d'un sol à la fusariose vasculaire du melon. *Ann. phytopathol.* **70**:412-417.

SANDS D.C. , ROVIRA A.D., 1971. Fluorescent *Pseudomonads* a Residual Component in the Soil Microflora *J. Appl. Microbiol.* **34**(1): 253–259.

SANDS D.C. , ROVIRA A.D., 1971. Fluorescent *Pseudomonads* a Residual Component in the Soil Microflora *J. Appl. Microbiol.* **34**(1): 253–259.

- SARAVANAKUMAR D., VIJAYAKUMAR C., KUMAR N ET SAMIYAPPAN, R., 2007.** PGPR-induced defense responses in the tea plant against blister blight disease. *Crop Protect.* 26(4):556-565.
- SCHER F.M ET BAKER R., 1982.** Effect of *Pseudomonas putida* and a synthetic iron chelator on induction of soil suppressiveness to *Fusarium* wilt pathogens. *Phytopathol.* 72:1567–1573.
- SCHIPPERS B., BAKKER A.W., BAKKER P.A.H. M., 1987.** Interactions of deleterious and beneficial rhizosphere micro-organisms and the effect of cropping practices. *ANN.REV.PHYTOPATH.* 25: 339-358
- SCHMUTTERER H., 1990.** Properties and potentials of natural pesticides from neem tree. *Annu. Rev.Entomol.* 35 :271-298
- SHARMA A., PATHAK A., SAHGAL M., MEYER J-M., WARY V ET JOHRI B .N., 2007.** Molecular characterization of plant growth promoting rhizobacteria that enhance peroxidase and phenylalanine ammonia-lyase activity in chile (*Capsicum annum* L) and tomato (*Lycopersicon esculum* Mill) .*Arch.Microbial.* N°188:483-494.
- SMIRNOV V.V., KIPRIANOVAE.A., GARAGULYA A.D., DODATCO T.A., ET PILYASHENKO I.I., 1990.** Antibiotic activity and siderophores of *Pseudomonas capacia*. *prikladnaya biokhimiya mikrobiologiya.* 26:75-80.
- SNEH B., DUPLER M.M., ELAD YY ET BAKER R ., 1984.** Chlamydospores germination of *Fusarium oxysporum.f.sp cucullerium* as affected by fluorescent and lytic bacteria from a *Fusarium* suppressive soil *Phytopathology.* 74 : 1115-1124.
- SNISSI A., EZZOUHRI L., ROSSI B D ET LARINI H. K., 2006.** Contrôle biologique de la Fusariose de la tomate causée par *Fusarium oxysporum . sp. Lycopersici* et *Fusarium oxysporium radicle-lycopersici*. *Congrès International de biochimie*, PP.352-356.
- SPAEPEN S., J. VANDERLEYDEN ET REMANS R., 2007.** Indole-3-acetic acid in microbial and microorganism-plant signaling. *FEMS Microbiol. Rev.* 31: 425-448 .
- Stanier, R.Y, Palleroni, N.J. and Doudoroff, M., 1966. The aerobic pseudomonads, a taxonomic study. *J. Gen. Microbiol.* 43: 159-271
- SUSLOW T.V., SCHROTH M.N., 1982.** Rhizobacteria of sugar-beets: effects of seed application and root colonization on yield. *Phytopathology* 72:199-206

TALIBI I., AMKRAZ N., ASKARNE L., MSANDA F., SAADI B., BOUDYACHE H ET AIT BEN AOUMAR A., 2011. Antibacterial activity of Moroccan plants extracts against *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*, the causal agent of tomatoes bacterial canker. *J Med Plants Res.* 5: 4332-4338.

TANAKA T., HASEGAWA A., YAMAMOTO S., LEE U.S., SUGIURA, Y ET UENO Y., 1988. Worldwidi contamination of cereals by the *Fusarium* mycotoxins nivalenol, deoxynivalenol, an (zearalenone. 1. Survey of 19 counmes. **J. Agric.** Food Chem. **36** : 979-983.

TANTAOUI A ., 1989. Contribution à l'étude de l'écologie du *Fusarium oxysporum* f.sp. *albedinis* agent causal du Bayoud. Densité et répartition de l'inoculum au sein du peuplement fusarien. D.E.S., University Cadi Ayyad, Marrakech, Morocco.239 p

TAQARORT N., ECHAIRI A., CHAUSSOD R., NOUAIM R., BOUBAKER H., AIT BEN AOUMAR A ET BOUDYACH E. H., 2008. Screening and identification of epiphytic yeasts with potential for biological control of green; old of citrus fruits. *World J. Microbiol. Biotechnol.*24:3031-3038

TECH A. H., 1987. Less wheat scab with urea than with ammonium nitrate fertilisers. *CereaRes. Commun.* 15: 35-38.

TEINTZ A M., HOSSAIN BARNES C.L., LEONG J ET VAN DER HELM, D.1981.Structure of ferripseudobactine, a siderophore from plant growth *pseudomonas* B, 10. synthesis in rabbit reticulocyte by nivalenol, a **coxic** principle isolated from *Fusariurn nival* growing rice. *J. Biochem.* **64** : 479-485.

THAKORE Y., 2006. The biopesticide market for global agricultural use. *Industrial Biotechnology.* 2(3):294-208

TOUTAIN G., LOUVET J., 1974. Lutte contre le Bayoud. IV. Orientations de la lutte au Maroc.zeae in Wheat Residue. *Plant Disease* **88**, 724-730.

TRIVEDI P., PANDEY A., 2008.Recovery of plant growth-promoting rhizobacteria from sodium alginate beads after3 years following storage at 4°C,J Ind Microbiol Biothecnol, N°35,205-209.

TURFREIJER A., 1942. Pyoverdinen de groene fluorescende kleurstoffen van *pseudomonas fluorescens*. University of Amsterdam. British abstract, 16 p.

- VALIDOV S. Z., KAMILOVA F ET LUGTENBERG B. J., 2009.** *Pseudomonas putida* strain PCL1760 controls tomato foot and root rot in stonewool under industrial conditions in a certified greenhouse. *Biological Control*, 48(1): 6-11.
- VALIDOV S., 2007.** Biocontrol of tomato foot and root rot by *Pseudomonas* bacteria in stonewool. Thèse de Doctorat. Department of Molecular Microbiology, Institute of Biology, Faculty of Science, Leiden University. pp. 192.
- VALIDOV S., KAMILOVA F., STEPHAN D., WANG J. J., MAKAROVA N., LUGTENBERG B., 2007.** Selection of bacteria able to control *Fusarium oxysporum* f. sp. *radicis-lycopersici* in stonewool substrate. *Journal of applied microbiology*, 102(2), 461-471.
- VALIDOV S., MAVRODI O., LA FUENTE L., BORONIN A., WELLER D., THOMASHOW L ET MAVRODI D., 2005.** Antagonistic activity among 2,4-diacetylphloroglucinol-producing fluorescent *Pseudomonas* spp. *FEMS microbiology letters*, 242 (2): 249-256.
- VAN DER HEIJDEN M.G.A., BARDGETT R.D., VAN STRAALEN N.M., 2009.** The unseen majority: soil microbes as drivers of plant diversity and productivity in terrestrial ecosystems. *Ecol. Lett.* 11: 296-310.
- VAN LOON L. C., BAKKER P. A. H. M. ET PIETERSE C. M. J., 1998.** Systemic resistance induced by rhizosphere bacteria. *Annu. Rev. Phytopathol.* 36: 453–483.
- VAN LOON L.C. 2007.** Plant responses to plant growth-promoting rhizobacteria. *Eur. J. Plant Pathol.* 119: 243-254.
- VINCENT M. N., HARRISON L. A., BRACKIN J. M., KOVACEVICH P. A., MUKERJI P., WELLER, D. M., PIERSON E. A., 1991.** Genetic analysis of the antifungal activity of a soilborne *Pseudomonas aureofaciens* strain. *Applied and Environmental Microbiology*, 57(10) : 2928-2934.
- VINING L. C., 1990.** Functions of secondary metabolites. *Annu. Rev. Microbiol.*, 44, PP. 395-427.
- VOISARD C., KEEL C., HAAS D. ET DÉFAGO G., 1989.** Cyanide production by *Pseudomonas fluorescens* helps suppress black root rot of tobacco under gnotobiotic conditions. *EMBO J.* 8:351–358

WANG C.J. 2012. Induction of drought tolerance in cucumber plants by a consortium of three plant growth promoting rhizobacterium strains. *PLoS One* 7(12).

WANG S.L., HSIO, W.T. 2002. Purification and characterization of an antimicrobial chitinase extracellularly produced by *Monascus purpureus* CCR31499 in a shrimp and crab shell powder medium. *J. Agric. Food. Chem.*, 50, pp.2249-2255.

WEGER L.A., DEKKERS L.C., VAN DER BIJ A.J. ET LUGTENBERG, B.L.L., 1994. Use of phosphate-reporter bacteria to study phosphate limitation in the rhizosphere and in bulk soil. *Mol. Plant-Microbe Interact.* 7: 32-38.

WELLER D. M., 1988. Biological control of soil borne pathogens in the rhizosphere with bacteria. *Ann Rev Phytopathol.* 26:379–407.

WELLER D. M., COOK R. J., 1983. Suppression of take-all of wheat by seed treatments with *fluorescent Pseudomonads*. *Phytopathology*, 73(3), 463-469.

WELLER D. M., HOWIE W. J ET COOK R.J., 1988. Relationship between in vitro inhibition of *Gaeumannomyces graminis var. tritici* and suppression of take-all of wheat by *Fluorescent Pseudomonads*. *Phytopathology* 78(8): 1094-1100.

WELLER D.M., RAAIJMAKERS J., MCSPANDDEN GARDENER B.B ET THOMASHAW L.S. 2002. Microbial populations responsible for specific soil suppressiveness plant pathogens. *Annu. Rev. Phytopathol.*, 40 : pp.309-348.

WHIPPS J.M., LUMSDEN R.D., 2001. Commercial use of fungi as plant disease biological control agents: status and prospects. In: Butt, T.M., Jackson, C., Magan, N. (Eds.), *Fungi as Biocontrol agents. Progress, Problems and Potential*. CABI Publishing, Wallingford, pp. 9-22.

XU G. W., GROSS D. C., 1986. Field evaluation of the interaction among *fluorescent Pseudomonas*, *Erwinia carotova* and potato yields. *Phytopathology*. 76:423–430.

ZAHIR, A.A., ARSHAD, M., FRANKENBERGER, W.T. 2004. Plant growth promoting rhizobacteria: application and perspectives in agriculture. *Adv. Agron.* 81:97-168.

Annexes

Milieux de culture

1. Milieu de King « King B » (King et *al.*, 1954)

- Peptone20g ;
- Glycerol 15ml ;
- K₂HPO₄1.5ml ;
- Mg SO₄ 1.5g ;
- Agar agar15g ;
- Eau distillée1000ml.

Ajuster à un Ph=7.2. Autoclavage 120°C pendant 20mn

2. Potatos Dextrose Agar PDA (Jonsthorpe et Booth, 1954)

- Pomme de terre 200g ;
- Dextrose20g ;
- Agar agar.....20g ;
- Eau distillée1000 ml.

Ajuster à un Ph=6.8. Autoclavage 120°C pendant 20mn

3. Milieu Levane (Garden et Luisetti, 1981)

- Nutriment agar..... 23g ;
- D glucose..... 2.5g ;
- Sucre de table 50g ;
- Eau distillée q s q1000ml.

Ajuster à un Ph=6.8. Autoclavage 120°C pendant 20mn

4. Milieu de Gélatine (Garden et Luisetti, 1981)

- Extrait de Levure 3g ;
- Bactéropeptone5g ;
- Gélatine120g ;
- Eau distillée q s q1000ml.

Ajuster à un Ph=6.8. Autoclavage 120°C pendant 20mn

5. Milieu de Clark et Lubs (Marchal et Bourdon, 1982)

- Peptone tryptique ou polypeptone5 à 7 g ;
- Glucose5g ;
- Phosphate bipotassique (K_2PO_4).....5g ;
- Eau distillée q.s.q1000ml.

Ajuster à un $pH = 7.2$

6. Milieu Citrate de Simmons ((Garden et Luisetti, 1981)

- Sulfate de magnésium ($MgSO_4$) 0.2g ;
- Ammonium dihydrogenophosphate1g ;
- Phosphate dipotassique1g ;
- Citrate de Sodium2g ;
- Chlorure de Sodium ($NaCl$)5g ;
- Bleu de bromothymol 0.08 g ;
- Agar20g ;
- Eau distillée q.s.q1000ml.

Ajuster à un $pH = 6.6 \pm 0.1$

7. Gélose nutritive GN (Garden et Luisetti, 1981)

- Extrait de levure 2 g
- Peptone 5g
- Extrait de viande.....1g ;
- $NaCl$ 5g ;
- Glucose5g ;
- Agar agar20g ;
- Eau distillée q.s.q1000ml.

Ajuster à un $pH = 6.8$. Autoclavage $120^\circ C$ pendant 20 mn.

8. Milieu TSI (Garden et Luisetti, 1981)

- Peptone20g ;
- Extrait de viande.....3g ;
- Extrait de levure3 g ;
- Chlorure de Sodium.....5g ;

- Citrate ferrique0.3 g ;
- Thiosulfate de Sodium0.3g ;
- Lactose.....10g ;
- Saccharose.....10g ;
- Glucose1g ;
- Rouge de Phénol 0.5g ;
- Agar agar2 g.

Ajuster à un pH =7.4

9. Bouillon nitraté (BN)(Garden et Luisetti,1981)

- Peptone..... 10 g ;
- Extrait de viande5 g ;
- Chlorure de sodium 5 g.

Ajuster à un pH=7.2

10. Milieu Mannitol de mobilité (Garden et Luisetti, 1981)

- Peptone20g ;
- Nitrate de Potassium1 g ;
- Mannitol2g ;
- Rouge de Phénol40 mg ;
- Gélose4g ;
- Eau distillée q.s.q 1000 ml.

Ajuster à un pH=8.1

11. Milieu Mevag (Marchal et Bourdon, 1982)

- Tryptone3g ;
- Dipotassium phosphate0.3g ;
- Potassium chlori 5 g ;
- Eau distillée q.s.q 1000 ml.

Ajuster à un Ph =7.8±0.2

12. Milieu esculine (Garden et Luisetti, 1981)

- Peptone8g ;
- Sels bilaires20g ;

- Citrate ferrique..... 0.5g ;
- Esculine1g ;
- Agar15g ;
- Eau distillée q.s.q1000ml.

Ajuster à un pH=7.1±0.2

Analyses statistiques

Var : variance

F1 : Souche bactérienne

F2:Méthode

F3 : Champignon

F4 : Milieu

*** : interaction**

Tableau VII : Analyse de variance sur le milieu King B.

	S.C.E	DDL	C.M.	TEST F	PROBA	E.T.	C.V.
VAR.RESIDUELLE 1	241,368	2	120,684			10,986	24,31%
VAR.FACTEUR 1	0,908	1	0,908	0,008	0,93711		
VAR.FACTEUR 2	211,343	1	211,343	1,751	0,31763		
VAR.FACTEUR 3	383,673	2	191,836	1,59	0,38595		
VAR.INTER F1*2	4,154	1	4,154	0,034	0,86309		
VAR.INTER F1*3	11,785	2	5,893	0,049	0,95454		
VAR.INTER F2*3	350,374	2	175,187	1,452	0,40768		
VAR.TOTALE	1203,605	11	109,419				

Tableau VIII : Analyse de variance sur le milieu PDA.

	S.C.E	DDL	C.M.	TEST F	PROBA	E.T.	C.V.
VAR.RESIDUELLE 1	51,328	2	25,664			5,066	45,66%
VAR.FACTEUR 1	0,31	1	0,31	0,012	0,91946		
VAR.FACTEUR 2	18,976	1	18,976	0,739	0,48146		
VAR.FACTEUR 3	347,055	2	173,528	6,762	0,12974		
VAR.INTER F1*2	1,635	1	1,635	0,064	0,81629		
VAR.INTER F1*3	52,653	2	26,326	1,026	0,49361		
VAR.INTER F2*3	329,828	2	164,914	6,426	0,13559		
VAR. TOTALE	801,785	11	72,89				

Tableau IX: Analyse de variance pour les quatre facteurs.

	S.C.E	DDL	C.M.	TEST F	PROBA	E.T.	C.V.
VAR.RESIDUELLE 1	13,079	2	6,539			2,557	4,75%
VAR.FACTEUR 1	2,042	1	2,042	0,312	0,63101		
VAR.FACTEUR 2	7,936	1	7,936	1,214	0,38648		
VAR.FACTEUR 3	64,213	2	32,106	4,91	0,17013		
VAR.FACTEUR 4	7682,682	1	7682,682	1174,847	0,00056		
VAR.INTER F1*2	0,001	1	0,001	0	0,98814		
VAR.INTER F1*3	15,293	2	7,646	1,169	0,46086		
VAR.INTER F1*4	0,734	1	0,734	0,112	0,7624		
VAR.INTER F2*3	353,319	2	176,66	27,015	0,03413		
VAR.INTER F2*4	63,375	1	63,375	9,691	0,0887		
VAR.INTER F3*4	249,974	2	124,987	19,113	0,04876		
VAR.INTER F1*2*3	105,694	2	52,847	8,081	0,11085		
VAR.INTER F1*2*4	1,816	1	1,816	0,278	0,64868		
VAR.INTER F1*3*4	20,921	2	10,46	1,6	0,38446		
VAR.INTER F2*3*4	57,161	2	28,58	4,371	0,18703		
VAR.TOTALE	8638,238	23	375,576				

Tableau XI : Résultats de test de NEWMAN et KEULS pour le facteur Milieu.

	S.C.E	DDL	C.M	Test F	Proba
VAR.FACTEUR 1	2,042	1	2,042	0,312	0.63
VAR.FACTEUR2	7,936	1	7,936	1,214	0.38
VAR.FACTEUR 3	64,213	2	32,106	4,91	0.17
VAR.RESIDUELLE	13,079	2	6,539		
VAR.TOTALE	8638,238	23	375,576		

Tableau XII : Résultats de test de NEWMAN et KEULS pour l'interaction Facteur 2*3.

Interaction méthode ISOLATS FONGIQUES	NIVEAU	MOYENNES	GROUPES HOMOGENES
1.0 1.0	TRI FOA	60,2	A
2.0 2.0	SPOT FOG	59	A
2.0 3.0	SPOT FOL	52,95	A
2.0 1.0	SPOT FOA	51,45	A
1.0 3.0	TRI FOL	50,7	A
1.0 2.0	TRI FOG	49,05	A

Tableau XIII: Résultats de test de NEWMAN et KEULS pour l'interaction Facteur3 *4.

INTERACTION ISOLATS FONGIQUE* MILIEU	NIVEAU	MOYENNES	GROUPES HOMOGENES	
2.0 1.0	FOG .PDA	75,25	A	
1.0 1.0	FOA. PDA	74,75	A	
3.0 1.0	FOL. PDA	65,35	A	
3.0 2.0	FOL. KING B	38,3		B
1.0 2.0	FOA. KING B	36,9		B
2.0 2.0	FOG. KING B	32,8		B