



الجمهورية الجزائرية الديمقراطية الشعبية
RÉPUBLIQUE ALGÉRIENNE DÉMOCRATIQUE ET POPULAIRE

وزارة التعليم العالي و البحث العلمي
MINISTÈRE DE L'ENSEIGNEMENT SUPÉRIEUR ET DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE



Université des Frères Mentouri Constantine 1
Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie

جامعة الاخوة منتوري قسنطينة
كلية علوم الطبيعة و الحياة

Département : Microbiologie

قسم : ميكروبيولوجيا.

Mémoire présenté en vue de l'obtention du Diplôme de Master

Domaine : Sciences de la Nature et de la Vie

Filière : Sciences Biologiques

Spécialité : Biotechnologie des Mycètes : Fermentation et Production de
substance Fongique.

Intitulé :

**Isolement de microorganismes thermophiles et la sélection
d'isolats à effet antagoniste sur l'agent de Fusariose de blé**

Présenté par :

Touitou Loubna

&

Krika Rachida

Soutenu le : 27/06/2018

Jury d'évaluation :

Présidente: Arabet Dallel

M.C.B. Université des Frères Mentouri Constantine 1.

Encadrante : Milet Asma

M.A.B. Université des Frères Mentouri Constantine 1.

Examinatrice : Benserradj Ouafa

M.C.B. Université des Frères Mentouri Constantine 1.

*Année universitaire
2017 - 2018*

Remerciements

Notre première gratitude va au tout-puissant ALLAH (ﷻ), pour nous donner la vie, le bénédicité et la force pour accomplir ce travail ; nos sincères remerciements au Dieu le grand créateur qui nous a guidé dans nos pats pour arriver à ce stade-là.

Nos remerciements les plus vifs s'adressent à notre encadreur Milet Asma, professeur à l'université des frères Mentouri Constantine.1

Nos remerciements vont également aux membres du Jury Arabet Dallel et Milet Asma Qui nous font le grand honneur d'évaluer ce travail. Qui ils trouvent ce travail, l'expression de notre profonde reconnaissance.

Dédicaces

Je dédie ce travail

A mes chers parents : Abdelhak et Ilhème

Sources de mes joies, secrets de ma force

Vous serez toujours le modèle

Papa, dans ta détermination, ta force et ton honnêteté

Maman dans ta bonté, ta patience et ton dévouement pour

nous

Merci pour tous vos sacrifices pour que vos enfants

Grandissent et prospèrent

Merci de trimer sans relâche, malgré les péripéties de la vie

Au bien être de vos enfants

Merci d'être tout simplement mes parents

C'est à vous que je dois cette réussite.

A mes adorables sœurs : Amale, Nouara et Marwa

A mes frères : Mehamed Amine, Imad et Ahmed Ramy

A mes grands-pères : Boujema et Ahmed

A mes grand-mère Nouara et Aicha

A tout les enfants Alaa et

Basemala

A mon binôme : Rachida Krika

A toute la famille Touitou et Benamira

A tous ceux qui me sont chères. À tous ceux qui m'aiment

L'Oubna

Dédicaces

Je dédie ce travail

A mes chers parents : Ahcene et Hasina
Sources de mes joies, secrets de ma force
Vous serez toujours le modèle

Papa, dans ta détermination, ta force et ton honnêteté
Maman dans ta bonté, ta patience et ton dévouement pour
nous

Merci pour tous vos sacrifices pour que vos enfants
Grandissent et prospèrent
Merci de trimer sans relâche, malgré les péripéties de la vie
Au bien être de vos enfant

Merci d'être tout simplement mes parents
C'est à vous que je dois cette réussite.

A mes soeurs Hanane ; Siham ; Assia Et Amira
A mon frère : Karim

A mes amies

A tout les enfants : Ritaj ; Iyad ; Anes, Assil et Mayar
A mon binôme : Loubna Touitou

A toute la famille Krika ; Toufouti ; Tarfa ; Boudinar ; Bousaida
Odar et Mebarki

A tous ceux qui me sont chères. À tous ceux qui m'aiment

Rachida

Table des matières

1- Introduction.....	1
2- Revue bibliographique.....	3
2-Le blé.....	3
2.1-Historique	3
2.2- Classification génétique.....	3
2.3- Classification génétique.....	5
2.4- Production et consommation du blé en Algérie	6
2.5- L'importation de blé en Algérie	7
2.6- Maladies du blé.....	8
2.6.1- Maladies causant des symptômes localisés sur feuillage	8
2.6.2-Maladies causant des pourritures racinaires	9
2.7- La maladie de fusariose	10
2.7.1-Généralité	10
2.7.2-Symptômes	10
2.7.3- Le genre <i>Fusarium</i>	12
2.7.4.1- Les champignons du genre <i>Fusarium</i>	12
4.2- Cycle biologique	14
2.8-Les mycotoxines	16
2.8.1-Initiation de maladie et développement de champignon	16
2- Taxonomie et Classification des espèces <i>Fusarium</i>	17
2.9- La lutte biologique.....	19
2.9.1- L'agent de la lutte biologique.....	20

2.9.1.1- <i>Les microorganismes thermophiles</i>	20
2.9.1.2- <i>Bacillus</i>	21
2.9.1.3- <i>La classification</i>	21
2.9.1.4- <i>Habitat</i>	22
2.9.1.5- Pouvoir pathogène	22
2.9.1.6- Le type respiratoire.....	23
2.9.2- <i>Aspergillus</i>	24
2.9.2.1- Caractérisation	24
2.9.2.2- Les principales espèces d'Aspergillus.....	24
2.9.2.3- Taxonomie.....	25
2.9.2.4- Les différents aspects de certaines espèces	26
2.9.2.5-La classification.....	27
3.Matériel et méthodes.....	29
3.1- Isolement de l'agent phytopatogène.....	29
3.1.1-Echantillonnage	29
3.1.2- Isolement	29
3.1.3- Identification de l'agent phytopatogène	30
3.1.3.1- <i>Observation macroscopique</i>	30
3.1.3.2- <i>Observation microscopique</i>	30
3.2-Isolement de l'agent antagoniste	31
3.2.1-Echantillonnage	31
3.2.2-Isolement à partir de l'eau	33
3.2.3- Isolement à partir du sol	34
3.2.5-Purification	35

3.2.6-conservation.....	35
3.2.7-Etude de l'activité antagoniste.....	35
3.2.7.1- <i>Confrontation par contact direct</i>	35
3.2.7.2- <i>Confrontation à distance</i>	37
3.2.7.3-Pourcentage d'inhibition	38
3.2.8-Identification des microorganismes sélectionnés	38
3.2.8.1- <i>Observation macroscopique</i>	38
3.2.8.2- <i>Observation microscopique</i>	39
3.2.9-Test de thermo résistance	39
3.2.10-Tests biochimiques	39
3.3-Etude de l'activité enzymatique des enzymes dégradent la paroi fongique.....	40
3.3.1- <i>Détermination de l'activité protéolytique</i>	41
3.3.2- <i>Détermination de l'activité lipolytique</i>	41
3.3.3- <i>Détermination de l'activité chitinolytique</i>	43
4-Résultats et discussion.....	45
4.1- isolement de l'agent phytopathogène	45
4.1.1-Identification morphologique de l'agent phytopathogène.....	45
4.2-Isolement de l'agent antagoniste de <i>Fusarium</i>	46
4.3-des caractéristiques des isolats à activité antifongique.....	50
4.3.1-Caractérisation morphologique des souches actives	50
4.3.1.1- <i>champignon</i>	50
4.2.1.2-l'étude microscopique	51
4.3.1.2- <i>les bactéries</i>	51
4.4.2- Les tests biochimiques.....	54

4.4.2.1-Test de thermo-résistance	54
4.4.2.2-la production des pigments (King B).....	54
4.4.2.3-Test de catalase	55
4.4.2.4-Test de type respiratoire	55
4.4.2.5-Test de Mannitol mobilité	56
4.5- Lutte biologique.....	60
5- Conclusion	
6- Références bibliographiques	
Annexes	
Résumés	

Liste des figures

N° de Figure	Titre	N° de page
1	Phylogénie du blé.	4
2	Schéma illustrant le cycle de développement du blé	6
3	productions algériennes des céréales lors de la campagne 2014/2015. DSASI.	7
4	Marché mondial de blé dur.	8
5	Rouille brune sur feuille de blé	9
6	Principaux symptômes de pied fusarien du blé (a) plantes mortes ; (b) dessèchement des jeunes plantes, (c) pourriture de pied sur la base de la tige du blé.	11
7	Symptômes de la fusariose sur céréales : épis de blé avec des grains fusariés (A), grains de blés ridés et rosâtres (B).	12
8	Spore de <i>Fusarium graminearum</i> .	13
9	Importance des espèces de <i>Fusarium</i> sur céréales et leur mycotoxine associée.	13

10	Cycle biologique de <i>Fusarium</i>	15
11	Photographie de grains fusariés selon la précocité de l'attaque	17
12	Les spores sous microscope au grossissement GX100.	21
13	Caractéristiques morphologiques d'une tête aspergillaire.	24
14	Observation microscopique(a) <i>Aspergillus niger</i> (b) <i>Aspergillus flavus</i> (c) <i>Aspergillus fumigatus</i> (d) <i>Aspergillus nidulans</i> .	26
15	Racines de blé (GTA dur) présentant les symptômes de fusariose.	30
16	Sites d'échantillonnages à partir de l'eau.	31
17	Sites d'échantillonnages à partir du sol (S1', S2', S3') et à partir du sol de la rhizosphère S4'.	32
18	Méthode de dilution à partir de l'eau.	33
19	Méthode de dilution à partir de sol	34
20	Confrontation entre l'agent phytopathogène <i>Fusarium sp.</i> et l'agent antagoniste par contact direct sur milieu PDA	36

21	Boite de Petri présentant le témoin de l'agent phytopathogène <i>Fusarium sp.</i>	36
22	Confrontation à distance entre <i>Fusarium sp.</i> et l'agent antagoniste	37
23	Observation macroscopique «A» (recto), B (verso) après 7 jours. Aspect macroscopique après 12 jours d'incubation à 30°C «C».	45
24	Aspect microscopique de <i>Fusarium moniliforme</i> (G X40)	46
25	Aspect macroscopique de l'isolat Chp activé contre <i>Fusarium moniliforme</i> .	50
26	Aspect microscopique de l'isolat Chp sous microscope l'objectif X40.	51
27	Aspect macroscopique des isolats bactériens sélectionnés sur milieu PDA	52
28	Observation des isolats bactériens (la souche B1, B2 et B3) avec coloration de Gram sous microscope (Gx40)	53
29	Le développement bactérien (Isolat B1, B2 et B3) après 24 heures de test de thermorésistante et incubation à 30°C.	54

Liste des Tableaux

N° du tableau	Titre	N° de page
1	Les différentes sections et espèces des Fusaria selon les principaux systèmes taxonomiques (Jeunot, 2005).	18
2	d'orientation générale	23
3	Isolats microbiens obtenus à partir des différents sites prospectés	47
4	Inhibition in vitro de la croissance de champignon <i>Fusarium</i> par les isolats (B1, B2, B3 et chp).	48
5	Méthodes de confrontation à distance (méthode indirecte).	49
6	Pourcentage d'inhibition des isolats sélectionnés vis-à-vis de <i>Fusarium moniliforme</i>	50
7	observation macroscopique des isolats	52
8	L'aspect microscopique des isolats bactériennes	53
9	Test de catalase	55

10	type respiratoire	56
11	Mannitol mobilité nitrate	57
12	l'activité enzymatique des enzymes dégrade la paroi fongique.	58
13	Les résultat des Tests enzymatiques pour les isolats sélectionnés	59

Liste des Abréviations

GN : Gélose nutritive

PDA : Potato dextrose agar.

Cm : Centimètre.

H : Heurs.

C ° : Degree celsice.

min: Minute

ul : microlitre

Introduction

Introduction

Les céréales et leurs dérivées constituent l'alimentation de base dans beaucoup de pays en développement, particulièrement dans les pays maghrébins. La filière céréalière constitue une des principales filières de la production agricole en Algérie (Djermoun A, 2009).

Parmi toutes les céréales, le blé est la principale production céréalière, en Algérie. Dans le marché mondial, il représente avec le riz et le maïs 85.4 % de la production céréalière mondiale (Gustafon *et al.*, 2009).

En agriculture, 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 de toxines dans les grains. Cette maladie endémique, est provoquée par un complexe d'espèces de champignons phytopathogènes, le « complexe fusarien », à large spectre « hôtes » (Miedaner, 1996).

Au cours de sa croissance, le blé peut-être soumis à un certain nombre d'agressions de natures diverses, entre autres les maladies fongiques. Celles-ci sont nombreuses, variées et touchent le blé au cours de toute sa croissance. Parmi les agents phytopathogènes qui causent beaucoup de dégâts aux cultures, les champignons responsables de la pourriture racinaire telles que *Fusarium* spp. s'avèrent plus dangereux du fait de leur caractère ubiquiste (Hofte *et al.*, 1992).

Par ailleurs, les produits chimiques utilisés à l'heure actuelle pour lutter contre les agents responsables de la fusariose du blé présentent des inconvénients. La plupart d'entre eux sont toxiques pour les utilisateurs qui entrent en contact avec la substance de préservation. Cela justifie les recherches actuellement menées dans ce domaine, qui tendent à mettre au point de nouvelles méthodes de lutte biologique, impliquant des organismes vivants.

Plusieurs être vivant, bactéries et champignons, ont fait l'objet d'étude ou ont été utilisées dans des applications de lutte biologiques. En plus de son rôle dans la restauration de la biodiversité dans les écosystèmes, la lutte biologique présente un rôle important dans le contrôle des maladies phytopathogènes (Emmert et Handelsman, 1999)

Dans cette optique, ce travail se dirige vers la lutte biologique par l'utilisation des microorganismes thermophiles, la première partie est propre généralement sur la présentation des agents phytopathogènes chez le blé. Et enfin l'étude antagoniste entre les

microorganismes thermophiles et l'agent phytopathogène qui touche le blé comme *Fusarium* sp.

De ce fait, l'objectif de ce travail consiste à sélectionner des microorganismes thermophiles contre l'agent de fusariose, isolées à partir du sol et de l'eau de « Hammam Debagh 97°C », Guelma.

Pour ce faire, le mémoire comporte les parties suivantes : Une synthèse bibliographique approfondie contenant des informations relatives au blé, au *Fusarium* et aux microorganismes antagonistes. Une étude expérimentale scindée en trois parties; la première partie repose sur l'isolement, la purification et l'identification de l'agent phytopathogène de fusariose, en l'occurrence, *Fusarium* sp.; la deuxième partie vise à isoler l'agent antagoniste à partir d'une région thermale « Hammame dbegh »; la troisième partie de l'étude expérimentale est concentrée sur la sélection des souches les plus performantes et ses capacités à produire des enzymes hydrolytiques (protéase, lipase et chitinase). Le mémoire se termine par une conclusion qui ouvre des perspectives de recherche sur le thème étudié.

Revue Bibliographique

2- Le blé

2.1- Historique

L'histoire de l'homme et celle des plantes cultivées constituent un ensemble d'interactions continues dans le temps et l'espace (Bonjean et Picard, 1990).

Si l'on considère aujourd'hui qu'un des principaux centres d'origine de l'agriculture a vu le jour au Levant, entre la fin de l'Épipaléolithique et le début du Néolithique, permettant entre autres l'émergence de la civilisation occidentale voici un peu plus de 10 000 ans, la date de l'initiation de la culture des blés dans ce secteur du globe est beaucoup plus discutée : elle se situerait, selon les archéologues, entre 8900 et 7000 av. JC. Ceci correspond au début de la période du Dryas qui fut localement un épisode climatique de sécheresse et de refroidissement, qui a pu aboutir à l'arrêt progressif du mode de vie « chasseur-cueilleur » et entraîner la domestication de certaines plantes - dont les blés - et, *via* le stockage de stocks alimentaires, la création de premières communautés villageoises (Hayden, 1990 ; Wadley et Martin, 1993).

2.2- Classification génétique

Le blé appartient au genre *Triticum* de la famille des *Gramineae*. C'est une plante herbacée annuelle, monocotylédone, à feuilles alternes, formée d'un chaume portant un épi constitué de deux rangées d'épillets sessiles et aplatis. Les fleurs de cette plante sont nombreuses, petites et peu visibles. Elles sont groupées en épis situés à l'extrémité des chaumes. La fleur est cléistogame, c'est-à-dire qu'elle reste fermée, la pollinisation s'effectuant par autogamie qui est le mode de reproduction le plus fréquent chez les blés. C'est une céréale dont le grain est un fruit sec et indéhiscence (qui ne s'ouvre pas), appelé caryopse, constitué d'une graine (composée d'un embryon et d'un tissu de réserve constitué de 70% d'amidon et 15% de gluten) et de téguments

Selon Mackey, (1968), l'origine génétique du blé dur remonte au croisement entre deux espèces ancestrales *Triticum monococcum* et une graminée sauvage du nom d'*Aegilops spelta*. Le croisement naturel de *Triticum monococcum* (porteur du génome A) × *Aegilops spelta* (porteur du génome B) a permis l'apparition d'un blé dur sauvage

de type AABB (*Triticum turgidum* sp. *Dicoccoïdes*) qui a, ensuite, progressivement évolué vers *Triticum turgidum* sp. *Dicocumpuis* vers *Triticum durum* (blé dur cultivé) (figure 1).

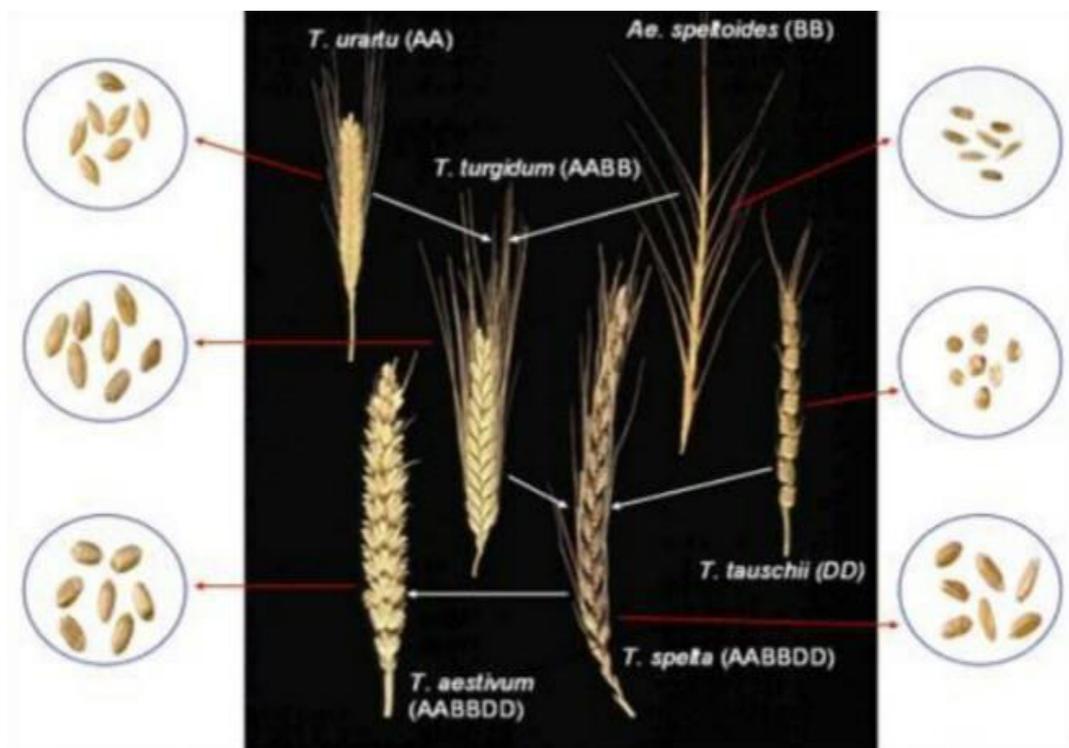


Figure 1 Phylogénie du blé (Shewry, 2009).

Structure du Grain de blé

Le grain de blé présente

Une structure très

Hétérogène :

- Germe :
- Amande :
 - Albumen amylicé
 - Couche à Aleurone
- Enveloppes :
 - Testa
 - Péricarpe

2.3- Le cycle végétatif du blé

Le cycle du blé (Figure 2) débute par la germination d'une graine après humidification. L'embryon n'a qu'un cotylédon (le blé est une monocotylédone) et la plantule comporte un coléorhize, qui donnera la racine, et un coléoptile, qui donnera l'axe feuillé. La levée commence quand la plantule sort de terre, le coléoptile forme un étui protégeant les premières feuilles. Il apparaît un renflement dans la partie supérieure du rhizome qui grossit et forme le plateau de tallage. Ensuite, le stade 3 feuilles est une phase repère pour le développement du blé ; c'est à partir de ce stade qu'il entre en vernalisation, mimée en conditions contrôlées par un passage en chambre climatique à 6°C pendant 6 à 8 semaines. Des bourgeons se forment à l'aisselle des feuilles et donnent des pousses appelées talles. Le tallage commence au début de l'hiver et se poursuit jusqu'à la reprise du printemps. Il est marqué par l'apparition d'une ou plusieurs tiges secondaires qui donneront chacune un nouvel épi. L'épi se développe au sommet du bourgeon terminal puis commence le stade de montaison correspondant à la montée de l'épi et à l'allongement des entre- noeuds. Enfin l'épiaison, en mai ou juin en France, a lieu lorsque la gaine éclatée laisse entrevoir l'épi qui va s'en dégager peu à peu. À ce stade, le nombre total d'épis est défini, de même que le nombre total de fleurs par épi. La reproduction se fait par cléïstogamie, ou autopollinisation automatique puisque les fleurs ne s'ouvrent pas. Chaque fleur peut potentiellement donner un grain, mais il est possible que certaines fleurs n'en donnent jamais, en raison d'un déficit de fécondation par exemple ou lorsque la fleur est colonisée précocement par des pathogènes qui vont empêcher la formation des grains et donc altérer le rendement. La floraison s'observe à partir du moment où quelques anthères sont visibles dans le tiers moyen de l'épi, elles entraînent l'ouverture des épillets et sortent en dehors des glumelles, laissant l'entrée possible aux agents pathogènes comme ceux responsables de la fusariose des épis. A leur sortie les anthères sont jaunes puis deviennent blanches après exposition au soleil. En conditions de culture au champ, le stade floraison correspond à 50% des épis fleuris

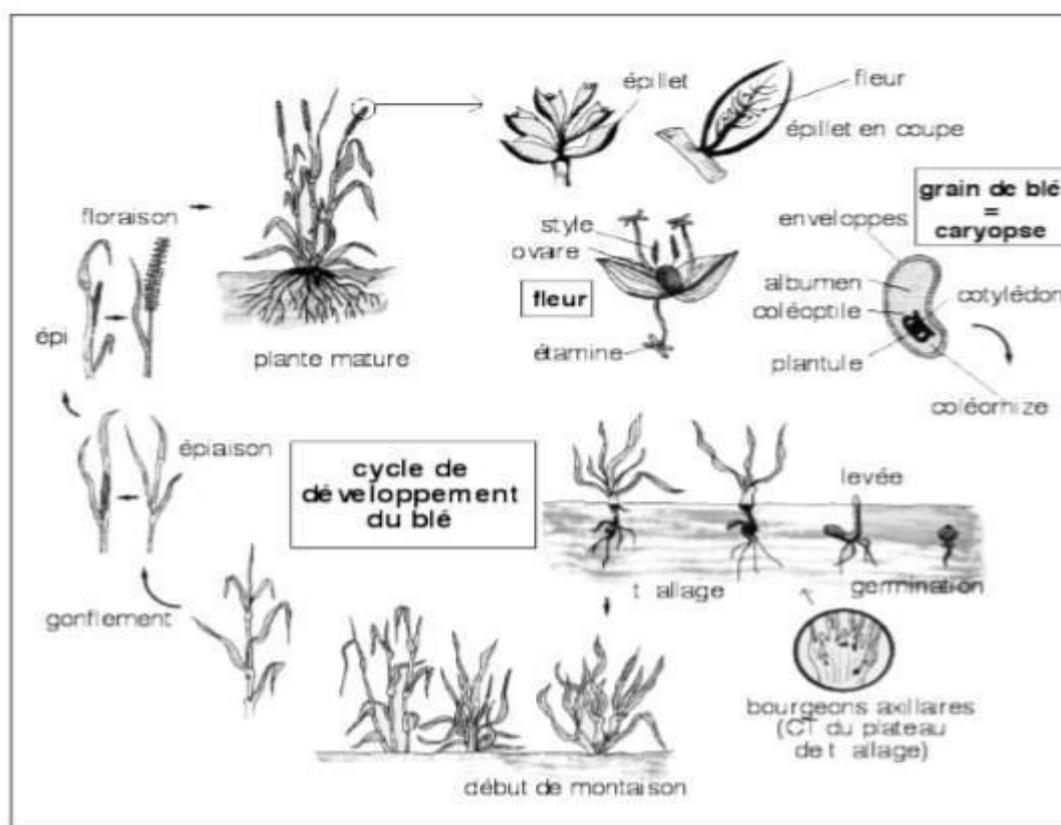


Figure2 Schéma illustrant le cycle de développement du blé (www.univ-lehavre.fr).

2.4- Production et consommation du blé en Algérie

Chaque année, environ 3,3 millions d'hectares sont consacrés à des cultures céréalières dont environ 1,5 million d'hectares sont plantés de blé dur, 600 000 hectares de blé tendre, la récolte de céréales a atteint 4 MMT dont le *blé panifié représentait 1% de la production totale*. Le blé étant le produit de consommation de base, les habitants des pays magrébins sont les plus gros consommateurs de cette denrée au monde notamment l'Algérie avec près de 600 grammes par personne et par jour (Abis, 2012).

La production de blé dur, en Algérie est loin de couvrir la demande qui est de plus en plus importante, suite au faible nombre de produits de substitution et au soutien des prix des céréales. La faiblesse de la production, dont les causes sont multiples, associée à

une forte demande alimentaire, justifie le fait que le pays se présente comme un gros importateur potentiel (Figure 3).

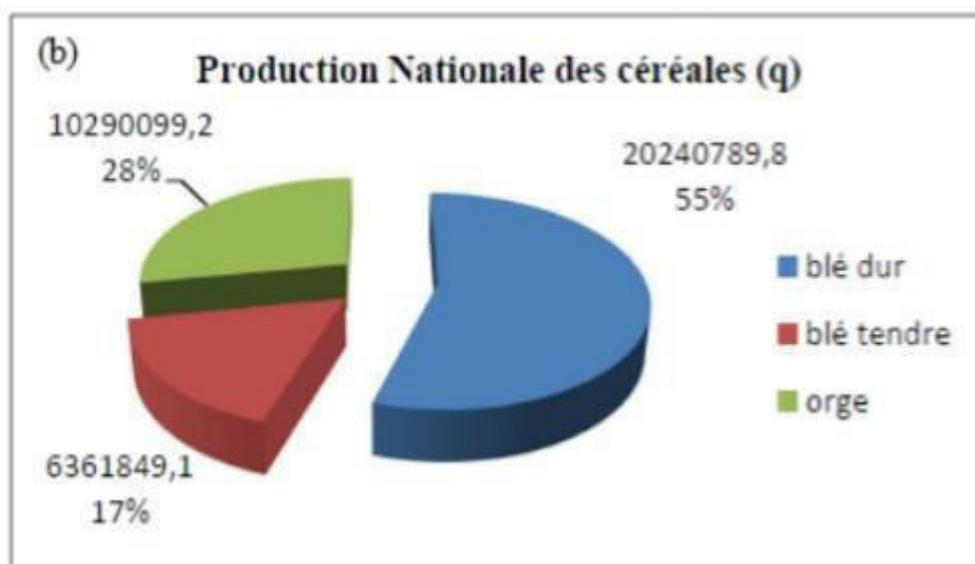


Figure 3 productions algériennes des céréales lors de la campagne 2014/2015. DSASI.

2.5- L'importation de blé en Algérie

Sur le marché mondial, l'Algérie demeure toujours parmi les grands importateurs de céréales (en particulier le blé dur et le blé tendre) du fait de la faible capacité de la filière nationale à satisfaire les besoins de consommation croissants de la population (Ammar, 2014).

Le blé fait partie des trois grandes céréales avec le maïs et le riz. C'est la deuxième par l'importance de la récolte mondiale, et la plus consommée par l'homme après le riz. On parle souvent du blé tendre (*Triticumaestivum*L. *ssp. aestivum*) et du blé dur (*Triticumturgidum*L. *ssp. Durum*(Desf.) Husn.). La France reste le principal fournisseur de blé en Algérie représentant 54 pour cent des importations en 2015 principalement en blé tendre. Et elle est importée le blé dur du Canada, du Mexique et des États-Unis (Hales et Rush, 2016).

Cependant, on peut constater que les principaux pays exportateurs du blé dur sont : le Canada, les Etats-Unis, l'Union Européen (80 % des parts de marchés) et le Mexique.

Par ailleurs, les principaux pays importateurs sont : l'Algérie, l'Italie et le Maroc (pays méditerranéens : 2/3 des échanges mondiaux) (Crystel, 2014) (figure 4). Leurs importations augmentent régulièrement, en relation avec une production déficitaire et parfois irrégulière, et une population en hausse (Renaud, 2014).

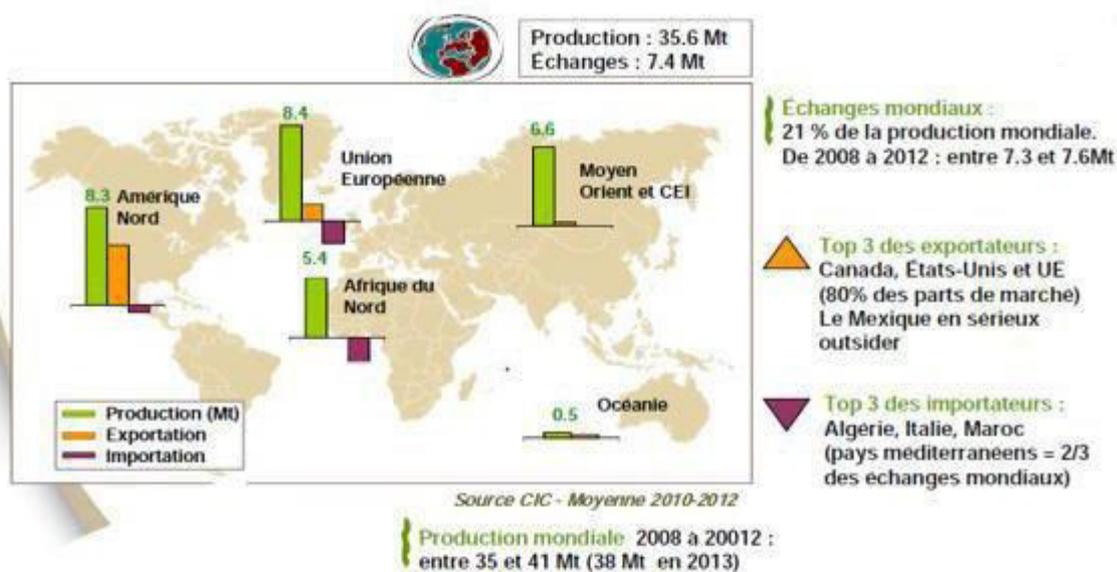


Figure 4 Marché mondial de blé dur (Crystel, 2014).

2.6- Maladies du blé

2.6.1- Maladies causant des symptômes localisés sur feuillage

Selon les enquêtes menées par Bendif (1992) et Sayoud *et al.* (1996) les rouilles sont essentiellement présentes au niveau des hauts plateaux et les plaines de la Mitidja. Leur identification est relativement facile car l'agent fongique produit des pustules caractéristique, formé essentiellement des spores qui sont facilement disséminées par le vent. Ces pustules correspondent à la déchirure de l'épiderme qui laisse apparaitre ainsi une poudre dont la couleur varie du orange, rouge brique, marron au jaune, selon

L'espèce pathogène. Les rouilles ne sont pas transmises par semence. Trois espèces de rouilles attaquent le blé :

Hôte alternatif : *Ancbusaazurea*

Anciennement : *Ancbusaitalica* ou *Buglosse d'Italie* ou *Fausse bourrache* (plante vivace). (I T G C) (Figure 5)

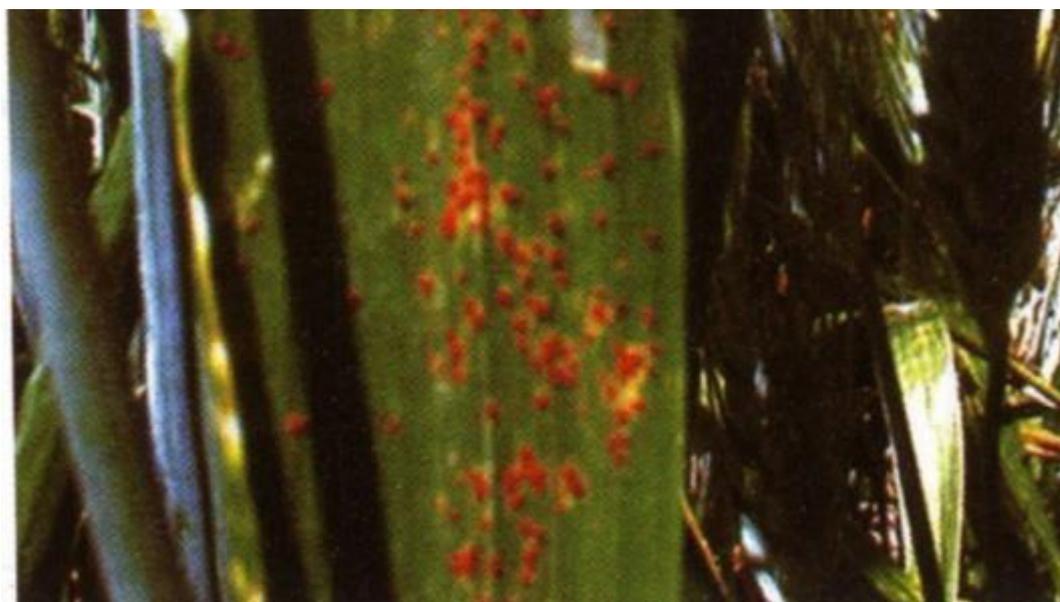


Figure 5 Rouille brune sur feuille de blé

Chez les végétaux, ces maladies se traduisent par des symptômes qui sont la résultante de l'action parasitaire du champignon et de la réaction de l'hôte (Bailly, 1980).

2.6.2-Maladies causant des pourritures racinaires

Pourritures racinaires ou du pied ou encore la pourriture commune, sont des appellations décrivant une même maladie due à différents agents fongiques du genre

Fusarium et *Cocbliobolus*. L'importance des dégâts est intimement liée au type de culture, à la région et surtout aux conditions climatiques

De nombreuses espèces de *Fusarium* sont associées à ces maladies chez la plupart des céréales cultivées actuellement (Devaux, 1995). Les deux maladies les plus communes provoquées par les *Fusaria* sur les céréales à paille sont la gale de l'épi (fusariose de l'épi) et la pourriture racinaire (Zillinsky, 1983).

2.7- La maladie de fusariose

2.7.1-Généralité

La fusariose est une maladie des céréales dites "à petits grains" que l'on retrouve partout dans le monde (Parry *et al.*, 1995). Les espèces du genre *Fusarium* sont des phytopathogènes responsables des pertes, économiquement, importantes chez la majorité des cultures. Ces agents pathogènes peuvent causer la fonte de semis, la pourriture des racines et du collet (Pauvert, 1984). L'importance économique de la fusariose est attribuée aux pertes de Rendements considérables (avortement des fleurs, diminution du nombre et du poids des grains) et à l'altération de la qualité des grains (Pirgozliev *et al.*, 2003) ; La maladie pourriture racinaire est répandue dans tous le Maghreb et en Algérie (Sayoud *et al.*, 1999).

2.7.2-Symptômes

Les nombreuses observations faites suite aux épidémies indiquent toujours des pertes colossales de grains. En Chine, notamment dans la vallée du Yangtzeet la Mandchourie, des rapports sont publiés tous les deux ans environ depuis 30 ans pour faire le bilan des nouvelles épidémies. 01 estime à 2,5 millions de tonnes les quantités de grains perdus durant ces années d'épidémies avec des pertes atteignant 30 à 40% dans certains champs (Parry *et al.*, 1995).

Elle se traduit par la fonte de semis, les semences pourrissent ou les plantules meurent avant leur levée (figure 6a). Les plantules qui lèvent sont jaunes et rabougries (figure

6b) ; leur collet, leurs racines ou la base de leur tige présentent une pourriture allant du brun au brun rouge (figure 6c). La tige peut comporter des stries brunes ou rougeâtres. Les lésions sont de forme et de taille variables et n'ont pas de pourtours définis. La maladie peut aussi frapper des plants plus vieux, ce qui cause une réduction du nombre ou de la taille des talles qui viennent à maturité prématurément et qui comportent des épis blancs et ratatinés. Les plants infectés sont moins vigoureux (Anonyme 4, 2017).



Figure 6 Principaux symptômes de pied fusarien du blé (a) plantes mortes ; (b) dessèchement des jeunes plantes, (c) pourriture de pied sur la base de la tige du blé. (Tony *et al.*, 2015).

La fusariose des épis de blé est caractérisée par le flétrissement des épis et une sénescence prématurée, les épis apparaissent alors blanchâtres (figure 7-A). Les grains de blé fusariés sont petits, légers, ridés et parfois couverts d'un duvet blanc ou rose (Figure 7-B). Si l'infection est plus tardive, les grains peuvent être de taille normale mais ils se décolorent en rose. Les symptômes observés sur orge sont semblables à ceux observés sur blé décrits plus haut (McMullen *et al.*, 2008).



Figure 7 Symptômes de la fusariose sur céréales : épis de blé avec des grains fusariés (A), grains de blés ridé et rosâtres (B), (McMullen *et al.*, 2008).

2.7.3- Le genre *Fusarium*

La première et véritable description du genre *Fusarium* a été réalisée par Link en 1809. Il doit son nom du latin *fusus* (fuseau) en rapport à la forme de ses macroconidies fusiformes et cloisonnées. Il appartient à la division des Ascomycètes et à la famille des Nectriacées. Le genre *Fusarium* inclut des champignons imparfaits ou anamorphes dont la reproduction est asexuée et se fait par le biais des conidies de formes et d'organisation très variées (Jeunot, 2005). D'autres sont parfaits ou téléomorphes dont leur reproduction est sexuée (Nelson *et al.*, 1983). Les champignons du genre *Fusarium* sont capables de produire des métabolites secondaires toxiques, les mycotoxines, dont la présence augmente l'incidence de la maladie sur les productions agricoles (Submitted on 2 Aug 2013).

2.7.3.1- Les champignons du genre *Fusarium*

La fusariose de l'épi peut être causée par une vingtaine d'espèces du genre *Fusarium* (Parry *et al.*, 1995). Le nom donné à *Fusarium* est relié à l'allure fusiforme de ses spores (Figure 8).

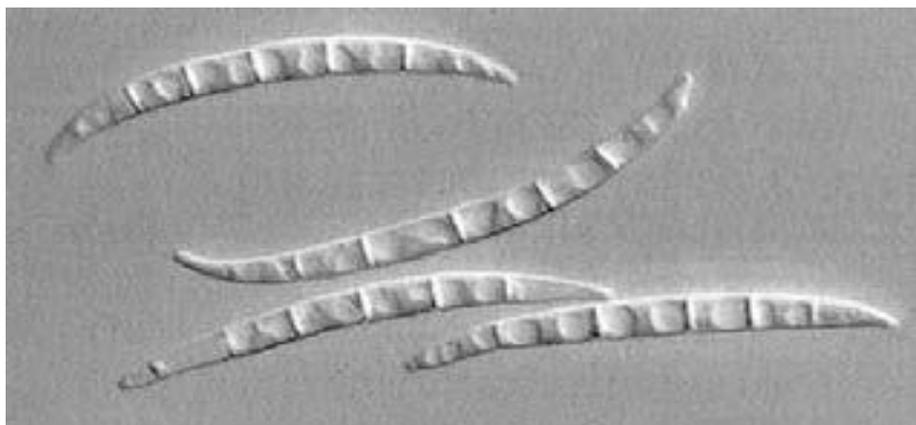


Figure 8 Spore de *Fusarium graminearum* (Leslie *et al.*, 2006)

De nombreuses espèces fusariennes ont été identifiées dans la nature dont les principales capables d'induire la fusariose de l'épi de blé: *F. tricinctum*, *F. poae*, *F. langsethiae*, *F. graminearum*, *F. culmorum*, *F. arthrosporioides*, *F. avenaceum*, *F. sporotrichioides*, *F. equiseti* et *F. crookwellense* (Xu & Nicholson, 2009). (Figure 9).

BLÉ	
ESPÈCE	TOXINE
<i>F. graminearum</i>	TCT B, ZEA
<i>F. avenaceum</i>	MON, BEA, ENN
<i>F. poae</i>	TCT B (NIV)
<i>F. culmorum</i>	TCT B, ZEA
<i>F. tricinctum</i>	MON, BEA (TCT A)
<i>F. sambicum</i>	TCT A, ZEA, BEA
<i>F. sporotrichioides</i>	TCT A
<i>F. equiseti</i>	TCT A et B, ZEA
<i>F. acuminatum</i>	TCT A
<i>F. crookwellense</i>	TCT B, ZEA
<i>F. pseudograminearum</i>	TCT B
<i>F. heterosporum</i>	ZEA
<i>F. oxysporum</i>	FUM
<i>F. verticillioides</i>	FUM
<i>F. subglutinans</i>	MON, BEA, FUM
<i>F. langsethiae</i>	TCT A

Figure 9 Importance des espèces de *Fusarium* sur céréales et leurs mycotoxines associée (Ballois, 2012).

3.2- Cycle biologique

Le cycle de vie des agents pathogènes responsables de fusariose est illustré par le cycle de *F. graminearum*. Pendant l'hiver et tout au long du cycle cultural, les agents pathogènes responsables de la fusariose des épis survivent dans le sol sous forme de chlamydospore (Bai & Shaner, 1994) (HALID 2013). Cet inoculum primaire se trouve sur les résidus de culture antérieure infectés qui permettent, après la récolte, le développement de périthèces et donc d'ascospores. Les périthèces permettent au champignon de passer l'hiver sous cette forme de conservation. Lorsque des conditions favorables à l'ouverture du périthèce sont réunies, c'est-à-dire obscurité et humidité suffisante, les ascospores se diffusent dans l'air ce qui permet la colonisation des fleurs, de la tige voire des grains par ces ascospores (figure 10). Le champignon est alors sous sa forme sexuée, *Gibberella*. Par la suite, les ascospores vont germer si l'humidité relative (HR) est supérieure à 85% et la température avoisine les 25-30°C. L'infection peut intervenir à différents stades de développement de la plante-hôte puisque la pénétration du champignon se fait par les zones dites sensibles, c'est-à-dire des ouvertures de tissus dues à la sénescence, par les anthères après la floraison, ou encore par le péricarpe, le champignon progressant entre lemme et pale a (Kang et Buchenauer, 2002).

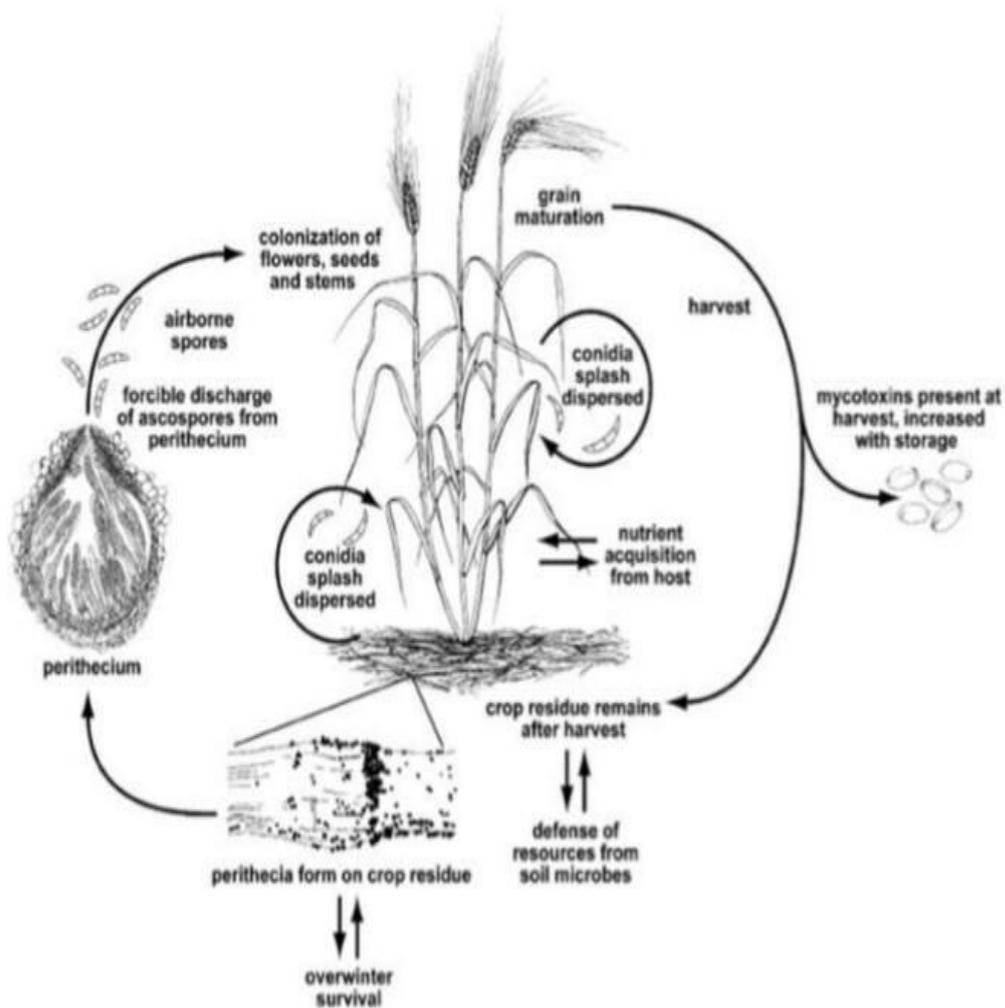


Figure 10 Cycle biologique de *Fusarium* (F.P. : *Gibberella*) sur céréales (Trail, 2009) .

2.8-Les mycotoxines

Outre les pertes quantitatives qu'ils occasionnent, les champignons du genre *Fusarium* produisent de mycotoxines dans les grains et les rendent impropres à la consommation (Jouany, 2007 ; Keller, 2011). Les mycotoxines sont des molécules aux structures chimiques très variées. Ce sont des métabolites secondaires synthétisés par des champignons filamenteux parmi lesquels les genres principaux sont *Aspergillus*, *Penicilium*, *Fusarium*, *Alternaria* et *Claviceps* (Steyn, 1995). La présence et la quantité de ces mycotoxines dans les céréales à la récolte constituent des critères déterminants de la qualité des grains. La communauté européenne a d'ailleurs baissé de nouveau les limites de tolérance en mycotoxines dans les céréales grâce à l'entrée en application en 2007 de la réglementation CE N° 1881/2006. Les espèces de *Fusarium* produisent différents types de mycotoxines parmi lesquelles les plus fréquentes sont les trichothécènes, les fumonisines et la zéaralénone (Placinta *et al.*, 1999).

2.8.1-Initiation de maladie et développement des champignons

La fusariose de l'épi de blé est donc initiée par le dépôt de spores matures sur des épis de blé en fleur. Ces spores germent, colonisent les anthères extrudées, généralement dans la partie médiane de l'épi, où commence la floraison et où l'humidité est supérieure à celle des autres épillets (Walter *et al.*, 2009 ; Leonard & Bushnell, 2003).. La spore qui se trouve sur la plante hôte germe en produisant un mycélium. Les hyphes qui forment le mycélium parviennent à pénétrer dans la plante, Le champignon rejoint les vaisseaux conducteurs du xylème et se développe ainsi dans la moelle de la tige. Cela permet au champignon de se développer dans l'ensemble de la plante. C'est le début de la phase symptomatique avec formation de nécroses sur la tige et décoloration des tissus. L'hyphe pénètre dans les cellules de l'hôte en traversant la paroi.

Les conidiophores parfois très ramifiés forment sur le thalle des coussinets (sporodochies) et portent des masses de spores d'aspects graisseux, les phialides sont plus ou moins allongées et peuvent produire deux types de conidies: des macroconidies

fusiformes, avec une cellule basale pédicellée, portant une sorte de talon et/ou des microconidies petites, généralement septées, piriformes, fusiformes ou ovoïdes (Botton *et al.*, 1990 ; Jeunot, 2005). Les symptômes observés sur grains sont très divers (Figure 11).

Lorsque l'attaque a lieu avant la formation des grains, ceux-ci seront très atteints voire absents (Bai & Shaner, 1994) ; ils sont plus petits et présentent une coloration blanche ou rose, correspondant au développement mycélien, 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 (Leonard & Bushnell, 2003)



Figure 11 Photographie de grains fusariés selon la précocité de l'attaque.

2- Taxonomie et Classification des espèces *Fusarium*

A l'heure actuelle nous utilisons principalement un classement dérivé de celui de Nelson *et al.* (1983) lesquels regroupent les *Fusarium* dans 15 sections (Tableau 1).

Tableau 1 Les différentes sections et espèces des Fusaria selon les principaux systèmes taxonomiques (Jeunot, 2005).

Section de wollenweber Reiking (1935)	Espèces de Snyder et Hansen (1940)	Espèces de Messiaen Cassini (1968)	Système de Nelson et al.,(1983)	
			Sections	Espèces
Submicrocera				
Pseudomicrocera				
Macroconia	F. epispaeria	F. epispaeriavargigas		
Eupionnotes		F. epispaeria F. epispaeriavardimerum	Eupionnotes	F.aquaeductuum F.merismoides/ F.dimerum
Spicarioides	F.rigidiscula	F.rigidisculum	Spicarioides	F.decemcellular
Arachnites	F.nivale	F.nivale	Arachnites	F.nivale/ F.M.nivale
Sporotrichiella	F.tricinatum	F.tricinatum	Sporotrichiella	F.tricinatum /F.poa F.sporotrichioides F.chlamydosporum
Roseum	F.roseum	<i>F.roseum</i> <i>Varavenaceum</i> <i>F.roseum</i> <i>arthrosporioides</i>	<i>Roseum</i>	<i>F.avenaceum</i> (dont <i>F.arthrosporioides</i>) <i>F.graminum</i>
<i>Arthrosporiella</i>			<i>Arthrosporiella</i>	<i>F.semitectum</i> <i>F.camptoceras</i>
			<i>F.roseumvargibbosum</i>	<i>Gibbosum</i>

<i>Gibbosum</i>				<i>F.acuminatum</i> <i>F.longipes</i>
<i>Discolor</i>		<i>F.roseum</i> <i>Varsambucinum</i> <i>F.roseumvargraminearum</i> <i>F.roseumvarculmorum</i>	<i>Discolor</i>	<i>F.heterosoprum</i> <i>F.retuclatum</i> <i>/ F.sambucinum</i> <i>F.graminearum</i> <i>F.culmorum</i> <i>F.crookwellense</i>
<i>Lateritium</i>	<i>F.lateritium</i>	<i>F.lateritium</i>	<i>Lateritium</i>	<i>F.lateritium</i> <i>F.udum</i>
<i>Liseola</i>	<i>F.moniliforme</i>	<i>F.moniliforme</i> <i>F.moniliforme</i>	<i>Liseola</i>	<i>F.moniliforme</i> <i>F.proliferatum</i> <i>F.subglutinans</i> <i>F.anthophilum</i>
<i>Elegans</i>	<i>F.oxysporum</i>	<i>F.oxysporum</i>	<i>Elegans</i>	<i>F.oxysporum</i>
<i>Martiella</i>	<i>F.solani</i>	<i>F.solani</i>	<i>Martiella</i> <i>Ventricosum</i>	<i>F.solani</i>
<i>Ventricosum</i>				

2.9- La lutte biologique

C'est une méthode qui consiste à utiliser les capacités biologique d'un organisme vivant en vue de limiter, arrêter ou bien inhiber le développement d'un autre organisme vivant sans avoir recours aux pesticides. Plusieurs être vivant, bactéries et champignons, ont fait l'objet d'étude ou ont été utilisées dans des applications de lutte biologiques. Quant à la lutte biologique, plusieurs microorganismes ont montré leur efficacité dans la protection du blé contre la fusariose. Les bactéries des genres *Bacillus*, *Pseudomonas*, *Lysobacters* sont les agents les plus étudiés (Yuen et al., 2007). En plus de son rôle dans la restauration de la biodiversité dans les écosystèmes, la lutte biologique présente un rôle important dans le contrôle des maladies phytopathogènes (Emmert et Handelsman, 1999) que l'utilisation des fongicides chimiques. Dans le même cadre, la lutte chimique utilise des pesticides (fongicides), prescrits par leurs fabricants comme les triazoles utilisés au moment de la floraison, limitent la fusariose sur l'épi des céréales et donc l'accumulation de toxines dans la plante (Anonyme 8).

2.9.1- L'agent de la lutte biologique

2.9.1.1- Les microorganismes thermophiles

Les microorganismes thermophiles tous les êtres vivants se développant à des températures supérieures à 45°C. Cette dernière définition est intéressante car elle définit 3 sous catégories au sein des thermophiles :

- **Les thermophiles modérés** dont les conditions optimales de croissance se situent entre 55 et 65°C ;
- **Les thermophiles extrêmes** dont la température optimale de croissance est comprise entre 65 et 80°C ;
- **Et les hyperthermophiles** dont la température optimale de croissance est supérieure à 80°C.

Des organismes thermophiles ont été isolés d'environnements naturels soumis au volcanisme ou au géothermalisme (sources hydrothermales océaniques profondes, sources chaudes terrestres, etc.), mais aussi de biotopes artificiels où les températures sont élevées (canalisations domestiques d'eaux chaudes, installations industrielles, etc.) (Karine Alain *et al.*, 2011).

Parmi les microorganismes thermophiles des bactéries et moisissures ont été isoler à partir de Hammam Debagh de Guelma, on trouve un seul champignon qui résiste à température élevé (*Aspergillus*) et des bactéries thermale identifier à partir plusieurs tests biochimiques et enzymatiques qui signifier le genre de cette bactérie est *Bacillus sp.* Ces microorganismes thermophiles utilisent comme agents de la lutte biologique contre le genre *Fusarium* qui attaque la plante de blé et provoque l'altération de la qualité et des risques sanitaires.

2.9.1.2-Bacillus

Les bactéries du genre *Bacillus* sont des grands bacilles à Gram positif, groupés en chaînettes, sporulants, chimio hétérotrophes et généralement mobiles avec des flagelles péritriches. Ce genre est aérobie, ou parfois facultatif et catalase positive (Klein et al., 2010). Représenté la forme microscopique de genre *Bacillus* et leur caractère (Figure 12).

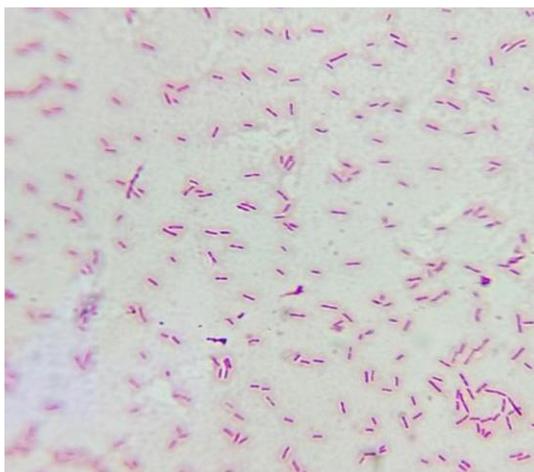


Figure 12 Les spores sous microscope au grossissement GX100.

2.9.1.3- La classification

La classification des "*Bacillus*" a été fortement remaniée depuis quelques années avec les nouveaux genres. Leur taxonomie n'est pas, en effet, simple car on regroupait sous le nom de *Bacillus*, un grand nombre de bacilles Gram + très différents comme le montre l'étalement extrême du GC % de 32 à 69 %. Les analyses des DNA 16S (correspondant aux RNA ribosomal 16S) ont permis la création de nouveaux genres aux côtés d'anciens qui subdivisaient déjà cette famille, avec de nombreux transferts : (Systématique microbienne (J-Noël Joffin).

- *Bacillus*
- *Alicyclobacillus* (*thermoacidophiles*),
- *Paenibacillus* (*incluant d'anciens bacillus, polymyxa, macerans, alvei?*),
- *Brevibacillus* (*ex B. brevis et laterosporus*),
- *Aneurinibacillus*,
- *Virgibacillus*

- *Halobacillus* (ex *sporosarcina*, coques sporulés),
- *Amphobacillus*.
- *Gracilibacillus* (1999),
- *Geobacillus* (2001),
- *Marinibacillus*,
- *Salibacillus* (199),
- *Ureibacillus* (2001),
- *Salibacillus* (1999).

Cette situation complexe montre combien il est difficile d'identifier ces bactéries sporulées dont l'intérêt est avant tout industriel.

Voir : <http://www.bacterio.cict.fr/bacdico/bb/bacillus.html>

2.9.1.4- Habitat

Les *Bacillus* sont ubiquitaires car leurs spores leur confèrent une grande résistance. On en trouve dans les sols qui constituent le principal réservoir, dans l'eau de mer, dans l'eau douce et sur les plantes. On en trouve également dans les aliments, et même dans les produits stérilisés alimentaires ou médicamenteux à cause de la thermorésistance des spores. (Decoster, FLM, P, I)

2.9.1.5- Pouvoir pathogène

- *Paenibacillus* (*Bacillus*) *larvae* actif sur les insectes.
 - *Bacillus anthracis*, *cereus* et *thuringiensis* (bonne orthographe), qui forment un groupe génomique d'après l'analyse de leur génome. (J-Noël Joffin).
- Bacillus subtilis*, *licheniformis*, *sphaericus*, sont également impliquées au cours d'intoxications alimentaires. Certaines espèces, entomopathogènes (*B.thuringiensis*, *larvae*) sont utilisées à l'état de spores sous forme de poudre répandue à la surface des eaux stagnantes pour détruire les larves de moustiques.

Les *Bacillus* sont responsables de l'altération des produits laitiers, les espèces les plus incriminées sont *Bacillus licheniformis*, *Bacillus cereus*, *Bacillus subtilis*, cette altération est due principalement aux activités enzymatiques des souches contaminantes

les produits qu'elles peuvent introduire des anomalies dans le lait (la coagulation du lait) (Christieans et Zagorec, 2013).

2.9.1.6- Le type respiratoire

Les bacilles sont des bactéries aérobies strictes ou aéro-anaérobie. Le tableau 2 illustre les différents caractères des *Bacillus*.

2.9.2-*Aspergillus*

2.9.2.1- Caractérisation

Les champignons filamenteux du genre *Aspergillus sp.* sont saprophytes, cosmopolites et opportunistes, sont caractérisés par un thalle végétatif formé de filaments mycéliens hyalins, de diamètre fin et régulier, septés et ramifiés. L'identification du genre *Aspergillus* reposera sur la mise en évidence des têtes aspergillaires (Figure 13) à l'examen microscopique des colonies obtenues après mise en culture du prélèvement. (Judith FILLAUX 2013).

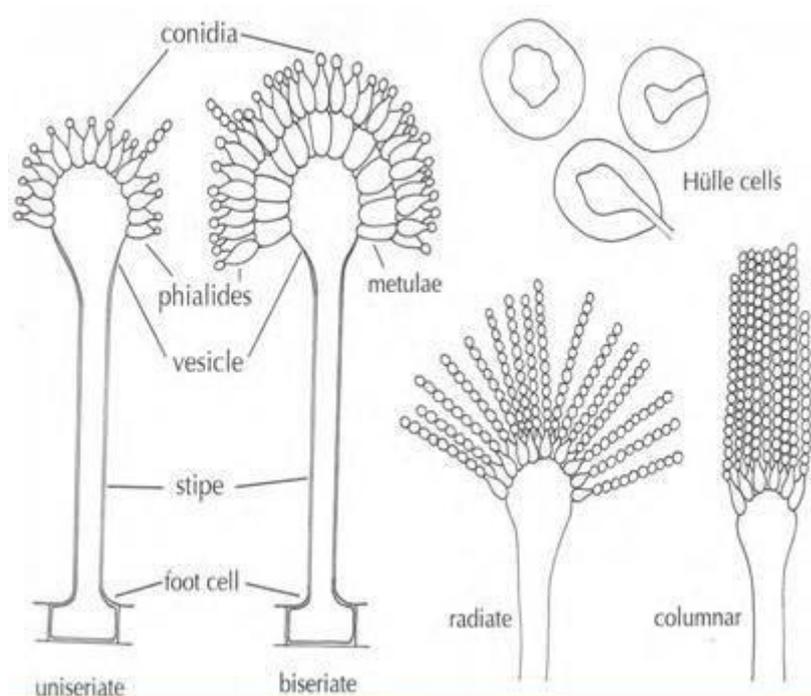


Figure 13 : Caractéristiques morphologiques d'une tête aspergillaire.

2.9.2.2- Les principales espèces d'Aspergillus

Les principales espèces d'Aspergillus sont comme suit : *A. fumigatus* ; *A. flavus* ; *A. niger* ; *A. nidulans* ; *A. terreus* ; *A. versicolor* ; *A. candidus*.

2.9.2.3- Taxonomie

Les espèces du genre *Aspergillus* appartiennent au règne des *Fungi*, à l'embranchement des *Ascomycota* qui regroupe des champignons à mycelium cloisonné (champignons septomycetes) présentant une reproduction sexuée avec formation d'asques contenant des ascospores. Les *Aspergillus* sont inclus dans le sous-embranchement des *Pezizomycotina*, la classe des *Eurotiomycetes*, la sous-classe des *Eurotiomycetidae*, et l'ordre des *Eurotiales* qui est caractérisé par des asques contenus dans des ascocarpes de type cleistothèce ou plus rarement gymnothèce, et par une multiplication asexuée par phialides produisant des phialoconidies (Hibbett *et al.* 2007 ; Bennett, 2010).

2.9.2.4- Les différents aspects de certaines espèces

La figure 14 montré l'aspect microscopique de genre *Aspergillus*.

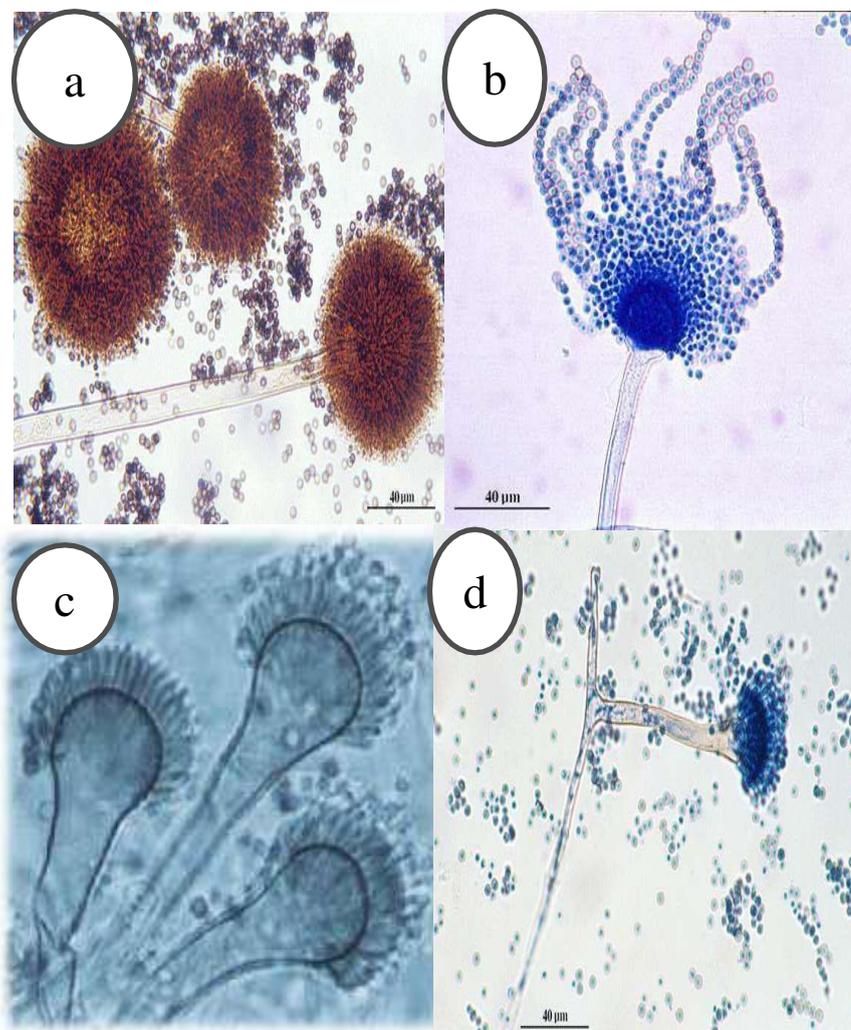


Figure 14 Observation microscopique (a) *Aspergillus niger* (b) *Aspergillus flavus* (c) *Aspergillus fumigatus* (d) *Aspergillus nidulans*

2.9.2.5- La classification

En effet, selon Botton *et al.* (1990) et Guiraud (1998), la classification des *Aspergillus* est comme suit :

Règne: **Fungi**

Division: **Eumycota**

Classe: **Deuteromycetes**

Ordre: **Moniliales**

Famille: **Moniliaceae**

Genre: *Aspergillus*

Matériel et méthodes

3. Matériel et méthodes

En Algérie, les maladies phytopathogènes des cultures agricoles sont principalement traitées par fongicides chimique connus pour leurs effets néfastes et toxiques sur l'environnement et la santé humaine. De ce fait, l'objectif de ce travail consiste à rechercher des microorganismes à partir d'une région thermale, Hammam Debagh (Guelma), développant une activité antagoniste vis-à-vis l'agent de fusariose de blé.

3.1- Isolement de l'agent phytopatogène

L'isolement de l'agent phytopathogène de cette étude a été réalisé à partir d'une culture de blé présentant des symptômes de la *fusariose*.

3.1.1-Echantillonnage

Dans ce travail les échantillons ont été prélevés le mois de Mars 2018 à partir des plantules de blé (GTA dur) présentant les symptômes de fusariose au niveau de racine de la région de Beni Hamiden, Constantine.

3.1.2- Isolement

L'isolement des agents phytopathogène a été effectué par le trempage des fragments de 1à2 cm à partir des racines de blé présentant des symptômes de *fusariose* (**Figure 1**) dans l'éthanol 90%, après dans l'hypochlorite de sodium(2,7%), et ce durent 30 secondes. Ensuite, les échantillons ont été rincés dans l'eau distillé stérile afin d'éliminer les contaminations de l'air (Benhamou *et al.* 1997).Après séchage par papier absorbant les fragments sont été mis aseptiquement dans des boîtes de Pétri stériles (1pièce/boite) coulés préalablement par le milieu pomme dextrose agar (PDA) (Annexe 1). L'incubation a été effectuée à 28° C pendant 7 jours. L'isolat purifié a été conservé dans des tubes contenant le milieu PDA incliné (Annexe 1) à 4°C (Botton *et al.*, 1990; Davet et Rouxel ,1997).



Figure 15 Racines de blé (GTA dur) présentant les symptômes de fusariose.

3.1.3- Identification de l'agent phytopatogène

L'identification d'isolat obtenu se base sur les caractères macroscopique et microscopique.

3.1.3.1- Observation macroscopique

L'observation macroscopique a été effectuée à l'œil nu, en observant les caractères suivant : la vitesse de croissance, la couleur et l'aspect de la colonie fongique.

3.1.3.2- Observation microscopique

L'identification microscopique fait appel aux caractères morphologiques des hyphes et des structures de reproduction (la présence ou non de cloisons, structure et disposition des spores : couleur, forme, cloisons et taille). L'observation a été réalisée selon la Rifai (1969), qui consiste à prélever fragment de culture, déposé sur une lamelle contenant une goutte de bleu coton. Après 5 min, l'observation a été réalisée à l'objectif 40.

3.2-Isolement de l'agent antagoniste

L'agent antagoniste de cette étude a été isolé à partir d'une région thermale « Hammam Debagh 97°C », Guelma. De ce fait, quatre échantillons ont été prélevés à partir de l'eau thermale, trois échantillons ont été prélevés à partir du sol de la région thermale et un échantillon a été prélevé à partir du sol de la rhizosphère des plantules de la région.

3.2.1-Echantillonnage

L'échantillonnage a été effectué à partir de Hammam Debagh (Guelma) le mois de février 2018 à partir de plusieurs sites (Figure 2, 3):

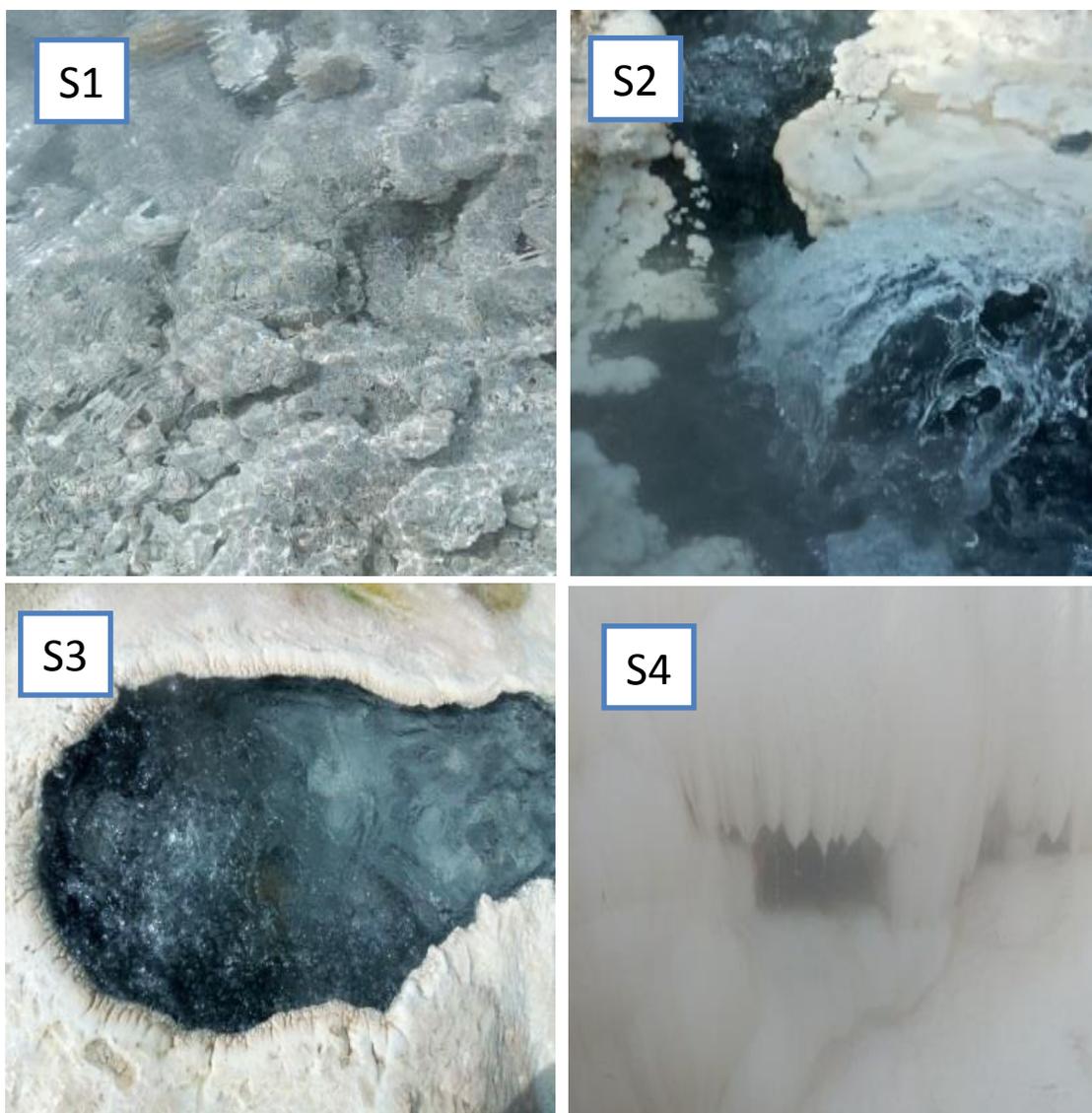


Figure16 Sites d'échantillonnages à partir de l'eau.

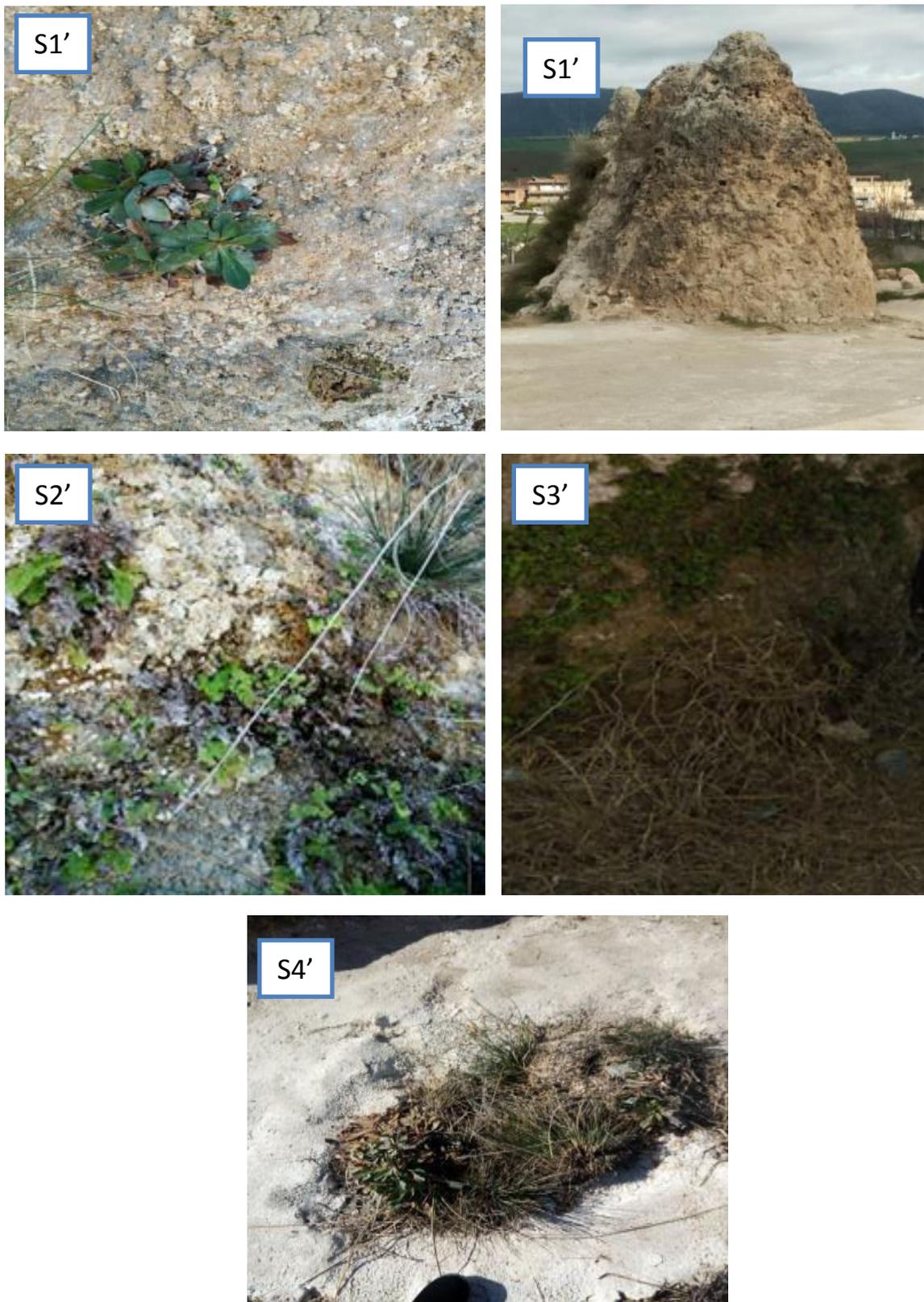


Figure 17 Sites d'échantillonnages à partir du sol (S1', S2', S3') et à partir du sol de la zone de la rhizosphère S4'.

3.2.2-Isolement à partir de l'eau

Quatre échantillons ont été prélevés à partir de l'eau thermale (Hammam debagh) à l'aide des flacons stériles, 15 cm de profondeur. Un millilitre de chaque échantillon de l'eau a été prélevé et dilué dans 9 ml d'eau physiologique stérile (NaCl 9%), puis le mélange a été agité au Vortex pendant 10 min, ensuite des dilutions décimales ont été effectuées jusqu'à 10^{-5} (Figure 4).

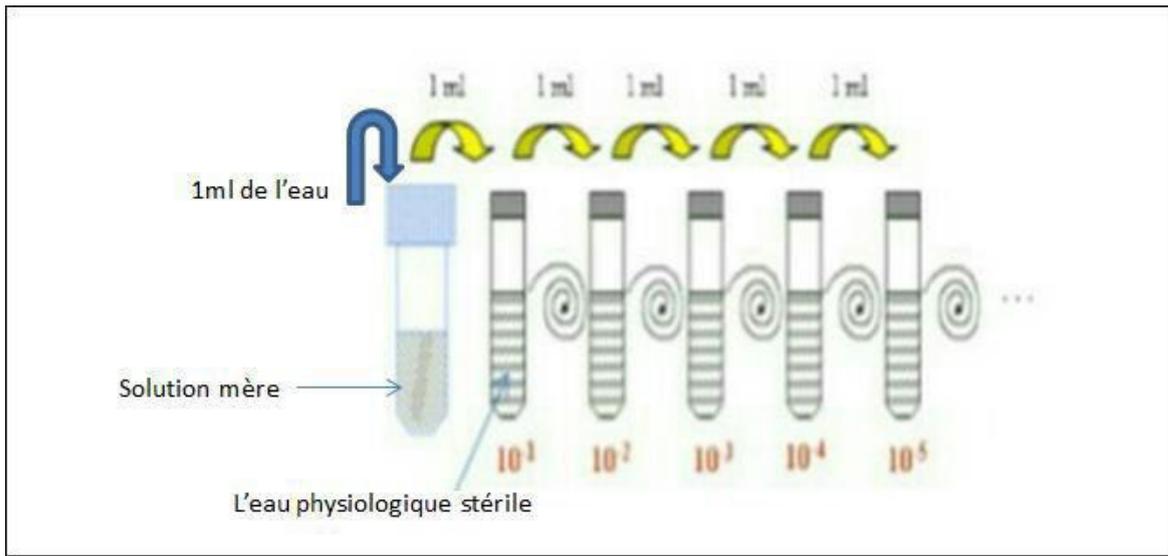


Figure 18 Méthode de dilution à partir de l'eau.

A partir des dilutions obtenues, un millilitre de chaque dilution a été ensemencé dans des boîtes de Pétri contenant les milieux PDA et GN. Dans le but d'isoler des microorganismes thermophiles, L'incubation a été réalisé comme suit : 5 boîtes de Pétri ont été incubées à 45°C et 5 boîtes ont été incubées à 55°C .

3.2.3- Isolement à partir du sol

Selon le protocole décrit par Pochon et Tardieu (1962), quatre échantillons du sol ont été prélevés à l'aide d'une grande spatule stérile, après l'écartement des cinq premiers centimètres de la couche superficielle du sol, puis déposés dans des flacons stériles. Ces derniers ont été transportés rapidement au laboratoire. Un gramme de chaque échantillon du sol prélevé, a été dilué dans 9 ml d'eau physiologique stérile (NaCl 9‰), puis le mélange a été agité au Vortex pendant 10 min. Ensuite, des dilutions décimales jusqu'à 10^{-5} ont été préparées (Figure 5).

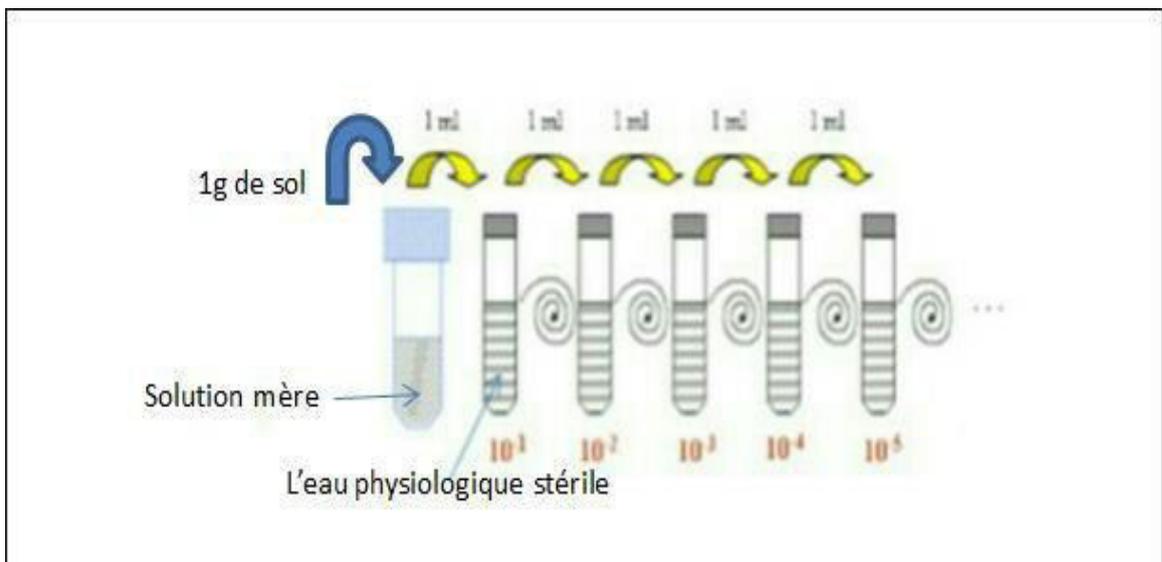


Figure 19 Méthode de dilution à partir de sol

A partir des dilutions obtenues, un millilitre de chaque dilution a été ensemencé dans des boîtes de Pétri contenant les milieux PDA et GN. Dans le but d'isoler des microorganismes thermophiles, L'incubation a été réalisée comme suit : 5 boîtes de Pétri ont été incubées à 45°C et 5 boîtes ont été incubées à 55°C.

3.2.5-Purification

Après l'étape d'isolement des repiquages successifs ont été réalisés jusqu'à l'obtention des microorganismes purs. L'incubation a été effectuée à 55°C jusqu'à l'obtention de colonies apparentes, 48heures pour les bactéries et à 45°C pendant 7 jours pour les champignons.

3.2.6-conservation

Après la purification, les jeunes colonies bactériennes ont été aseptiquement transférées et ensemencées dans des tubes à essai contenant le milieu PDA incliné. L'incubation a été réalisée à 55°C pendant 48h pour les bactéries et à 45°C pendant 7 jours pour les champignons. Cependant, la conservation a été réalisée au réfrigérateur à 4°C.

En outre, une autre méthode de conservation a été suivie et qui consiste à mettre les colonies dans des tubes contenant une solution de 20% de glycérol et les congeler à -20°C(Botton *et al.*,1990).

3.2.7-Etude de l'activité antagoniste

L'activité antagoniste in vitro des isolats thermophiles vis-à-vis *Fusarium sp.* a été étudiée selon deux méthodes: la méthode de confrontation par contact directe et à distance (contacte indirecte).

3.2.7.1-Confrontation par contact direct

Cette technique consiste à placer, dans la même boîte de Pétri contenant le milieu PDA appropriée, deux disques gélosés (0,9 cm de diamètre), l'une portant l'antagoniste et l'autre l'agent phytopathogène. Les deux pastilles ont été placées suivant un axe diamétral à 3 cm et à équidistance du centre de la boîte (Figure 6). Toutes les combinaisons entre l'agent antagoniste et l'agent pathogène ont été répétées 3 fois. Les repiquages ont été effectués en même temps au repiquage de témoin (repiquage de *Fusarium sp.* sans antagoniste) (Figure 7). L'incubation a été réalisée à 28°C pendant dix jours (Hibaret *al.*,2005).

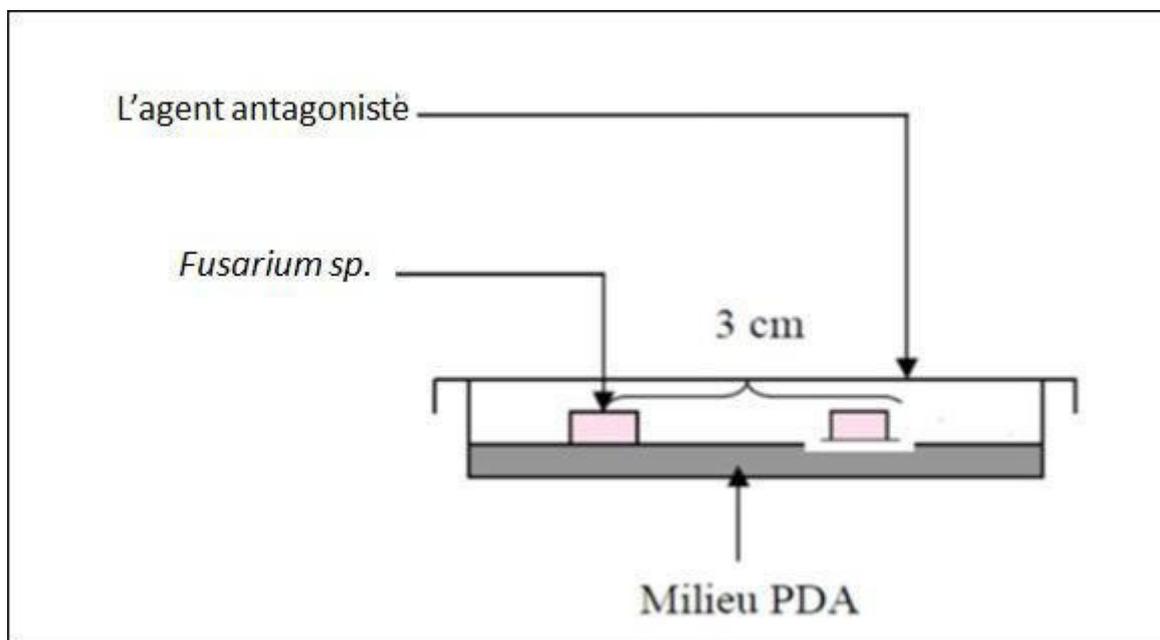


Figure 20 Confrontation entre l'agent phytopathogène *Fusarium sp.* et l'agent antagoniste par contact direct sur milieu PDA

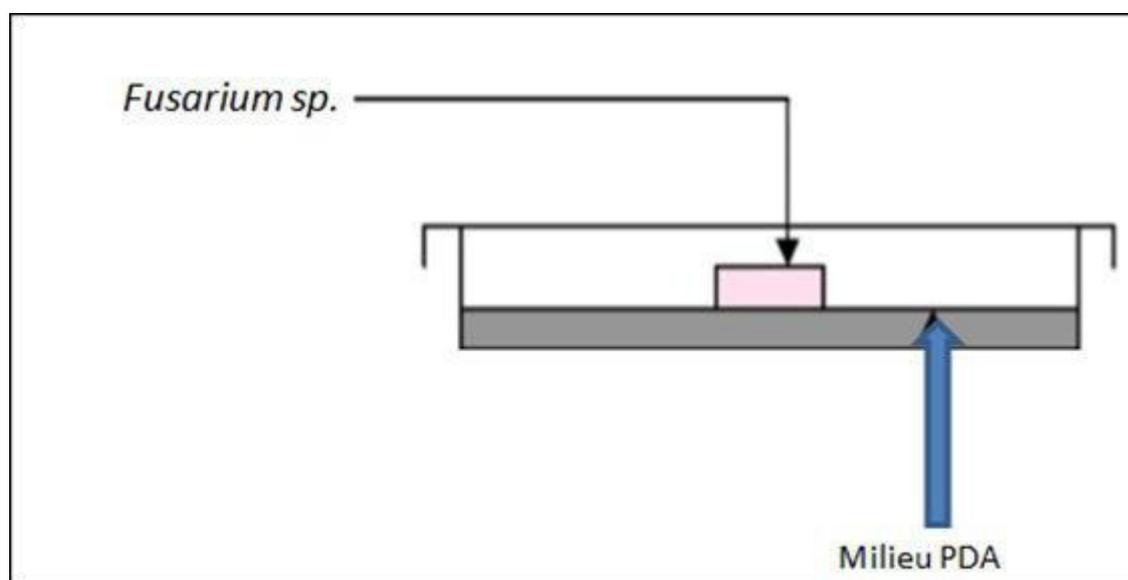


Figure 21 Boîte de Petri présentant le témoin de l'agent phytopathogène *Fusarium sp.*

3.2.7.2-Confrontation à distance

Le principe de cette méthode consiste à repiquer l'agent antagoniste et l'agent phytopathogène dans deux boîtes séparées; par la suite, un assemblage a été réalisé par la superposition de deux boîtes, l'agent antagoniste en bas et le phytopathogène *Fusarium sp.* en haut (Figure 8).

La jonction des boîtes a été assurée par des couches de parafilm afin d'éviter toute déperdition de substances volatiles. Le témoin a été préparé par superposition de deux boîtes, celle du haut contenant une pastille de *Fusarium sp.* alors que celle du bas ne contient que le milieu PDA.

Les conditions de culture ont été identiques à celle de la confrontation par contact direct. Toutes les combinaisons entre les agents antagoniste et de *Fusarium sp.* ont été répétées 3 fois.

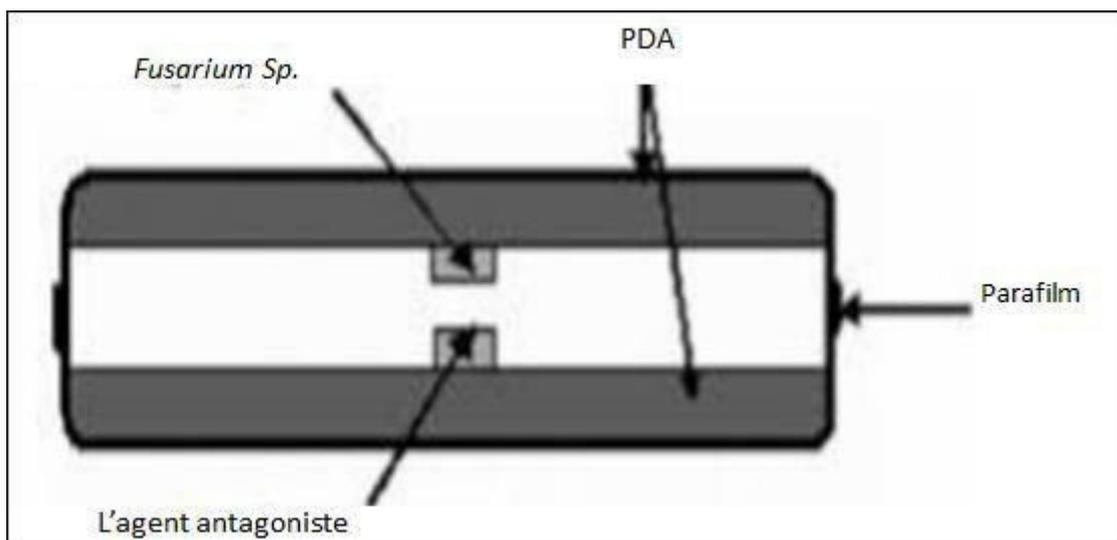


Figure 22 Confrontation à distance entre *Fusarium sp.* et l'agent antagoniste

3.2.7.3-Pourcentage d'inhibition

La lecture des résultats consiste à mesurer la distance développée par le phytopathogène en direction de l'antagoniste au de dix jours après l'incubation et qui sera comparée à celle développée par le phytopathogène uniquement. Le taux d'inhibition de *Fusarium moniliforme* testé a été évalué par le calcul du pourcentage d'inhibition de la croissance mycélienne du phytopathogène selon la formule proposée par (Sy, 1976; Vincent,1990) :

$$\text{IC \%} = (\text{DT} - \text{DPA} / \text{DT}) \times 100$$

DT : Croissance diamétrale du témoin.

DPA : Croissance diamétrale mycélienne du phytopathogène en présence de l'antagoniste.

IC% : Inhibition de la croissance.

3.2.8-Identification des microorganismes sélectionnés

L'identification des microorganismes sélectionnés a été réalisée par l'observation macroscopique et microscopique pour l'isolat fongique. Cependant, les isolats bactériens ont été identifiés par observation macroscopique et microscopique et des tests biochimiques.

3.2.8.1-Observation macroscopique

L'aspect macroscopique des colonies bactériennes a été observé directement à l'œil nu, sur la gélose après purification, il permet de connaître la forme, le contour, la texture, la couleur, et la viscosité. En effet, l'étude macroscopique de moisissure sélectionnées a été effectuée à l'œil nu, en observant les caractères suivant : la couleur et l'aspect de la colonie fongique.

3.2.8.2-Observation microscopique

L'identification microscopique de moisissure sélectionnée fait appel aux caractères morphologiques des hyphes et des structures de reproduction (la présence ou non de cloisons, structure et disposition de spores : couleur, forme, cloisons et taille). L'observation microscopique des bactéries permet de déterminer la forme des bactéries, la mobilité et le mode de regroupement.

➤ Coloration de Gram

La coloration de Gram est une étape importante et essentielle pour l'identification d'une bactérie isolée et la vérification de la pureté de l'isolat. La coloration de Gram est une coloration différentielle permettant de classer les bactéries en deux groupes selon la structure de leur paroi en bactéries à Gram positive et à Gram négative (Dennis,2007) en effet, la coloration de Gram consiste à préparer un frottis à partir d'une colonie de 24h, puis les préparations ont été observées à l'objectif (40×) et à immersion (100×) (Singleton,2005).

3.2.9- Test de thermo-résistance

La préparation des suspensions bactériennes a été réalisée à partir des colonies jeunes de 24 à 48 heures et diluées dans 9 ml de l'eau physiologique stérile (NaCl9%). Après agitation pendant 10 min, un traitement thermique à 80°C a été réalisé au trois bactéries antagoniste pendant 12 minutes. Ce traitement à la chaleur sert à éliminer toutes les formes végétatives et à récupérer la flore sporulée. 100 µL de chaque dilution traitée sont inoculés à la surface du milieu gélosé. Les boîtes sont, ensuite, incubées à 30° C pendant 24h et toute la flore bactérienne sporulée, aérobie anaérobies facultative, est obtenue (Seldin *et al.*, 1983). Celle-ci, correspond aux différentes bactéries formatrices d'endospores (endospore forming bacteria), y compris le genre *Bacillus*.

3.2.10-Tests biochimiques

L'identification biochimique est un examen qui permet d'identifier une bactérie en s'appuyant sur ces caractères biochimique, voici les caractères biochimiques qu'on cherche souvent chez les bactéries sélectionne (production de pigment fluorescent sur milieu King B, Recherche de la catalase, Détermination du type respiratoire et Le milieu mannitol).

➤ **Production de pigment fluorescent sur milieu King B**

Pour des *Pseudomonas* du groupe fluorescent (Lelliottet *al.*, 1987) la méthode consiste à ensemencer les souches à tester à l'aide d'une anse de platine stérile par des stries dans des tubes contenant le milieu King B. Les tubes ont été incubés à 28°C.

➤ **Recherche de la catalase**

La catalase est une enzyme qui dégrade le peroxyde d'hydrogène (H₂O₂) en eau et en oxygène. Ce test a été réalisé par la mise d'une goutte d'H₂O₂ sur une lame, et puis une colonie bactérienne a été mise sur la préparation.

En effet, le dégagement gazeux indique la production d'O₂ provenant de la dégradation d'H₂O₂, donc la souche est catalase +.



➤ **Détermination du type respiratoire**

Ce test a été réalisé sur la gélose viande foie (VF) répartie en tube profonds. Les tubes ont été ensemencés à l'aide d'une anse de platine qui traverse la gélose jusqu'au fond du tube, puis remontée de façon à ensemencer uniformément le milieu. Les cultures ont été incubées à 30°C pendant 48 heures (Guiraud *et al.* 1998).

➤ **Le milieu mannitol**

Ce milieu permet l'étude de la fermentation de mannitol, la mobilité de la souche. La présence d'un faible teneur d'agar dans le milieu (gélose semi-molle) rend possible le déplacement des bactéries mobiles autour de la pique centrale.

Ce test a été réalisé sur le milieu mannitol et ensemencé par pique central à l'aide d'une pipette pasteur fermée. L'incubation a été réalisée à 37°C pendant 24 heures. Grâce à la présence d'un indicateur de pH (le rouge de phénol) les résultats ont été estimés.

3.3-Etude de l'activité enzymatique des enzymes dégradent la paroi fongique

Grâce à leur grande spécificité d'action, les enzymes constituent un outil de fabrication dans de nombreux secteurs de la recherche, du contrôle et de la production industrielle de métabolites. Elles sont purifiées à partir de diverses matières biologiques premières, dont les microorganismes présentent une source très avantageuse. Un ensemble de tests enzymatiques ont été réalisés pour voir la capacité des isolats fongiques de dégrader des lipides, des protéines et de la chitine.

3.3.1-Détermination de l'activité protéolytique

La recherche de l'activité caséolytique est notamment utile dans l'identification des *Bacillus* et parfois des *Pseudomonas* (Camille Delarraset *al.*, 2007).

La caséine étant la protéine du lait (constitue la majeure partie des composants azotés du lait). De ce fait, un test d'hydrolyse de caséine a été effectué sur gélose au lait (Annexe 2). Les souches sélectionnées ont été ensemencées en un seul disque de moisissure (0,9 mm de diamètre) à l'aide d'un perforateur stérile et déposé de manière renversée au centre de la boîte. L'incubation a été réalisée à 30°C.

En fait, les résultats ont été appréciés quotidiennement durant 72 heures. la présence de cette activité a été détectée par un halo clair autour de la culture indiquant l'hydrolyse de la caséine, par contre un résultat négatif ne montre aucune zone d'hydrolyse autour de la culture (De Vos *et al.*, 2009).

3.3.2-Détermination de l'activité lipolytique

Les moisissures produisent principalement trois catégories d'enzymes lipolytiques : les lipases, les estérases et les phospholipases. Selon la nature de leur substrat, il est possible de diviser les enzymes lipolytiques en deux catégories : les lipases (triacylglycérol acylhydrolases) et les estérases (carboxyl estérases). Les lipases sont des carboxyl estérases qui catalysent l'hydrolyse et la synthèse d'acylglycérol à longues chaînes, c'est-à-dire qu'ils contiennent plus dix atomes de carbone (>10C), alors que les estérases catalysent l'hydrolyse de glycéroester à courtes chaînes (<10C). Il est à noter que parfois les lipases possèdent aussi une activité estérase, mais que l'inverse n'est pas vrai. Les

lipases agissent en conditions aqueuses sur les liens carboxyl esters de triacyl glycérols pour libérer des acides gras et du glycérol, c'est l'action hydrolytique des lipases. Tout fois, dans des conditions où les molécules d'eau sont moins abondantes ou disponibles, la réaction inverse, soit de synthèse, peut survenir (Gupta *et al.*, 2004)

➤ ***hydrolyse du tween 80***

La recherche d'estérase a été effectuée par le test d'hydrolyse des Tweens 80. En effet, la dégradation du tween 80 par les souches sélectionnées a été réalisée sur un milieu approprié (Annexe 2), en cas de réaction positive, il se forme un halo opaque autour de la culture après incubation à 30°C pendant 24 à 48 heures, le développement d'un précipité autour de la culture témoigne la présence d'une estérase (acide gras) (Sierra, 1957).

➤ ***Lécithinases***

Le jaune d'œuf est un substrat composé de lécithine, triglycérides et d'une lipoprotéine, il permet donc de rechercher trois enzymes : La lécithine : l'apparition d'un halo opaque, blanc jaunâtre, à bord net sous la colonie ou à la limite, indique la présence d'une lécithinase. Si la lécithinase est absente, toute l'opacité floue à la surface de la colonie indique la présence d'une lipase. La lipoprotéinase est révélée par l'apparition d'un halo clair autour de la colonie.

Ce test est réalisé par ensemencement en un seul disque de moisissure (0,9cm de diamètre) à l'aide d'un perforateur stérile et déposé de manière renversée au centre de la boîte, sur gélose nutritive contenant l'émulsion du jaune d'œuf stérile (egg-yolk agar ou Gélose à l'œuf) (Annexe 2). L'apparition de toute zone claire autour de la culture après 24 à 72 heures d'incubation à 30°C, prouve que la souche possède la lécithinase, enzymes dégradant la paroi cellulaire (De Vos *et al.*, 2009).

3.3.3- Détermination de l'activité chitinolytique

Les chitinases sont des enzymes hydrolytiques qui s'attaquent aux liaisons glycosidiques des molécules de chitine. Plus précisément, elles hydrolysent les liaisons (1→4)-β des résidus de N-acétyl-β-D-glucosaminide présents dans la chitine et les chitodextrines (Jollès et Muzzarelli, 1999).

L'activité chitinolytique des souches antagonistes a été évaluée sur des boîtes de Petri contenant le milieu chitine-agar (CA) et incubées à 30 °C pendant 5 jours après inoculation des disques au centre. Cependant, la largeur (mm) de chaque halo clair autour de souche antagoniste a été mesurée et enregistrée comme indicateur de l'activité chitinolytique (Nihorimbere *et al.*, 2013).

Résultats

4- Résultats

Le présent travail porte sur l'isolement et la sélection des isolats possédants une activité antifongique, afin de les utiliser comme agent de lutte biologique vis-à-vis de moisissure du genre *Fusarium*, agent causal de la maladie de fusariose de racine de blé.

4.1- Isolement de l'agent phytopathogène

L'isolement de l'agent phytopathogène à partir des échantillons de plantes de racines de blé présentant des symptômes de fusariose a permis l'obtention d'un seul isolat fongique.

4.2- Identification morphologique de l'agent phytopathogène

Les caractères macroscopique et microscopique de l'isolat fongique ont été étudiés sur milieu PDA après 7 jours de développement (Figure 9).

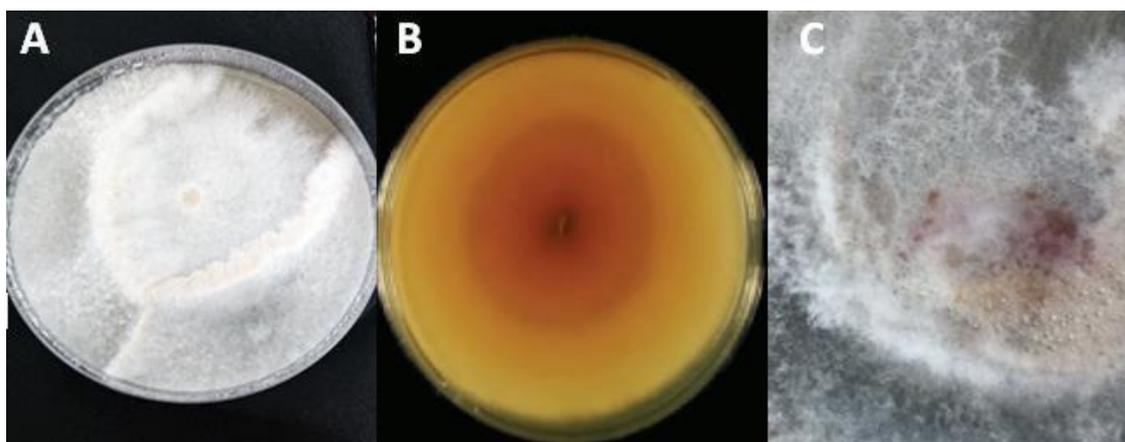


Figure 23 Aspect macroscopique de la colonie de la souche *Fusarium sp.* A (recto), B (verso): après 7 jours; C: 12 jours d'incubation à 30°C sur milieu PDA.

L'isolat fongique est caractérisé par une croissance rapide. Les colonies sont d'allure cotonneuse, de couleur blanche au départ, puis rose. Le verso est de couleur pourpre foncé au centre et beige à la bordure (Bioforma, 2002).

L'observation microscopique de l'isolat Fus1 à Gx40 a montré la présence de conidies fusiformes, allongées, légèrement incurvée, peu pointues aux extrémités. Ces caractères morphologiques correspondant à celles d'une espèce de *Fusarium sp.* (Larenet *et al.*, 1995; Sutton *et al.*,1998).

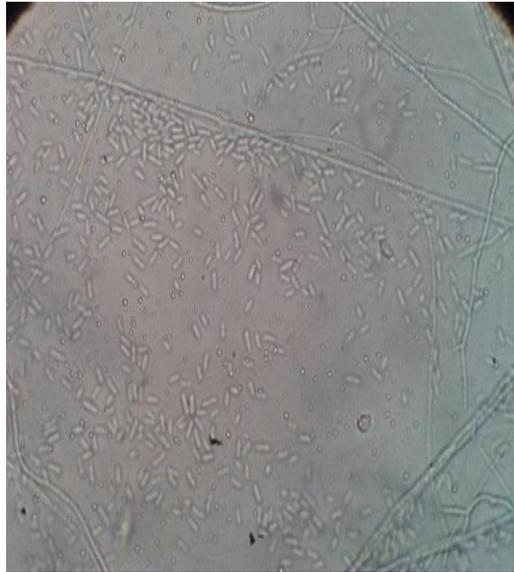


Figure 24 Aspect microscopique de *Fusarium sp.* (GX40).

4.3-Isolement de l'agent antagoniste

Huit isolats ont été isolés à partir de de Hammam Debagh en l'occurrence: Sept bactéries à une température de 55°C et un isolat fongique à une température de 45°C ont été isolés à partir des échantillons prélevés de l'eau et du sol de hammam Debagh (Tableau 2).

Tableau 2 Isolats microbiens obtenus à partir du sol des différents sites prospectés

Sites d'isolement prospectés	Microorganismes isolés (8)	
	Bactéries (55°C)	Moisissures (45°C)
S1(L'eau de la région thermale Guelma Hammam Debagh)	2	0
S2(L'eau de la région thermale Guelma Hammam Debagh)	2	0
S1'(sol de la région thermale Guelma Hammam Debagh)	0	1
S2'(sol de la région thermale Guelma Hammam Debagh)	2	0
S3'(sol de la région thermale Guelma Hammam Debagh)	1	0

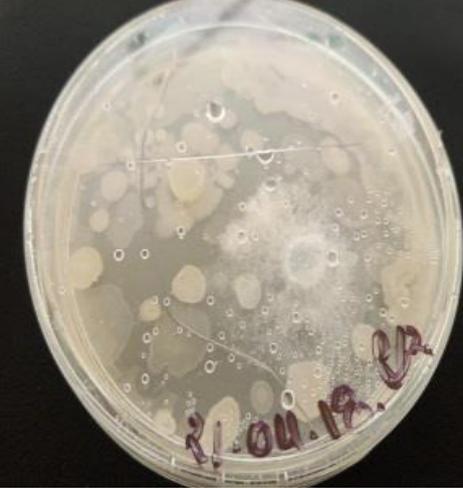
4.3.1- Sélection des isolats à effet anti-*Fusarium*

➤ *Confrontation direct*

L'activité antifongique a été recherchée chez les huit isolats obtenue précédemment. La technique utilisée pour la mise en évidence des propriétés antagonistes est la confrontation de l'agent phytopathogène *Fusarium sp.* avec les huit isolats dans la même boîtes de Pétri.

Quatre isolats ont été sélectionnés à partir de Hammam Debagh, une moisissure Chp et trois bactéries (B1, B2 et B3) possèdent un effet antifongique sur *Fusarium sp.* (tableau 2).

Tableau 3 Inhibition in vitro de la croissance de *Fusarium* par les isolats antagonistes (B1, B2 et B3) après 07 jours d'incubation.

Les isolats	Recto	Verso
Chp		
B1		
B2		



Le tableau 3 montre le pourcentage d'inhibition des isolats sélectionnés vis-à-vis l'agent phytopathogène *Fusarium sp.*

Tableau 4 Pourcentage d'inhibition des isolats sélectionnés vis-à-vis *Fusarium sp.*

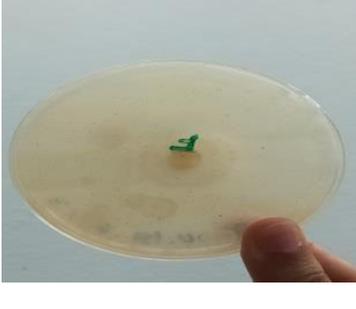
Les isolats	I (%) <i>Fusarium sp.</i>
Chp	76,47%
B1	85,88%
B2	64,70%
B3	85,88%

Les résultats de ce test ont montré que les taux d'inhibition de *Fusarium sp.* par les isolats varient entre 64% et 85% suivant la bactérie et la moisissure antagoniste. En effet, le meilleur effet inhibiteur a été développé par les isolats B1 et B3 (tableau 3).

➤ *Confrontation à distance*

Dans une autre étude, les isolats sélectionnés ont été testés par la méthode de confrontation à distance. En effet, les isolats testés ont un effet antagoniste vis-à-vis l'agent phytopathogène *Fusarium sp* (tableau 4). Alors ils sont capables de produire des composés diffusibles et volatiles qui inhibent la croissance de la souche *Fusarium sp*. (Trivedi et Pandey, 2008)

Tableau 5 Méthodes de confrontation à distance (méthode indirecte)

Les isolats	L'agent antagoniste	Agent phytopathogène
B1/ <i>Fusarium sp.</i>		
B2/ <i>Fusarium sp.</i>		
B3/ <i>Fusarium sp.</i>		



4.4-Identification des isolats à activité antifongique

4.4.1- Etude des caractères macroscopiques et microscopiques

Les caractères morphologiques et culturaux ont été déterminés après l'ensemencement des souches pures sur le milieu de culture. L'observation macroscopique se fait à l'œil nu, elle se base essentiellement sur les caractères macroscopiques indiquant précédent.

L'étude macroscopique de l'isolat Chp sur milieu PDA après 7 jours d'incubation est caractérisée par une croissance rapide d'allure poudreuse, vert foncé et le verso beige.

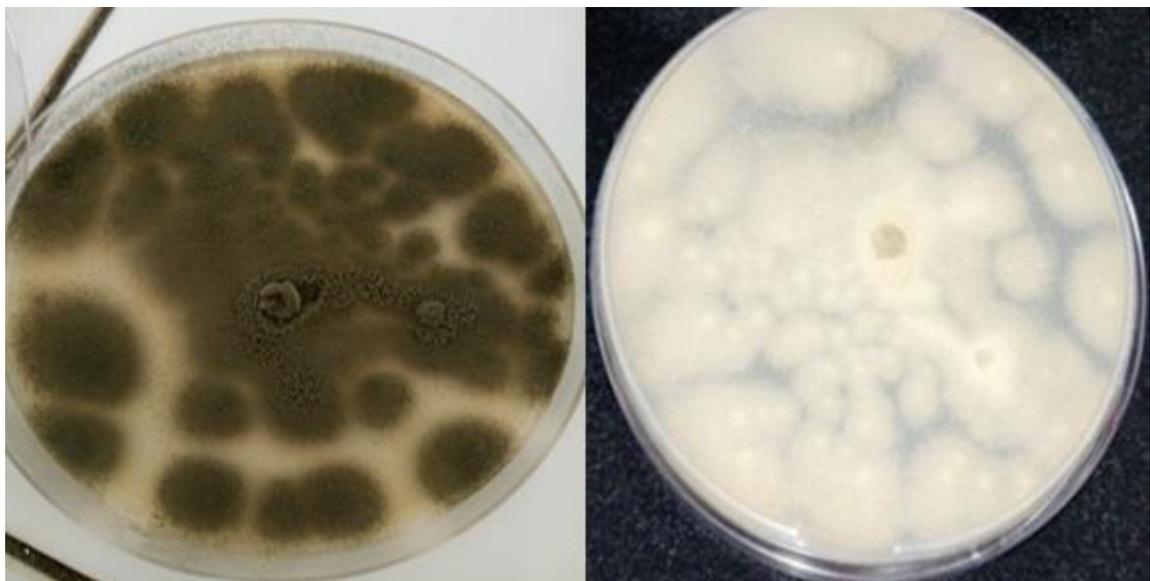


Figure 24 Aspect macroscopique de l'isolat fongique Chp

L'étude microscopique repose sur l'observation des structures caractéristiques de l'isolat Chp antagoniste sélectionné. En effet, l'observation microscopique sous microscope optique à (Gx40) présentant une tête et un hyphe non septé et spore rond (figure 13).

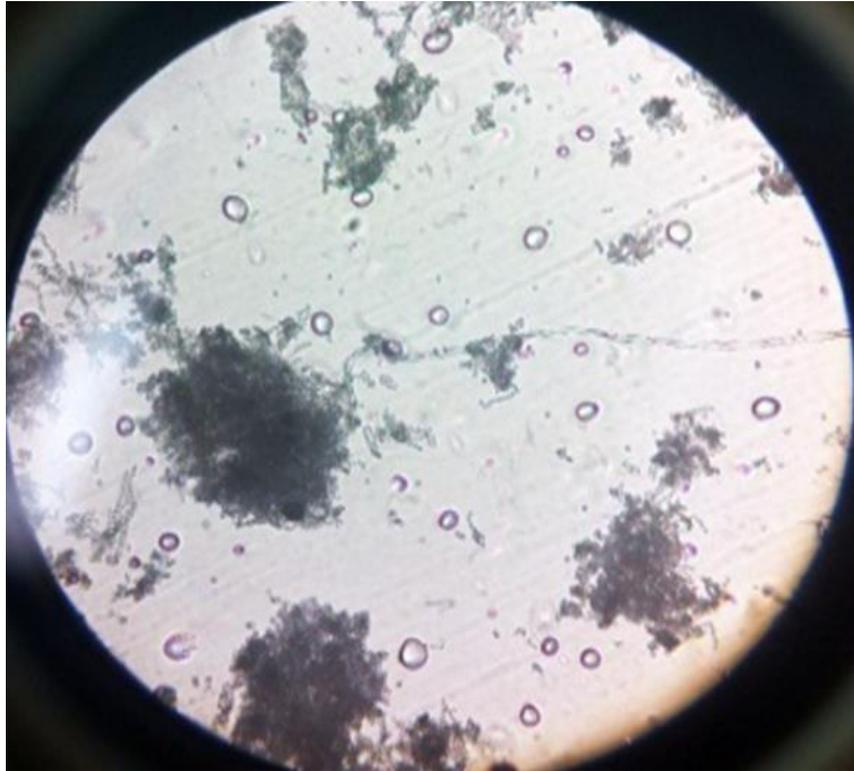


Figure 25 Aspect microscopique de l'isolat Chp sous microscope l'objectif X40.

Les résultats de cette étude préliminaire (aspect macroscopique et microscopique) confirment que l'isolat Chp appartient au genre *Aspergillus*.

L'étude macroscopique des isolats bactériens sélectionnés a montré qu'ils forment des caractères culturaux différents (figure 14). Les coloniesensemencées sur milieu PDA, apparaissent au bout de 24 heures à 55°C,

Les caractères macroscopiques des isolats sélectionnés B1, B2 et B3 ont été étudiés sur milieu GN. Quelques caractéristiques des colonies bactériennes ont été prises en considération notamment, la forme, la couleur et le contour des colonies (figure 14, tableau 3).

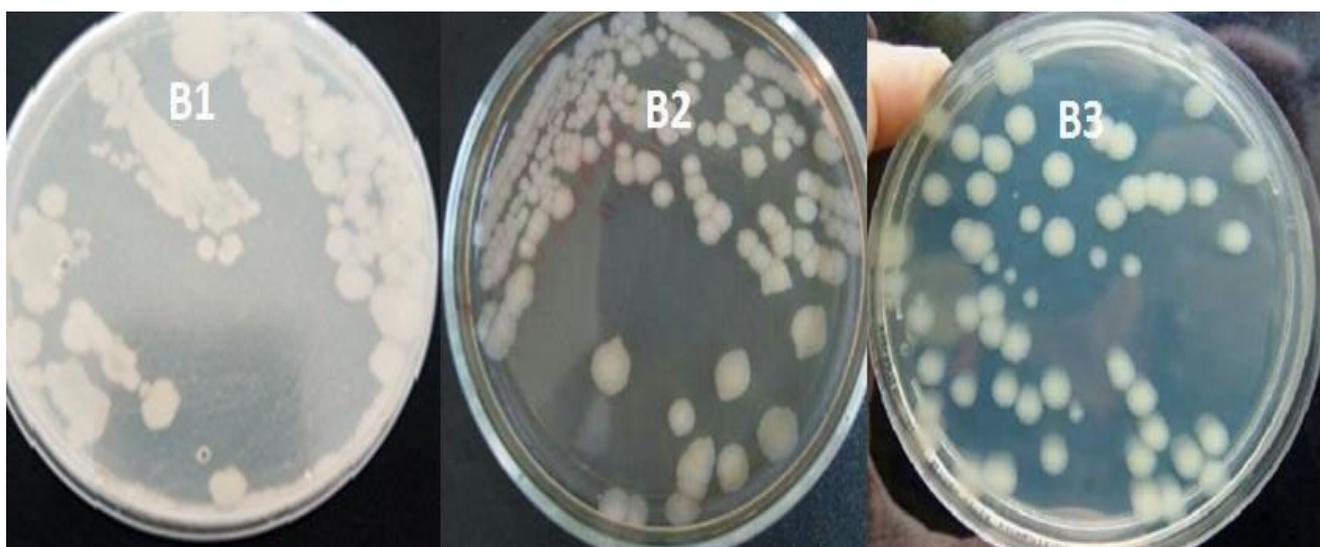


Figure 26 Aspect macroscopique des isolats bactériens sélectionnés sur milieu PDA

Tableau 6 observation macroscopique des isolats

Isolats	Taille	Forme	Elévation	Bord	Conteur	Surface	Couleur
B1	Moyenne	Circulaire	Elevée	Régulier	Régulier	Plane	Beige
B2	Moyenne	Circulaire	Bombée	Régulier	Régulier	Bombée	Beige
B3	Moyenne	Circulaire	Bombée	Régulier	Régulier	Convexe	Beige

L'observation à l'état frais et la coloration de Gram ont permis de développer une idée sur la morphologie des cellules bactériennes, leur mobilité. Les trois bactéries sont de forme bacille, Gram positif et immobiles (figure 15, tableau 4).

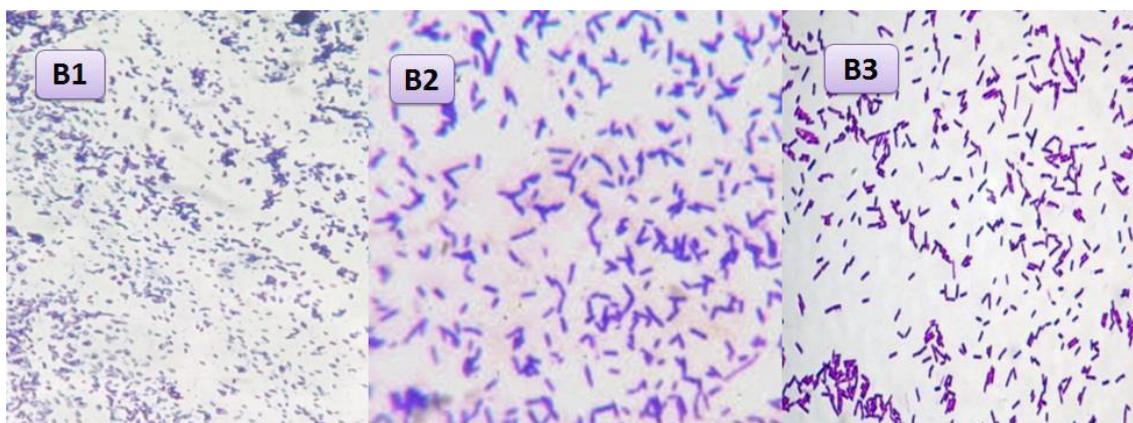


Figure 27 Observation microscopique des isolats bactériens (B1, B2 et B3) par coloration de Gram (Gx40).

Tableau 7 Caractères microscopique des isolats bactériens B1, B2 et B3.

Isolats	Forme	Mobilité	Taille
B1	Bacille	Immobile	Petite bacille
B2	Bacille	Immobile	Moyenne
B3	Bacille	Immobile	Moyenne

4.4.2- Les tests biochimiques

4.4.2.1-Test de thermo-résistance

Les résultats de test de thermo résistance des trois isolats (B1, B2 et B3) ont montré un développement bactérien. Celle-ci, correspond aux différentes bactéries formatrices d'endospores (endospore forming bacteria), y compris le genre *Bacillus*.

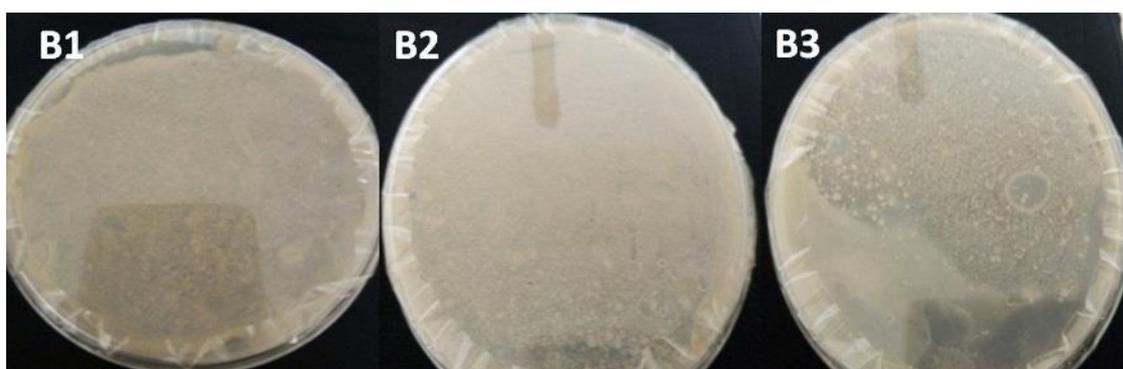


Figure 28 Le développement bactérien (Isolat B1, B2 et B3) après 24 heures de test de thermorésistance et incubation à 30°C.

4.4.2.2- La production des pigments (King B)

Les résultats de ce test ont montré l'absence de fluorescence, donc les trois bactéries ensemencées sur milieu King B ne sont pas de genre *pseudomonas sp.*

4.4.2.3-Test de catalase

Le test de la catalase permet de vérifier si une bactérie possède l'enzyme de la catalase ayant comme utilité de décomposer le peroxyde d'hydrogène (H₂O₂).

Les résultats de ce test sont illustrés dans le tableau 5. En effet, les trois bactéries antagonistes sont capables de produire la catalase (tableau 5).

Tableau 8 Test de catalase

Les isolats	B1	B2	B3
Test de catalase			

la présence de gaz indique la production d'O₂ provenant de la dégradation d'H₂O₂ donc les 3 isolats sont catalase + .

4.4.2.4-Test de type respiratoire

Les résultats de ce test ont montré le type respiratoire des bactéries antagonistes sur milieu VF après incubation à 30° C à 48 heures. En effet, les trois bactéries sont aéro anaérobies facultatives comme il est illustré dans le tableau 6.

Tableau 9 type respiratoire des bactéries antagonistes.

Isolats bactérienne	Type respiratoire
B1	
B2	



4.4.2.5-Test de Mannitol mobilité

Le milieu de mannitol mobilité permet l'étude de la fermentation de mannitol et la mobilité des isolats bactériens (B1, B2 et B3). La lecture de ce test est possible grâce à la présence d'un indicateur de pH, le rouge de phénol. L'utilisation du mannitol acidifie le milieu qui peut ainsi être révélé par le virage de l'indicateur de pH à sa teinte acide (jaune) (Tableau7).

Tableau 10 test de mannitol mobilité

Isolats bactériens	Mannitol mobilité
B1	
B2	
B3	

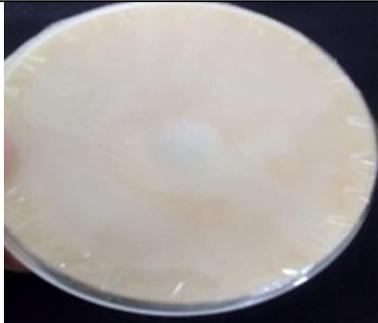
Le test de mannitol mobilité a révélé que les trois bactéries B1, B2 et B3 capables de dégrader le mannitol donc les trois isolats bactériens sélectionnés sont mannitol+.

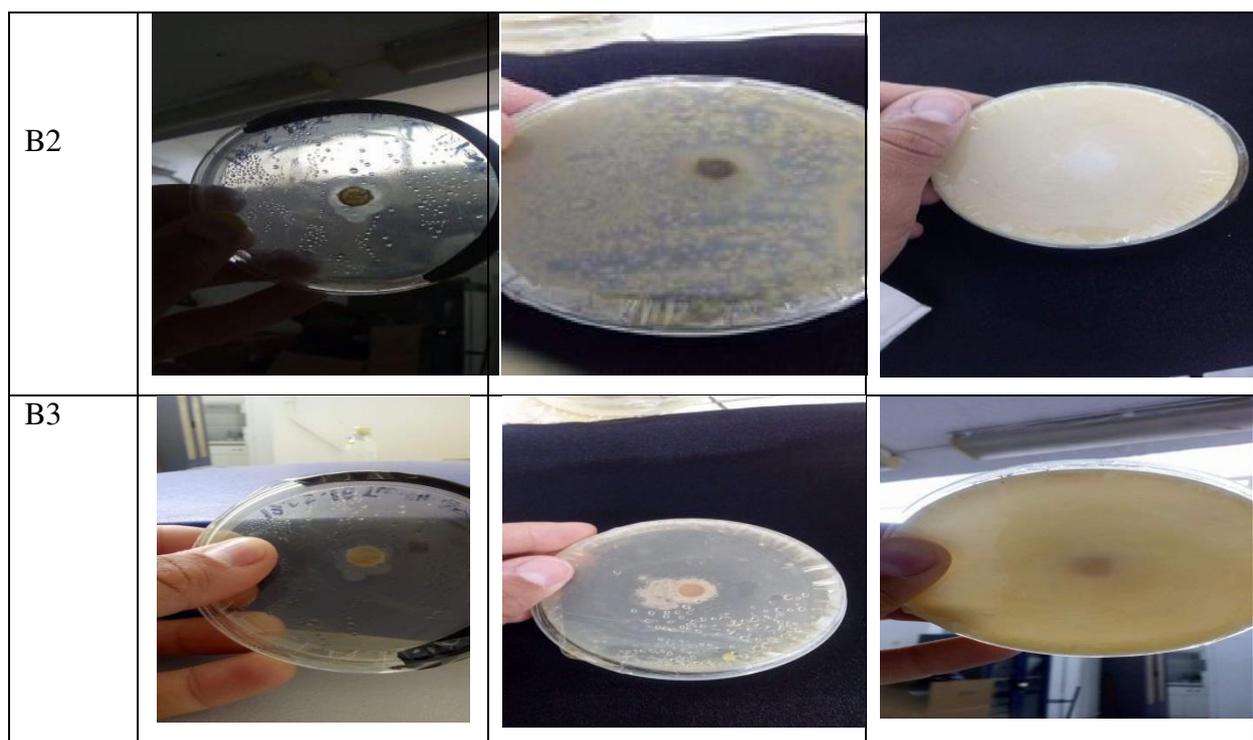
- Les tests d'identification préliminaires, reposés sur l'étude morphologique et physiologique des isolats bactériens, ont montré que tous les isolats appartiennent au genre *Bacillus* notamment les *Bacillus* thermophiles. En effet, ils apparaissent au microscope optique sous forme de bâtonnets caractérisés par la coloration Gram+, manitol+, aéro anaérobie facultatifs et catalase positif.

4.5- Enzymes dégradant la paroi des cellules fongiques

Le résultat de ce test montre la capacité des souches les plus performantes (*Aspergillus sp.*, *Bacillus sp1.*, *Bacillus sp2.* et *Bacillus sp3.*) à produire des enzymes nécessaires dégradant la paroi des cellules fongiques comme la protéase, la lipase la chitinase (tableau 11).

Tableau 11 Détection de l'activité de protéase et de lipase développées par *Aspergillus sp.*, *Bacillus sp1.*, *Bacillus sp2.*, *Bacillus sp3.*

isolats	Hydrolyse de tween 80	Lécithinase	Hydrolyse de la caséine
CH			
B1			



Le tableau 12 cité ci-dessous montre que la souche *Aspergillus sp.* ne possède pas l'enzyme qui dégrade le tween 80 et encore ne possède pas l'enzyme qui dégrade la lécithinase donc *Aspergillus sp.* est capable de sécréter la protéase et n'a pas capable de produire la chitinase et la lipase.

Les bactéries B1, B2 et B3 hydrolysent le tween 80 et la lécithinase donc ils sont capables de produire l'estérase. En fait, les bactéries B1, B2 et B3 sont capable de produire la lipase et la protéase ne sont pas capables de produire la chitinase.

Tableau 12 Les résultat des Tests enzymatiques pour les isolats sélectionnés

Les isolats	Hydrolyse de tween 80	Lécithinase	Hydrolyse de la chitine	Hydrolyse de la caséine
Chp	-	-	-	+
B1	+	+	-	+
B2	+	-	-	+
B3	+	+	-	+

Discussion

3- Discussion

L'utilisation intensive de la lutte chimique a provoqué de graves conséquences sur l'environnement et la santé de l'homme (Rocha *et al.* 2014) d'où l'apparition des produits phytosanitaires d'origine naturelle, dits, biologiques. Parmi ces derniers, on note les rhizobactéries promotrices de la croissance des plantes (PGPRs: plant growth promoting rhizobacteria), qui sont largement utilisées en agriculture biologique comme agents naturels de biocontrôle (McSpadden- Gardener, 2004).

Le présent travail s'inscrit dans le cadre de caractérisation d'un ensemble de microorganismes, isolées de région thermale d'Algérie, pour leurs capacités *in vitro* contre l'agent causal de fusariose à savoir, *Fusarium sp.*

La souche phytopathogène de *Fusarium sp.* utilisée ici, a été isolée et sélectionnée à partir des racines, présentant les symptômes de fusariose de blé. Ce résultat montre que cette souche est responsable de fusariose de blé dans la région Constantine. La présence de ce champignon phytopathogène dans des plantes de blé malade a été rapporté par plusieurs études, telle que. Jeunot B (2005) .

La lutte biologique contre la maladie de fusariose du pied du blé, implique la recherche des microorganismes possédant un potentiel antagoniste vis-à-vis des champignons phytopathogènes causant la maladie. Parmi ces microorganismes antagonistes, les *Bacillus* sont les plus connus et classés parmi les plus actifs (Williams et Asher 1996)

En effet, les souches d'*Bacillus* étudiées dans le présent travail, ont été isolés du sol et de l'eau de la région de Guelma « Hammam Debagh ». Ce site est choisi par rapport à particularité écologique (la température élevée).

Sur le volet microbiologique, l'examen de l'échantillon collecté a abouti à l'isolement de huit isolats : sept bactéries et une moisissure thermophiles, dont, en moins, quatre isolats (trois bactéries et une moisissure représentant et conformes des bactéries du genre *Bacillus* (De vos *et al.*, 2009 et Madiganet *al.*, 2006) et une moisissure représentant le genre *Aspergillus sp.*(Judith FILLAUX 2013)).

La recherche d'activité antifongique a été effectuée pour les huit souches obtenues précédemment. La technique utilisée pour la mise en évidence des propriétés antagoniste est la confrontation de l'agent phytopathogène (*Fusarium sp.*) avec une souche de *Bacillus* dans une même boîte de Pétri et une moisissure de genre *Aspergillus sp.* Le milieu PDA utilisé dans le présent test est capable de pourvoir une source de carbone nécessaire pour la croissance des microorganismes.

À titre de rappel, ce test a permis de sélectionner quatre isolats (trois bactéries et une moisissure) qui ont une activité inhibitrice contre le champignon *Fusarium sp.*

En 1997, Landa *et al.* ont montré que les *Bacillus* sont des antagonistes puissants pour leur croissance et la synthèse de substances antifongique. Nos résultats ont aussi montré que les *Bacillus* ont été des puissants antagonistes des champignons du genre *Fusarium* avec un pourcentage d'inhibition *in vitro* des souches B1, B2 et B3 est égal à 85,88%, 64,70%, 85,88%. Aussi, ces résultats correspondent avec ceux obtenus par Swain et Ray (2006).

Selon (Trachuk *et al.*, 2008), les souches de *Bacillus* thermophiles peuvent parasiter les microorganismes phytopathogènes en dégradant leur parois.

Dans le cas de test d'antagonisme d'*Aspergillus sp.* par le taux de croissance de phytopathogène est faible par rapport à l'antagoniste, ce qui correspond de mettre en évidence l'effet inhibiteur en direct de *Aspergillus sp.* exercé sur *Fusarium sp.* Le témoin du *Fusarium sp.* cultivé seul occupe une surface d'environ 8 cm de diamètre au bout de 7 jours d'incubation. La souche *Aspergillus sp.* a réduit le développement de *Fusarium sp.* avec un pourcentage d'inhibition 76,47%.

Aspergillus sp. possèdent l'enzyme qui hydrolyse la caséine donc il dégrade la paroi de *Fusarium*. Les souches les plus performantes sont les bactéries B1 et B2 avec un pourcentage d'inhibition égale à 85,88%.

Le test d'hydrolyse de la caséine a été réalisé sur le lait gélosé : il a permis la mise en évidence de l'activité protéolytique chez les quatre isolats B1, B2 et B3. En effet, les isolats bactériens ne possèdent pas l'activité protéolytique. Par contre *Aspergillus* (Chp) possède une activité protéolytique caractérisée par une zone d'hydrolyse égale à 2,5 cm (Smith *et al.*, 1952; Duce et Thomas, 1959).

La souche B2 et B3 étudiées ont la capacité d'hydrolyser le tween 80 qui se traduit par un halo d'opacification autour de la culture. C'est la capacité d'utiliser les estérases comme substrat. Dans ce contexte il a été montré une diversité d'enzymes lysozymiques thermostables telle que les estérases chez les espèces thermophiles du genre *Bacillus* qui sont relativement diversifiées dans leurs propriétés et des spécificités de substrat (Miettinen et Zhang., 2005). En outre, Shamsuzzaman *et al.* (1987) ont découvert les estérases thermostable de *Bacillus sp.* donc ces enzymes dégradent les lipases et les estérases de paroi des cellules fongiques de *Fusarium sp.*

Les souches B1 et B3 produisent l'enzyme de chitinase qui dégrade la chitine. Grâce à cette habilité à dégrader la chitine, composant majeur dans la structure de membrane cellulaire des agents phytopathogènes (Someya *et al.*, 2004), ces enzymes chitinolytiques ont été considérées importantes dans le contrôle biologique (Singh *et al.*, 1999).

La variation du taux d'inhibition de *Fusarium sp.* par les souches antagonistes pourrait être lié à la composition de métabolites secondaires secrétés qui varie selon la souche productrice, comme elle pourrait être liée aux conditions de production de métabolites antifongiques.

En fait, cette capacité des *Bacillus sp.* et *Aspergillus sp.* à inhiber la croissance des champignons phytopathogènes est d'habitude liée à la production de substances antifongiques (Fguira *et al.*, 2005 ; Atta, 2009) et/ou à la production d'enzymes extracellulaires hydrolytiques (Mukherjee and Sen, 2006; Prapagdee *et al.*, 2008), elle pourrait être influencée par certains facteurs physiques (Allaire, 2005), dont les plus importants sont la présence de source de carbone et d'azote dans le milieu de culture, mais aussi les divers facteurs environnementaux à savoir le pH, la température, ou encore la période d'incubation. Il devient alors nécessaire d'optimiser au maximum les conditions de culture pour avoir une production élevée en métabolites secondaires (Himabindou et Jetty, 2006).

6- Conclusion

Dans cette étude qui se focalise sur la recherche des microorganismes développant une activité antifongique des champignons phytopathogène responsables de fusariose du blé. L'exploitation des échantillons du sol en provenance du Hammam dbegh a abouti à l'isolement de huit isolats thermophiles, dans le but de sélectionner des souches qui pourront être efficaces dans la gestion de la maladie de pied fusarien du blé. Les résultats d'évaluation du pouvoir antagonisme de chaque souche a montré que certains *Bacillus* et une moisissure *Aspergillus sp.* isolés à partir d'échantillon cité précédemment présentent une activité antifongique puissante vis-à-vis du *Fusarium sp.* Cette propriété pourrait être exploitée dans le cadre de la lutte biologique. L'étude d'un ensemble des caractéristiques morphologiques, physiologiques et biochimiques des souches bactériennes actives a permis d'apporter des informations sur des propriétés biologiques des *Bacillus*, en particulier, leur diversité métabolique importante.

Bien que ces résultats soient préliminaires, ils permettent d'orienter les recherches Vers des nouvelles perspectives aussi bien dans l'agriculture.

De ce fait, il est intéressant de se fixer des points de recherche future, on complète de ce travail comme suite :

- Evaluer l'effet d'antagoniste des souches isolées sur l'agent phytopatogène.
- Déterminer le mécanisme d'action des substances antifongiques.
- Tester l'effet antagoniste sur des plantes de blé cultivées.
- L'identification génétique des isolats antagonistes et l'isolat fongique phytopatogènes.
- Etudier la possibilité de ces souches dans la production des enzymes.

7- Résumé

La pourriture racinaire est aussi connue sous les noms de pourriture du pied, fusariose du pied, pourriture des racines sèches, ou encore pourriture commune. L'exploration des échantillons de blé (racines) présentant des symptômes de fusariose de pied, dans la région de Constantine a permis d'obtenir un isolat fongique filamenteux (Fus1). L'identification morphologique de cet isolat a révélé qu'il s'agit de *Fusarium sp.*

L'exploration des échantillons prélevés à partir d'une région thermale de Hammam Debagh (Gelma), a permis l'obtention de huit isolats microbiens thermophiles.

Quatre isolats ont été sélectionnés à partir de Hammam Debagh, une moisissure Chp et trois bactéries (B1, B2 et B3) possèdent un effet antifongique sur *Fusarium sp.* (Taux d'inhibition varient entre 64% et 85%), cependant, le meilleur effet inhibiteur a été développé par les isolats B1 et B3.

L'identification morphologique des isolats sélectionnés a montré que les isolats bactériens ; B1, B2 et B3 sont identifiés comme étant *Bacillus sp1.*, *Bacillus sp2.* et *Bacillus sp3.* respectivement, alors que l'isolat fongique Chp est identifié comme *Aspergillus sp.* À notre connaissance, l'isolement d'*Aspergillus sp thermophile* à partir du sol de Hammam dbegh, Guelma.

Les tests de l'activité enzymatique ont montré la capacité des souches sélectionnées à produire les enzymes en l'occurrence : la lipase et la protéase. En fait, les bactéries B1 et B3 sont capable de produire la chitinase.

8- Summary

Root rot is also known as foot rot, Fusariose rot, dry root rot, or common rot. Exploration of wheat samples (roots) with symptoms of fusariose rot in the Constantine region gave a filamentous fungal isolate (Fus1). The morphological identification of this isolate revealed that it is *Fusarium* sp. Exploration of samples taken from a thermal region of Hammam Debagh (Gelma) showed eight thermophilic microbial isolates. Four isolates were selected from Hammam Debagh; a Chp fungus and three bacteria (B1, B2 and B3) that have an antifungal effect on *Fusarium* sp. (Inhibition rates varied between 64% and 85%). However, the best inhibitory effect was developed by the two isolates B1 and B3.

Morphological identification of the selected isolates revealed that the bacterial isolates; B1, B2 and B3 were identified as *Bacillus* sp1., *Bacillus* sp2. and *Bacillus* sp3. respectively, while the fungal isolate Chp was identified as *Aspergillus* sp. To our knowledge, the isolation of termophilic *Aspergillus* sp. was done from Hammam Dbegh soil, Guelma.

The enzymatic activity tests demonstrated the ability of the selected strains to produce some enzymes; lipase and protease in our case. In fact, B1 and B3 bacteria are capable to produce chitinase.

9- ملخص

يعرف عفن الجذر أيضاً باسم تعفن القدم ، أو تعفن جذر فيوزاريوم ، أو تعفن الجذور الجافة ، أو تعفن شائع. أسفر استكشاف عينات القمح (الجذر) تحمل أعراض الفزاريوم في منطقة قسنطينة عن عزلة فطرية خيطية (Fus1). كشف الكشف المورفولوجي لهذه العزلة أنه فيوزاريوم س.

أسفرت عملية استخلاص العينات المأخوذة من منطقة حمام دباغ (قالمة) الحرارية عن 8 عزلات جرثومية حرارية. تم اختيار أربع عزلات من حمام دباغ ، وهو عبارة عن عزلة خيطية Chp وثلاث بكتيريا (B1 و B2 و B3) لها تأثير مضاد للفطريات على الفيوزاريوم. (تتراوح معدلات التثبيط بين 64% و 85%) ، ومع ذلك ، فإن أفضل تأثير كابح تم تطويره بواسطة العزلات B1 و B3.

وأظهر التحديد المورفولوجي لعزلات مختارة أن العزلات البكتيرية B1 و B2 و B3 باسم *Bacillus sp1* ، *Bacillus sp2* و *Bacillus sp3*. على التوالي ، في حين يتم تحديد العزلة الفطرية بـ *Chp Aspergillus sp*. على حد علمنا ، فإن العزلة من *Aspergillus* حراري يتم عزلها لأول مرة من تربة الحمام دباغ ، قالمة. وأظهرت اختبارات النشاط الأنزيمي قدرة السلالات المختارة على إنتاج الإنزيمات في هذه الحالة: الليباز والبروتيز. في الواقع ، البكتيريا B1 و B3 قادرة على إنتاج الكيتيناز.

- Judith FILLAUX mardi 17 décembre 2013
- Marie Machouart Service de Parasitologie-mycologie CHU Brabois.
- .
- : < <http://library.ndsu.edu/repository/handle/10365/17320> >.
- 73-77.
- 7-9 avril 2007.
- Abdelkader Djermoun département agronomie *Université de Hassiba Benbouali de Chlef* Revue Nature et Technologie. n° 01/Juin 2009 page1.
- Abis (2012) Le blé en Méditerranée sociétés, commerce et stratégies. Economie et territoire relations commerciales CIHEAM paris : 241-247.
- Adapté de Pany *et al.*, 1995.
- Ammar M (2014) organisation de la chaîne logistique dans la filière céréales en Algérie états des lieux et perspective. thèse de doctorat de CIHEAM Montpellier : p 17_20.
- Anonyme 4, 2017.
- Bacillus A, Decoster, FLM, P, I.
- Benhamou N et Chet I,(1996) .Parasitism of sclerotia of *Sclerotium rolfsii* by *Trichoderma harzianum*: ultra structural and cytochemical aspects of the interaction .phytopathology86.p405-416.
- Benhamou N. et Chet I., 1997. Cellular and molecular mechanisms involved in the interaction between “*Trichoderma harzianum* and *Pythium ultimum*”. Appl. Environ. Microbiol, 63:295-297.
- Bonjean A .et Picard E., (1990) - Les céréales à paille origine, historique, économie et sélection. Eds Nathan, 235 pages.
- Botton B, Beretion A, Fevre M, Gauthier S, Guy Ph, Larpent J.Ph, Reymond P, Sanglier J.J, Vayssier Y ., et Veau P.,(1990). Moisissures utiles et nuisibles. Importance industrielle. 2eEd, Masson. Paris, Milan, Barcelone et Mexico. 512.
- Botton B, Bretion A, Fevre M, Gauthier S, Guy Ph, Larpent J.P, Reymond P, Sanglier J.J, Vayssier Y., et Veau P.,(1990) . Moisissures utiles et nuisibles. Importance industrielle. 2eEd. Masson. Paris, Milan, Barcelone et Mexico. 512.

- Botton B., Breton A., Fevre M., Gauthier S., Guy P.H., Larpent J.P., Reymond P., Sanglier J.J., Vayssier Y., Veau P.(1990). Moisissures utiles et nuisibles importance industrielle. 2ème édition. Masson. Collection Biotechnologies. p :34-428.
- Botton B., Breton A., Fevre M., Guy Ph., Larpent J.P., Veau P. (1985). Moisissures utiles et nuisibles, importance industrielle. Masson. Paris. 35-276.
- Botton B., Bretton A., Fever M., Gautier S., Guy Ph., Larpent J.P., Reymond P., Sanglier J-J., Vayssier Y and Veau P. (1990). Moisissures utiles et nuisibles, importance industrielle, (edn) Masson, Paris.
- CHABASSE, D., 2002. Les moisissures d'intérêt médical. Cahier N°25 de formation de biologie médicale, pp. 25-27.
- Christieans Souad., Zagorec Monique. (2013). Flores protectrices pour la citrus fruits. *International J. Food Microbiol.*105: 11-17.
- classification of the Fungi. *Mycol Res* 111:509-47.
- conservation des aliments. Editions Quae. p : 52.
- Crystal L., 2014. Le marché du blé dur : service agronomie- Economie-Environnement. Mercredi 06 Février 2014. Édition : ARVALIS. n. 79.
- De Vos P., Garrity G. M., Jones D., Krieg N. R., Ludwig W., Rainey F. A., Schleifer K. H. and Whitman W. B. (2009). *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*, 2nd ed., The *Firmicute*. Springer. New York. Volume 3.63-67.
- De vos p.D 8, logan, N.A.(2009). *Bacillus*. *Bergey's Manual of systematics of Archaea and Bacteria*.
- Domain A.L., (1995). Emerging concepts of secondary metabolism in Devaux ,A., (1995). Rapport No.4 : Essais sur la Resistance du blé à la fusariose del'épi (*fusarium graminearum*). Ministère de l'agriculture des Pêcheries et de l'alimentation du Québec.
- Emmert E.A.B. et Handelsman J. ,(1999). Biocontrol of plant disease: a (Gram-) positive perspective. *FEMS. Microbiol. Lett.* P.171, 1-9.
- Errakhi R., Bouteau F., Lebrihi A and Barakate M. (2007).Evidences of biological control capacities of *Streptomyces* spp. against *Sclerotium rolfsii* responsible for damping off disease in sugar beet (*Beta 1608 Afr. J. Microbiol. Res. vulgaris L.*). *World J. Microbiol. Biotechnol.*23: 1503–1509.

- fermentation. *ProcessBiochem.* 40 : 2962–2967.
- fluorescent plant pathogenic *Pseudomonas*. *Journal App. Bacterial.*29: 470-489.
- forchitinase production by soil isolates of *Penicilliumchrysogenum*under solid substrate
-G. Trüper, M. Dworkin, W. Harder & K. H. Schleifer. pp. 768-808. Springer, New York, N. Y.
- Gerhardt P (1994).Methods for General and Molecular Bacteriology, Washington, DC, American Society for Microbiology.
- Grignac P., (1978). Amélioration variétale de blé dur (*Triticum durum* Desf.).Annale de l'INA (El –Harrach) : 83 -110.
- Guiraud J. P. (1998). Microbiologie alimentaire. Ed. Dunod. Paris.
- Guiraud J.P. (1998). Microbiologie alimentaire, (edn) Dunod. Paris.
- Guiraud J.P. (1998). Microbiologiealimentaire, (edn) Dunod.Paris.
- Gustafson P., Raskina O, Ma X.-F., Nevo E., (2009). Wheat evolution, domestication and improvement. In: *Wheat science and Trade*. pp.
- HAL Id: tel-00849969. <https://tel.archives-ouvertes.fr/tel-00849969> Submitted on 2 Aug 2013.
- HAL Id: tel-00849969<https://tel.archives-ouvertes.fr/tel-00849969> Submitted on 2 Aug 2013.
- HAL Id: tel-00849969<https://tel.archives-ouvertes.fr/tel-00849969>Submitted on 2 Aug 2013.
- HAL Id: tel-00849969<https://tel.archives-ouvertes.fr/tel-00849969> Submitted on 2 Aug 2013.
- Hales N, Rush C (2016) Algeria Grain and Feed Annual 9 : 1-11.
- Hibbett, D. S., M. Binder, J. F. Bischoff, et al., 2007. A higherlevel phylogenetic
- Höfte H and Chrispeels M.J., (1992). Protein sorting to the vacuolar membrane. *Plant Cell* .
- <http://www.bacterio.cict.fr/bacdico/bb/bacillus.html>
- Ingénieur INPToulouse,n°534,236p.www.
sist.sn/gsd/collect/publi/index/assoc/HASH8e42/a871ase70.dir/doc.pdf.

- Jeunot B ; (2005) . Les fusariotoxines sur céréales : détection, risque et nouvelle réglementation. Thèse : pour obtenir le diplôme d'état de docteur en pharmacie. Université.
- Jouany J.P., (2007). Vaches laitières et mycotoxines, l'étau se resserre. En attendant les outils de diagnostic. PLM, 383: p. 46-48.
- KANG Z., BUCHENAUER H. « Studies on the infection process of *Fusarium culmorum* in wheat spikes: Degradation of host cell wall components and localization of trichothecene toxins in infected tissue ». *European Journal of Plant Pathology*. 2002.
- Karine Alain, Claire Geslin, Anne Godfroy, Daniel Prieur.
- Keller N., (2011). The fungal treasure chest: Spore origins? *Fungal Biol. Rev*, 25.
- Kharroub K. (2007). Identification et étude moléculaire des bactéries et des archéobactéries aérobies halophiles de la sebkhia Ezzemoul (Ain M'Lila). Thèse de doctorat, Université Mentouri-Constantine. P. 194.
- Laboratoire de Parasitologie- Mycologie du CHU d'Angers (Mars 2002) Formation Biologie médicale-4, rue Larrey 49033 Angers cedex 78-89.
- Landa, B.B., Hervas, A., Bethiol, w., Jimenez-Diaz, R.M. 1997. Antagonistic activity of bacteria from the chickpea rhizosphere against *Fusarium oxysporum f. sp. ciceris*. *Phytoparasitica*, 25pp. 305-318.
- Lansing M. Prescott., Linda M. Sherwood., Christopher J. Woolverton. (2010). *Microbiologie 3ème édition*. De Boeck supérieur. p : 73-74 -75- 578.
- Larone D H.** (1995). *Medically Important Fungi - A Guide to Identification*, 3rd ed. ASM
- Lelliott R. A., Billing E. et Hayward A. C. (1966). A determinative scheme for the
- LESLIE J. F., SUMMERELL B. A., BULLOCK S. *The Fusarium Laboratory Manual*. First edition. Blackwell Publishing, 2006. 414 p. ISBN : 9870813819196.
- Mackey J. (1968). Species relations in Triticum. Proc. 2nd International Wheat Genetic Symposium, *Hereditas*, 2 : 237-276.
- Madigan, M.T. (2006) *The family heliobacteriaceae in the prokaryotes* (pp.951-964). Springer vs.
- MCMULLEN M. P., STACK R. W. « *Fusarium* head blight (Scab) of small grains » [En ligne]. North Dakota State University, Plant Pathology Department, 2011. [Consulté le 12 juillet 2012]. Disponible sur le web

- Nelson P.E., Toussoun T.A. et Marasas W.F.O., (1983). *Fusarium species*. An illustrated.
- Nihorimbere V, Pascal K, Ernest S (2013). Isolation of *Bacillus* strains from the rhizosphere of Tomato and their *in vitro* antagonistic effects against phytopathogenic fungi. *Glob. Adv. Res. J. Microbiol.* 3(2):65-71.
- PARRY D., JENKINSON P., MCLEOD L. « *Fusarium* Ear Blight (scab) in Small-Grain Cereals - a Review ». *Plant Pathology*. avril 1995. Vol. 44, n°2, p. 207-238.
- PARRY D., JENKINSON P., MCLEOD L. « *Fusarium* Ear Blight (scab) in Small-Grain Cereals - a Review ». *Plant Pathology*. avril 1995. Vol. 44, n°2, p. 207-238.
- Patidar P., Agrawal D., Banerjee T., Patil S. (2007).Optimisation of process parameters
- Pauvet P., (1984). Les fusarioses des céréales. *Phytoma*, 202: 15-16.Perspectives agricoles et agroalimentaires Maghrébines Libéralisation et Mondialisation » Alger :
- PIRGOZLIEV S. R., EDWARDS S. G., HARE M. C., JENKINSON PETER. « Strategies for the control of *Fusarium* head blight in cereals ». *European journal of plant pathology. Workshop of the EU COST Action 835 Agriculturally Important Toxigenic Fungi*. Springer, 2003. p. 731-742.
- Pitt J.I., Hocking A.D. (2009).Fungi and food spoilage.Springer. New York.
- PLACINTA C. ., D’MELLO J. P. ., MACDONALD A. M. . « A review of worldwide contamination of cereal grains and animal feed with *Fusarium* mycotoxins ». *Animal Feed Science and Technology*. 31 mars 1999. Vol. 78, n°1–2, p. 21-37.
- Pochon J., Tardieux P. (1962). Techniques d’analyse en microbiologie du sol. Edition la Press, Washington, D.C.
- République Algérienne Démocratique et Populaire Ministère de l Agriculture et du Développement Rural Institut Technique des Grandes Cultures.
- Rifai, M A. (1969).A revision of the genus *Trichoderma*.*Mycologia.Papers.* 116: 1-56.
- Sayoud R., Ezzahiri B., Bouznad Z., (1999). Les maladies des céréales et des légumineuses alimentaires au Maghreb. ITGC. Alger. 64.
- Shen B. (2003). Polyketide biosynthesis beyond the type I, II and III polyketide
- Sierra G. 1957.A Simple method for the detection of lipolytic activity of microorganisms and some observations on the influence of the contact between cells and fatty substrates.*Antonie Van Leeuwenhoek.* 23:15-22.

- Smith N.R, Gordon R.E, Clark F.E (1952) Aerobic spore-forming bacteria. *J Appl. Bacteriol.* 27: 78-99.
- STEYN P. S. « Mycotoxins, general view, chemistry and structure ». *Toxicology letters*. 1995. Vol. 82, p. 843–851.
- Sutton D A., Fothergill A W., Rinaldi M G. (1998). *Guide to Clinically Significant Fungi*, 1st ed. Williams & Wilkins.
- Swain, M.R., Ray, R.C. 2006. Biocontrol and other beneficial activities of *Bacillus subtilis*.
- Sy (A.A.). 1976. Contribution à l'étude de *Pyricularia oryzae* Cav. Recherche In vitro d'antagonisme dans une perspective de lutte biologique Thèse Doct.
- synthase paradigms. *Curr. Op. Chem. Biol.* 7: 285-295.
- Systématique microbienne (J-Noël Joffin).
- Takahashi J.A., Monteiro de Castro M.C., Souza G.G., Lucas E.M.F., Bracarense A.A.P., Abreu L.M., Marriel I.E., Oliveira M.S., Floreano M.B., Oliveira T.S. (2008). Isolation and screening of fungal species isolated from Brazilian cerrado soil for antibacterial activity against *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Salmonella*
- Tindall B. J. (1992). The family *Halobacteriaceae*. In *The Prokaryotes*. Eds. A. Balows, H. Tourelle. St. Mandé. 110 - 111.
- Tournas V.H., Katsoudas E. (2005). Mould and yeast flora in fresh berries, grapes and
- Trachuk, L.A., Revina, P., Shemyakina, T.M., Chestukina, G.G., Stepanov, V.M. 1996. Chitinases of *Bacillus licheniformis* B-6839: isolation and properties. *Can. J. Microbiol.*, 42, pp.307-315.
- Trivedi P., Pandey A. (2008). Plant growth promotion abilities and formulation of *Bacillus megaterium* strain B 388 (MTCC 6521) isolated from a temperate Himalayan location. *Indian J. Microbiol.* 48(3): 342-347.
- Trivedi S., Gehlot H S., Rao S R. (2006). Protein Thermostability in Archaea and Eubacteria. *Genet Mol Res.* 5 (4): 816-827.
- Tuker, K.G et Thomas C.R (1992) Mycelial morphology the effect of spore inoculum Level. *Biotechnol. Lett.* 14: 1071-1074.

-*typhimurium*, *Streptococcus pyogenes* and *Listeria monocytogenes*. *J. med. mycol.* 18 : 198-204.

Vol. 108, n°7, p. 653–660.

-Watanabe, T., Oyanagi, W., Suzuki, K., Tanka, H. 1990 chitinase system of *Bacillus circulans* WL and importance of chitinase A1 in chitin degradation *Journal of Bacteriology*, 172 pp. 4017-4022.

-Williams, G.E.A Sher, M.J.C. 1996. Selection of rhizobacteria for the control of phylum Ultrium and Aphanomycescohioides on sugar-beet seedlings. *Crop Prot.*, 15, pp. 479- 486.

-Yuen G. Y., et Schoneweis S. D., (2007). Strategies for managing *Fusarium* head blight.

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

Annexe

Annexe 1

Composition des milieux de cultures

Gélose nutritive

Gélose nutritive ou gélose nutritive ordinaire (GNO) ou encore gélose ordinaire, est un milieu d'isolement non-sélectif dont la composition chimique théorique en g/L d'eau purifiée est :

La préparation du **bouillon nutritif** est la même, sauf qu'il n'y a pas l'ajout de l'agar.

10g Peptone

5g Extrait de viande

5g chlorure de

15g Gélose

pH 7,2 autoclave 20 minutes à 120°C (Guiraud,

1998).

Milieu PDA

POTATO DEXTROSE AGAR (PDA)

Pomme de terre 250 g

Glucose 20 g

Agar 15 g

Eau distillée..... compléter jusqu'à 1000 ml

- Laver la pomme de terre non pelée.
- Couper en cubes dans 500 ml d'eau distillée.
- Porter à ébullition pendant 30 – 45 min.
- D'autre part faire fondre l'agar dans 500 ml d'eau distillée.
- Écraser la pomme de terre, filtrer puis ajouter le filtrat à la solution d'agar.
- Ajouter le glucose.
- Compléter le volume à 1000 ml.
- Stériliser par autoclavage à 121° C / 15 min.

Composition du milieu finale :

1000ml Extrait de pomme de terre

20g Glucose

15g Agar

Stériliser 20 minutes à 120°C à autoclave (Ronald M. Atlas, 2000).

Annexe 2

Composition des milieux de test enzymatique

Géloseau lait

préparation 1

lait écrémé poudre..... 05g.

Eau distillée..... 50g.

Stérilisation par autoclave à 121°C / 20minutes.Préparation 2

Agar... 01g.

Eau distillée..... 50g.

Stérilisation par autoclave à 121°C / 20 minutes. La stérilisation des deux préparations se fait séparément, ensuite et au moment de l'utilisation les deux préparations sont mise en surfusion (45°C) et mélangées puis coulées sur boîte pétri. Après séchage, le milieu estensemencé.

Milieu pour la mise en évidence de l'hydrolyse de Tween 80

Extrait de levure5g.

NaNO₃..... 1g.

Solution salin... 50ml.

CaCl₂, 2H₂O..... 0,1g.

Tween80..... 10ml.

Agar.....8g.

Eau distillée..... 1000ml.

Milieu pour la recherche de la lécithinase (Egg-yolk agar)

Gélose nutritive..... 90ml

Emulsion de jaune d'œuf10ml

Gélose au lait

Préparation 1

Lait écrémé poudre05g

Eau distillée 50ml

Stérilisation par autoclave à 121°C / 20min

Préparation 2

Agar 01g

Eau distillée50ml

Stérilisation par autoclave à 121°C / 20min

N. B. La stérilisation des deux préparations se fait séparément, ensuite et au moment de l'utilisation les deux préparations sont mises en surfusion (45°C) et mélangées puis coulées sur boîte pétri. Après séchage, le milieu estensemencé.

Milieu pour la recherche de la lécithinase (Egg-yolk agar)

Gélose nutritive.....90 ml

Emulsion de jaune d'œuf..... 10 ml

Préparation de l'émulsion de jaune d'œuf

Après avoir flamber la coquille avec de l'alcool pendant 30 secondes, récupérer le jaune d'œuf et additionner 4 fois le volume en eau distillée stérile, mélanger rigoureusement puis mettre le mélange à l'étuve pendant 2 heures à 30°C et ensuite au réfrigérateur pendant 24 heures.

N. B. Au moment de l'utilisation, mettre la gélose nutritive en surfusion (45°C) et ajouter l'émulsion de jaune d'œuf, après séchage le milieu est ensemencé.



Solutions

Eau physiologique

Eau distillée 1000ml

Chlorure de sodium (NaCl) 9g

Isolement de microorganismes thermophiles et la sélection d'isolats à effet antagoniste sur l'agent de Fusariose de blé

Mémoire de fin de cycle pour l'obtention du diplôme de Master en **Biotechnologie des Mycètes : Fermentation et Production de substance Fongique.**

La pourriture racinaire est aussi connue sous les noms de pourriture du pied, fusariose du pied, pourriture des racines sèches, ou encore pourriture commune. L'exploration des échantillons de blé (racines) présentant des symptômes de fusariose de pied, dans la région de Constantine a permis d'obtenir un isolat fongique filamenteux (Fus1). L'identification morphologique de cet isolat a révélé qu'il s'agit de *Fusarium sp.*

L'exploration des échantillons prélevés à partir d'une région thermale de Hammam Debagh (Gelma), a permis l'obtention de huit isolats microbiens thermophiles.

Quatre isolats ont été sélectionnés à partir de Hammam Debagh, une moisissure Chp et trois bactéries (B1, B2 et B3) possèdent un effet antifongique sur *Fusarium sp.* (Taux d'inhibition varient entre 64% et 85%). Cependant, le meilleur effet inhibiteur a été développé par les isolats B1 et B3.

L'identification morphologique des isolats sélectionnés a montré que les isolats bactériens ; B1, B2 et B3 sont identifiés comme étant *Bacillus sp1.*, *Bacillus sp2.* et *Bacillus sp3.* respectivement, alors que l'isolat fongique Chp est identifié comme *Aspergillus sp.* À notre connaissance, *Aspergillus sp* thermophile n'a jamais été isolée à partir du sol de Hammam dbegh, ce qui constitue une première pour le présent travail.

Les tests de l'activité enzymatique ont montré la capacité des souches sélectionnées à produire les enzymes en l'occurrence : la lipase et la protéase. En fait, les bactéries B1 et B3 sont capable de produire la chitinase.

Mots clés : Microorganismes thermophiles, Blé, *Fusarium*, Lutte biologique, Pourriture racinaire.

Laboratoire de recherche : Laboratoire de Mycologie, Biotechnologie et de l'Activité anti Microbienne (LaMyBAM)

Jury d'évaluation :

Présidente: Arabet Dallel	MCB. Université des Frères Mentouri Constantine 1.
Encadrante : Milet Asma	MAB. Université des Frères Mentouri Constantine 1.
Examinatrice : Benserradj Ouafa	MCB. Université des Frères Mentouri Constantine 1.

Date de soutenance : 27/06/2018