

REPUBLIQUE ALGERIENNE DEMOCRATIQUE ET POPULAIRE
MINISTERE DE L'ENSEIGNEMENT SUPERIEUR ET DE LA
RECHERCHE SCIENTIFIQUE

UNIVERSITE SAAD DAHLAB DE BLIDA 1
FACULTE DES SCIENCES DE LA NATURE ET DE LA VIE
DEPARTEMENT DES BIOTECHNOLOGIES

Mémoire de fin d'études

En vue de l'obtention du diplôme de Master 2

Spécialité : Biologie des Interactions Plantes-Microorganismes

THEME

**Evaluation de l'efficacité de *Pseudomonas* spp.
fluorescents lyophilisés sur le biocontrôle de la
fusariose vasculaire.**

Présenté par

M^{lle} OTSMANE Zineb & M^{lle} BOUMAHDI Zohra

Soutenu devant le jury :

| | | | |
|-------------------------------|----------------|-------------------|--------------------|
| M ^{me} BOUCHENAK. F | M.C.B | USDB ₁ | Présidente de jury |
| M ^{me} BENOUSSAID. N | M.A.A | USDB ₁ | Promotrice |
| M ^{me} BENCHABANE. D | M.A.A | USDB ₁ | Examinatrice |
| M ^{lle} MEKHALDI. D | Post-graduante | USDB ₁ | Invitée |

ANNEE UNIVERSITAIRE: 2015/2016

Remerciement

A notre Dieu clément et miséricordieux qui par sa grâce nous avons pu achever ce travail

Au terme de ce travail, nous tenons à exprimer nos sincères remerciements et notre profonde gratitude à nos promoteurs **Pr. BENCHABANE. M et M^{me} Benoussaid. N** qui ont dirigé ce travail, pour la disponibilité, les conseils avisés et la confiance qu'ils nous ont accordé pour faire avancer ce travail,

Nos plus vifs remerciements vont aussi aux membres de jury, notamment à Mme **Bouchenak. F** qui nous a fait l'honneur d'accepter la présidence du jury de ce mémoire, qu'elle trouve ici le témoignage de notre haute considération et de notre profond respect.

Nous exprimons nos vifs remerciements à **M^{me} BENCHABANE** d'avoir accepté d'examiner et enrichir ce travail.

Notre profond respect envers **Mme FADIL Djamila**, Ingénieur au Laboratoire de Mycologie, pour ces encouragements et sa disponibilité durant toute l'expérimentation. Qu'elle trouve ici le témoignage de notre gratitude, de notre admiration et de nos plus vifs remerciements pour l'attention portée à la réalisation de ce travail.

Nous tenons également à remercier **Melle MEKHALDI .D** pour sa présence, et sa disponibilité.

Nous voudrions témoigner notre reconnaissance à **M^{me} BELKAHL.A et BOUARAR. W** pour leur aide au cours de la réalisation de la partie expérimentale au sein du laboratoire de virologie.

Enfin, nous tenons à exprimer nos sincères remerciements aux personnes qui nous ont toujours soutenu et encouragé au cours de la réalisation de ce mémoire.

Dédicaces

❖ *A mes adorables parents...*

Qui sont toujours présents et continuent de l'être pour faire mon bonheur. Merci pour vos sacrifices pour que je grandisse et prospère. Merci pour m'avoir donné le goût de l'effort et m'avoir permis d'arriver jusqu'ici. Qu'ils trouvent ici l'expression de toute ma reconnaissance et de mon affection. Enfin merci tout simplement d'être... ma maman et mon papa.

❖ *A mes frères Mohamed, Abdelazize, et Ossama*

qui n'ont cessé d'être pour moi des exemples de persévérance, de courage et de générosité.

❖ *A mes sœurs Fatima, Razika. Naima. Amina.*

J'exprime à travers ses lignes tous mes sentiments d'amour et de tendresse envers vous. Que l'amour et la fraternité nous unissent à jamais. Ce travail est le vôtre. Que Dieu vous protège et vous prête bonne santé et longue vie.

❖ *A mon beau-frère Ahmed et ma chère nièce Hayet.*

❖ *A toute ma famille pour l'amour et le respect qu'il m'a toujours accordé.*

❖ *A tous mes amis : l'incroyable, le rare et celle qui mérite le titre d'amie avec excellence: Souhila, Soumia , Asma ,Fatiha. .Hadda. Hadjer. Fatma., Meriem Ahlem. Hafidha.. Halima.,Farouk, Mahamadou .Hakim.walid.*

*Sans oublier ma chère binôme **Zineb** la personne qui m'avait toujours soutenue et aidée partagée tous le parcours et tous les moments de réalisation de ce travail.*

Merci pour tous ce que vous avez fait.

*A toute ma promotion **BIPM** (2015/2016) sans exception.*

Zohra

Dédicaces

Je dédie ce modeste travail :

- ❖ *Aux personnes les plus proches à mon cœur qui m'ont toujours aimé, supporté, conseillé, et qui n'ont jamais cessé de m'encourager et de me pousser vers la réussite :*

Ma mère et Mon père

- ❖ *A ma source de patience, de soutien et d'amour mes très chers sœurs: **Aziza, Hafida, Souad***
- ❖ *A mes très chères frères : **Foudil, Hasan, Ahmad, Djamal** pour leur soutien pendant toutes les années d'études.*
- ❖ *A mes belles sœurs : **Amina, Aicha, Souhad***
- ❖ *A mes beaux frères : **Chemes el dine, farid, sedik***
- ❖ *A mes nièces et mes neveux et toute ma grande famille **Otsmane***
- ❖ *A mes très chères cousines : **Meriem, Nawal, Nessrine, Aicha, Safa, Khadidja, Malika, Hiba, Fatma, Hanane, Louiza.***
- ❖ *A mes meilleurs amies, d'être toujours à mes côtés : **Hanane (N), Asma, Hanane (M), Khadidja, Fairouz, Zola, Hadda, Fatima, Yasmin***

*A la personne qui j'ai l'honneur de partager la réalisation de ce travail, ma chère copine et mon binôme : **Zohra***

*A tout ma promotion **BIPM 2016***

Zineb

تقيم فعالية Pseudomonas

fusariose vasculaire ، المجففة عامل مكافحة البيولوجية ل spp. fluorescents

ملخص

يهدف عملنا الى تحديد أثر التجفيف بالتجميد والحفاظ على استقرار وفعالية Pseudomonas

spp. fluorescents ، عامل مكافحة البيولوجية ل fusariose vasculaire يتمثل عملنا في دراسة عدائية، in vitro، لخمس سلالات بكتيرية Pseudomonas spp. (BB2 BB9 BB10 F21 PI9) ضد fluorescents ثلاثة سلالات فطرية (F.o.I, F.o.F.o.a) بطريقتين (المواجهة المباشرة و الترشيح الدقيق).

تطبيق هذه rhizobacteria بطريقة المواجهة المباشرة سمح بتحديد العدائية المحتملة، in vitro، المتغيرة ضد السلالات الفطرية في أوساط النمو الثلاثة المفحوصة عن طريق الحد من نمو الأشكال الثلاثة ل Fusarium oxysporum، مع وجود استقرار في تثبيط بعض السلالات. تم الحصول على أفضل نتيجة من سلالة F21 مع نسبة تثبيط 70٪ وجها لوجه مع F.o.I. في وسط PDA. أظهرت النتائج التي تم الحصول عليها من خلال طريقة الترشيح الدقيق نشاط عدائي ضعيف من طرف معظم السلالات، النشاط التثبيطي الأكبر سجل بواسطة السلالة PI9 بنسبة 31٪ وجها لوجه مع F.o.I.

أجريت تجارب مكافحة البيولوجية in situ تحت الدفيئة باستخدام ثلاثة سلالات بكتيرية ل Pseudomonas spp. Fluorescents (BB2, BB10, F21) المجففة بالتجميد مع أو دون وقاية وجها لوجه مع Fusarium oxysporum f.sp.lycopersici بالتفاعل مع نبات الطماطم في ظروف شبة متحكم فيها. النتائج أكدت وجود عوامل مرضية في الجذور والسيقان دون ظهور الأعراض.

الكلمات المفتاحية : Pseudomonas spp. Fluorescents ، Fusarium oxysporum ، Rhizobactérie ، التجفيف بالتجميد، العدائية.

Evaluation de l'efficacité de *Pseudomonas* spp. fluorescents lyophilisés sur le biocontrôle de la fusariose vasculaire.

Résumé

Notre travail a pour but de déterminer l'effet de la lyophilisation et la conservation sur la stabilité et l'efficacité des *Pseudomonas* spp. fluorescents, agents de biocontrôle de la fusariose vasculaire. Le travail consiste à l'étude du pouvoir d'antagoniste *in vitro* de cinq souches bactériennes de *Pseudomonas* spp. fluorescents (BB2, BB9, BB10, F21 et PI9) contre trois souches fongiques (*F.o.l*, *F.o.a* et *F.o.In*) avec deux méthodes (confrontation directe et la microfiltration).

L'application de ces rhizobactéries par la méthode de confrontation directe a permis de mettre en évidence des potentialités antagonistes *in vitro*, variables contre les souches fongiques sur les trois milieux de culture examinés (KB,PDA,Mixte), en limitant la croissance des 3 formes spéciales de *Fusarium oxysporum*, avec une présence de stabilité dans l'inhibition chez certaines souches. Le meilleur résultat a été obtenu par la souche F21 avec un taux d'inhibition de 70% vis-à-vis le F.o.In sur le milieu PDA. Les résultats obtenus par la méthode de microfiltration montrent une faible activité antagoniste enregistrée par la plupart des souches, l'activité antagoniste la plus importante a été marquée par la souche PI9 avec un taux d'inhibition de 31 % vis-à-vis le F.o.l.

Les essais de biocontrôle *in situ* sous serre, ont été réalisés par l'utilisation de trois souches bactériennes de *pseudomonas* spp. fluorescents (BB2, BB10 et F21) lyophilisées avec et sans protecteur et non lyophilisées vis-à-vis de *Fusarium oxysporum f.sp.lycopersici* en interaction avec la plante de tomate en condition semi contrôlée. Les résultats confirment la présence de l'agent pathogène au niveau des racines et des collets sans manifestation des symptômes.

Mots clés : *Pseudomonas* spp. fluorescents, *Fusarium oxysporum*, Rhizobactérie, Lyophilisation, Antagonisme.

LISTE DE FIGURES

| | |
|---|----|
| Figure01 : conidies de Fusarium.(A) macroconidies.(B) microconidies. (C) chlamydospores | 3 |
| Figure 02 : Cycle biologique de <i>Fusariumoxysporumf.splycopersici</i> | 5 |
| Figure 03 : Principaux symptômes de la fusariose vasculaire de la tomate. | 6 |
| Figure 04 :Symptômes de la fusariose vasculaire du lin | 8 |
| Figure05 : A : symptômes de la fusariose vasculaire du palmier dattier (Bayoud). | 10 |
| Figure 06 : Une section du sol montrant un sol en vrac et la rhizosphère du sol avec trois régions de rhizosphère - Ecto rhizosphère, rhizoplans et endorhizosphère. | 13 |
| Figure 07 : Interactions entre les <i>Pseudomonas</i> spp. fluorescents, le micro- organisme phytopathogènes et les cellules racinaires | 17 |
| Figure 08 : Les principaux mécanismes d'action des rhizobactérie du groupePGPR | 18 |
| Figure 09 : Différent souche de <i>Pseudomonas spp</i> fluorescent lyophilisée | 23 |
| Figure10 : Réhydratation et purification de <i>Pseudomonas</i> spp.fluorescents lyophilisées | 29 |
| Figure 11 : Ensemencement sous forme de deux stries parallèles | 30 |
| Figure 12 : Les étapes de préparation de la suspension bactérienne | 31 |
| Figure13 : les étapes de microfiltration | 32 |
| Figure 14 : dispositif expérimental (3 Bloc aléatoire complets). | 33 |
| Figure 15 :Désinfection et germination des semences. | 34 |
| Figure16 : préparation d'inoculum bactérienne. | 35 |
| Figure17 : les étapes d'inoculations bactériennes. | 35 |
| Figure 18 : Aspect des souches de <i>Pseudomonas</i> fluorescents (a) sous UV, (b) à l'œil nu. | 38 |
| Figure 19 : Evolution de la croissance mycélienne de F.o.a (G1) en confrontation avec les 5 souches bactériennes de <i>Pseudomonas</i> . | 39 |
| Figure 20 : Evolution de la croissance mycélienne de G1en confrontation avec les 5 souches bactériennes <i>Pseudomonas</i> sur | |

| | |
|--|----|
| milieu KB. | 40 |
| Figure 21 : Evolution de la croissance mycélienne de G1 en confrontation avec les 5 souches bactériennes Pseudomonas sur milieu mixte (KB+PDA). | 41 |
| Figure 22: Evolution de la croissance mycélienne de G2 en confrontation avec les 5 souches bactériennes Pseudomonas sur PDA. | 42 |
| Figure 23: Evolution de la croissance mycélienne de G2 en confrontation avec les 5 souches bactériennes Pseudomonas sur milieu KB. | 43 |
| Figure 24: Evolution de la croissance mycélienne de G2 en confrontation avec les 5 souches bactériennes Pseudomonas sur milieu Mixte. | 44 |
| Figure 25 : Evolution de la croissance mycélienne de F2 en confrontation avec les 5 souches bactériennes Pseudomonas | 45 |
| Figure 26 : Evolution de la croissance mycélienne de F2 en confrontation avec les 5 souches bactériennes Pseudomonas sur milieu Mixte. | 46 |
| Figure 27: Evolution de la croissance mycélienne de F2 en confrontation avec les 5 souches bactériennes Pseudomonas sur milieu KB. | 47 |
| Figure 28: Activité Antagoniste Des Souche Pseudomonas vis-à-vis F.o.a sur PDA et KB Après 72h de conforentation. | 48 |
| Figure 29: Activité Antagoniste Des Souche Pseudomonas vis-à-vis F.o.a sur PDA et KB Après 15j de conforentation. | 48 |
| Figure 30: Activité Antagoniste Des Souche Pseudomonas vis-à-vis F.o.l sur PDA et Mxt Après 72h de conforentation. | 49 |
| Figure 31: Activité Antagoniste Des Souche Pseudomonas vis-à-vis F.o.l sur PDA et KB Après 15j de conforentation. | 49 |
| Figure 32: Activité Antagoniste Des Souche Pseudomonas vis-à-vis F.o.ln sur PDA et KB Après 72h de conforentation. | 50 |
| Figure 33: Activité Antagoniste Des Souche Pseudomonas vis-à-vis F.o.ln sur Mxt Après 15J de conforentation. | 50 |

- Figure 34** : Activité Antagoniste Des Souche *Pseudomonas* vis-à-vis les trois pathogène sur 3 milieux Après 30j. 51
- Figure 35** : Evolution de la croissance mycélienne de G1 en confrontation avec les 5 souches bactériennes *Pseudomonas* sur milieu PDA. 51
- Figure 36** : Evolution de la croissance mycélienne de G2 en confrontation avec les 5 souches bactériennes *Pseudomonas* sur milieu PDA. 52
- Figure 37** : Evolution de la croissance mycélienne de F2 en confrontation avec les 5 souches bactériennes *Pseudomonas* sur milieu PDA. 53
- Figure 38**: Microfiltration des quelques souches *Pseudomonas* spp flueorecents.sur milieu PDA. 54
- Figure 39**: Résultats de ré isolement au niveau de racine et collet. 55
- Figure 40** : Colonisation bactérienne sur les fragments des racines 55

Liste des tableaux

| | |
|---|----|
| Tableau 01 : Tableau montrant les différents microorganismes utilisés en lutte biologique. | 12 |
| Tableau 02. Quelques caractéristiques et substances utilisées comme cryoprotecteurs intracellulaires (CPI) et extracellulaires (CPE) d'après Coulibaly <i>et al.</i> (2011). | 26 |
| Tableau 03: Caractéristiques des souches antagonistes utilisées | 27 |

Liste des abréviations

- Do** : Densité optique
- °C** : Degré Celsius
- F** : *Fusarium*
- F.o.l (G2)** : *Fusarium oxysporum* f.sp *lycopercisi* .
- F.o .ln (F2)** : *Fusarium oxysporum* f.sp *lini*
- F.o.a (G1)** : *Fusarium oxysporum* f.sp *albedenis* .
- f.sp** : Forme spécial
- g** : Gramme
- %** : Pourcentage.
- h** : Heure
- mm** : Millimètre.
- nm** : nanomètre
- trs** : tours
- rpm** : rotation par minute
- ml** : millilitre
- pH** : potentiel Hydrogène
- J** : jour
- Fig** : figure

Sommaire

| | |
|--------------|---|
| Introduction | 1 |
|--------------|---|

Partie I : DONNEES BIBLIOGRAPHIQUES

| | |
|---|----|
| I. La Fusariose vasculaire | 3 |
| <i>I. 1. Fusarium oxysporum f.sp.lycopersici</i> | 4 |
| <i>I. 2. Fusarium oxysporum f.sp.lini</i> | 6 |
| <i>I. 3. Fusarium oxysporum f.sp.albedinis</i> | 8 |
| I.4. La lutte contre les fusarioses vasculaires | 10 |
| I.4.1 Moyens de luttés préventives | 10 |
| I.4.2. Moyens de lutte curative | 11 |
| II. Généralités sur les rhizobactéries | 13 |
| II.1 Notions sur la rhizosphère | 13 |
| II .2 Les <i>Pseudomonas</i> . spp fluorescents | 15 |
| III. Conditionnement et formulation des <i>Pseudomonas</i> spp. fluorescents | 21 |
| III.1 La lyophilisation | 22 |
| III.2 Impact de séchage sur la viabilité des microorganismes | 23 |
| III.3. Les dégâts oxydatifs cellulaires | 24 |
| III.4. Modifications de la structure membranaire | 24 |
| III.5. La cryoprotection | 25 |

Partie II : MATÉRIELS ET MÉTHODES

| | |
|---|----|
| I. Matériel biologique | 27 |
| II. Purification des souches utilisées | 28 |
| III. Potentialités Antagonistes <i>in vitro</i> des isolats | 29 |
| IV. Essai d'Antagonisme <i>in situ</i> | 32 |
| V. Suivi du développement de la maladie | 36 |
| VI. Essai de ré-isolément de Fol | 36 |

| | |
|----------------------------------|----|
| VII. Colonisation rhizosphérique | 37 |
|----------------------------------|----|

PARTIE III : RESULTATS ET DISCUSION

| | |
|--|----|
| I. Aspects cultureux des souches bactériennes lyophilisées | 38 |
| II. Résultats de l'activité antagoniste <i>in vitro</i> des souches bactériennes de <i>Pseudomonas</i> spp. fluorescents | 38 |
| III. Résultats de l'activité antagoniste <i>in vivo</i> des souches bactériennes de <i>Pseudomonas</i> .spp fluorescent | 54 |
| IV.DISCUSSION | 56 |
| CONCLUSION | 63 |
| REFERENCE BIBLIOGRAPHIQUE | |
| ANNEXES | |

Introduction

Fusarium oxysporum est un agent fongique ubiquiste bien représenté au sein de la communauté microbienne tellurique, notamment dans la microflore rhizosphérique; Il se rencontre pratiquement dans la quasi-totalité des sols agricoles. Cette espèce présente des formes phytopathogènes hautement spécifiques sur des hôtes variables, induisant des flétrissements, unilatéralement ou généralisés, causant ainsi la mortalité des plants. Ces formes dénommées formes spéciales (f. sp) en fonction de la plante hôte parasitée ; il a été mis en évidence plus de 100 formes spéciales chez cette espèce (Armstrong et Armstrong 1981).

Leur développement rapide et insidieux, occasionnent chaque année des dégâts avec des conséquences très importantes sur le rendement et la qualité des récoltes (Messiaen et Cassini, 1968 ; Yezli et *al.*, 2015). Les fusarioses vasculaires causées par *Fusarium oxysporum*, sont incontestablement des maladies les plus destructives et la plus menaçante dans le monde et en Algérie.

Bien que certain pratiques culturales soient recommandés, il n'existe aucune méthode permettant de lutter efficacement contre ces maladies .Parmi les alternatives à la seule lutte chimique, le recours à la protection biologique constitue une des solutions alternatives qui permettra de lutter contre les agents phytopathogènes tout en diminuant l'emploi de produits chimiques (Bounoua, 2011).

Parmi les agents exploités en lutte biologique vis-à-vis de la fusariose vasculaire, les rhizobactéries promotrices de la croissance des plantes (PGPR) appartenant au groupe *Pseudomonas* spp fluorescents ont été reconnues comme des agents potentiels de biocontrôle (Bloemberg et Lugtenberg, 2001).

Il y a des difficultés majeures dans l'application des inoculums dans la pratique spécialement en plain champs. Si les formulations liquides sont les plus faciles à réaliser, elles ne donnent pas souvent satisfaction. En milieu liquide les microorganismes se présentent nus et en ordre dispersé lors de l'inoculation dans le sol et dans les substrats artificiels. Dans ces conditions le

Introduction

rapport de force est souvent en faveur de la flore résidente, et les résultats des inoculations peuvent être d'autant plus découverts que l'antagonisme de la flore autochtone sera plus puissant. De plus le stockage et la conservation de ces inoculum sont souvent délicats (Digat ; 1988).

Le séchage de la biomasse microbienne (*Pseudomonas fluorescens*) sous forme de poudre rend plus économique sa conservation, son transport et sa commercialisation (Mputu et *al.*, 2013).

Parmi les différentes méthodes de séchage (atomisation, fluidisation et lyophilisation), la lyophilisation permet d'obtenir une déshydratation poussée compatible avec des durées de conservation très longues. Cette méthode implique des changements de la température du produit assez agressifs pour les micro-organismes car elle nécessite une congélation. Dans certains cas, elle occasionne des altérations cellulaires (peroxydation des acides gras) et génétiques (modification des protéines). L'utilisation de cryoprotecteurs au cours de la lyophilisation et d'antioxydants pendant le stockage augmente sensiblement le taux de viabilité de ces cellules (Coulibaly et *al.*, 2010).

Dans ce sens que notre travail a été orienté dans le but de mettre en évidence l'effet de la lyophilisation et la conservation sur l'efficacité et la stabilité de l'expression des effets antagonistes des souches de *Pseudomonas* spp fluorescents vis -à-vis de quelque espèce fongiques de *Fusarium oxysporum* .A cet effet, notre travail a été réalisé en deux parties :

- Essai d'antagonisme *in vitro* vis-à-vis de trois formes spéciales de *Fusarium oxysporum* : *Fusarium oxysporum* f.sp. *lycopersici*, *Fusarium oxysporum* f.sp. *lini* et *Fusarium oxysporum* f .sp. *albedinis*.
- Essai d'antagonisme *in situ* vis à vis de *Fusarium oxysporum* f.sp. *lycopersici* agent de la fusariose vasculaire de la tomate.

I. La Fusariose vasculaire

La fusariose vasculaire est l'une des maladies des plantes les plus répandues et dont les incidences sur les cultures sont les plus graves (Nelson et al, 1981). Il s'agit d'une *trachéomycose* provoquée par un champignon imparfait de l'ordre des *hypocréales* (*Fusarium oxysporum*). De nombreuses formes spéciales attaquent spécifiquement des cultures vivrières (Palmier Dattier, melon, concombre, pois et tomate) ou ornementales (œillet, cyclamen). Ces fusarioses causent souvent des pertes importantes sur les spéculations agricoles et sylvicoles (Marasas et al., 1984).

Les *Fusarium* sont des ascomycètes ubiquistes abondants dans les sols et souvent phytopathogènes. Cependant, ils peuvent survivre à l'état saprophytique dans les débris végétaux, et au niveau de la rhizosphère des plantes non hôtes (Booth 1971 ; Edel et al .,1995). Le champignon se conserve dans le sol grâce à ses chlamydospores et au mycélium capable de survivre sur les débris (Erskine et Bayaa, 1996).

Ces agents des flétrissements fusariens, *Fusarium oxysporum*, se rencontre pratiquement dans la quasi- totalité des sols agricoles, surtout sous sa forme asexuée (Armstrong et al., 1981), où il présente 40 à 70 % de la microflore fusarienne totale (Tivoli, 1988). Trois types de spores sont produites dans le sol et dans les milieux de cultures : les chlamydospores, les macroconidies et les microconidies (Walker, 1971 ; Ohara et al Nadales.,2010) (Figure 01).

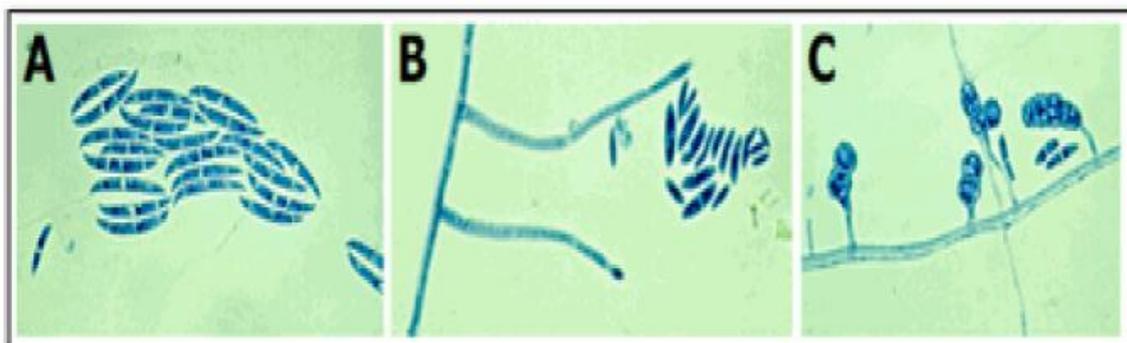


Figure 01 : Conidies de *Fusarium* .(A) macroconidies . (B) microconidies. (C) chlamydospores (Nadales,2010).

Le pouvoir pathogène des souches de *Fusarium oxysporum* vis-à-vis de différentes plantes hôtes ainsi que leurs virulences vis-à-vis des cultivars de la même espèce hôte a permis de les identifier et de les répertorier respectivement en formes spéciales et en races physiologiques. Il a été dénombré plus de 120 formes spéciales et races (Ozbay et Newman, 2004). Parmi ces formes spéciales : *Fusarium oxysporum* f.sp. *lycopersici* agent de la fusariose vasculaire de la tomate, *Fusarium oxysporum* f.sp. *lini* agent causal de la fusariose vasculaire du lin et *Fusarium oxysporum* f.sp. *albedinis* qui cause la fusariose vasculaire du palmier dattier (bayoud) .

I. 1. *Fusarium oxysporum* f.sp.*lycopersici*

Fusarium oxysporum f.sp. *Lycopersici* est l'agent parasite responsable du flétrissement vasculaire des cultures de tomate (*Lycopersicon Esculentum*) à travers le monde (Snyder et Hansen, 1940).

I.1.1 Epidémiologie et Cycle biologique

Le pathogène au cours de son cycle de vie, présente deux phases (Nelson, 1981 ; Beckman ,1989) (Figure 02):

- 1) La phase saprophytique : elle est caractérisée par la conservation du champignon au niveau du sol sous forme de microconidies, macroconidies et de chlamydospores. Il survit sur la matière organique provenant des débris des végétaux (Beckman ,1989).
- 2) La phase parasitaire ; en présence de plantes hôte, les formes de conservation germent grâce à la stimulation d'exsudats racinaire, et par contact des points de formation des racines latérales ou au niveau des blessures, permettant la pénétration du pathogène dans les racines et son évolution à travers le cortex intercellulaire jusqu'à atteindre les tissus vasculaires (Nelson, 1981).

La prolifération de champignon augmente dans les tissus vasculaire et provoque des altérations, tel que le blocage de la circulation de la sève .Cette

phase se termine par la mort de la plante, ainsi la phase saprophyte recommence avec la dissémination du champignon (Nelson, 1981).

La dissémination de *Fusarium oxysporum* f.sp. *lycopersici* est assurée, entre autre par les semences (Besri, 1977), les eaux de pluie et d'irrigation, le vent ainsi que les outils agricoles (Smith et Moss, 1984).

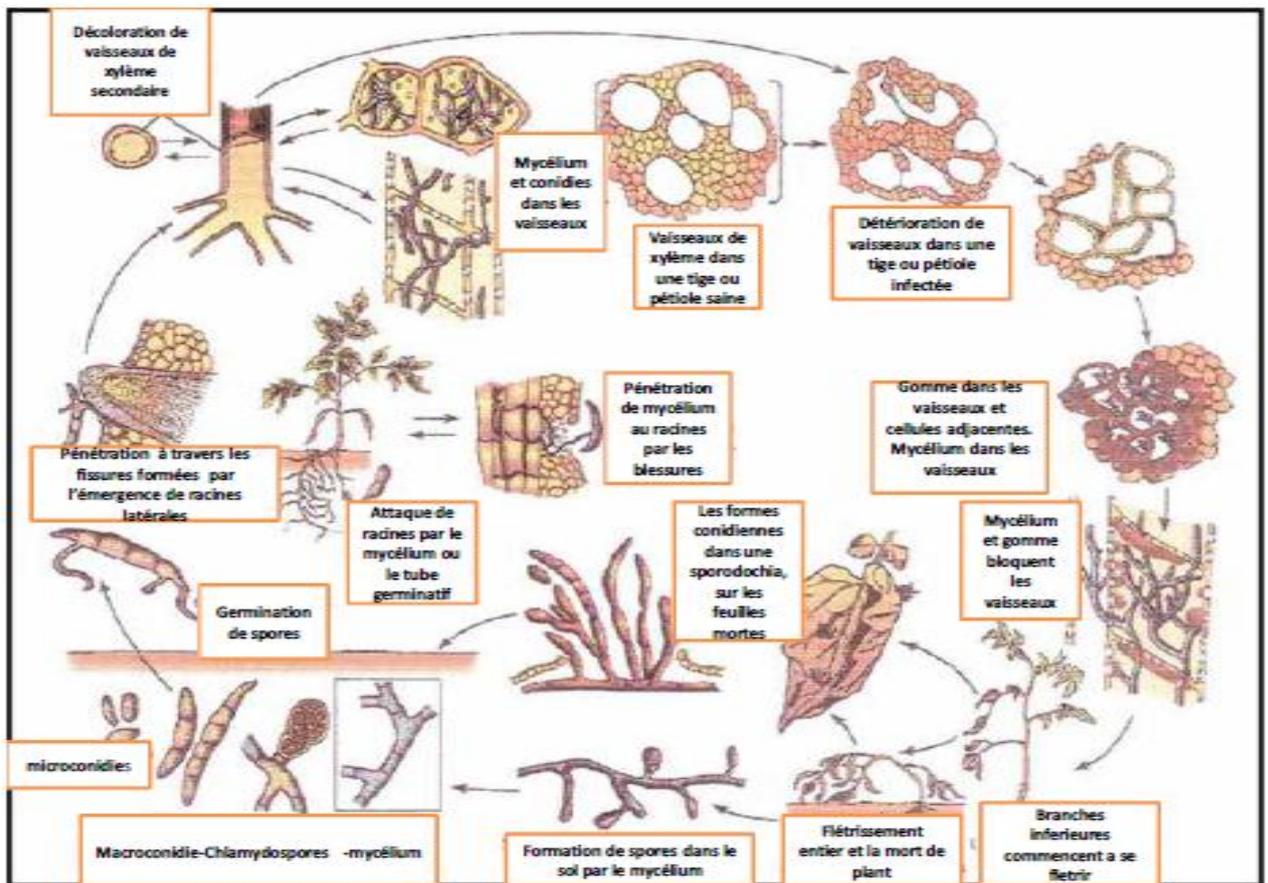


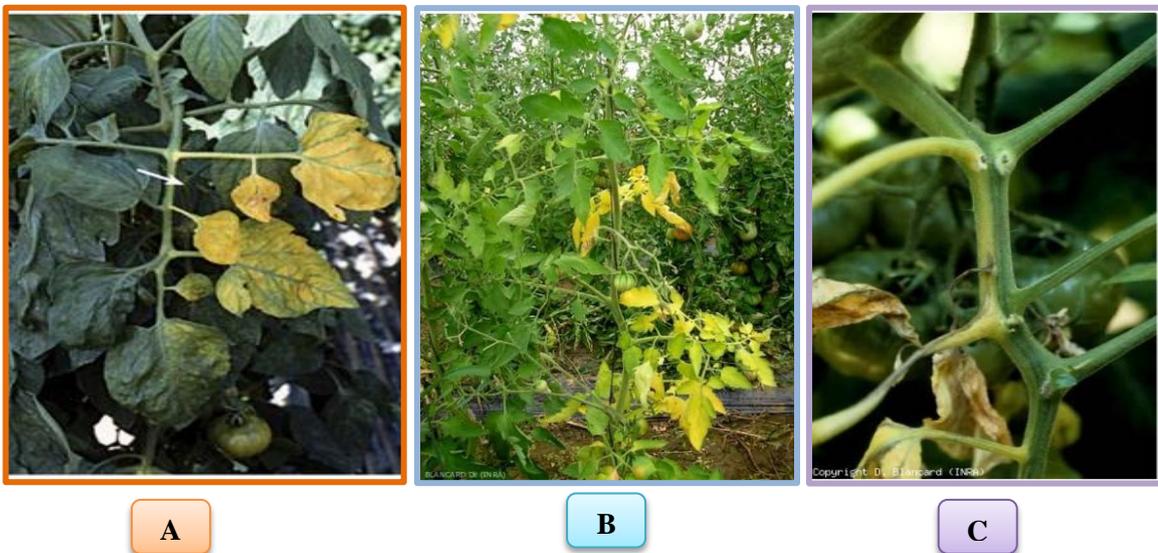
Figure 02: Cycle biologique de *Fusarium oxysporum* f.sp. *lycopersici* (Agrios, 2005).

I.1.2. Symptomatologie

La fusariose vasculaire de la tomate se distingue par une symptomatologie typique des trachéomycoses, souvent ayant comme conséquence des flétrissements et des décolorations du système vasculaire. L'évolution des symptômes ainsi que leur gravité diffèrent selon les stades phénologiques de la plante (Beckmane, 1989) (Figure 03).

Elle provoque un flétrissement rapide (parfois en une journée) sur les jeunes plantules. Sur les plantes plus âgées, les premiers symptômes visibles sont un jaunissement après un flétrissement des feuilles de base, puis des feuilles situées plus haut (Figure 3A). Lorsque la plante possède plusieurs branches, le jaunissement se manifeste d'abord sur une seule branche, souvent sur le côté qui correspond aux racines atteintes (Figure 3A). Le flétrissement est irréversible, et lorsque les dégâts affectent l'ensemble de feuillage, la plante meurt (Figure 3B) (Bouhot et *al.*, 1972).

En coupe, la base de la tige montre des vaisseaux bruns à noirâtres (conséquences de l'activité des substances phénoliques) localisés sur un secteur du côté des racines atteintes ou bien répartis sur toute la section (Figure 3C) (Kraft et *al.*, 1994) .



Jaunissement

Flétrissement

La meurt de la plante

Figure 03 : Principaux symptômes de la fusariose vasculaire de la tomate

(Blancard, 2013).

I. 2. *Fusarium oxysporum f.sp.lini*

La fusariose vasculaire du lin est une maladie causée par le champignon *fusarium oxysporum f.sp .lini*. La contamination se réalise uniquement à partir du sol (Murray ,1993).

I. 2.1 Cycle Biologique

Le cycle de la maladie de *Fusarium oxysporum f.sp lini* inclus deux phases, phase saprophyte et phase parasitaire (Nelson,1981;Beckman,1989):

- 1- La phase saprophytique : (en absence de la plante hôte), le champignon *Fusarium oxysporum f.sp lini* est un saprophyte abondant et active dans le sol et la matière organique, avec certaines formes spécifiques qui sont pathogènes des plantes (Smith et al ., 1988).Sa capacité saprophytique lui permet de survivre dans le sol entre les cycles des cultures dans les débris végétaux infectés (Rheinberg,1988).
- 2- La phase parasitaire : (en présence de la plante hôte) : les racines libèrent des exsudats qui stimulant la germination des chlamydospores et la croissance du mycélium (Schoroth et Hildebrand, 1964). Le champignon peut envahir la plante soit avec son tube germinatif des sporanges ou avec le mycélium en envahissant les racines, via les blessures ou au point de formation de racines latéraux (Agrios,1988).

I.2.2. Symptomatologie

Les symptômes peuvent apparaître dès le stade 40 cm avant la formation des boutons floraux jusqu'à la maturité des lins. Quelques plantes éparses montrent un jaunissement unilatéral caractéristique qui affecte d'abord les feuilles situées sur de mêmes lignes d'insertion. Ce changement de couleur s'étend rapidement à toutes les autres feuilles et aux plantes avoisinantes. Celles-ci se dessèchent et tombent prématurément. Les tiges prennent une couleur rougeâtre (Agrios ,1988; Smith et al., 1988 ; Bert ,2013) (Figure 4A).

Quand les tiges sont mourantes, le champignon apparaît sous forme d'un mycélium blanc-rosé au niveau du collet (Figure 4B) et les racines présentent une couleur bleugris avec d'importantes nécroses (Figure 4C) (Agrios ,1988; Smith et al., 1988 Bert ,2013).



Figure 04: Symptômes de la fusariose vasculaire du lin (Anonyme ; 2016). (A : jaunissement. B : meurt de tige C : nécrose sur racine.)

I .3.Fusarium oxysporum f.sp.albedinis

La fusariose vasculaire du palmier dattier, dénommée communément bayoud, est causée par *Fusarium oxysporum* f .sp. *albedinis* qui persiste sous forme de chlamydospores dans les tissus morts des palmiers malades (les racines, rachis, etc.) (Sedra ,1994).Les chlamydospores peuvent être libérés dans le sol où elles restent dormantes. Le champignon est très inégalement réparti dans le sol et a été trouvé à des profondeurs de 0-30 cm et parfois plus de 1 m (Tantaoui, 1989).

I. 3.1.Cycle biologique

Les chlamydospores sont rares mais peuvent persister dans le sol pendant plus de 8 ans. Même de petits nombres sont suffisants pour déclencher la maladie et l'infection de seulement quelques racines peuvent entraîner la mort de l'arbre.

Les chlamydospores germent dès que les conditions sont favorables et pénètrent dans les tissus vasculaires des racines, à partir desquels le mycélium atteint la tige. Dans les vaisseaux, le mycélium produit des microconidies qui sont transportées vers le haut par la sève. Quand ce mouvement est empêché par une paroi transversale, les microconidies germent, le tube germinatif pénètre dans la paroi et la formation de microconidies reprend de l'autre côté de la paroi. La mort

de l'arbre intervient quand le champignon atteint avec ses toxines le bourgeon terminal (Louvet, 1977 ; Djerbi; 1983).

Au cours de sa progression, *F. oxysporum* f.sp. *albedinis* s'échappe du xylème et colonise le parenchyme environnant par un mycélium inter et intracellulaire, c'est ce qui donne plus tard la coloration brun rougeâtre caractéristique des arbres malades. Après la mort de l'arbre, le mycélium continue à se développer dans les tissus morts et forme de nombreuses chlamydospores dans les cellules du sclérenchyme (Louvet, 1977 ; Djerbi; 1983).

I.3.2. Symptômes

Le premier symptôme externe de la maladie s'observe sur une palme de la couronne moyenne ; cette palme prend un aspect plombé et se dessèche selon un processus très particulier. En effet, les folioles ou les épines situées d'un côté de cette palme se dessèchent progressivement du bas vers le sommet, et se replient vers le rachis (Figure 05 A). Ce dessèchement gagne ensuite les folioles du côté opposé, progressant cette fois de haut en bas, et toute la palme finit par se dessécher complètement et prend une couleur blanchâtre.

Le côté dorsal du rachis est marqué d'une strie brune longitudinale, qui avance de la base vers l'apex de la fronde, et qui correspond au passage du mycélium dans les faisceaux vasculaires du rachis. Ensuite, la feuille va prendre une forme arquée, similaire à une feuille vivante, et prend le long du tronc. Les mêmes symptômes apparaissent ensuite sur les palmes voisines ; puis l'attaque se généralise à l'ensemble du palmier entraînant sa mort au bout de 6 mois à 2 ans (Figure 05 B) (Bulit *et al.*, 1967 ; Louvet *et al.*, 1970; Djerbi, 1988).

Mais ces symptômes ne sont pas toujours aussi typiques, il est possible qu'ils se développent d'une façon différente. Il se peut, par exemple, que la coloration l'apex vers la base, des deux cotés à la fois. Parfois, aussi, un jaunissement généralisé pourrait être repéré avant l'apparition des symptômes typiques

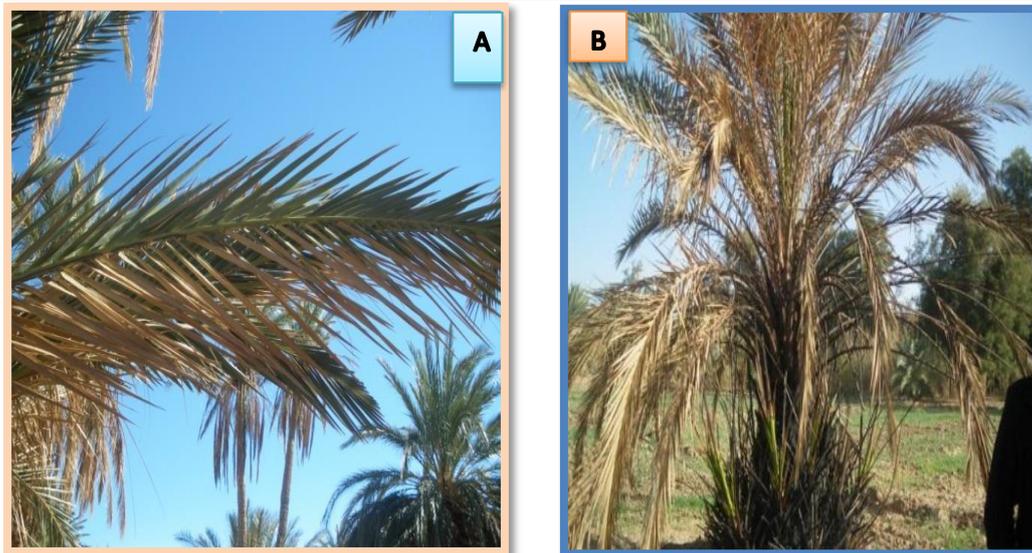


Figure 05 : Symptômes de la fusariose vasculaire du palmier dattier (Bayoud)
(Benzohra et al., 2015)

I.4. La lutte contre les fusarioses vasculaires

I.4.1 Moyens de lutte préventifs

A. La lutte culturale

En général, les mesures de contrôle contre la flétrissure fusarienne demeurent dans leur globalité d'ordre préventif. Elles consistent à éviter les conditions qui favorisent la maladie soit : un sol léger et acide, un manque d'azote et de calcium, des températures élevées (l'optimum pour le développement du *Fol* est de 28°C) et un manque de lumière en intensité et en temps. Sun et Huang (1985), ont mis au point un amendement organique et minéral à raison de 1g par poids de sol permet de contrôler efficacement divers espèces de *Fusarium*.

B. la lutte physique

Anchisi et al. (1985), ont développé un traitement à l'eau chaude pour protéger les plants dans un sol où l'on sait la maladie présente. La méthode consiste à traiter les racines avec de l'eau à 48-49°C pendant 30 secondes avant de transplanter ou moins de 48 heures après. Cela stimule la croissance des racines.

C. La lutte génétique

La lutte génétique consiste à sélectionner des cultivars résistants et à réaliser des multiplications et des hybridations combinées pour l'obtention de génotypes

résistants (Louvet, 1979 ; Ito *et al.*, 2005). Des gènes de résistance contre *F. oxysporum* ont été identifiés chez beaucoup d'espèces végétales et ont été introduits par sélection dans des variétés cultivées (Louvet, 1979 ; Diener *et al.*, 2005).

I.4.2. Moyens de lutte curative

A. Lutte chimique

La lutte chimique s'opère principalement par l'utilisation de fongicides systémiques ou incorporés dans le sol pour limiter le développement du pathogène, tels que le Binomyl, le Captafol, bromure de méthyle et thiophanate qui sont des produits efficaces.

En raison de la difficulté d'atteindre les couches profondes du sol dans lesquelles le parasite se conserve sous forme de chlamydospores (Maraitre, 1973), en plus des coûts élevés des opérations de désinfection du sol, les traitements chimiques à base de fongicides systémiques appliqués au cours de culture, sont souvent inefficaces dans la pratique, car ils développent le phénomène de résistance chez le pathogène (Benhamou, 2001) et le déséquilibre de la microflore du sol par la destruction de certains bons antagonistes (Tramier et Bettechini, 1974). Ces difficultés dans le contrôle du fusarium ont stimulé la recherche vers la lutte biologique (Fravel *et al.*, 2003).

B. Lutte biologique

En raison des fortes potentialités de conservation du pathogène dans le sol et ses mécanismes d'invasion dans le végétal, la quasi-totalité de ces méthodes de lutte ne permet pas de contrôler de manière efficace ce genre de trachéomyose. En conséquence, les stratégies du contrôle biologique des fusarioses ont acquis un intérêt particulier.

Elles consistent à utiliser des agents antagonistes naturels des pathogènes, limitant ainsi leur prolifération et/ou à développer les défenses des plantes et à augmenter la résistance du sol à la réceptivité des maladies (Smith, 1971 ; Bloemberg et Lugtenberg, 2001).

Différentes bactéries et champignons rhizosphériques sont considérés comme un moyen efficace dans l'inhibition du développement de cet agent

pathogène (Mujeebur et Sahahana, 2002). Certaines études ont mis en évidence l'effet inhibiteur de nombreux agents microbiens (Tableau 1).

Tableau 01 : Tableau montrant les différents microorganismes utilisés en lutte biologique.

| Agents de lutte | Mode d'action | Références |
|---|---|---|
| <i>Aspergillus niger</i> | Production de phenylethanol, acide phenylacetique, et acide phynoxycetic | (Mujeeber et Shahana, 2002). |
| <i>Penicillium digitatum</i> <i>Penicillium oxalicum</i> | Liberation des enzymes Lytiques | (Mujeeber et Shahana, 2002). |
| <i>Trichoderma harzianum</i> <i>Trichoderma viridae</i> | Compétition pour nutriments, colonisation de racines, induction de résistance systémique, antibiose | (Michelina <i>et al.</i> , 2011) |
| <i>Pseudomonas spp</i> | Production de sidérophores (pyoverdine et pyochiline) et l'antibiotique. | (Dmitri <i>et al.</i> , 2006) |
| <i>Bacillus subtilis</i> | Production de phenylethanol, acide phenylacetique, et acide phynoxycetic | (Shanmugam et kanoujia, 2011) |
| <i>Fusarium oxysporum</i> non pathogène (Fo47) | Compétition pour nutriments, colonisation de racines, IRS | (Alabouvette <i>et al.</i> , 2008; Kaur <i>et al.</i> , 2010) |

.II. Généralités sur les rhizobactéries

II.1 Notions sur la rhizosphère

La rhizosphère est une zone à l'interface racine-sol, où la biologie et la chimie du sol sont influencées par la racine. Comme les racines des plantes se développent à travers le sol, ils libèrent la plupart des composés solubles dans l'eau tels que des acides aminés, des sucres et des acides organiques et fournir de la nourriture pour les micro-organismes (Nihorimbere et *al.*, 2010). La santé de la plante et le sol associé dépendent de cette région rhizosphère et ses réactions biochimiques (Seshadri et *al.*, 2015).

Le mot rhizosphère a été introduit en 1904 par le microbiologiste visionnaire Lorenz Hiltner (Hartmann et *al.*, 2008) . « Rhizo » vient du grec *rhiza* signifiant racine, « Sphère » vient du latin *sphaera* signifiant le champ d'action ou d'influence (Bowen et Roriva, 1991).

Globalement, il existe trois éléments distincts reconnu dans la rhizosphère (Naidu et *al.*, 2015) : l'endorhizosphère (intérieur de la racine), le rhizoplan (surface racinaire) et l'ectorhizosphère (sol lié à la racine par opposition au sol distant) (Gray et Smith, 2005) (Figure 06).

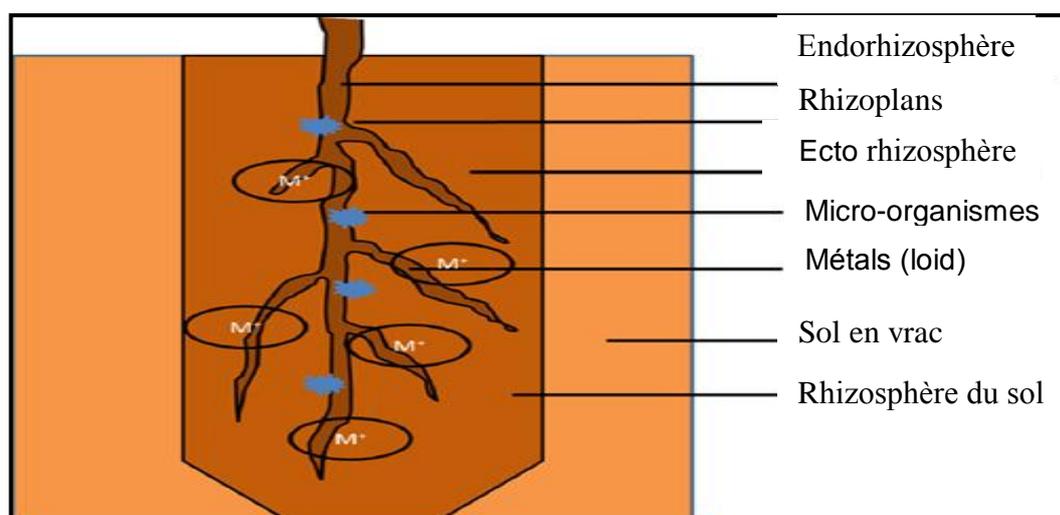


Figure 06: Une section du sol montrant un sol en vrac et la rhizosphère du sol avec trois régions de rhizosphère - Ecto rhizosphère, rhizoplans et endorhizosphère (avec du métaux (loid) et les micro-organismes) (Seshadri et *al.* 2015).

Les espèces végétales, stade de développement des plantes et le type de sol ont été indiqués comme facteurs principaux déterminant la composition des communautés microbiennes de la rhizosphère (Broeckling et *al.*, 2008). La diversité et la prédominance des populations microbiennes de la rhizosphère dépendent d'un certain nombre de facteurs biotiques et abiotiques d'une niche écologique particulière (Nihorimbere et *al.*, 2010).

les systèmes racinaires modifient en effet leur environnement abiotique et biotique en libérant dans la rhizosphère des composés de diverses natures qui servent de substrats énergétiques aux communautés bactériennes (Bais et *al.*, 2004). La libération de composés organiques par les racines vivantes des plantes est dénommée rhizodéposition (Nguyen, 2003). L'exsudation racinaire fait partie du processus de la rhizodéposition (Badri et Vivanco, 2009).

La rhizosphère des plantes est généralement occupée par les rhizobactéries délétères (DRB) qui peuvent inhiber la croissance des plantes, et les PGPR (plant growth promoting rhizobacteria) (Nehla et *al.*, 1996). Elles s'adaptent à l'environnement rhizosphérique et sont dénommées rhizobactéries (Schroth et Hancock, 1981). Les rhizobactéries sont considérées comme des concurrents microbiens efficaces dans la zone racinaire (Bakker et *al.*, 2007).

II .1.1 Généralités sur Les PGPR (Plant Growth Promoting Rhizobacteria)

Plant Growth Promoting Rhizobacteria (PGPR) sont des bactéries du sol qui sont capables de coloniser la rhizosphère et d'améliorer la croissance des plantes au moyen d'une grande variété de mécanismes tels que la minéralisation de la matière organique, la lutte biologique contre les agents pathogènes transmis par le sol, la fixation biologique de l'azote, et la croissance des racines (Pii et *al.*, 2015).

Les PGPR colonisent la rhizosphère en utilisant les exsudats racinaires comme substrats nutritifs, mais à la différence des autres bactéries rhizosphériques elles ont, en retour, un effet bénéfique sur la plante via une multitude de mécanismes (Gilles et *al.*, 2008). Les PGPR peuvent être divisés en deux groupes majeurs selon leur relation avec la plante hôte (Khan, 2005) :

1-Des rhizobactéries symbiotiques qui pourraient envahir l'intérieur des cellules (PGPR intracellulaires : par exemple : les bactéries des nodules).

2-Des rhizobactéries non symbiotique qui restent à l'extérieur des cellules des plantes (PGPR extracellulaires : par exemple *Bacillus*, *Pseudomonas*, *Azotobacter* ect).

II .1.2 Rhizobactéries bénéfiques non symbiotiques

Les bactéries non symbiotiques répondant à cette définition appartiennent à différents genres et espèces dont les plus étudiés sont : *Agrobacterium radiobacter*, *Azospirillum spp*, *Bacillus spp*, *Pseudomonas spp fluorescents* (Lemanceau, 1992). Beaucoup de recherches se sont concentrées sur ces deux derniers types de bactéries parce qu'ils sont des habitants communs de la rhizosphère et possèdent une grande activité dans le contrôle biologique de maladies liées au sol. Ils ont la capacité de produire de nombreux antibiotiques et ils sont faciles à cultiver *in vitro* ou à manipuler au laboratoire (Raaijmakers et al., 2002).

II .2 Les *Pseudomonas. spp fluorescents*

II .2 .1 Généralité

Pseudomonas fluorescens est une bactérie gram-négative, en forme de bâtonnets avec des flagelles polaires qui lui assurent la mobilité. C'est une bactérie ubiquitaire rencontrée dans les sols, sur les racines des végétaux, sur les plantes, ainsi que dans les eaux douces et marines (Wong, Levi et al. 2011).

La fluorescence est due à la production d'un pigment fluorescent jaune-vert appelé pyoverdine soluble dans l'eau et insoluble dans le chloroforme (Paulsen et al., 2005; Wong, Levi et al. 2011). Ces bactéries sont faciles à cultiver, comme ils peuvent se développer dans un milieu de base riche en éléments organiques ; à pH neutre et à une Température comprise entre 4 et 43°C (Palleroni, 1984). Ces bactéries non sporulantes sont aérobies obligatoires (Bossis et al., 2000).

II .2.2 Taxonomie

Le genre *Pseudomonas* est découvert en 1894 par Migula, il appartient au phylum des Proteobacteria, classe des Gammaproteobacteria, famille des Pseudomonaceae, ordre des Pseudomonales (Migula, 1895 ;Moore *et al.*,2006)

Le genre *Pseudomonas* comprend principalement les *Pseudomonas* fluorescents ainsi que quelques espèces non fluorescents (Botelho et Mendonça, 2006).

Le groupe de *Pseudomonas* fluorescent représente

- 1) Les espèces phytopathogènes à cytochrome c oxydase-positive, comme *P. cichorii* , *P. marginalis* et *P. tolaasii*, (Botelho et Mendonça ,2006).
- 2) Les *Pseudomonas spp* fluorescent phytopathogènes nécrogène sans cytochrome c oxydase : *P. syringae* et *P .viridiflava* (Botelho et Mendonça ,2006).
- 3) Les non-phytopathogènes, des souches non –nécrogènes, tels que *P.fluorescens*, *P. putida*, *P. chlororaphis*, *P. aureofaciens* et *P. aeruginosa* espèce type (Botelho et Mendonça ,2006).

II .2.3 Intérêt agroécologique des *Pseudomonas .spp* fluorescents

Les *Pseudomonas spp.* fluorescents présentent un intérêt scientifique majeur, ils se caractérisent par une diversité génétique et phénotypique en relation avec leur impact positif sur le fonctionnement de la rhizosphère, en exerçant des actions directes et/ou indirectes sur le développement de la plante; de plus ils représentent un modèle d'étude pour la compréhension des interactions avec les microorganismes d'une part (*Pseudomonas* - champignons et bactéries pathogènes), et avec la plante (eucaryote - procaryote) d'autre part (Benchabane *et al.* , 2013) (Figure 07)..

La compréhension des mécanismes d'action et des conditions permettant l'optimisation des effets bénéfiques de ces rhizobactéries constitue une voie indispensable pour leur exploitation dans les pratiques agronomiques comme biopesticides et/ou biofertilisants, afin de diminuer la dépendance excessive des

sol-racine et sont conditionnés par des actions directes et/ou indirectes sur la plante (Figure 08).

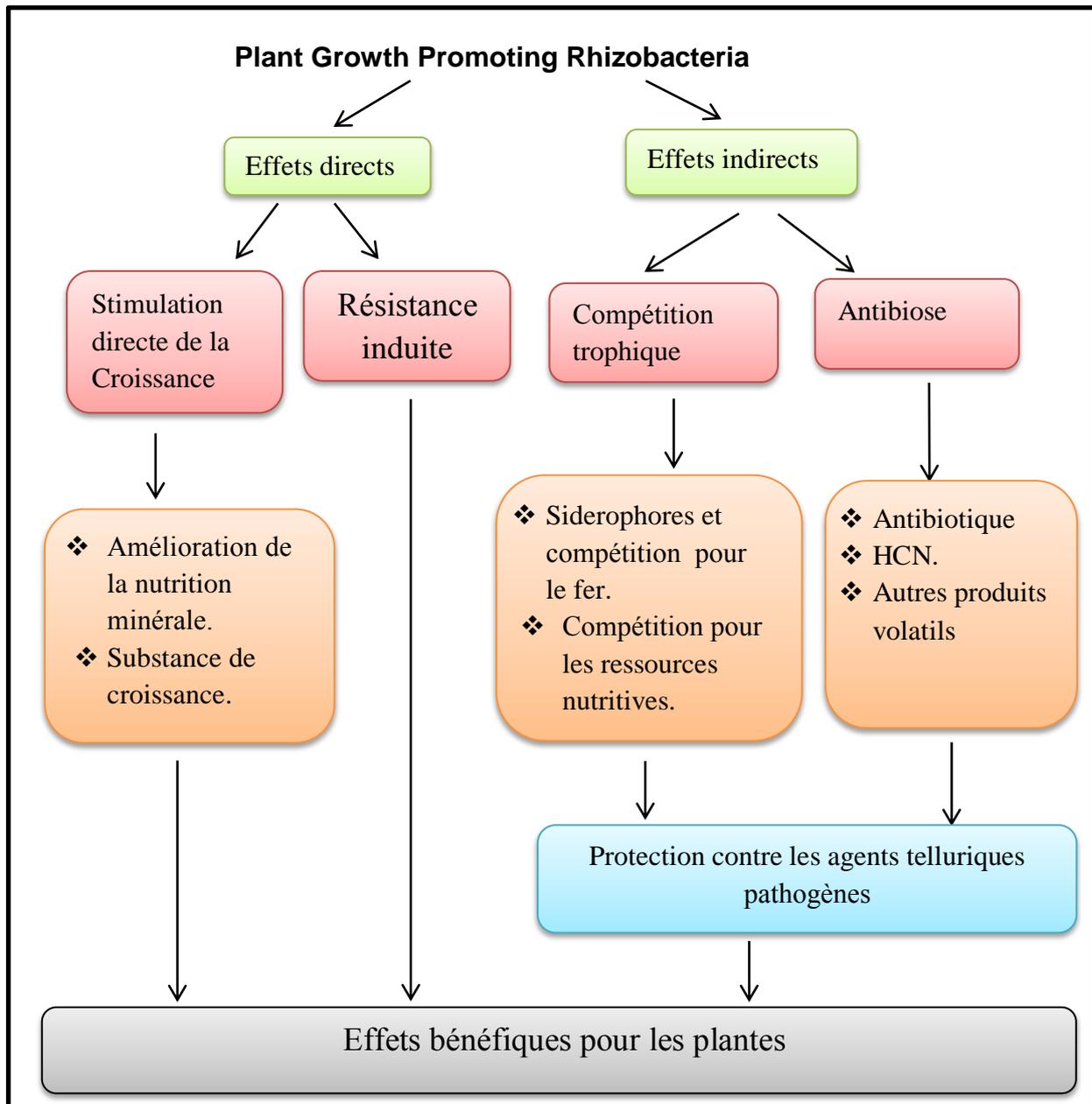


Figure 08 : Les principaux mécanismes d'action des rhizobactérie du groupe PGPR (Mattar, 1993).

II .2.4.1 Action directe

Il s'agit de la modification du métabolisme et de la physiologie de la plante, les rhizobactéries secrètent des substances qui stimulent directement la croissance

végétale (Lifshitz et *al.*,1987) et améliorent la résistance des plantes (Ton et *al.*,2001) .

a) Stimulation de la croissance

Les rhizobactéries exercent un effet bénéfique sur la croissance végétale (Sturz et Christie, 2003 ;Lidia et *al.*,2007 ;). Les *Pseudomonas* spp fluorescents contribuent à l'amélioration de l'alimentation minérale des plantes essentiellement pour le fer, le phosphore, l'azote et le manganèse (Compant et *al.*, 2005).

La réduction du manganèse du sol par les *Pseudomonas* spp fluorescents pourrait augmenter sa disponibilité et favoriser son assimilation par la plante (Weller et *al.*, 2002).La sécrétion d'acides organiques et de phosphatases facilitent la conversion de formes insolubles de phosphore en formes disponibles pour les plantes (Richardson,2001).Les espèces de *Pseudomonas* spp .fluorescents comme *P.chlororaphis* ,*P.putida* et *P.aeruginosa* ont été identifiés comme rhizobactéries solubilisant le phosphate (Bano et Musarat,2003).

Les siderophores peuvent influencer directement l'alimentation de la plante en fer (Lemanceau, 1992).En effet, le fer ferrique chelaté par les siderophores peut être assimilé directement par le système racinaire (Benchabane, 2005).

b) Induction systémique de la résistance des plantes

La reconnaissance de certaines bactéries de la rhizosphère par la plante peut conduire à une réaction d'immunisation lui permettant de mieux se défendre vis-à-vis d'une attaque par un organisme pathogène (Van Loon, 2007).Cette « immunisation » de la plante est appelée résistance systémique induite (ISR) (Jourdan et *al.*, 2008).

Le phénomène d'induction de la résistance se traduit par une augmentation de la capacité de se défendre contre un large spectre d'agents pathogène (fongiques, bactéries et viraux) (Pieterse et *al.*, 2002). Il a été démontré également que *Pseudomonas* spp. fluorescents peuvent jouer le rôle d'éliciteurs sur l'activation des gènes de défense des plantes (Soylu et *al.*, 2002) .

II .2.4 .2 Action indirect

Elle concerne la modification des équilibres microbiens au niveau de la rhizosphère (Kloepper et Schroth 1981). Les *Pseudomonas* fluorescents produisent un grand nombre de métabolites secondaires qui pourraient jouer un rôle dans l'effet antagoniste de ces micro-organismes dans le sol. Ces agents inhibiteurs peuvent être scindés en quatre groupes : les antibiotiques, les siderophores, les enzymes et l'acide cyanhydrique (HCN) (Jacques et *al.*, 1993).

a) La compétition trophique

La compétition consiste en « la consommation ou le contrôle de l'accès à une ressource comme les nutriments, l'espace ou tout autre facteur dont la disponibilité est limitée » (Widden, 1994). Dans certains cas, les rhizobactéries à croissance rapide peuvent éliminer les pathogènes fongiques par une compétition pour le carbone et les sources d'énergie (Kamilova et *al.*, 2005).

La compétition trophique instaurée par les *Pseudomonas* spp fluorescents porte particulièrement sur la compétition pour le fer (Loper et Buyer, 1991), par la synthèse des sidérophores et de protéines membranaires réceptrices (Dujiff et *al.*, 1999) .

Les sidérophores ce sont des substances de faible poids moléculaire et servant de transporteur de l'ion ferrique Fe^{+3} à l'intérieur de la cellule microbienne (Jacques et *al.*, 1993).

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

Les *Pseudomonas* spp. fluorescents produisent des siderophores appelés pyoverdines ou pseudobactines (Lemanceau ,1992). Toutefois, certaines souches de *Pseudomonas* spp produisent un autre sidérophore non fluorescent qui est la pyocheline avec une affinité inférieure pour le fer (Mercado-Blanco et *al.*, 2001).

b) L'antibiose

L'antibiose consiste en une inhibition directe de la croissance du pathogène via la production de métabolites aux propriétés antifongiques et/ou antibiotiques (Defago, 1993 ; De Souza *et al.*, 2003).

Les antibiotiques sont des métabolites microbiens bioactifs qui à faible concentration inhibent la croissance ou l'activité métabolique d'autres micro-organismes. Les antibiotiques naturels ont fait l'objet de la recherche intense pour les 70 dernières années (Mavrodi *et al.*, 2011). Il est généralement admis que dans les écosystèmes terrestres, les antibiotiques naturels s'accumulent en concentrations inhibitrices principalement dans des environnements riches en éléments nutritifs (Mavrodi *et al.*, 2011).

Les antibiotiques constituent un mécanisme efficace de lutte contre les agents phytopathogènes d'autant que certaines de ces substances ont un large spectre d'action vis-à-vis des champignons (Lepoivre, 2003).

La production d'antibiotiques par certains *Pseudomonas* spp fluorescents est maintenant reconnu comme un facteur important dans la capacité de lutte contre les maladies (Ossilivan et Ogara , 1992) . De nombreux *Pseudomonas* fluorescents sont capables de produire différents métabolites à activité antibiotique ou antifongique, tels que le 2-4 diacétylphloroglucinol (2,4-DAPG), la pyolutéorine, la pyrrolnitrine, les phénazines, le HCN et les butyro-lactones (Suty ,2010).

I. Conditionnement et formulation des *Pseudomonas* spp. fluorescents

Les souches microbiennes qu'ils s'agissent de bactéries de levures ou de moisissures nécessitent un conditionnement stable durant une longue période en vue de leur commercialisation (Zamora *et al.*, 2006). Les cellules microbiennes se conservent rarement à l'état natif dans leur milieu de culture. Leur croissance est souvent réalisée en fermenteur dans un substrat liquide mais conservés dans ce milieu après leur croissance ; les cellules y consomment les derniers nutriments disponibles et révèlent, pour la plupart un métabolisme fermentaire qui nuit à la

qualité du produit (modification du pH, émanation d'odeurs, etc.). De plus, les cellules après avoir épuisé leurs réserves meurent en grand nombre. Il est donc nécessaire de stabiliser la population microbienne et le séchage des cellules apparaît comme une solution pratique (Zhao et Zhang, 2005; Coulibaly *et al.*; 2011).

Le séchage des micro-organismes a pour but de leur assurer une conservation optimale, compatible avec la préservation d'une viabilité maximale, et rendre ainsi plus économique leur stockage, leur transport et leur commercialisation. (Bossart et Halloin, 2001; Demirhan et Özbek, 2010).

Il existe plusieurs techniques de séchage des microorganismes appliquées à l'échelle industrielle à savoir **l'atomisation** (Bucio *et al.*, 2005; Coulibaly *et al.*, 2011), **la fluidisation** (Li *et al.*, 2004) et **la lyophilisation** (Rey, 1965; Perry, 1998; Zhao et Zhang, 2005; Coulibaly *et al.*, 2009). Ces méthodes sont assez agressives vis-à-vis des micro-organismes puisqu'elles soumettent ces derniers à des variations plus ou moins importantes de température et ou de pression. Par ailleurs, des effets liés au flux d'eau à travers les membranes cellulaires peuvent également être déterminants sur la qualité du produit séché (Bossart et Halloin, 2001; Coulibaly *et al.*, 2011).

De toutes ces techniques, la littérature indique que **la lyophilisation** apparaît la plus utilisée en dépit de son coût, pour le séchage et la conservation des bactéries en général et des *Pseudomonas* spp en particulier car elle est adaptée pour les souches sensibles à des températures élevées (Harrison et Pelczar, 1963; Vidhyasekaran et Muthamilan, 1995; Palmfeldt *et al.*, 2003).

III.1 la lyophilisation

La lyophilisation est la technique la plus utilisée pour le séchage des *Pseudomonas* sp (Harrison & Pelczar, 1963; Palmfeldt *et al.*, 2003; Vidhyasekaran *et al.*, 1997). L'intérêt de la lyophilisation est lié au fait que, grâce à la diminution du poids total des bactéries par rapport aux bactéries congelées, les coûts de stockage et de transport sont inférieurs. De plus, les cellules peuvent être stockées à température ambiante pendant plusieurs jours en gardant une stabilité et une viabilité élevée et sont plus facilement manipulables (Figure 09).

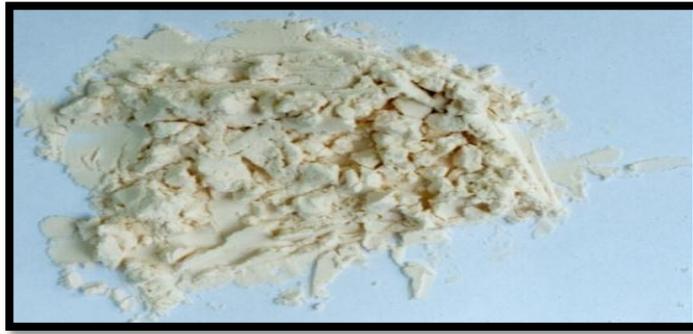


Figure 09: Souche de *Pseudomonas* spp fluorescents lyophilisées (Mputu, 2012).

La lyophilisation est une méthode qui consiste à sécher un corps imbibé d'eau par l'action conjuguée du froid et du vide, l'extraction de l'eau congelée se fait par la sublimation de la glace, c'est-à-dire par le passage direct de la glace à l'état de vapeur sans passer par l'état liquide (Voser, 2005). La lyophilisation s'effectue en trois phases : congélation de l'eau, sublimation de la glace et désorption de l'eau de constitution_dans un cycle de lyophilisation :

- La congélation, où les produits sont réfrigérés à des températures de l'ordre de $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ à $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$; l'eau se transforme alors en glace (Shuck et *al.*, 2004).
- La dessiccation primaire, sous vide, qui consiste à sublimer la glace libre (interstitielle), donc sans effet d'ébullition (pas d'eau en phase liquide) (Nanasombat et Sriwong, 2007; Coulibaly et *al.*, 2011).
- La dessiccation secondaire, qui permet d'extraire par désorption les molécules d'eau piégées à la surface des produits séchés (Coulibaly et *al.*, 2011; Nanasombat et Sriwong, 2007; Perry, 1998).

III.2 Impact de séchage sur la viabilité des microorganismes

Ces méthodes sont assez agressives vis-à-vis des micro-organismes puisqu'elles soumettent ces derniers à des variations plus ou moins importantes de température et ou de pression. Par ailleurs, des effets liés au flux d'eau à travers les membranes cellulaires peuvent également être déterminants sur la qualité du produit séché (Bossart et Halloin, 2001; Coulibaly et *al.*, 2011). Ces techniques entraînent des dommages à la membrane cellulaire, comme une peroxydation lipidique, une dénaturation des protéines et de l'ADN conduisant à une perte de viabilité (Zhao et Zhang, 2005).

Le séchage a un impact direct sur la viabilité des bactéries. Il existe plusieurs facteurs qui influencent directement cette viabilité, il s'agit notamment des facteurs physiques (Lievence and Riet van't, 1994; Morgan *et al.*, 2006; Coulibaly *et al.*, 2011) mais aussi des facteurs biologiques (Lievence and Riet van't, 1994; Miyamoto-Shinohara *et al.*, 2008).

Les bactéries gram-positives résistent mieux à la lyophilisation comme les bactéries lactiques (Castro *et al.*, 1995; Perry, 1998; Selmer-Olsen *et al.*, 1999; Nanasombat and Sriwong, 2007) tandis que leurs homologues gram-négatives, et notamment *Pseudomonas* et *Escherichia coli* sont très sensibles à toute forme de séchage surtout en l'absence de composés protecteurs (Louis *et al.*, 1994; Palmfeldt *et al.*, 2003). Cette différence de résistance au séchage entre les bactéries gram-positives et gram-négatives est principalement due à la composition de leur paroi cellulaire. Les bactéries séchées sont exposées aux différentes réactions d'oxydation au cours de leur conservation. Les composants cellulaires les plus exposés pendant le séchage et la conservation de *P. fluorescens* sont : la membrane plasmique, les acides gras polyinsaturés, les protéines et le glutathion (Mputu *et al.*, 2012).

III.3. Les dégâts oxydatifs cellulaires

La membrane plasmique est la plus vulnérable des composants de la cellule à cause de son épaisseur (Volodymyr, 2011). Les dommages subis par la cellule peuvent être : une peroxydation des lipides, une oxydation des protéines et une oxydation de l'ADN et ces altérations peuvent conduire à la mort cellulaire. Plusieurs de ces réactions ont lieu au niveau de la membrane cellulaire (Cadet *et al.*, 1995).

III.4. Modifications de la structure membranaire

La structure membranaire est la première cible de la détérioration de l'état physiologique des cellules lors d'une situation de stress (Béal *et al.*, 2008), ce qui conduit à une rupture de la paroi cellulaire (Lievence et Riet van't, 1994). Le dommage subit par la membrane cytoplasmique est principalement due à la déshydratation, ce qui entraîne comme conséquence le relargage en solution des composants intracellulaires (cations, nucléotides, enzymes, protéines etc) des

cellules lyophilisées au cours de leur réhydratation (Lievens et Riet van't, 1994; Yao *et al.*, 2008).

III.4.1 Peroxydation lipidique

Pendant la lyophilisation et au cours du stockage, les bactéries subissent d'intenses phénomènes de dégradation, liés pour la plupart à l'oxydation des lipides membranaires. Ces réactions d'oxydation sont les principaux facteurs déterminant la durée de vie des cellules (Coulibaly *et al.*, 2011). La peroxydation lipidique est un phénomène général qui se produit en présence d'oxygène. Tous les lipides contenant des acides gras insaturés sont concernés.

III.4.2 L'oxydation des protéines

Comme pour les lipides, la lyophilisation et le stockage entraîne des dommages aux protéines, étant donné que leur structure dépend partiellement de l'eau. Ces protéines forment avec l'eau des liaisons qui sont rompues lors de la lyophilisation conduisant ainsi à leur dénaturation (Lievens and Riet van't, 1994).

III.4.3.Dommage de l'ADN

L'ADN est très sensible au séchage comme démontré chez *E. coli* (Santivarangkna *et al.*, 2007). Les modifications observées après l'oxydation du DNA sont très nombreuses, il s'agit entre autre de la conversion des résidus thymine en thymine glycol et en 5-hydroxyméthyluracile, de la guanine en 8-hydroxyguanine, l'oxydation du désoxyribose entraîne une coupure des brins. En effet, la guanine est la cible privilégiée de nombreux oxydants (Cadet *et al.*, 1995; Cadet *et al.*, 2003; Saumaa *et al.*, 2007; Kumari *et al.*, 2008).

III.5. La cryoprotection

La lyophilisation a longtemps été considérée comme la technique de déshydratation appropriée pour les bactéries (Palmfeldt, Radström *et al.*, 2003; Morgan, Herman *et al.*, 2006; Santivarangkna, Higl *et al.*, 2008).) et afin de réduire les effets nocifs de la congélation et du stockage sur les cellules, la cryopréservation vise la protection des concentrés bactériens grâce à l'ajout de substances dites « cryoprotectrices » (Mäyrä-Mäkinen et Bigret, 1998).

Le choix d'un composé protecteur appropriés est très important pour assurer une viabilité élevée des bactéries pendant la lyophilisation et au cours du stockage (Lievense et Riet van't 1993; Leslie, Israeli et *al.* 1995; Kawahara 2008. Ces composés protecteurs doivent être peu volatils, solubles dans l'eau et n'avoir aucun caractère toxique au niveau cellulaire. Ils ont des origines diverses : polyols, sucres, protéines laitières, acides aminés, antioxydants ou macromolécules (Béal, Marin et *al.*, 2008). Le Tableau 1 nous donne les différentes classes des composés protecteurs.

Tableau 02. Quelques caractéristiques et substances utilisées comme cryoprotecteurs intracellulaires (CPI) et extracellulaires (CPE) d'après Coulibaly et *al.* (2011).

| Caractéristiques | Intracellulaires (CPI) | Extracellulaires (CPE) |
|---|--|--|
| Poids moléculaire (g/mol) | <400 | >10000 |
| Activité à une concentration de l'ordre | De la mole (M) | De la millimole (mM) |
| Exemples de molécules utilisées | Glycérol, méthanol, éthanol, dyméthylsulfoxyde, polyéthylène oxyde (PEO-400) | lactose, saccharose, tréhalose, polyvinyl, pyrrolidone , dextran, maltodextrine, , amidon. |

Mputu et *al.*, (2012) et Mputu (2013), ont démontré que l'utilisation des composés protecteurs (glycérol et maltodextrine) avant la lyophilisation permet de maintenir une viabilité remarquable à la fin de la lyophilisation et au cours du stockage de *Pseudomonas fluorescens*.

Notre travail qui porte sur l'effet de la lyophilisation et la conservation sur l'efficacité et la stabilité de l'expression des effets antagonistes des souches de *Pseudomonas* spp fluorescents vis -à-vis de *fusarium oxysporum* agent de la fusariose vasculaire a été réalisée au niveau du laboratoire de Microbiologie de département de Biotechnologie de l'université Saad Dahleb Blida1.

I. Matériel biologique

1. Souches bactériennes

Dans notre étude nous avons utilisé cinq souches de *Pseudomonas* spp. fluorescents isolées, identifiées et lyophilisées par Benoussaid (travaux en cours) à partir de la rhizosphère de quelque arbres fruitiers de Sud Algérien (BB9, BB10, BB2, F21, PI9) (**Tableau 03**) ces souches appartiennent à la collection du laboratoire du Mycologie (département de biotechnologie l'université Blida 1).

Tableau 03: Caractéristiques des souches antagonistes utilisées.

| Souches | Origine | Caractéristique | | | | | | | | |
|---------|-----------------|-----------------|-----|-----|------|-----|----|----|----|-----|
| | | Pvd | Hcn | IAA | Phos | Cwe | | | | |
| | | | | | | Pr | Ch | Ce | Pe | Pro |
| BB2 | Palmier dattier | + | - | + | + | + | + | - | - | + |
| BB9 | Palmier dattier | + | + | + | + | + | + | - | - | + |
| BB10 | Palmier dattier | + | + | + | + | + | + | - | - | + |
| F21 | Palmier dattier | + | + | + | + | + | + | - | - | + |
| PI9 | Poirier | + | + | + | + | + | + | - | - | + |

Pyoverdines, (pvd), acide cyanhydrique (HCN), Acid Indole Acetic (IAA), phosphatase (phos), les enzymes dégradent la paroi cellulaire (Cwe) (Pro) Protéase, chitinase (Ch), cellulase(Ce),Pectinase (Pe),

2. Souches fongiques

Pour évaluer l'activité antagoniste des souches bactériennes précédemment citées, nous avons utilisé trois formes spéciales de *Fusarium oxysporum* (*Fusarium oxysporum* f.sp. *lycopersici*, *Fusarium oxysporum* f.sp. *lini* et *Fusarium oxysporum* f.sp. *albedenis*). Ces souches fongique

appartiennent à la collection de laboratoire de Mycologie (département de biotechnologie l'université Blida1).

3. Matériel végétal

3.1. Semence

La plante utilisée pour la réalisation de nos essais d'antagonisme *in situ* est la tomate (*Lycopersicon Esculentum* variété Saint Pierre). Les semences de la tomate ont été fournies par la station expérimentale du département de biotechnologie Université de Blida1.

3.2. Sol

Pour la réalisation du test d'antagonisme *in situ*, le sol utilisé dans notre expérimentation a été prélevé à partir d'une serre non cultivée au niveau du département de biotechnologie de l'université de Blida1.

Après élimination des éléments grossiers à l'aide d'un tamis a été mélangé avec la tourbe a raison d'une part de tourbe et deux parts de sol, le mélange a subi une stérilisation pendant 1h à 250 °C pour éliminer le maximum de la microflore tellurique indigène.

Le mélange ainsi obtenu (sol + tourbe) a été reparti dans des pots en plastique à raison de 180 gramme par pot.

II. Purification des souches utilisées

Les souches ont été réhydratées dans 9 ml d'eau peptonée. Après dilutions successives, une goutte de chaque échantillon a été ensuite étalée sur la gélose KB (King et *al.*, 1954) (Annexe1).(fig10).La pureté des souches bactériennes a été vérifiée en réalisant plusieurs repiquages successifs. La production du pigment fluorescent a été notée par la présence d'une couleur verdâtre visible a l'œil nu et sous lumière UV après 24h d'incubation à 28°C.

Figure10 : Réhydratation et purification de *Pseudomonas* spp. fluorescents lyophilisés.



La purification des souches fongiques a été réalisée par transplantation successif des disques dans des boîtes de Pétri contenant le milieu PDA (Potato Dextrose Agar) (Jehnston et Booth, 1983) (Annexe1). L'incubation des cultures fongiques a été effectuée à 30 °C pendant 5-7 jours. Les souches purifiées ont été conservées à 4 °C.

III. Potentialités Antagonistes *in vitro* des isolats

Le test d'antagonisme *in vitro* a été effectué avec les 5 souches bactériennes de *Pseudomonas* fluorescent lyophilisées vis-à-vis de trois souches fongiques phytopathogènes de *Fusarium oxysporum* (*Fusarium oxysporum* f.sp. *lycopersici*, *Fusarium oxysporum* f.sp. *lini* et *Fusarium oxysporum* f.sp. *albedenis*) agents de la fusariose vasculaire.

Le test a été réalisé par 2 méthodes :

- la première méthode est celle de la confrontation directe en boîte de Pétri.
- La deuxième est celle de la microfiltration des suspensions bactériennes.

1. Test de confrontation direct des souches antagonistes vis-à-vis des souches pathogènes

Le pouvoir antagoniste de nos souches bactériennes sur l'inhibition de la croissance mycélienne des 3 formes spéciales de *Fusarium oxysporum* a été testé sur trois milieux différents : le milieu PDA (favorable au développement des champignons), milieu KB (favorable au des *Pseudomonas*) et le milieu mixte composé de parts égales des deux milieux.

La méthode utilisée est celle décrite par Vincent et *al.*, (1991). Les souches de *Pseudomonas* spp fluorescents âgées de 24 h sont étalées sous forme d'une ligne sur une distance de 1,5 cm à partir des deux bords d'une boîte de Pétri contenant du milieu gélosé. A l'opposé un disque fongique de 6 mm venant d'une culture de 7 jours est déposé au centre de la boîte (figure 11). L'ensemble est incubé à une température de 28 °C pendant sept jours. Trois répétitions ont été effectuées pour chaque interaction.

La réduction du diamètre des colonies mycéliennes des champignons pathogènes en présence des souches de *Pseudomonas* comparé au témoin non inoculé, indique la présence d'une activité antagoniste. Le pourcentage d'inhibition est calculé selon la relation suivante (Wang et *al.*, 2002) :

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

$R_{\text{témoin}}$: distance radicale max de la croissance du champignon.

R_{test} : distance radicale sur une ligne en direction de l'antagoniste.

L'évolution de la croissance mycélienne en interaction avec les souches de *Pseudomonas* a été notée toute les 24h pendant une période 7 jours.

Pour vérifier la stabilité de l'activité antagoniste *in vitro* des cinq souches, deux autres observations ont été réalisées : le quinzième et le trentième jour de confrontation.

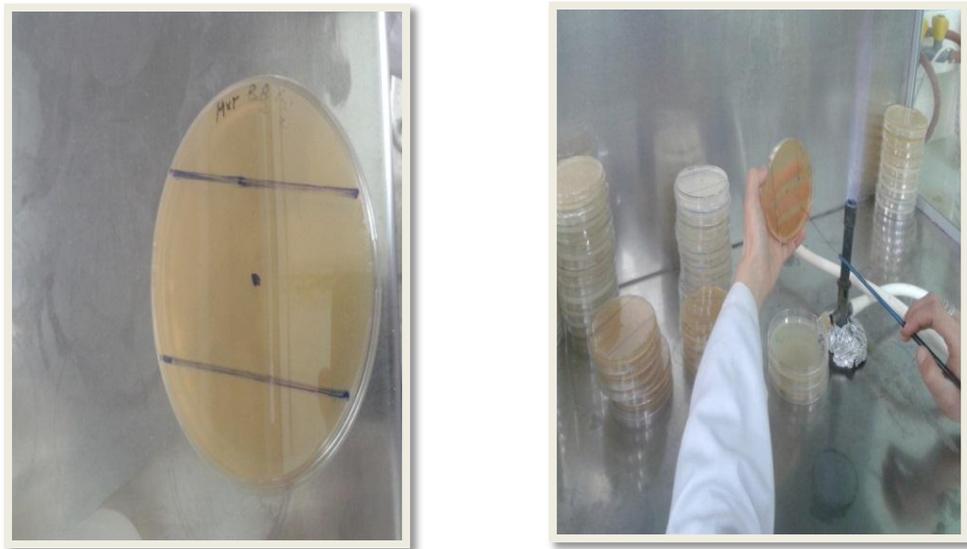


Figure 11: Ensemencement sous forme de deux stries parallèles.

2. Méthode de la Microfiltration

➤ Préparation des filtrats de cultures

Les bactéries ont été cultivées séparément dans des erlenmeyers de 250 ml contenant chacun 50 ml de milieu KB liquide (Figure 12). Les cultures sont agitées (170 trs/ mn) pendant une semaine à 28°C. Après centrifugation à 6000 rpm pendant 15 mn, le surnageant est récupéré et filtré sur membrane millipore stérile (0.22 Mm de diamètre) à l'aide d'une seringue stérile. Le filtrat obtenu est conservé à froid à 4 °C dans des fioles fermées hermétiquement (Yezli et al ; 2015).

➤ Action du filtrat sur la croissance mycélienne du parasite

Un volume de 2.5 de chaque micro filtrat stérile, est additionné dans des flacons contenant 250 ml de PDA (Figure13) (Le filtrat du témoin est remplacé par du KB liquide). Des pastilles de 6mm de diamètres sont prélevés à la périphérie d'une culture fongique de chaque forma spéciale de *Fusarium oxysporum* et sont placées dans des boites contenant le milieu PDA.

La croissance mycélienne des parasites est évaluée par la mesure du diamètre moyen des colonies après 7 jours d'incubation à 28 °C (Sedra et Maslouhy, 1995). Un pourcentage moyen d'inhibition de la croissance mycélienne du parasite est calculé comme précédemment. Toute les expériences ont été répété 3 fois.



Figure 12 : Les étapes de préparation de la suspension bactérienne



Figure 13 : Les étapes de microfiltration

IV. Essai d'Antagonisme *in situ*

Dans le but de vérifier les potentialités antagonistes des souches de *Pseudomonas* lyophilisées et conservées vis à vis *Fusarium oxysporum* f.sp. *lycopersici* agent de la fusariose vasculaire de tomate, trois souches (BB9, BB10, F21) ont été choisis pour ce test.

IV.1. Dispositif expérimental

Les essais expérimentaux *in situ* ont été réalisés selon un dispositif composé de trois blocs aléatoires complets. Chaque bloc renferme onze traitements différents avec 10 répétitions pour chaque traitement. Le nombre total des plantes est de 310. Les traitements utilisés sont les suivants :

T1, T4 et T7 : plants inoculées respectivement avec les souches BB9, BB10, F21 lyophilisées avec conservateur en interaction avec Fol.

T2, T5 et T8 : plants inoculées respectivement avec les souches BB9, BB10, F21 lyophilisées sans conservateur en interaction avec Fol.

T3, T6 et T9 : plants inoculées respectivement avec les souches BB9, BB10, F21 non lyophilisées en interaction avec Fol.

T10 : Témoin positif (+), plants inoculées uniquement avec la suspension conidienne de F.O.L.

T11 : Témoin négatif (-), plants inoculées iniquement par l'eau distillée stérile

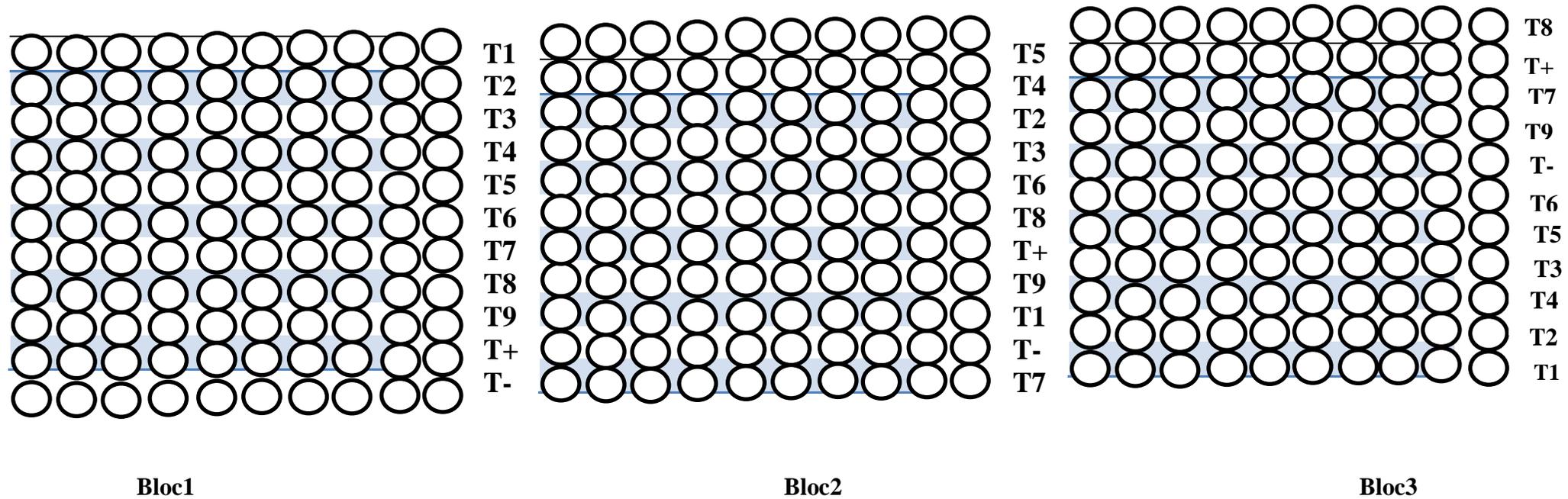


Figure 14: Dispositif expérimental (3 Bloc aléatoire complets).

IV.2 Désinfection des semences et semis

Les semences ont été désinfectées par trempage dans hypochlorite de sodium (2%) pendant 10 min suivi de 3 rinçages successifs à l'eau distillée stérile (fig15).les semences désinfectées ont été séchées sur papier filtre stérile puis enveloppées dans un papier filtre stérilisé et humecté et placées dans des boites de Pétri en verre. Afin d'obtenir une germination, les boites ont été couvertes par un papier aluminium, et incubées à une température de 25 °C pendant 4 jour. Une fois germées, les graines ont été transférées dans des pots en plastiques de 250ml, à raison d'une graine par pot et maintenues sous serre en verre. L'arrosage des plantules a été effectué chaque jour avec de l'eau stérile.



Figure 15: Désinfection et germination des semences.

IV.3 Inoculation bactérienne

Après trois semaines de semis, au stade 2 à 3 feuilles, les plantules de tomate ont été inoculées au niveau des racines par des suspensions bactériennes à raison de 10 ml par pot ayant une concentration de 5×10^6 dont la densité optique a été mesurée par un spectrophotomètre ($\lambda=600 \text{ nm}$)($D.O \approx 0.9$).L'inoculum bactérien a été préparé à partir d'une crème bactérienne de 24 h, cultivé sur le milieu de culture KB puis transféré dans de l'eau distillée stérile pour chaque souche.

Les plantes de témoin négatif (T-) ont été inoculées uniquement avec l'eau distillée stérile, et les plantes du témoin positif (T+) ont été inoculées uniquement avec la suspension conidiennes de F.O.L.



Figure16 : Préparation d'inoculum bactérien.

Injection 10ml de la suspension bactérienne



Figure 17 : les étapes d'inoculation bactérienne.

IV.4 Inoculation fongique

Les suspensions conidiennes ont été obtenues à partir de cultures fongiques des souches F.O.L cultivées sur milieu PDA (Potato Dextrose Agar). Des disques mycéliens âgés de 7 jours ont été transférés dans des flacons contenant de milieu PDP stérile. La suspension a été par la suite filtrée à l'aide d'un Entonnoir contenant une compresse stérile puis ajustée à une concentration approximative de 5×10^6 conidies/ml à l'aide d'une cellule de Malassez. L'inoculation a été réalisé 48h après l'apport des bactéries à raison de 10ml par pot.

V. Suivi du développement de la maladie

L'estimation du niveau d'infection des plants de tomate par la fusariose vasculaire a été réalisée à l'aide de l'échelle donnée par Fuchs et Defago (1991). Cette échelle comporte cinq notations :

- 0=pas de symptômes.
- 1=jaunissement partiel.
- 2=flétrissement unilatéral.
- 3= flétrissement généralisé.
- 4=Dessèchement total du plant.

Des observations quotidiennes sur l'état sanitaire et le degré d'infection des plants ont été effectuées quotidiennement pendant 3 semaines.

Le taux d'infection de la maladie exprimé en pourcentage a été calculé selon le rapport suivant :

$$I = \frac{\text{Nombre de plants malades} \times 100}{\text{Nombre total de plants}}$$

La sévérité de la maladie a été évaluée selon l'équation donnée ci-dessous qui tient compte des degrés de notation de l'échelle de Fuchs et Defago (1991).

$$S = \sum (E \cdot a / N \cdot T) \times 100$$

S= la sévérité de la maladie exprime en pourcentage.

E=le degré de notation variant de 0 à 4.

a=le nombre de plants malades du 4 degré de notation.

N=le nombre de plants malades.

T=la valeur du degré de notation le plus élevé qui est le 4.

VI. Essai de ré-isolement de F.o.I

Pour la détection de la présence de l'agent pathogène, nous avons procédé au réisolement de ce dernier à partir des racines et des collets des différents traitements 30 jours après l'inoculation. A cet effet, les plantules ont été dépotées et les racines délicatement lavées sous l'eau du robinet pour éliminer le

sol adhérent. Des coupes de 0.5cm ont été réalisées au niveau du collet et racine, et subies une désinfection à hypochlorite de sodium (0.5%) pendant 5 mn, suivi d'un rinçage successif à l'eau distillée stérile et séchées séparément sur papier filtre stérile. Chaque fragment a été déposé dans une boîte de Pétri contenant le milieu PDA et incubé à 28°C. Des observations ont été réalisées pour confirmer la présence ou l'absence de l'agent pathogène.

VII. Colonisation rhizosphérique

Dans le but d'évaluer le pouvoir colonisateur des souches bactériennes de *Pseudomonas*, une vérification de l'installation des bactéries au niveau des rhizosphères des plantes étudiées a été réalisée. A cet effet un fragment de racine est prélevé au niveau de chaque traitement et de chaque bloc, suivi de plusieurs rinçages à l'eau distillée stérile et séché séparément sur papier filtre stérile. Chaque fragment a été déposé aseptiquement sur le milieu King B dans des boîtes de Pétri. Les observations ont été effectuées 24h à 48h après incubation à 25 °C.

I .Aspect culturaux des souches bactériennes lyophilisées

Après réhydratation des souches bactériennes lyophilisées et purification, les caractères macromorphologiques observés sur milieu B de King (1954), montrent que les souches de *Pseudomonas* fluorescents après lyophilisation et conservation présentent les mêmes caractéristiques que les souches non lyophilisées. Les colonies sont de couleur crème parfois beige à contour régulier et leurs diamètre vari de 0.2 à 5 mm selon l'âge de la culture .Les colonies présentent un aspect lisse avec une élévation plus ou moins convexe (Lelliot et Stead ,1987 et Schaad,1988).

Les membres de ce groupe se caractérisent par l'aptitude à synthétiser en situation de carence en fer des siderophores présentant un pigment fluorescent observés sous rayonnement ultraviolet (Palleroni,1984 et 1992).Ce pigment émis dans le milieu est d'une intensité variable d'une souche à une autre (fig18) .

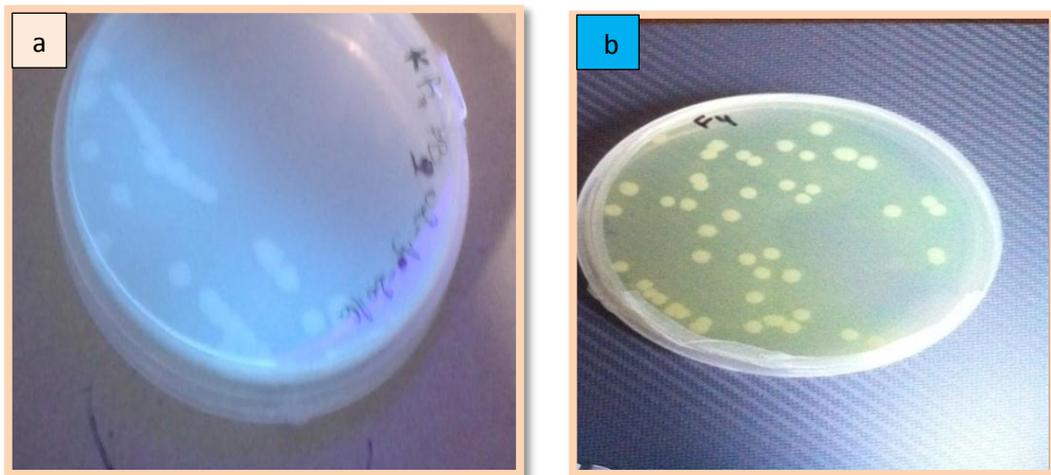


Figure 18 : Aspect des souches de *Pseudomonas* fluorescents (a) sous UV, (b) à l'œil nu.

II. Résultats de l'activité antagoniste *in vitro* des souches bactériennes de *Pseudomonas* spp. fluorescents.

Les tests d'antagonisme *in vitro* montrent que les cinq souches de *Pseudomonas* fluorescents (BB10, BB9, BB2, PI9 et F21) exercent des effets antagonistes vis-à-vis des trois formes spéciales de *Fusarium oxysporum* (*F.o.a*, *F.o.l* et *F.o.ln*) mais à des degrés divers. Cette variation dépend des souches antagonistes utilisées,

des milieux de culture et aussi de la méthode utilisée (méthode de confrontation directe et méthode de confrontation indirecte).

II.1. Confrontation direct en boîte de Pétri

Même à des taux variables, les cinq souches bactériennes (BB2, BB9, BB10, F21, PI9) ont montré une activité vis-à-vis des trois souches fongiques sur les trois milieux de cultures (PDA, KB et le milieu mixte). Cette inhibition a été détectée après 72h de confrontation.

D'après les figures (28.29.30.31.32.33.34) et tableau (01 annex3), nous constatons que les souches bactériennes utilisées ont montré des activités antagonistes substantielles, variables contre les souches fongiques sur les trois milieux de culture examinés, causant des zones claires d'inhibition dans les différents milieux de cultures et limitant la croissance des 3 forma spéciales de *Fusarium oxysporum*.

II.1.1 Cas de *Fusarium oxysporum* f.sp. *albedinis*

➤ Sur le milieu PDA

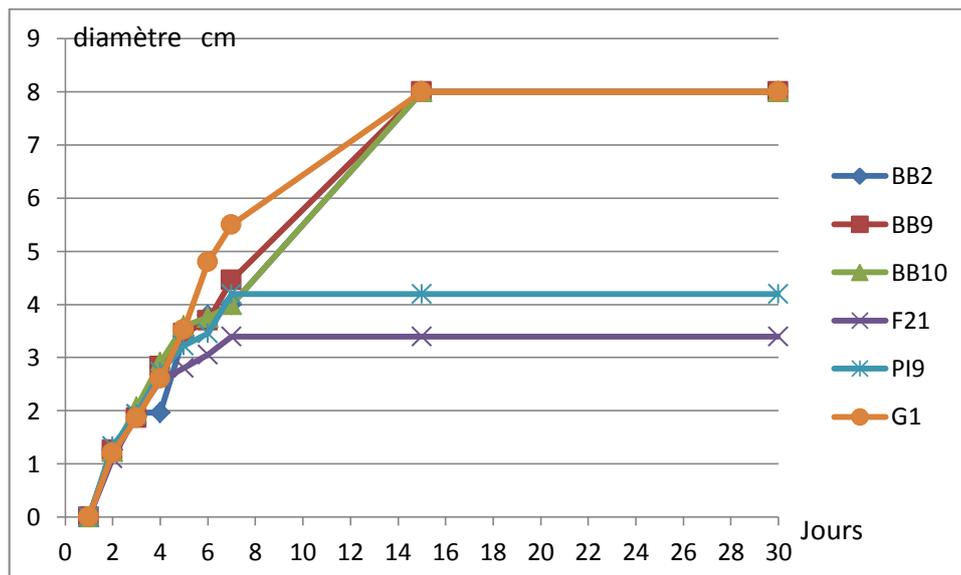


Figure 19 : Evolution de la croissance mycélienne de F.o.a (G1) en confrontation avec les 5 souches bactériennes de *Pseudomonas*.

Nous constatons que la croissance mycélienne de l'agent pathogène de *F.o.a* (G1) en confrontation avec les différentes souches bactériennes est nettement

inférieure par rapport aux témoins *F.o. a* (absence des antagonistes) (figure19). Notons que, la croissance mycélienne en confrontation avec la souche F21 est plus réduite par rapport aux autres souches avec un taux d'inhibition de 38.2%. Concernent les souches bactérienne BB10, BB2 et PI9, nous avons noté des taux respectivement de 27.3%,27.3% et 23.7%. Le taux le plus faible a été signalé par la souche BB9 (18.9%) (fig01) (Annexe 3).

Au-delà du 7^{ème} jour, nous remarquons une stabilité dans l'inhibition de la croissance mycélienne en confrontation avec les 2 souches antagonistes F21 et PI9 avec respectivement des taux de 57.5% et 47.5 %.

➤ Sur le milieu King B

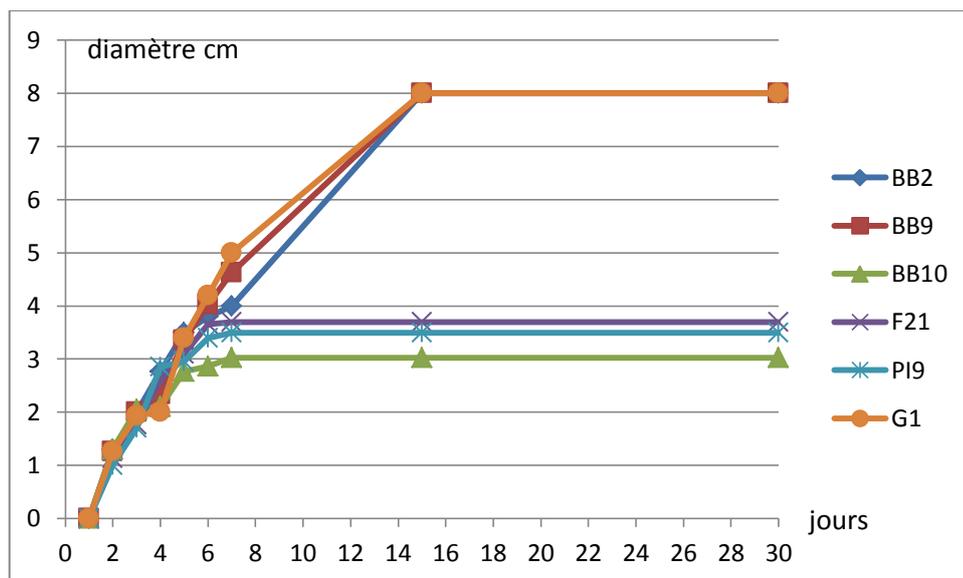


Figure 20: Evolution de la croissance mycélienne de G1 en confrontation avec les 5 souches bactériennes *Pseudomonas* sur milieu KB.

Les résultats de l'inhibition de la croissance de l'agent pathogène *F.o.a* (G1) sur le milieu KB illustré par la figure (20) montrent que la croissance mycélienne en confrontation avec les souches antagonistes BB10, PI9, F21 c'est arrêté le 7^{ème} jour avec des taux d'inhibition variables respectivement de 39.4%,30% et 26% (fig 02) (Annexe 3). Au du 7^{ème} jour et avec les même souches, nous notons une stabilité de l'effet antagoniste avec respectivement des taux de 62.12%,56.25% et 53.75%. Après 15 jours de confrontation avec les souches BB2 (20%) et BB9 (7.4%), le pathogène a repris sa croissance pour atteindre le même diamètre (8cm) que celui du témoin.

➤ **Sur milieu mixte**

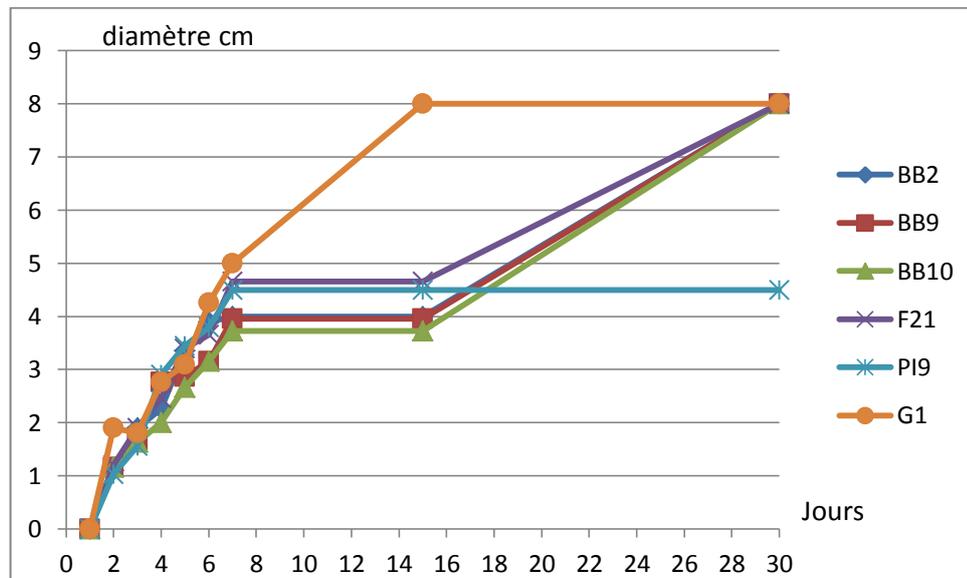


Figure21 : Evolution de la croissance mycélienne de G1 en confrontation avec les 5 souches bactériennes Pseudomonas sur milieu mixte (KB+PDA).

A travers les résultats obtenus (figure21), l'effet antagoniste le plus important a été enregistré avec la souche BB10 (25.4%). Les souches BB2, et BB9 viennent en deuxième position avec le même taux d'inhibition (20%). Avec les souches bactériennes F21 et PI9, nous avons noté des taux plus faibles respectivement de 6.8% et 10%. (fig 03) (Annexe 3). Une stabilité de l'activité antagoniste des 5 souches bactériennes à l'encontre du champignon a été détectée après quinze jours de confrontation. Au-delà (après 15 jours de confrontation), le pathogène a repris sa croissance avec toutes les souches à l'exception de la souche PI9 qui montre une stabilité dans l'activité antagoniste avec un taux de 33.37%.

II.1.2. Cas de *Fusarium oxysporum* f.sp.*lycopersici*

➤ Sur milieu PDA

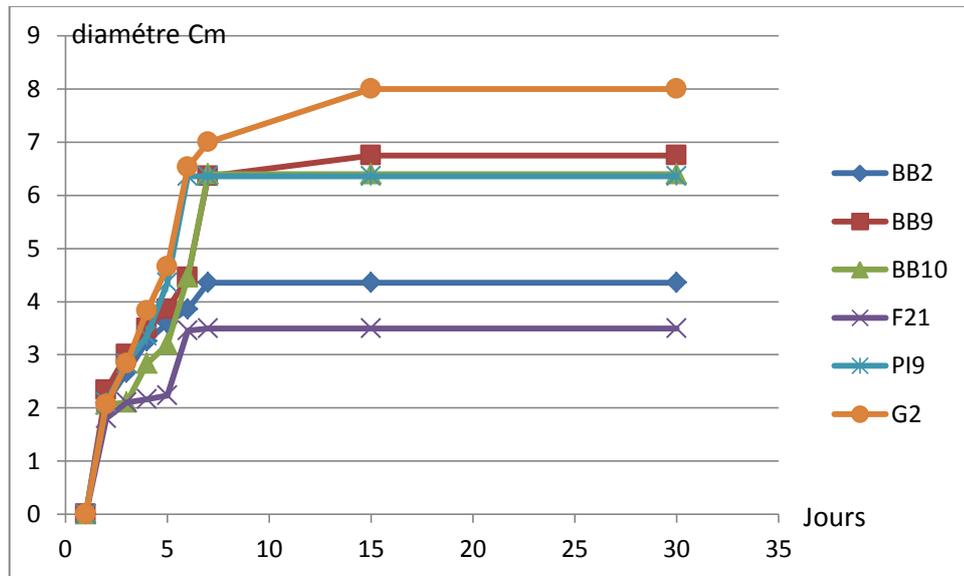


Figure 22: Evolution de la croissance mycélienne de G2 en confrontation avec les 5 souches bactériennes *Pseudomonas* sur milieu PDA.

La croissance mycélienne de l'agent pathogène (*F. o. l*) (G2) en confrontation avec les souches bactériennes F21 et BB2 est nettement inférieure par rapport au témoin *F.o.l* (absence des antagonistes), qui correspond à des taux d'inhibition appréciables respectivement de 50% et 37.8%, alors que la souche BB₉ représente la plus faible activité antagoniste (3.6%). Notons que la souche F21 a marqué un effet antagoniste plus important que les autres souches bactériennes utilisées. La stabilité de l'activité antagoniste a été maintenue avec les 5 souches (BB2 45%, BB9 15.62%, BB10 20%, PI9 20.5% et F21 56.25%) jusqu'à la fin de l'essai (30 jours de suivi).

➤ Sur le milieu King B

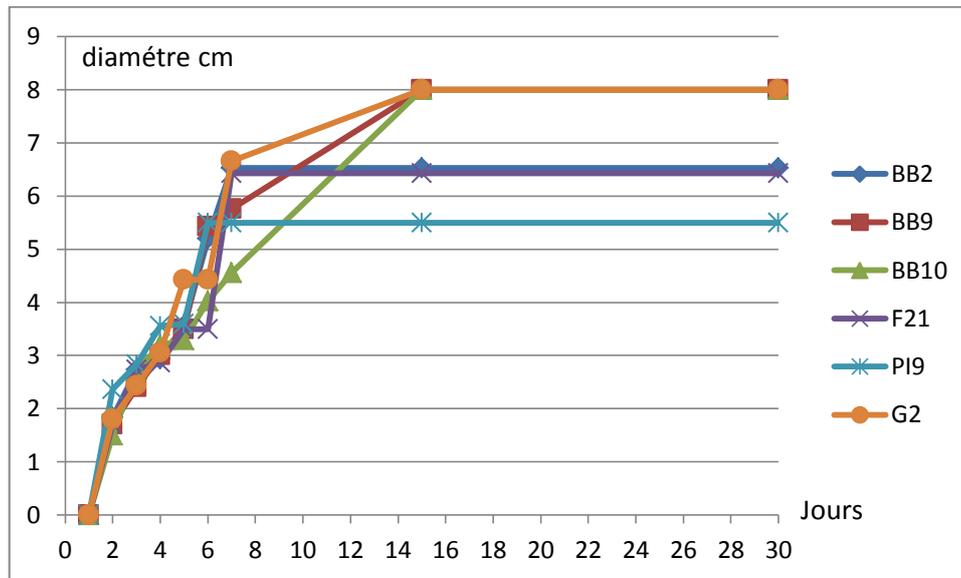


Figure 23: Evolution de la croissance mycélienne de G2 en confrontation avec les 5 souches bactériennes *Pseudomonas* sur milieu KB.

L'effet antagoniste le plus important a été signalé par la souche bactérienne BB10 avec un taux de 31.6%, alors que les souches BB9, PI9, F21 et BB2 ont montré des activités moins importantes vis-à-vis de l'agent pathogène avec des taux de 13.6%, 17.5%, 3.5% et 2%. Au-delà du 7^{ème} jour d'interaction, nous remarquons une stabilité dans l'activité antagoniste avec les souches antagonistes F21 (19.62%), PI9 (31.25%) et BB2 (18.37%) jusqu'à la fin de l'essai. Avec les deux souches bactériennes BB10 et BB9, l'agent pathogène a repris son développement à partir du 15^{ème} jour d'interaction pour atteindre un diamètre maximal de 8 cm.

➤ Sur le milieu Mixte

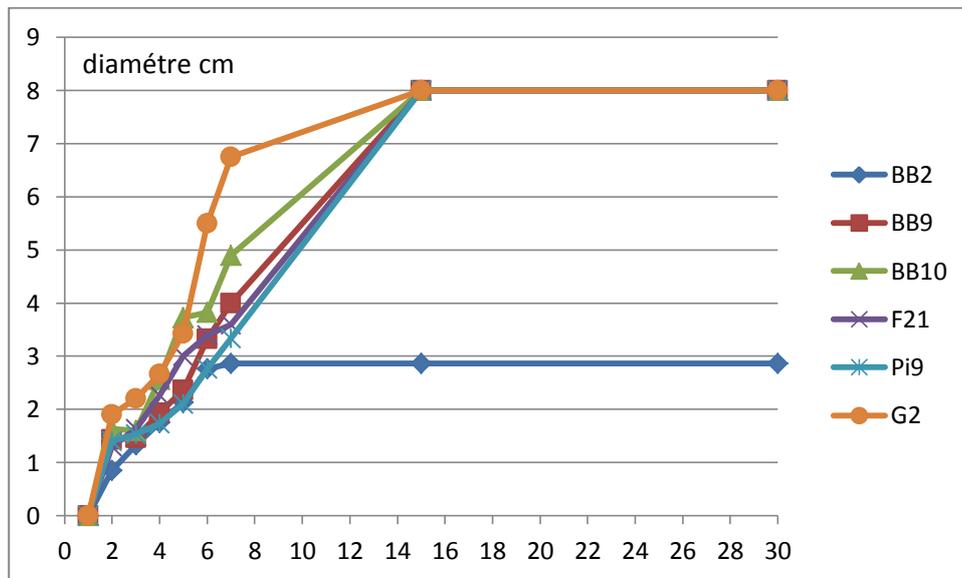


Figure 24: Evolution de la croissance mycélienne de G2 en confrontation avec les 5 souches bactériennes *Pseudomonas* sur milieu Mixte.

L'effet antagoniste le plus important a été enregistré par la souche BB₂ (58%), alors que les souches PI9, F21, BB9 ont montré des activités antagoniste moins importantes (50.6%, 47%, 40.8%). La souche BB10 possède un faible pouvoir antagoniste avec un taux d'inhibition de 27.4%. Au-delà du septième jour, le champignon a repris sa croissance avec toutes les souches, à l'exception de la souche antagoniste BB₂ qui présente toujours une stabilité dans l'activité antagoniste (64.25%).

II.1.3 Cas de *Fusarium oxysporum* f.sp.*lini*

➤ Sur milieu PDA

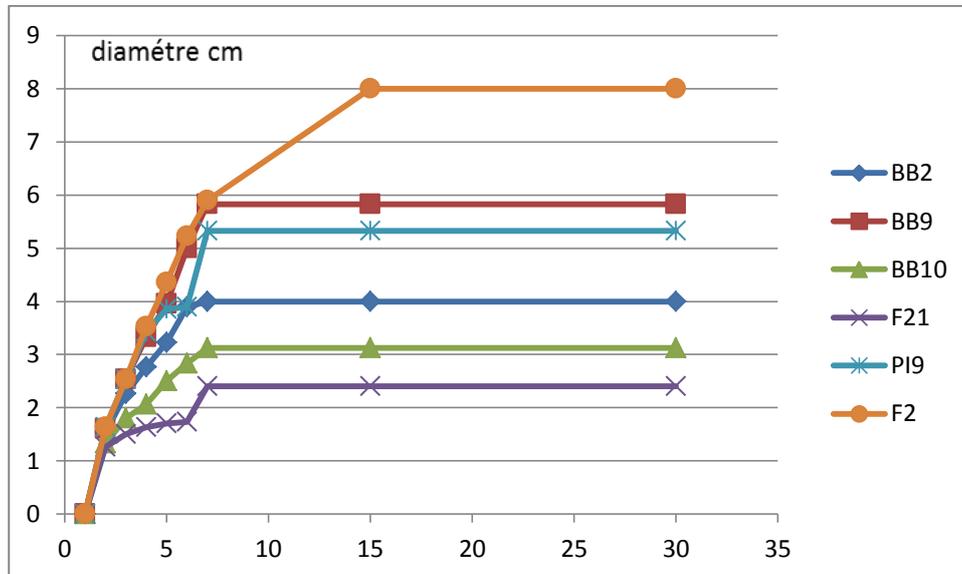


Figure 25 : Evolution de la croissance mycélienne de F2 en confrontation avec les 5 souches bactériennes *Pseudomonas*.

Les souches BB2 et BB10 montrent une activité inhibitrice importante avec des taux d'ordre de 32.20% et 47% pour chaque souche. Le taux d'inhibition maximal a été enregistré par la souche F21 (59.32%), et le taux le plus faible a été signalé par la souche BB9 (1.2%). Au-delà du 7^{ème} jour, nous remarquons une stabilité de l'activité antagoniste des différentes souches antagonistes jusqu'à la fin de l'essai (30 jours d'interaction) (F21 : 70%, BB2 : 50%, BB9 : 27.12% ; BB10 : 60.87% et PI9 : 33.37%).

➤ **Sur milieu Mixte**

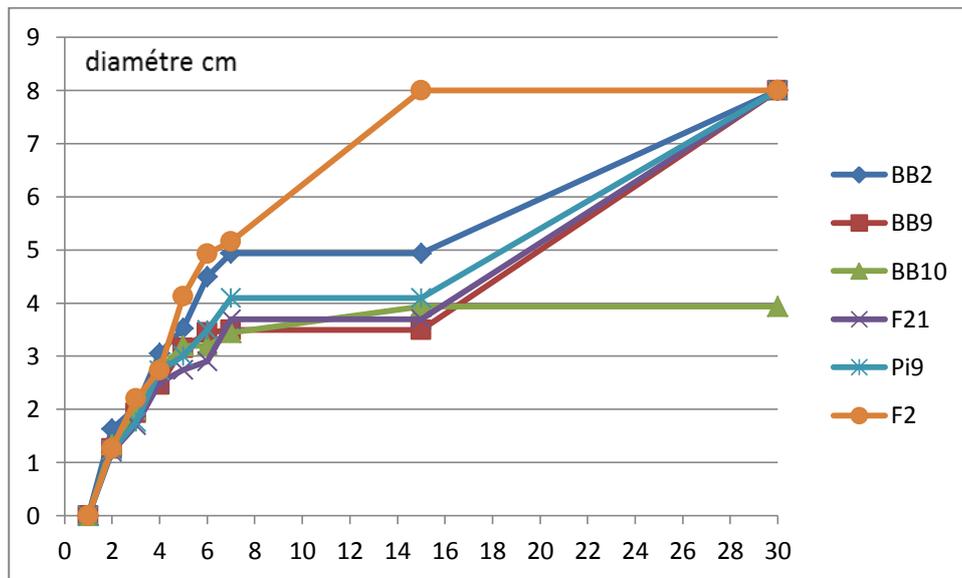


Figure26 : Evolution de la croissance mycélienne de F2 en *confrontation* avec les 5 souches bactériennes *Pseudomonas* sur milieu Mixte.

La croissance mycélienne en confrontation avec la souche F21 est minime par rapport aux autres souches montrant un taux d'inhibition maximal de 56.6%. Concernant BB9, BB10 et PI9, nous avons noté des taux relativement faibles (respectivement de 32.2%, 23.7%, 20.6%), alors que le taux le plus faible (< 20%) a été exhibé par la souche BB2 (4.3%). Une stabilité de l'effet antagoniste a été notée chez les cinq souches du septième jour jusqu'au quinzième jour. Au-delà du 15^{ème} jour, le champignon a repris sa croissance avec les 4 souches (BB9, BB2, PI9 et F21) alors qu'en interaction avec BB10 (50.75%), la stabilité de l'activité antagoniste persiste jusqu'à la fin de l'essai.

➤ Sur milieu King B

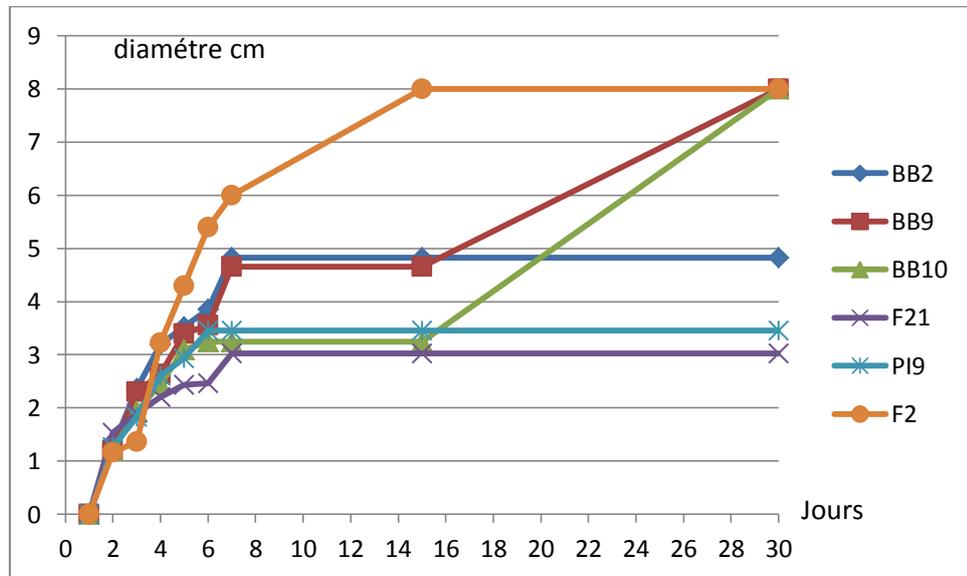


Figure 27: Evolution de la croissance mycélienne de F2 en confrontation avec les 5 souches bactériennes *Pseudomonas* sur milieu KB.

Le taux d'inhibition le plus élevé a été enregistré avec la souche bactérienne F21 (50%). Les souches BB10, et PI9 viennent en deuxième et troisième position respectivement avec des taux inhibition d'ordre 45.9% et 42.4%. (fig02) (Annexe3) alors qu'avec les souches BB9 et BB2, les taux étaient de 22.4% et 19.5%. Concernant l'interaction de l'agent pathogène *F. o. In* avec les souches F21 (62,12%), PI9 (56.75%) et BB2 (39.62%), la croissance mycélienne a marqué une stagnation le 7^{ème} jour. Par contre le champignon a poursuivi sa croissance avec BB9, BB10 jusqu'à la fin de l'essai.

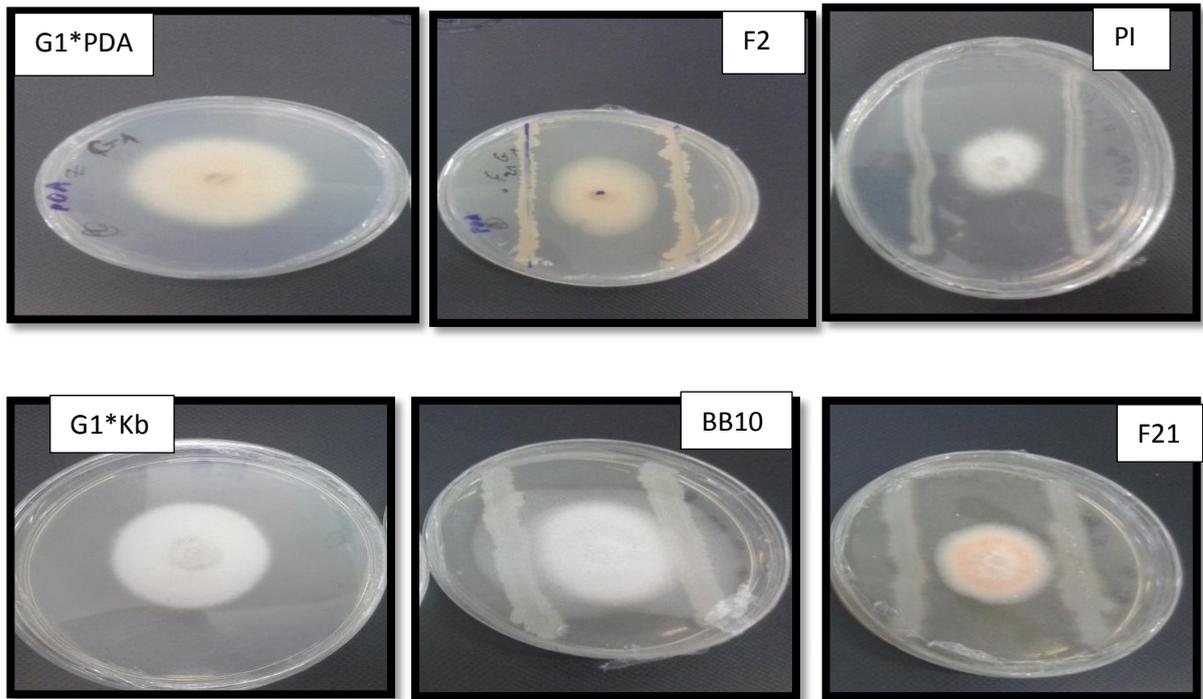


Figure 28: Activités antagonistes des souches *Pseudomonas* vis avis *F.o.a* sur milieu PDA et KB après 72hde confrontation.

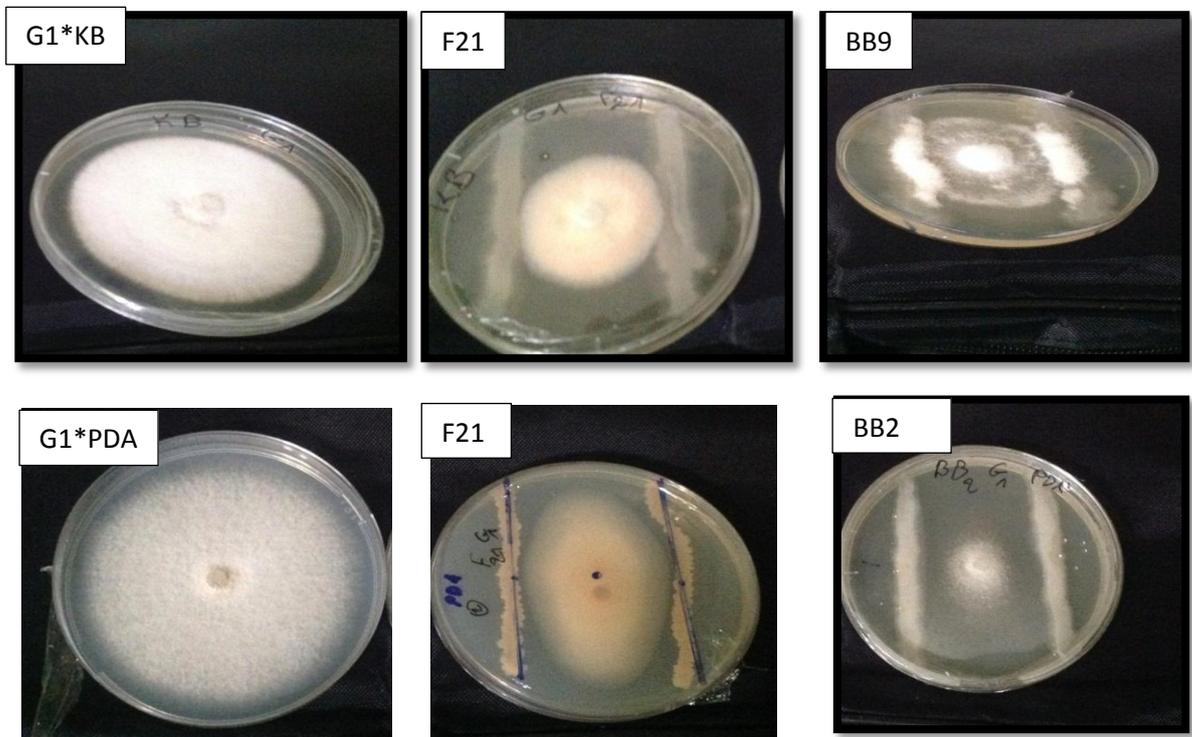


Figure 29 : Activités antagonistes des souches *Pseudomonas* vis avis *F.o.a* sur le milieu PDA et KB après 15 jours de confrontation.

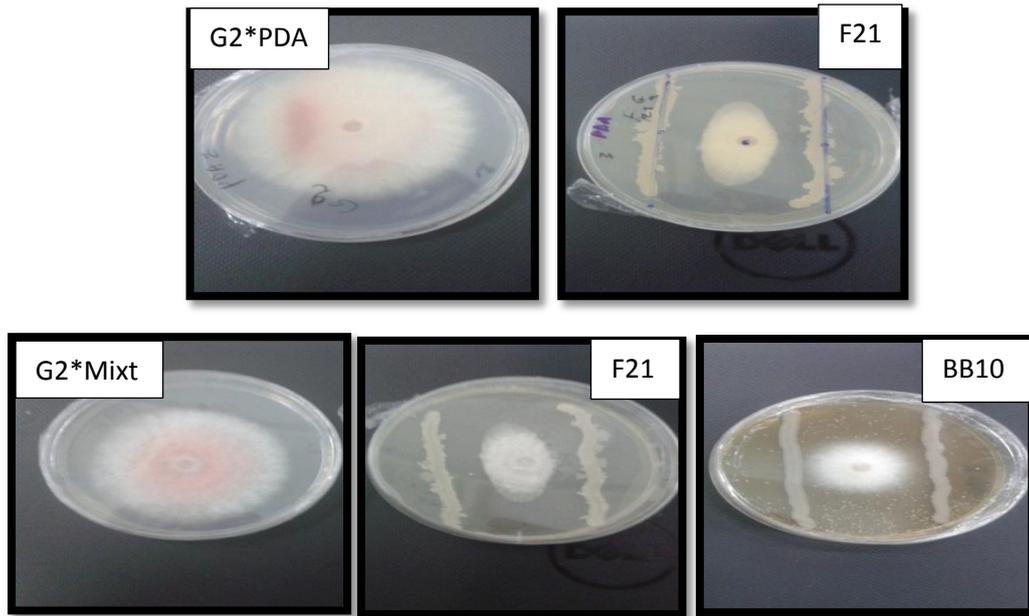


Figure 30: Activités antagonistes des souches de *Pseudomonas* vis avis *F.o.* sur milieu Mixte et PDA après 72h de confrontation.

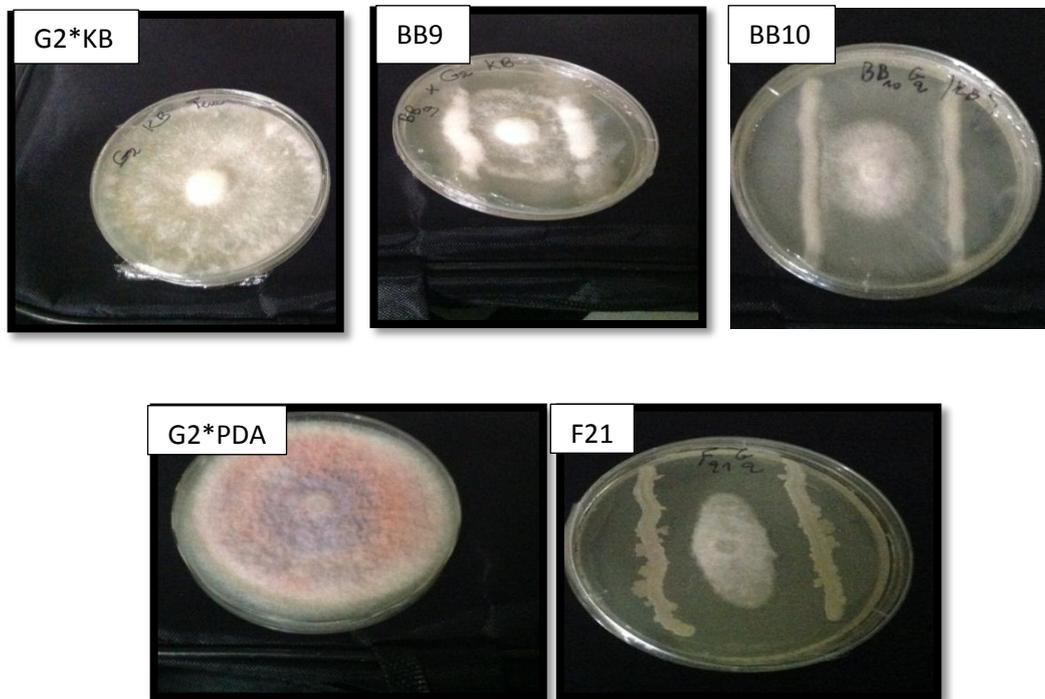


Figure 31 : Activités antagonistes des souches de *Pseudomonas* vis avis de *F.o.* sur milieu KB et PDA après 15 jours de confrontation.

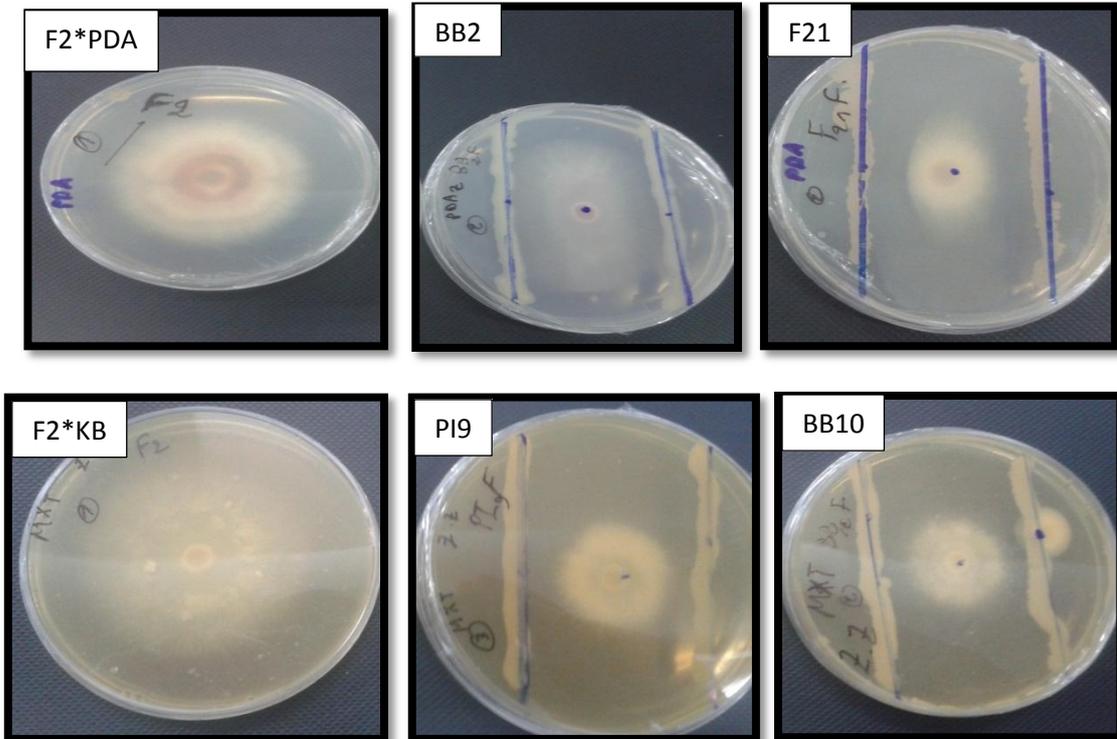


Figure32 : Activités antagonistes des souches *Pseudomonas* vis avis *F.o.In* sur milieu KB et PDA après 72h de confrontation.



Figure33 : Activités antagonistes des souches de *Pseudomonas* vis avis de *F.o.In* sur milieu Mixte après 15 jours de confrontation.



Figure 34: Activités antagoniste des souches de *Pseudomonas* vis-à-vis des 3 pathogènes sur les trois milieux après 30 jours de confrontation.

II.2. Microfiltration

Les résultats du pouvoir antifongique des cinq souches bactériennes de *Pseudomonas* fluorescent, vis-à-vis des 3 pathogènes fongiques sont illustrés dans la figure (38) et le (Tableau 2 Annexe 3).

D'après nos résultats, les souches bactériennes utilisées ont montré des activités antagonistes négligeables et parfois nulle vis-à-vis des trois formes spéciales de *Fusarium oxysporum* sur le milieu de culture PDA.

L'incorporation du filtrat des souches antagonistes dans le milieu de culture a provoqué une inhibition mais moins importante que lors des confrontations directes.

II.2.1. Cas *Fusarium oxysporum* f.sp. *albedinis*

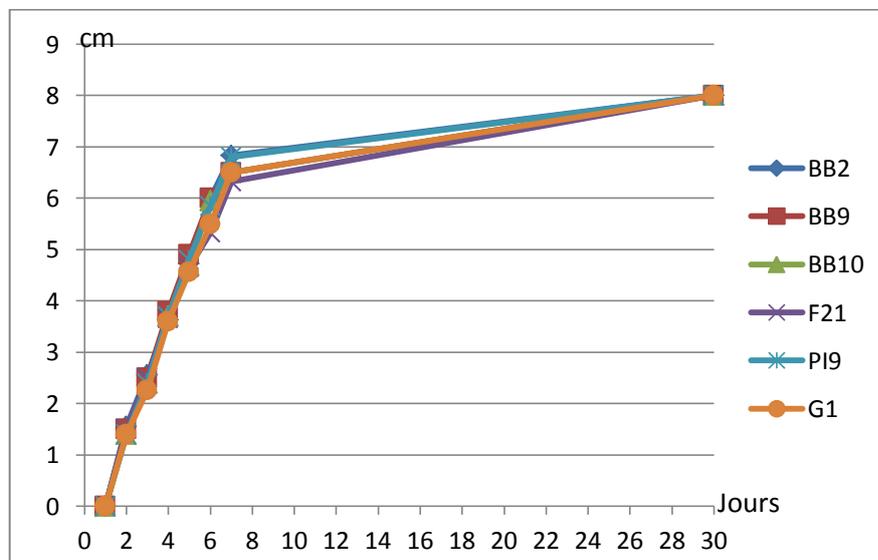


Figure 35 : Evolution de la croissance mycélienne de G1 en confrontation avec les 5 souches bactériennes de *Pseudomonas* fluorescent sur milieu PDA.

Nous notons à travers nos résultats que le pouvoir antagoniste des cinq souches bactériennes sur la croissance mycélienne de l'agent pathogène *F.o.a* est très faible voire nulle en comparant avec les témoins *F. o. a* (absence des antagonistes). La croissance mycélienne de l'agent pathogène atteint son maximum le 7^{ème} jour avec des taux variables d'un antagoniste à un autre allons de 2.61% enregistré par la souche F21 à nulle enregistré par les 4 souches BB2, BB9, PI9 (0%).

II.2.2 Cas de *Fusarium oxysporum f.sp.lycopercisi*

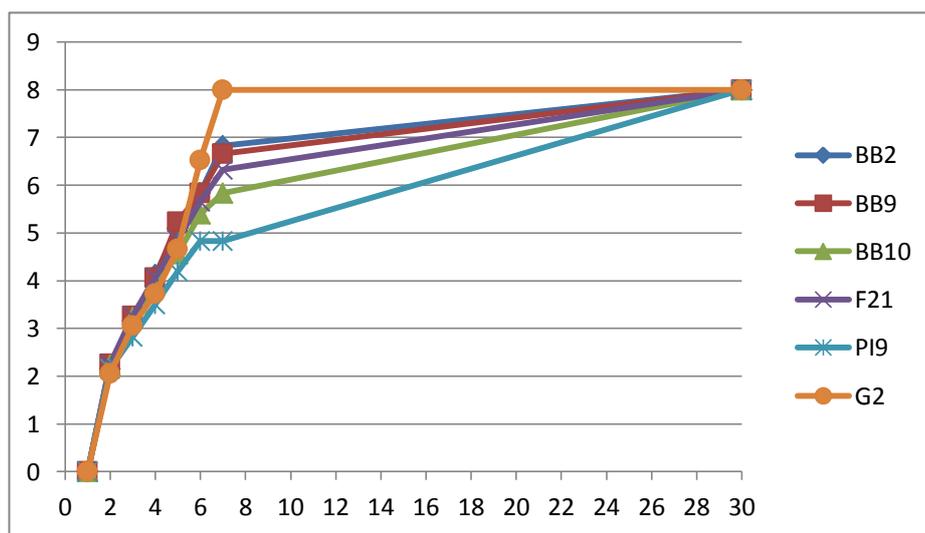


Figure 36 : Evolution de la croissance mycélienne de G2 en confrontation avec les 5 souches bactériennes *Pseudomonas* sur milieu PDA.

D'après les résultats obtenus (fig36), nous remarquons que la croissance mycélienne de l'agent pathogène de *F. o.l* en confrontation avec la souche PI9 est faible par rapport aux autres souches durant la première semaine avec un taux d'inhibition de 31%, alors qu'avec BB10, F21, BB9 et BB2, nous avons noté des taux très faibles, même négligeables (< 20%) qui sont respectivement de 16.71%, 9.75%, 4.85% et 2.42%. Au-delà du 7^{ème} jour, le champignon reprend son développement en confrontation avec toutes les souches pour atteindre son maximum (8cm).

II.2.3. Le cas de *Fusarium oxysporum f.sp.lini*

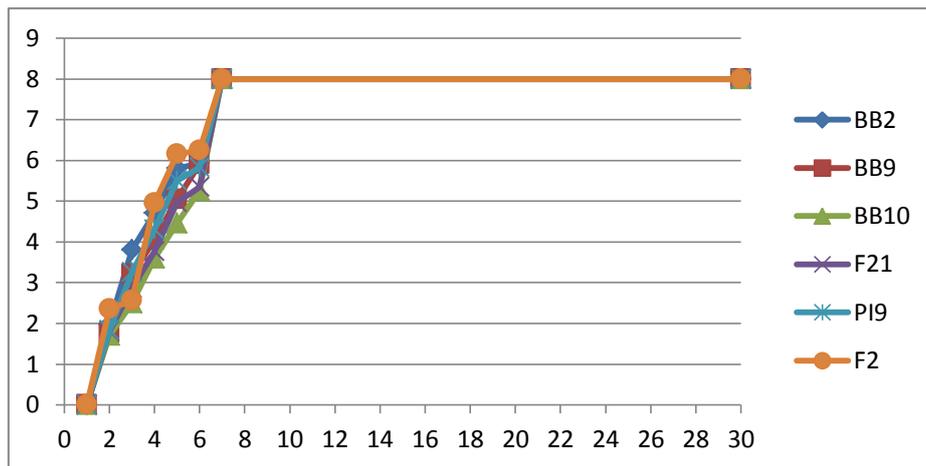


Figure 37 : Evolution de la croissance mycélienne de F2 en confrontation avec les 5 souches bactériennes *Pseudomonas* sur milieu PDA.

D'après les résultats obtenus dans la figure (37), nous remarquons que la croissance mycélienne de l'agent pathogène de *F. o.ln* en confrontation avec les différentes souches bactériennes est inférieure mais négligeable par rapport au témoin. Sur les cinq souches utilisées, une souche (BB10) a montré une activité antagoniste contre l'agent pathogène avec un taux d'inhibition de 21.42%. Le reste des souches (BB9, BB2, F21) a montré une activité très faible même négligeable (< 20%) (7.14%, 7.14%, 5.71%). Concernant la souche PI9, l'activité était nulle. Au-delà du 7^{ème} jour, nous notons l'arrêt de l'activité antagoniste des différentes souches utilisées en confrontation avec *F. o. ln*.

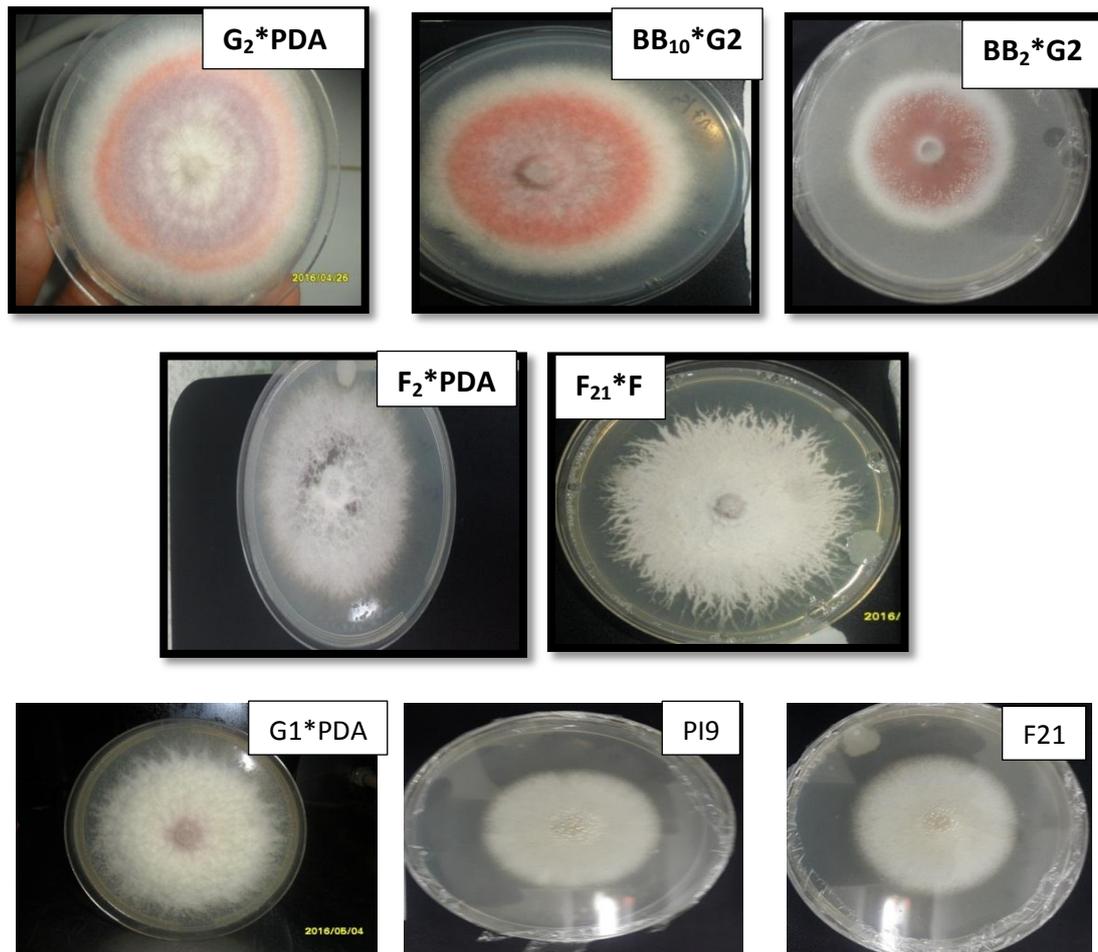


Figure 38: Microfiltration des quelques souches *Pseudomonas*. spp. fluorescentes sur milieu PDA.

III. Résultats de l'activité antagoniste *in vivo* des souches bactériennes de *Pseudomonas* spp. fluorescentes

Après 30 jours de suivi de l'évolution de la fusariose vasculaire sur tomate, aucun symptôme typique n'a été détecté sur les plants infestés par l'agent pathogène en confrontation avec des différentes souches bactériennes et ceux-là au niveau des 3 blocs (fig 01) (Annexe 2).

III.1 Réisolement

Afin de confirmer la présence de l'agent pathogène sur les jeunes plantes, nous avons jugé utile de procéder au réisolement de ce dernier à partir des racines

et des collets des différents traitements en comparant avec les témoins non bactérisés. Les résultats confirment la présence de pathogènes dans tous les traitements en comparant avec les plants non bactérisés qui montrent l'absence totale du champignon (fig39).

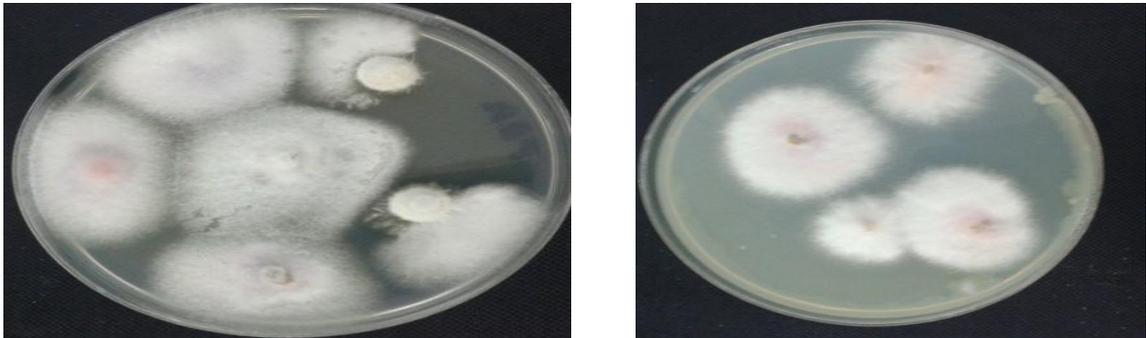


Figure 39: Résultats de ré isolement au niveau de racine et collet.

III.2. Colonisation bactérienne

Pour vérifier l'installation des bactéries au niveau des rhizosphères des plantes des différents traitements. Les observations effectuées après 72h d'incubation révèlent la présence des colonisations notables des *Pseudomonas* fluorescents sur les fragments des racines prélevés des différents traitements caractérisées par leur pigment fluorescent présent sur toute la surface de la boîte de Pétri comparativement avec les traitements non bactéries qui montrent l'absence totale d'une colonisation bactérienne (fig 40).



Figure 40 : Colonisation bactérienne sur les fragments des racines.

IV. Discussion

Dans la présente étude ; les résultats sur l'effet antagoniste des souches de *Pseudomonas* fluorescents lyophilisées vis-à-vis des différents isolats fongiques par la méthode de confrontation directe, reflètent clairement que ces cinq souches (BB2, BB9, BB10, F21 et PI9) testées ont la capacité inhérente à induire des effets antagonistes sur la croissance du mycélium et par conséquent sur la prolifération de ces trois champignons (G1, G2 et F2).

Cependant, nous notons que le milieu de culture influence sur l'activité antagoniste des souches de *Pseudomonas* spp. fluorescents. L'activité antagoniste *in vitro* dépend non seulement des espèces et les souches testées, mais aussi de la composition du milieu de culture (Digat.,1992). La variabilité dans l'expression de l'activité antagoniste des souches de *Pseudomonas* spp fluorescents dans les trois milieux de culture suggère une diversité dans les mécanismes impliqués dans le biocontrôle.

Sur le milieu KB, l'inhibition de la croissance mycélienne des souches fongiques *F.o.a* (G1) a été exercé par la souche antagoniste BB10 avec un taux d'inhibition de 62.12% et *F.o.l* (G2) a été exercé par la souche antagoniste PI9 avec un taux d'inhibition de 31.25% ,alors que vis-à-vis de *F.o.ln* (F2), la souche F21 c'est montré très antagoniste en enregistrant un taux d'inhibition de 62.12 %. Nos résultats se rapprochent ceux obtenus par Benssaid (2006) qui a pu opter des taux d'inhibition allons de 22.45% à 33.02% avec la souche S20 de *Pseudomonas fluorescens* en interaction avec les souches de *Fusarium oxysporum* sur milieu KB.

Le principale mécanisme mis en cause dans l'effet antagoniste des souches de *Pseudomonas* fluorescent *in vitro* pourrait être liée à la synthèse des sidérophores qui chélatent les ions de fer trivalent, suite à la production de pigment fluorescents (Hass et al ., 1991, Digat,1992 et Weller et Thomashow 1993).

Le groupe de *Pseudomonas* spp fluorescents intervient dans l'inhibition des microorganismes pathogènes et la suppression des maladies par le phénomène

de compétition vis-à-vis du fer (Lemanceau, 1992 et Seong et Shin, 1996). Ce pouvoir antagoniste s'exprime bien sur le milieu KB. L'activité antagoniste observé sur milieu KB avec les souches BB10, PI9 et F21 vis-à-vis de *Fusarium oxysporum* confirme cette hypothèse.

Le fer est un élément indispensable à la germination conidienne, la production en quantité importantes de métabolites chélatrice de Fe³ permet aux *Pseudomonas* spp fluorescents de s'appropriier tout le fer nécessaire à leur croissance, vue leur forte affinité, et de le rendre inaccessible aux microorganismes vivants dans le même milieu (Jaques *et al.*, 1994).

Nos résultats ont révélé également des activités antagonistes chez les antagonistes appliqués dans les milieux PDA et mixte. le taux d'inhibition le plus important enregistré vis-à-vis des souches fongiques *F.o.ln* (F2), *F.o.l* (G2) et *F.o.a* (G1) est exercée par la souche antagoniste F21 qui a montré des taux respectivement de 70%, 56.25% et 57.5%. Sur le milieu mixte (PDA+ KB), l'inhibition de la croissance mycélienne des souches fongiques *F.o.l* (G2) *F.o.ln* (F2) *F.o.a* (G1) a été exercée respectivement par les souches antagonistes BB2, BB10 et PI9 qui ont montré des taux d'inhibition respectivement de 64.25 %, 50.75%, et 33.73%.

Ces résultats suggèrent que l'activité antagoniste exhibée par les différentes souches sur les deux milieux, n'est pas due à l'action des sidérophores, car les deux milieux ne favorisent pas la production des pigments fluorescents. Nous pouvons attribuer l'activité antagoniste exercée par les cinq souches, à la synthèse des métabolites secondaires particulières (phenazines, HCN, enzymes lytiques, siderophores...) (Tableau 03 annexe 03).

Plusieurs études corroborent nos résultats. Weller *et al.*, (1988), ont confirmé que la compétition pour le fer n'est pas le seul mode d'action des *Pseudomonas* spp fluorescents antagonistes. Colin *et al.*, (1984) et Fravel (1988), ont montré qu'il n'y a pas de corrélation entre l'activité antagoniste des *Pseudomonas* spp fluorescents et la concentration en pigment fluorescent, même si ces bactéries sont plus aptes à mobiliser le fer que les *Fusarium*. Les

Pseudomonas spp fluorescents possèdent d'autres mécanismes inhibiteurs, qui peuvent être attribués à la synthèse d'antibiotique et d'autres types de métabolites secondaires à effet d'antibiose (Lemanceau, 1988).

Selon Alabouvette et al., 1983, parmi les différents processus qui conduisent à un antagonisme entre microorganisme, ce sont les phénomènes d'antibiose et d'hyperparasitisme qui ont été les plus fréquemment étudiés par les pathologistes à la recherche des mécanismes microbiologique utilisable pour la lutte contre les agents phytopathogenes.

D'après les travaux de Howellee et Stipanovic (1980), de nombreuses molécules antibiotiques sont impliquées, notamment la pyolutéorine et la purolnitrine synthétisées par la souche PF5 de *Pseudomonas fluorescens*. Ces antibiotiques ont inhibé *in vitro* la croissance de *Pythium ultimum* et de *Rhizoctonia solani*. Il a été démontré également que certaines souches de *Pseudomonas fluorescens* ont la capacité de produire le 2,4 diacétyl phloroglucinol (Phl) qui se caractérise par des effets d'antibiose (Keel et al., 1990, 1991).

D'après Comprorata, (1985), cette interprétation favorise également l'action des enzymes (β 1-3) gluconase-chitinase qui conduisent à la lyse du mycélium du parasite. Beaucoup de travaux ont montré l'implication importante des enzymes chitinolytiques dans le mycoparasitisme, l'antagonisme et la lutte biologique. Dans l'interaction mycoparasitisme *in vitro*, une induction de l'expression des enzymes chitinolytiques est induite dans les premières heures de contacts avec le pathogène, ces enzymes apparaissent à être impliqué dans la pénétration et la mort de l'hôte (Chérif et Benhamou,1990 ;Haran et al.,1996 ;Carosolio et al.,1999).

La chitine et le b-1,3-glucane (laminarine) sont les principaux constituants de la paroi de la plupart des champignons (Bartiniki- Garcia, 1968).Ainsi les agents antagonistes produisant les enzymes lytiques comme la glucanase et la chitinase, qui dégradent les parois du pathogène, ont comme mécanisme d'action le parasitisme.

Certains champignons et levures antagonistes ont la capacité d'adhérer spécifiquement aux hyphes et aux conidies des champignons pathogènes avant de produire les enzymes lytiques. Il a été suggéré qu'un fort attachement des cellules de l'antagoniste peut stimuler l'activité de tous les composés extracellulaire possédant une action enzymatique ou antibiotique (Cook et al., 1997). Cependant, d'autres études ont montré que c'est la production des enzymes lytiques par les cellules des antagonistes en présence du pathogène qui améliore la capacité de celles-ci à s'attacher aux hyphes du pathogène (Wisniewski et al., Chan et tian,2005).

Cependant, à travers nos résultats nous avons marqué chez certaines souches bactériennes une stabilité dans l'inhibition de la croissance mycélienne détectée après 15 et 30 jours de confrontation. L'absence de stabilité de l'inhibition détectée chez d'autres souches peut être expliquée par la production de quantités insuffisante du métabolite secondaire par les *Pseudomonas spp* fluorescents lyophilisées pour l'activité inhibitrice. Ce constat peut être expliqué par d'éventuelles intensités de production de métabolites secondaires dans les premiers jours, et leur probable dégradation après 7 jours.

D'autres métabolites produits par ces *Pseudomonas spp* fluorescents peuvent également interférer avec la croissance des phytopathogènes ; il s'agit d'enzymes mycolytiques, de l'acide cyanhydrique ou de l'ammoniaque (Jacques et al.,1993).

Les résultats obtenus à partir de 2^{ème} méthode d'antagonisme *in vitro* (la microfiltration), ont montré une faible activité antagoniste en comparant aux résultats obtenus avec la 1^{er} méthode enregistré par la plupart des souches. L'incorporation du filtrat des souches antagonistes dans le milieu de culture PDA provoque des taux d'inhibition moins importants variant de 21 % pour la souche PI9 contre la souche fongique *F.o.In* (F2) à 30 % pour la souche PI9 contre la souche fongique *F.o. I* (G2).

Ces résultats d'antagonisme par action des filtrats de culture sont en accord avec ceux de Howelle et Stipanovic (1979), Scher et Baker(1982), Digat(1983), Lemanceau et al .(1988). Ceci confirme aussi l'hypothèse de Sedra et Maslouhy

(1994), selon laquelle ces antagonistes sécrètent des substances antibiotique. Ces dernières agissent sur le parasite par une lyse du mycélium ; ceci est à l'origine du phénomène d'aplatissement des colonies observé face aux antagonistes.

Les différences d'intensité du pouvoir inhibiteur de nos souches pourraient être liées à la nature et la quantité des substances sécrétées. Mishagi et *al.* (1982), ont établi une corrélation entre la quantité de pigments fluorescents et le pouvoir antagoniste des *Pseudomonas*. Plusieurs types de pigment fluorescent sont mentionnés dans la littérature telles que : la pyoverdine (Turfreijer, 1942 ; Bossier et *al.*, 1988 ; Iswandi,1986), la fluorescine (King et *al.*,1948) et la pseudobactine (Kloepper et *al.*,1980).

Après une comparaison entre nos résultats (antagoniste *in vitro*) avec les cinq souches bactériennes lyophilisée et les résultats du test d'antagoniste *in vitro* avec les même cinq souches bactériennes mais non lyophilisée (tableau 03 Annexe 03) effectués par Lehalali, (2014), il ressort une stabilité dans l'expression des effets bénéfiques après le processus de lyophilisation et conservation des souches bactériennes *Pseudomonas* spp. fluorescents. Il ressort qu'à travers nos résultats, la lyophilisation n'a pas exercé des effets négatifs sur la membrane cellulaire, et par conséquent sur l'expression des effets bénéfiques des souches de *Pseudomonas* fluorescents lyophilisées.

La membrane plasmique est la plus vulnérable des composants de la cellule à cause de son épaisseur (Volodymyr, 2011). Les dommages subis par la cellule peuvent être : une peroxydation des lipides, une oxydation des protéines et une oxydation de l'ADN et ces altérations peuvent conduire à la mort cellulaire. Plusieurs de ces réactions ont lieu au niveau de la membrane cellulaire (Cadet et *al.*, 1995).

Concernant les potentialités antagonistes des trois souches de *Pseudomonas* fluorescents lyophilisées (BB10, BB9 et F21) *in situ* vis-à-vis de l'agent pathogène de la fusariose vasculaire de la tomate causé par *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici*, les résultats montrent l'absence des symptômes externes et internes de la maladie malgré la confirmation de la présence de l'agent pathogène au niveau des racines et du collet (fig 39) suite au reisolement de ce dernier. Ces résultats peuvent être attribués aux conditions défavorables du développement de l'agent pathogène.

Selon Blancard (2013), *F.o.l* préfère des températures plutôt élevées, et il sévit durant les périodes chaudes de l'année à savoir une température du sol et de l'air variant de 28°C à 30°C (Messiaen *et al.*, 1991) ; Alors que la période de notre étude ne correspondait pas à cette température qui était marquée entre 24°C et 25°C avec quelques précipitations (Anonyme, 2016).

Ces résultats peuvent être expliqués également par d'autres paramètres tels que l'instabilité génétique du champignon. L'étude du pouvoir pathogène au sein de l'espèce *Fusarium* " *oxysporum*, a conduit à la définition de formes spécialisées théoriquement inféodées, chacune, à une plante-hôte unique ; plus de 70 formes spécialisées ont ainsi été décrites (Messiaen et Cassini, 1981 ; Henni *et al.*, 1994).

La variabilité du pouvoir pathogène a été relativement peu étudiée chez cette espèce. Il est généralement admis que le pouvoir pathogène des *Fusarium* diminue après une longue période de culture et qu'il n'est pas toujours récupéré après un passage sur l'hôte (Armstrong *et al.*, 1940). Cependant, certaines études, ont démontré une grande stabilité du pouvoir pathogène au cours du vieillissement des spores (Messiaen et Cassini, 1968). Quand elle existe, la variabilité peut s'exprimer sur les deux composantes du pouvoir pathogène : virulence ou agressivité.

Les résultats obtenus par Follin et Laville (1966), montrent que chez *F. oxysporum* f. sp. *cubense*, il n'y a aucune relation entre le morphotype d'une souche et son agressivité. Dans son ouvrage sur les *Fusarium*, Nelson (1981)

considère, en effet, que les variantes morphologiques d'isolats pathogènes voient leur pouvoir pathogène diminuer (Henni, 1994).

Chez le *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici* (Wellman et Blaisdell, 1941), le morphotype duveteux serait très pathogène alors que le morphotype ras muqueux serait peu pathogène.

Les résultats souvent contradictoires exposés ci-dessus démontrent la nécessité d'étudier la variabilité du pouvoir pathogène des formes spécialisées du *F. oxysporum* et ses éventuelles relations avec la morphologie des thalles. Les recherches ont été abordées avec deux isolats du *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici* provenant des plants de tomates fusariés récoltés respectivement en Algérie et en France (Henni, 1994).

Conclusion

Conclusion

Les méthodes de lutte classique : culturales, génétiques et chimiques vis-à-vis des phytopathogènes présentent des limites et un manque de durabilité. Les PGPR sont utilisés comme une solution alternative ou complémentaire, qui semble assurer une efficacité durable.

Les PGPR peuvent permettre de stimuler la croissance des plantes et de réduire l'effet des agents phytopathogènes, et ainsi ils peuvent permettre de diminuer l'utilisation des pesticides, ce qui devrait encourager les efforts des recherches dans ce domaine.

Les résultats de test antagoniste *in vitro* réalisés par la méthode de confrontation direct des 5 souches *Pseudomonas* spp. fluorescents lyophilisée vis à vis des 3 souche fongique (*F.o.l*, *F.o.In* et *F.o.a*) sur les trois milieu de culture (PDA, KB et Mixte), ont permis de détecter des potentialités inhibitrices importantes. Le taux le plus importante a été marqué par la souche F21 avec un taux d'inhibition de 70 % vis-à-vis de *F.o.In* sur milieu

Ces bactéries antagonistes montrent une variabilité dans les taux d'inhibition vis-à-vis du champignon cryptogamique. La variation de l'activité antagoniste *in vitro* dépend non seulement des souches antagonistes, mais aussi du milieu de culture utilisé.

D'autre part, les observations effectués après quinze et trente jours sur l'évolution de la croissance mycélienne des trois formes spéciales de *Fusarium oxysporum* en confrontation avec les cinq souches bactériennes ont permis de marquer une stabilité dans l'expression du pouvoir antagoniste chez certaines souches alors que chez d'autres, nous notons un développent maximal du mycélium après quelque jour de confrontation.

Les résultats de l'effet antagoniste obtenus par la microfiltration ont montré que les taux enregistrés sont inférieures voir négligeable par rapport à ceux obtenus par la méthode de la confrontation directe avec un taux d'inhibition maximale de 30% enregistrés par la souche PI9 vis-à-vis le *F.o.l*.

Conclusion

Les résultats de la deuxième partie consacrée à l'expérimentation des potentialités antagonistes de trois souches bactériennes lyophilisées *in situ* contre la fusariose vasculaire de la tomate ont confirmé la présence de l'agent pathogène au niveau des racines et des collets sans manifestation des symptômes.

En conclusion, les souches lyophilisées utilisées présentent des potentialités antagonistes importantes, cependant la lyophilisation apparaît la technique la plus utilisée en dépit de son coût pour le séchage et la conservation des bactéries en général et des *Pseudomonas* spp en particulier car elle est adaptée pour les souches sensibles à des températures élevées. De plus, les cellules peuvent être stockées à température ambiante pendant plusieurs jours en gardant une stabilité et une viabilité élevée et sont plus facilement manipulables.

Au terme de notre travail, la poursuite de l'étude sur ces souches est nécessaire pour confirmer d'une part les résultats obtenus par leur application *in situ* vis-à-vis de *F.o.l* et d'autre part étudier leur efficacité potentielle sous différentes conditions du milieu et mettre en clare les mécanismes cellulaire et moléculaire d'interaction *Pseudomonas* – plante- pathogène impliqués dans la protection.