

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

UNIVERSITE SAAD DAHLAB DE BLIDA

FACULTE DES SCIENCES AGRO-VETERINAIRES

DEPARTEMENT DES SCIENCES AGRONOMIQUES

MEMOIRE DE MAGISTER

Spécialité : Phytopathologie

EVALUATION DES ACTIVITES DE BIOCONTROLE DE
PSEUDOMONAS FLUORESCENS* ET DE *TRICHODERMA
***HARZIANUM* SUR LA FUSARIOSE DE LA TOMATE.**

Par

CHETOUANI Fatma Zohra

Devant le jury composé de :

S.A. SNOUSSI	Professeur, U.S.D. Blida	Président
M. BENCHABANE	M.C.A., U.S.D. Blida	Promoteur
H. BELKAHLA	Professeur, U.S.D. Blida	Examinatrice
A. BOUTEKRABT	Professeur, U.S.D. Blida	Examineur

Blida, Juillet 2012.

RESUME

Certaines bactéries et champignons de la rhizosphère exercent des effets bénéfiques sur la croissance des plantes et le biocontrôle des agents pathogènes. Notre objectif consiste en la mise en évidence de la capacité antagoniste de la souche *Pseudomonas fluorescens* C7R12 et l'isolat fongique *Trichoderma harzianum* vis-à-vis de *Fusarium oxysporum* f.sp.*lycopersici* agent de flétrissement vasculaire de la tomate. Cette étude se présente en deux parties principales : la première porte sur les activités antagonistes *in vitro* sur différents milieux de culture solides et liquides et la deuxième partie concerne l'étude *in situ* de l'action de ces antagonistes vis-à-vis du pathogène en interaction avec la plante hôte ; et éventuellement l'analyse des effets bénéfiques de phytostimulation générés.

Les essais de confrontation directe réalisés *in vitro*, sur milieu de culture solide ou liquide, ont révélé que ces antagonistes ont pu inhiber le développement du pathogène avec des rapports allant jusqu'à 75% par rapport aux témoins. Cette inhibition s'est traduite par des fortes réductions en croissance mycélienne, en élongation du tube germinatif, en germination conidienne et en sporulation. Il a été constaté l'implication des effets d'antibiose ainsi que ceux de la compétition trophique et du mycoparasitisme. L'inhibition de ces paramètres vitaux, pour le développement des pathogènes, peuvent contribuer amplement dans la répression de ses capacités reproductives et infectieuses.

Des résultats intéressants ont été également obtenus *in situ*. En effet, l'interaction de ces antagonistes avec les plants de tomate a permis de réduire d'une façon significative le taux d'infection et la sévérité de la maladie ; les actions de bioprotection ont été estimées jusqu'à 65% en infection et 80% en sévérité. Globalement, la combinaison des deux souches a induit une meilleure action par rapport à l'utilisation séparée de chaque antagoniste. De plus, les plants traités se caractérisent par un meilleur développement racinaire et aérien et une augmentation de leur phytomasse en plus des gains appréciables en termes de teneur en chlorophylle et en protéines totales.

Mots clés: *Pseudomonas fluorescens*, *Trichoderma harzianum*, *Fusarium oxysporum* f.sp.*lycopersici*, phytostimulation, biopro

SUMMARY

Some bacteria and fungi of the rhizosphere induce beneficial effects on the growth of plants and the biocontrol of the pathogenic agents. Our working objective is description of the capacity of the strain of *Pseudomonas fluorescens* C7R12 and the fungal isolate *Trichoderma harzianum* against *Fusarium oxysporum f.sp.lycopersici* agent of wilt vascular of the tomato. This study has been achieved in two main parts: the first one concerns the *in vitro* antagonists activities on various solid and liquid cultural media and the second part concerns the study *in situ* the interaction of these antagonists with the plant host and the beneficial effects of phytostimulation that these antagonists can generate.

Tests of direct confrontation realized *in vitro*, on solid or liquid cultural media, revealed that these antagonists were able to inhibit the development of the pathogenic of more than 75 %. This inhibition was translated by a stop of the mycelial growth, conidia germination and elongation of structural's pathogens. It has been noted the implication of antibiosis effects as those of the trophic competition and the myco-parasitism. The inhibition of these vital parameters, for the development of pathogenic, can contribute amply in the repression of its reproduction and infection processes.

Interesting results were also obtained *in situ*. Indeed, the interaction of these antagonists with the plantations of tomato allowed reducing in a significant way the rate of infection and the severity of the disease, so by decreasing the number of affected plantations and the gravity of the symptoms. The actions of bio protection were estimated at 65% in infection and 80% in severity of the disease. Furthermore, the treated plantations are characterized by a better root and air development and an increase of their weights besides the considerable gains in terms of content in chlorophyll and in total proteins. Associations of the microbial antagonists (combination use), in our study, made it possible to note that there can be complementary, cumulative and even synergic effects.

Key words: *Pseudomonas fluorescens*, *Trichoderma harzianum*, *Fusarium oxysporum f.sp.lycopersici*, phytostimulation, bioprotection.

ملخص

أظهرت بعض الدراسات أهمية بعض أصناف البكتيريا و الفطريات التي تنمو بجوار جذور النباتات و التي بإمكانها تحفيز النمو النباتي و إبطال تأثير الجراثيم الطفيلية الضارة عن طريق التضاد الحيوي. هدفنا من هذه الدراسة التجريبية هو إبراز فعالية العزلة البكتيرية (C7R12) من سلالة *Pseudomonas fluorescens* و عزلة فطرية نافعة (G4) من سلالة *Trichoderma harzianum* ضد *Fusarium oxysporum f.sp. lycopersici* شملت دراستنا مرحلتين أساسيتين : في المرحلة الأولى أظهرنا فيها المفعول الميكروبيولوجي الايجابي لهذه العزلات بواسطة تجارب مخبريه ، أما بالنسبة للمرحلة الثانية فقد قمنا بدراسة تأثير هذه الأحياء المجهرية في تنشيط مقاومة نبات الطماطم للمرض المسبب من طرف الفطر الضار *Fusarium oxysporum* و تحفيز النمو النباتي.

النتائج المتحصل عليها في المرحلة الأولى سمحت لنا بالحصول على توقيف أنتاش بنيات التوليد ، نمو الفطر و تطول الأنايب الانتاشية في الأوساط المغذية. في الجزء التجريبي الثاني، لاحظنا أن نباتات الطماطم أظهرت أكثر مقاومة للمرض و ذلك من خلال التقليل من الإصابة و التراجع الملموس في نوعية (درجة) الأعراض. كما انه وقد تم تسجيل تحفيزا في القدرات الإنمائية . وقد برز هذا جليا على مستوى مؤشرات النمو (عدد وطول السيقان، تطاول الجذور، الوزن الطازج والجاف، نسبة البروتينات الكلية.....).

الكلمات المفتاحية:

Pseudomonas fluorescens, Trichoderma harzianum, Fusaium oxysporum
المكافحة البيولوجية – التحفيز الإنمائي - *f.sp.lycopercisi*

REMERCIEMENT

Je tiens tout d'abord à remercier mon promoteur Monsieur le Dr. Benchabane Messaoud, maître de conférence à l'université de Blida d'avoir accepté la direction de ce travail et d'avoir m'accueilli au sein de son laboratoire. Vous m'avez donné accès aux ressources nécessaires pour mes recherches, sans lesquelles ces lignes ne seraient probablement pas écrites aujourd'hui. Vous m'avez aussi accordé votre confiance durant mes périlleuses expériences. Mais, surtout, vous avez très souvent fait preuve de patience à mon égard, ce qui n'est pas toujours évident.

J'exprime mes vifs remerciements et mon profond respect aux honorables membres du jury, de m'avoir accordé leurs temps et la patience pour juger et aider à l'amélioration de ce travail :

- Pr. S/A. Snoussi
- Pr. H. Belkahla
- Pr. A. Boutekrabt

Je remercie tout particulièrement Djamilia pour m'avoir formée au travail de laboratoire et pour toute l'aide technique qu'elle m'a apportée. Ma gratitude ira également à Samia, Amina et tous mes amis pour leur aide et leur gentillesse.

Un grand merci aux personnes les plus chères à mes yeux, à mes parents qui m'ont soutenu jusqu'à la dernière minute, et qui m'ont donné l'amour et le courage pour continuer, à mon frère et mes très chères sœurs Affaf et fifi, pour leur encouragement. A ma belle-famille pour tout le soutien et l'aide.

Un merci tout spécial va à mon mari Mustapha, qui m'a accompagné avec tant d'amour et de tendresse, aucun mot, ne peut exprimer réellement mon profond amour, mon respect et ma vive gratitude

TABLE DES MATIERES

RESUME	
REMERCIEMENT	
TABLE DES MATIERES	
LISTE DES ILLUSTRATIONS, GRAPHIQUES ET TABLEAUX	
INTRODUCTION	10
1. LES FUSARIOSES VASCULAIRES	13
1.1. Généralités sur <i>Fusarium</i>	13
1.2. Taxonomie	15
1.3. Biologie de <i>Fusarium oxysporum</i>	16
1.4. Les maladies causées par <i>F. oxysporum</i>	18
1.4.1. Le flétrissement vasculaire	18
1.4.2. La pourriture racinaire	21
1.5. Lutte contre la fusariose	21
2.1. Généralités sur les microorganismes antagonistes	25
2.1.1. Effets bénéfiques des microorganismes antagonistes	26
2.1.2. Combinaison des microorganismes	30
2.2. Sols résistants	31
2.2.1. Types de résistances	31
2.2.2. Origines des résistances	33
2.3. Bactéries promotrices de la croissance des plantes	36
2.3.1. Les <i>Pseudomonas</i> fluorescents	37
2.3.1.1. Mode d'action des <i>Pseudomonas</i> fluorescents	38
2.4. Spectre d'action des PGPR	48
2.5. PGPR endophytes	48
2.6. Communication bactérienne « Quorum sensing »	54
2.7. PGPF ou champignons bénéfiques	57
2.7.1. Taxonomie	58
2.7.2. Utilisation du genre <i>Trichoderma</i> dans la lutte	60

2.7.3. Interaction <i>Trichoderma</i> pathogènes	61
2.7.4. Interaction <i>Trichoderma</i> plantes	66
3. MATERIEL ET METHODES	68
3.1. Matériel biologique	68
3.2. Conditions des plantations	71
3.3. Antagonisme <i>in vitro</i>	71
3.4. Antagonisme <i>in situ</i>	75
4. RESULTAT ET DISCUSSION	81
4.1. Antagonisme <i>in vitro</i>	95
4.2. Antagonisme <i>in situ</i>	95
CONCLUSION	119
APPENDICE	122
REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES	129

LISTE DES ILLUSTRATIONS, GRAPHIQUES ET TABLEAUX

Figure 1.1	Structure de lycomarasmine	17
Figure 1.2	Structure de l'acide fusarique	18
Figure 1.3	Cycle général de la maladie de flétrissement vasculaire causée par <i>F.oxysporum</i> sp. <i>lycopersici</i> chez la tomate	20
Figure 2.1	Comparaison de l'organisation du cluster <i>rsp</i> de <i>P. fluorescens</i> SBW25 avec le cluster <i>hrp</i> de <i>P. syringae</i> pv. <i>syringae</i> 61	53
Figure 2.2	Schéma représentatif du système de « Quorum sensing »	55
Figure 3.1	Dispositif expérimental des essais	69
Figure 3.2	Dispositifs expérimentaux des essais d'antagonisme <i>in situ</i>	70
Figure 4.1	Inhibition <i>in vitro</i> du FOL par C7R12	84
Figure 4.2	Inhibition <i>in vitro</i> du FOL par <i>Trichoderma</i> sp	84
Figure 4.3	Isolat fongique témoin	86
Figure 4.4	Inhibition de l'élongation du FOL par <i>Trichoderma</i>	86
Figure 4.5	Inhibition de l'élongation du FOL par C7R12	86
Figure 4.6	Inhibition de l'élongation du FOL par G4+C7R12	86
Figure 4.7	Inhibition du pathogène dans le sol	87
Figure 4.8	Inhibition de <i>Fusarium</i> par <i>Trichoderma</i>	90
Figure 4.9	Inhibition de <i>Fusarium</i> par C7R12	90
Figure 4.10	Evolution de l'infection (%) de la fusariose vasculaire de la Tomate	97
Figure 4.11	Evolution de l'infection (%) de la fusariose vasculaire de la Tomate	99
Figure 4.12	Effet des traitements sur le développement de la fusariose vasculaire de la tomate	99
Figure 4.13	Vue comparative entre plant traité et non traité	100
Figure 4.14	Vue comparative des racines d'un plant traité (C7R12) et non Traité	102
Figure 4.15	Gains en hauteur, en poids sec et frais des plants de tomate	106
Figure 4.16	Gains en longueur, en poids frais et sec des racines des plants	106
Figure 4.17	fragments de racine de tomate après 4 jours d'incubation	106
Figure 4.18	Fragments des racines de tomate bactérisés par <i>P.</i>	

	<i>fluorescens</i> C7R12 après 24 heures d'incubation	107
Figure 5.19	Boite présentant des colonies bactériennes sur le milieu King B après 24 heures d'incubation	107
Tableau 1.1	Groupes de compatibilité végétative chez les différentes formes spéciales de <i>Fusarium oxysporum</i> (VCG).	14
Tableau 1.2	Téléomorphes de différentes espèces de <i>Fusarium</i>	15
Tableau 2.1	Exemples de suppression des fusarioses vasculaires par les <i>Pseudomonas spp</i> fluorescents	38
Tableau 2.2	Stimulation de la croissance des plantes et du rendement des cultures après leur inoculation par des souches de <i>Pseudomonas spp.</i>	39
Tableau 2.3	Principales molécules antibiotiques produites par certaines souches de <i>Pseudomonas fluorescens</i>	42
Tableau 3.1	origine des microorganismes testés	69
Tableau 3.2	Caractéristiques physicochimiques du sol	70
Tableau 4.1	Activités antagonistes dans les trois milieux de culture	82
Tableau 4.2	Taux d'inhibition de la croissance mycélienne sur les trois milieux culture	82
Tableau 4.3	Elongation du tube germinatif de l'isolat FOL en mm	85
Tableau 4.4	Taux d'inhibition de l'élongation du tube germinatif de l'isolat FOL	85
Tableau 4.5	Taux de la germination conidienne de l'isolat FOL	87
Tableau 4.6	Effet des traitements sur le développement du pathogène dans le sol	88
Tableau 4.7	Effet des traitements sur le développement du pathogène dans le sol (24 heures d'intervalle)	88
Tableau 4.8	des antagonistes sur le développement du champignon pathogène dans le sol	89
Tableau 4.9	effet des antagonistes sur la densité du pathogène	89
Tableau4.10	Evolution de l'infection (%) de la fusariose vasculaire de la tomate	96
Tableau4.11	Effet des traitements sur le développement de la fusariose de la tomate après 30 jours de plantation	98
Tableau4.12	Hauteur (cm), poids frais et sec(g) de la partie aérienne	101
Tableau4.13	Longueur (cm), poids frais et sec(g) de la partie racinaire	103
Tableau4.14	Effet des traitements sur la phytostimulation des plants de tomate	104

INTRODUCTION

Certes, l'agriculture intensive pratiquée de part le monde, a fortement servi l'humanité en assurant des améliorations nettes en production agricole sur le plan qualitatif et quantitatif, néanmoins ce mode de production, basé essentiellement sur l'utilisation systématique et souvent abusive des intrants chimiques. La présence de ces derniers, notamment les engrais et les pesticides et l'accumulation de leurs résidus, menacent la qualité de l'environnement et la santé humaine, sans omettre le péril pesant sur la biodiversité et la perturbation de la vie microbienne particulièrement celle associée au sol et aux rhizosphères.

Sur la base de ce constat, le concept d'agro écologie a été développé dans le but d'apporter des alternatives à des méthodes agricoles qui deviennent menaçantes pour notre environnement et notre santé. L'objectif de l'agro écologie est donc de garantir un développement agricole durable et compétitif, nécessaire pour couvrir des besoins croissants, tout en respectant l'environnement afin de récolter des aliments sains et de préserver les écosystèmes.

Les maladies des cultures causées par les pathogènes du sol, constituent l'un des majeurs obstacles qui entraînent une réduction importante des rendements. Les affections cryptogamiques souvent redoutables et affectent une gamme très large des plantes cultivées. Parmi ces pathogène, l'espèce *Fusarium oxysporum*, responsable des pourritures radiculaires et de trachéomycoses, cause des flétrissements aussi bien sur des cultures herbacées que ligneuses [1]. Cette espèce est représentée par une multitude de formes spéciales reconnues par leur pathogénecité spécifique en interaction avec des hôtes déterminés, c'est le cas de *Fusarium oxysporum* f.sp. *lycopersici* dont l'hôte principal est la tomate.

Le contrôle de ces maladies telluriques se base essentiellement sur l'utilisation des produits chimiques qui ne peuvent pas assurer pas une protection

efficace et durable. Le mode de vie de ces pathogènes, ainsi que leurs formes de conservation et de résistance dans le sol sont parmi les principales causes de l'échec de la lutte chimique [2]. La lutte génétique (amélioration des génotypes), s'est révélée également relativement efficace pour contrôler les maladies d'origine tellurique, mais son emploi est limité par certains nombres de difficultés, telles que l'obtention de génotypes résistants, le développement de nouvelles souches de parasite possédant d'autres mécanismes pathogènes et surtout le développement des formes de résistance vis-à-vis des traitements appliqués [3].

Dans le sol, les microorganismes représentent la majorité des organismes vivants et constituent une importante part de la diversité génétique de la planète. Il a été estimé qu'un gramme de sol peut contenir jusqu'à 10^{10} à 10^{11} de microorganismes [4] et jusqu'à 200 m d'hyphes fongiques [5]. De plus, les microorganismes jouent un rôle clé et influencent un grand nombre des processus des différents écosystèmes, incluant l'acquisition des éléments nutritifs pour les plantes [6], les cycles géochimiques comme celui de l'azote [7] ou du carbone [8] et la structure du sol [9].

L'intensité de l'activité microbienne est remarquable au niveau du sol rhizosphérique. Les micro-organismes trouvent en effet dans ce milieu des substrats énergétiques libérés par les racines et nécessaires à leur métabolisme à savoir les sucres, les acides aminés, les acides organiques, et les hormones. Certains de ces micro-organismes, principalement des bactéries induisent des effets positifs sur la croissance des plantes et souvent confèrent aux systèmes racinaires une protection vis-à-vis des agents phytopathogènes du sol [2,10]. L'utilisation de ces microorganismes bénéfiques non pathogènes, en tant que biopesticides, est une technologie émergente et écologiquement compatible considérée comme alternative prometteuse aux pesticides de synthèse. Globalement, l'effet protecteur conféré par ces agents de lutte biologique est basé sur la compétition, l'activité antagoniste rhizosphérique vis-à-vis de la croissance des pathogènes via la production d'antibiotiques ou d'enzymes et/ou leur capacité à stimuler la croissance et les systèmes de défense chez l'hôte végétal, phénomène dénommé « Induced Systemic Resistance » (ISR).

Parmi les microorganismes expérimentés et utilisés, même si ce n'est pas à grande échelle, les souches de *Pseudomonas* spp. fluorescents et de *Trichoderma* spp. méritent une attention particulière, en raison de leur adaptation à la vie tellurique et plus particulièrement pour leur compétence rhizosphérique. Ces groupes microbiens bénéfiques ont été expérimentés avec succès dans de nombreux essais conduits en conditions contrôlées ou en conditions naturelles [11].

Dans ce contexte de contrôle biologique vis-à-vis des agents pathogènes, notre travail vise à expérimenter les potentialités antagonistes de la souche de *Pseudomonas fluorescens* C7R12 et de l'isolat cryptogamique *Trichoderma harzianum* et à mettre en évidence leur pouvoir de biocontrôle *in vitro* et *in situ*, lorsqu'ils sont introduits seuls ou en combinaison vis-à-vis de *Fusarium oxysporum* f.sp. *lycopersici* agent de flétrissement vasculaire de la tomate.

CHAPITRE 1

LES FUSARIOSES VASCULAIRES

1.1. Généralités sur *Fusarium*

Plusieurs genres de champignons telluriques sont capables d'infecter les racines de plantes sauvages et cultivées et de causer des dégâts importants. Il s'agit notamment de *Rhizoctonia*, *Verticillium* et *Fusarium*; à ce groupe on peut ajouter des oomycètes tels que *Phytophthora*, *Pythium* et *Aphanomyces*. L'ensemble de ces microorganismes cause des maladies soit de pourriture racinaire soit de flétrissement suite à l'obstruction des vaisseaux conducteurs [12]. Les espèces de *Fusarium* provoquent de maladies qui entraînent des pertes économiquement importantes comme le flétrissement vasculaire ou la pourriture racinaire et du collet chez des plantes cultivées au champ et en serre [13].

Fusarium oxysporum Schlecht. Snyder et Hansen [02] est l'espèce la plus répandue ; c'est un champignon saprophyte du sol capable de survivre longtemps sous forme de chlamydospores [12]. L'espèce *F. oxysporum* peut infecter un grand nombre de plantes, souvent de façon très spécifique. Cette espèce présente des formes phytopathogènes hautement spécifiques sur des hôtes déterminés, dénommées formes spéciales (f.sp) « forma spcialea » en fonction de la plante hôte parasitée ; ainsi il a été mis en évidence plus de 120 forma spéciales et races chez cette espèce [14]. En raison de la complexité des caractères phénotypiques et des similitudes génotypiques, il est généralement admis la difficulté de distinction taxonomique entre ces formes spéciales ; pour cela, la pathogénécité demeure le caractère distinctif majeur [15]. La diversité génétique entre les isolats de *Fusarium oxysporum* a été extrêmement analysée et regroupée en de nombreux groupes de compatibilités végétatives (G.C.V) « végétative compatibility groups ». Désormais, les G.C.V peuvent constituer un outil de prédilection et d'analyse des similarités génétiques pour ce taxon fongique [16] (Tableau 1.1)

Tableau 1.1 : Groupes de compatibilité végétative chez les différentes formes spéciales de *Fusarium oxysporum* (VCG) [17].

Formes spéciales (fsp)	Hôte	Code f.sp	Nombre de VCG
adzukicola	Vigna angularis	038 -	0380, 0381
albedinis	Phoenix dactylifera	017 -	0170
allii	Allium sativum	039 -	0390
apii	Apium	001 -	0010-0012
asparagi	Asparagus	100 -	1001-1008, 10011-10019
basilici	Ocimum	040 -	0400
batatas	Ipomoea	036 -	-
betae	Beta	027 -	-
canariensis	Phoenix canariensis	024 -	0240
cepae	Allium cepae	042 -	0420
chrysanthemi	Chrysanthemum	005 -	0050, 0051
ciceris	Cicer	028 -	0280
conglutinans	Brassica	010 -	0100, 101, 104
cubense	Musa	012 -	0120-0126, 0128-1224
cucumerinum	Cucumis sativus	018 -	0180-0183
cyclaminis	Cyclamen	015 -	0151-0153
dianthi	Dianthus	002 -	0020-0022, 0025, 0027, 0028
elaeidis	Elaeis	014 -	0140, 0141
erythroxyli	Erythroxyllum	029-	-
eragariae	Fragaria	043 -	-
garlic	Allium sativum	101 -	1011-1013
gladioli	Gladiolus	034 -	0340-0345
lactucum	Lactuca	030 -	0300
lagenariae	Lagenaria	041 -	-
lilii	Lilium	019 -	0190
lini	Linum	044 -	0440
lupini	Lupinus	031 -	-
lycopersici	Lycopersicom	003 -	0030-0033
matthioli	Matthiola	021 -	0210
medicaginis	Medicago	004 -	0040, 0041
melongenae	Solanum melongena	032 -	0320
melonis	Cucumis melo	013 -	0130-0136, 0138
nicotianae	Nicotiana	037 -	-
niveum	Citrullus	008 -	0080-0082
opuntiarum	Opuntia	045 -	0450-0456
papaveris	Papaver	025 -	-
phaseoli	Phaseolus	016 -	0161-0168
pisi	Pisum	007-	0070-0073
radicis-cucumerinum	Cucumis sativus	026-	0260, 0261
nicotianae	Nicotiana	037-	-
niveum	Citrullus	008-	0080-0082
raphani	Raphanus	022-	0220
spinaciae	Spinacia	033-	0330-0332
tracheiphilum	Vigna unguiculata	006-	0060
tuberosi	Solanum tuberosum	035-	-
tulipae	Tulipa	023-	0230
vanillae	Vanilla	020-	0201, 0202
vasinfectum	Gossypium	011	0110-0119, 01111, 01112
zingiberi	Zingiber	046-	-
raphani	Raphanus	022-	0220

1.2. Taxonomie

Le genre *Fusarium* appartient au phylum des Deutéromycètes (champignons imparfaits, Fungi imperfecti), car la plupart des espèces étaient d'abord décrites sur la base de caractères morphologiques et une reproduction sexuée n'a pas été observée. Ces formes imparfaites (anamorphes) sont caractérisées par un mycélium septé et la production de conidies hyalines généralement unicellulaires sur des conidiophores libres; elles sont classées dans le groupe des Moniliales [18]. *Fusarium* produit des macroconidies composées de 2 à plusieurs cellules. Leur forme recourbée typique avec une cellule apicale plus ou moins pointue est un des critères d'identification des représentants du genre ; dans beaucoup d'espèces on observe une cellule basale en forme de pied [7]. La production de métabolites secondaires et notamment de toxines (mycotoxines et phytotoxines) est courante chez *Fusarium* et le profil de ces composés peut être utilisé pour la classification des espèces [19].

Des formes sexuées (téléomorphes) ont été observées pour certaines espèces de *Fusarium* ; elles font toutes partie des Ascomycètes, de la famille des *Nectriales* et notamment des genres *Gibberella* et *Nectria* [7] (Tableau 1.2).

Tableau 1.2. Formes téléomorphes de quelques espèces de *Fusarium* [7]

Espèces de <i>Fusarium</i>	Forme téléomorphe
<i>F. graminearum</i>	<i>Gibberella zea</i>
<i>F. fujikuroi</i>	<i>Gibberella fujikuroi</i>
<i>F. verticilloides</i>	<i>Gibberella moniliformis</i>
<i>F. avenaceum</i>	<i>Gibberella avenacea</i>
<i>F. solani</i>	<i>Gibberella haematacocco</i>
<i>F. acuminatum</i>	<i>Gibberella auminata</i>
<i>F. lateritium</i>	<i>Gibberella baccata</i>
<i>F. circinatum</i>	<i>Gibberella circinata</i>
<i>F. pseudograminearum</i>	<i>Gibberella coronicola</i>

Ainsi, *Fusarium oxysporum* est considéré comme ascomycète bien que le stade sexuel doit être encore identifié. Il est proposé d'être plutôt proche du groupe téléomorphique *Gibberella* que *Nectria* [16,20]. Au sein de l'espèce *F.*

oxysporum on distingue plus de 120 *formae speciales* en fonction de leur pathogénicité sur des plantes hôtes.

1.3. Biologie de *Fusarium oxysporum*

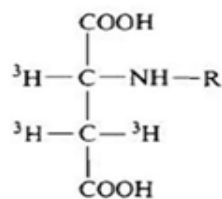
Dans un milieu de culture solide, comme le milieu PDA (Potato dextrose agar), les différentes formes spéciales de *F. oxysporum* peuvent varier en apparence. Généralement, au début de la croissance, le mycélium aérien est blanc et peut ensuite changer vers une grande variété de couleurs (du violet jusqu'au pourpre foncé) selon la souche de *F. oxysporum* (ou forme spéciale). Si les sporodochiums (amas de conidiophores provenant d'un stroma ou masse d'hyphes) sont abondants, la culture apparaîtra en couleur crème ou orange [21].

Fusarium oxysporum produit trois types de spores asexuées: microconidies, macroconidies et chlamydospores. Les microconidies sont uni ou bicellulaires et sont produites abondamment et fréquemment par le champignon sous tout type de conditions. C'est aussi le type de spores qui est observé plus fréquemment à l'intérieur des vaisseaux des plantes infectées. Les microconidies de *F. oxysporum* ont souvent la forme d'une virgule ou sont ellipsoïdales [22, 23]. Les macroconidies sont composées de trois jusqu'à cinq cellules, elles sont pointues et courbées jusqu'au bout. Ces spores peuvent être observés dans des sporodochiums à la surface des plantes attaquées par le pathogène [22,23]. Les chlamydospores sont des spores rondes d'une ou deux cellules, entourées d'une paroi épaisse plus ou moins pigmentée. Elles sont observées au milieu des hyphes ou en position terminale, souvent en forme de paires, quelques fois en triplets et rarement en forme rassemblée [22,23].

F. oxysporum est un habitant du sol où il croit sur des débris de plantes ou survit en forme de chlamydospores. Ces derniers après leur germination, les tubes germinatifs se développent pour atteindre des sites privilégiés sur les racines et initier le processus d'infection. La germination des chlamydospores ainsi que l'évolution saprophytique du mycélium est largement stimulées et favorisées dans la rhizosphère que dans les autres compartiments du sol [14].

Le sol rhizosphérique, par le biais des exsudats racinaires des plantes, constitue une étape cruciale dans l'initiation de l'infection systémique où les chlamydospores n'ont besoin que de quelques heures pour germer et pénétrer à travers les tissus non différenciés [12]. Généralement le processus d'infection, par voie systémique, peut se réaliser par une pénétration active dans les cellules immatures qui entourent le méristème subapical de la racine. Lorsque ces cellules se divisent et se différencient, le pathogène est éliminé des futures cellules phloémiques et du cortex, mais se maintient dans les vaisseaux et le parenchyme médullaire [13]. Dans les vaisseaux, le mycélium produit les microconidies qui sont transportées vers le haut par la sève ; quand ce mouvement est empêché par une paroi transversale, les microconidies germent et le tube germinatif pénètre dans la paroi pour que la formation des microconidies reprend de l'autre côté de cette paroi. La mort du plant intervient quand le champignon atteint avec ses toxines le bourgeon terminal. Après la mort du plant, le mycélium continue à se développer dans les tissus morts et forme de nombreuses chlamydospores dans les cellules du parenchyme [13].

Le genre *Fusarium* est connu pour produire une large gamme de toxines (mycotoxines et phytotoxines). Chez *F. oxysporum* deux toxines ont été identifiées capables d'induire à elles seules des symptômes. Il s'agit de la lycomarasmine (Figure 1.1) et de l'acide fusarique (Figure 1.2). Leur production *in planta* a été démontrée pour le dernier chez plusieurs plantes infectées, tels le coton, la tomate ou le pois, indiquant qu'ils pourraient jouer un rôle dans l'induction de la maladie. Cependant la production de cette toxine ne peut pas être corrélée systématiquement avec la pathogénicité du champignon [24].



Lycomarasmine

Figure 1.1 : structure de lycomarasmine [24]

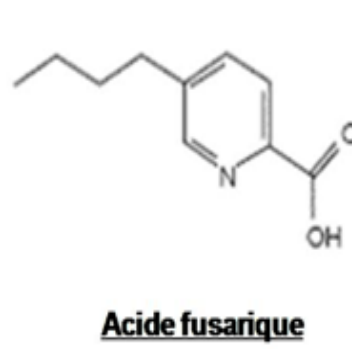


Figure 1. 2 : Structure de l'acide fusarique [24]

1.4. Les maladies causées par *F. oxysporum*

Parmi les maladies causées par *F. oxysporum* on trouve le flétrissement vasculaire aussi appelé fusariose vasculaire (vascular wilt), la pourriture racinaire et du collet (root rot, crown rot) et la pourriture des semis (damping-off). La dénomination fusariose est utilisée de façon moins spécifique et peut indiquer tout syndrome causé par *Fusarium*. De ces maladies, le flétrissement vasculaire est la maladie qui provoque les plus grandes pertes et chez un grand nombre de plantes cultivées, telles que les cultures légumières, florales et même tropicales [22].

Les agents du flétrissement fusarien appartenant à l'espèce *Fusarium oxysporum*, constituent un groupe de champignons qui comporte un grand nombre de formes spéciales d'origine tellurique [25]. Ces pathogènes se rencontrent pratiquement dans la quasi-totalité des sols agricoles, surtout sous sa forme asexuée où il présente 40 à 70 % de la microflore fusarienne totale. Il inclut une large diversité de souches capables de survivre pour de longues périodes dans la matière organique dans le sol ou en interaction avec plusieurs espèces de plantes herbacées et ligneuses [26] où elles causent de sérieux dégâts et pertes qui peuvent atteindre 100 % de la récolte sur diverses cultures d'importance économique [24].

1.4.1. Le flétrissement vasculaire

Le flétrissement vasculaire est plus sévère dans des conditions chaudes du sol et en serres [22]. Les symptômes exprimés sont le résultat d'un stress sévère en eau, ils peuvent être très variables en fonction de la plante et incluent

l'éclaircissement de la nervure, l'épinastie des feuilles, la chlorose et le dessèchement. La plupart des plantes flétrissent et meurent, tandis que les plantes qui ont été moins affectées deviennent chétives et peu productives [22]. Des symptômes très similaires peuvent être causés par d'autres champignons, comme *Verticillium dahliae* et *V. albo-atrum*. *F. oxysporum* est unique parmi les champignons responsables de flétrissement vasculaire par sa spécificité d'hôte [27].

Parmi les formes spéciales: *Fusarium oxysporum* f.sp *lycopescici* agent du flétrissement fusarien de la tomate est l'un des plus redoutables agents parasites de cette culture. Il a été signalé pour la première fois dans les îles de Manche par Mass GE en 1895 [28], puis il s'est répandu dans de nombreuses régions productrices de tomate, touchant déjà en 1991 plus de 32 pays [29,30]. En Algérie, cette maladie a été signalée initialement en 1966 par Pecault et al. [31]. Chez cette espèce, trois races physiologiques ont été identifiées [32] distinctes par leur virulence pour les variétés de la tomate qui contiennent un gène unique de résistance, la race 1 a été décrite initialement en 1886 [33], la race2 a été signalée également en 1945 dans l'Ohio [34] et la race 3 a été observée en Australie en 1978 [35] et aussi signalée dans plusieurs pays d'Amérique : Californie et en Floride [36]. Les trois races de ce champignon sont classées dans quatre groupes de compatibilité végétative, les deux races sont actuellement regroupées dans trois groupes de compatibilité végétative, le VCG_S 0030 à 0032, la troisième race appartient au VCG_S 0030 et 0033 (Tableau 1.1) [37].

Le champignon peut provoquer des symptômes, caractérisant cette infection vasculaire, sur la plante et à n'importe quel stade végétatif. Les premiers symptômes externes se caractérisent par un jaunissement basal du rachis, d'une foliole et éventuellement de la feuille entière [38]. La décoloration de la tige commençant par un léger jaunissement longitudinal sur une portion de celle-ci et évolue en une bande jaune plus marquée puis en nécrose beige à marron claire. Les symptômes sur fruits débiteront par une coloration très claire, brunissant avec le temps et évoluant par la suite sur la totalité du fruit [39].

Au cours de son cycle de vie, le champignon présente une phase saprophyte et une phase parasitaire [39,40]. Le cycle peut être constitué d'une

période unique correspondant à une reproduction asexuée continue qui se renouvelle et se perpétue sous forme conidienne. En présence de la plante, les chlamydospores germent et les filaments produits pénètrent et se développent à l'intérieur des vaisseaux correspondants à la racine atteinte [40].

Durant la phase saprophyte, le champignon se conserve pendant plusieurs années sous forme de chlamydospores sur les débris végétaux et dans le sol, à des profondeurs de 80 cm à 1 mètre [39,41]. Généralement, le développement de la maladie se réalise dans des sols sableux et acides, sur des cultures carencées en azote, en phosphore et /ou en calcium [42], à la température de l'ordre de 28°C à 30°C et avec une humidité relative élevée [43].

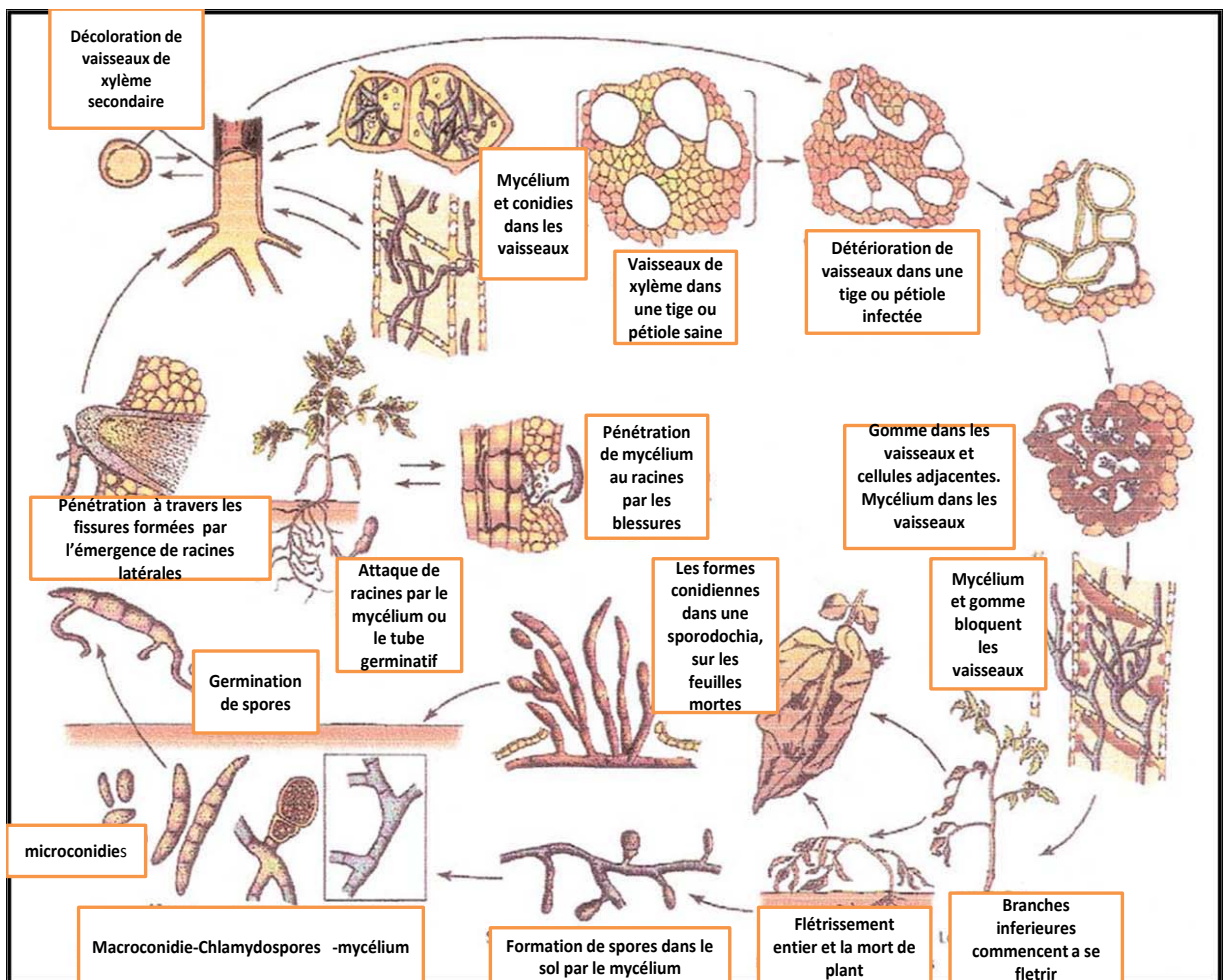


Figure 1. 3: Cycle général de la maladie de flétrissement vasculaire causée par *F.oxysporum* f.sp. *lycopersici* chez la tomate [22]

1.4.2. La pourriture racinaire

La pourriture racinaire est différente du flétrissement vasculaire et peut se produire conjointement avec d'autres maladies des racines. Chez le pois ce type de maladie peut aussi être occasionné par *F. oxysporum* f.sp. *solani*, *Aphanomyces euteiches*, *Rhizoctonia solani* ou *Pythium*. Les premiers symptômes sur les racines primaires et secondaires sont des traînées rouge-marron à noir qui se réunissent au cours de la saison [44]. Chez la tomate, la pourriture racinaire et du collet est causée par *Fusarium oxysporum* f. sp. *radicis-lycopersici*, mais contrairement à la fusariose vasculaire, peu de formae speciales sont décrites. *Fusarium oxysporum* f. sp. *radicis-lycopersici* pénètre les tissus corticaux des racines et de l'hypocotyle à travers des blessures et aux sites d'émergence de racines secondaires [45].

1.5. Lutte contre les fusarioses

Comme pour toutes les maladies causées par des microorganismes telluriques, les fusarioses ne peuvent pas être éradiquées par des produits chimiques. L'utilisation de variétés des plantes résistantes avec un choix judicieux de la date de semis est la seule mesure pour contrôler les maladies aux champs. Par contre dans sous serres, le contrôle phytosanitaire ou des traitements thermiques du sol entre deux cultures sont possibles.

En général, les mesures de contrôle demeurent dans leur globalité d'ordre préventif : élimination des plantes malades et des résidus de culture, désinfection des terreaux et utilisation des semences saines, pratique de la jachère et la réalisation des rotations [42]. Barna et al [46], soulignent l'importance du maintien d'une fertilisation azotée afin de favoriser la production de pousses jeunes pour améliorer la résistance de la plante. Le recours au chaulage peut diminuer les attaques fusariennes [46].

A titre préventif, la lutte physique proposée par Anchisi et al [47] qui consiste à traiter les racines avec de l'eau chaude de 48° à 49° C pendant 30 secondes avant la transplantation pour stimuler la croissance des racines. La stérilisation et/ou la solarisation ne sont pas des solutions pratiques à grande échelle et à long terme.

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 mais présentent des inconvénients : sont très chers, provoquent la pollution de l'environnement, induisent les chloroses chez les jeunes plantes et la résistance chez le pathogène en cas d'utilisation abusive [48]. En raison de la difficulté d'atteindre les couches profondes du sol dans lesquelles le parasite se conserve sous forme de chlamydospores [48], 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 [49].

La lutte génétique consiste à sélectionner des cultivars résistants et à réaliser des multiplications et des hybridations combinées pour l'obtention de génotypes résistants [3,29]. De gènes de résistance contre *F. oxysporum* existent chez beaucoup d'espèces végétales et ont été introduits par sélection dans des variétés cultivées. Ainsi, chez la tomate, le melon, le haricot, le pois chiche et *Arabidopsis thaliana* des gènes dominants de résistance ont été identifiés [3, 22, 50].

La tomate fait partie des espèces végétales impliquées dans des projets de séquençage; un membre du genre *Fusarium*, *F. graminearum* et *F. oxysporum* f.sp. *lycopersici* font également l'objet de projets de génomique avec séquençage du génome [37, 51]. Ceci facilite les analyses de l'interaction entre la tomate et *F. oxysporum* f.sp. *lycopersici*. Parmi les gènes de résistance contre *F. oxysporum* f.sp. *lycopersici* décrits chez la tomate le gène I-2 a été cloné. Ces gènes appartiennent à la famille des gènes R codant une protéine intracellulaire avec un site de liaison aux nucléotides (NBS) et des domaines riches en répétition de leucine (LRR) [52]. Ce gène est exprimé spécifiquement dans les cellules autour des vaisseaux conducteurs qui sont les tissus colonisés par le champignon [53]. Côté champignon, le gène d'avirulence correspondant au gène de résistance I-3 codant pour une protéine sécrétée dans le xylème lors de la colonisation [54].

Même si on ne peut pas généraliser, il est intéressant de noter que les gènes impliqués dans la résistance semblent s'exprimer de façon coordonnée dans le temps et dans l'espace. Malheureusement, ces génotypes sont de qualité fruitière médiocre dans le cas du palmier dattier. L'apparition de souches résistantes du pathogène réduit l'efficacité de ces procédures de lutte et nécessite la recherche de nouveaux gènes de résistance [28].

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.

On sait depuis longtemps que l'incidence de la fusariose peut varier sur des sols différents infestés de *Fusarium*. Ce phénomène de « sols suppressifs » a été trouvé corrélé parfois aux caractéristiques pédologiques mais surtout à sa population microbienne. Des études qui portent sur ce phénomène et les microorganismes impliqués sont nombreuses. Des bactéries et des champignons ont été isolés à partir de sols suppressifs et leur potentiel en lutte biologique est étudié. Parmi les bactéries, des espèces du genre *Pseudomonas* ont été décrites pour empêcher le développement de la maladie du *Fusarium* root rot chez la tomate [55,56]. Il est particulièrement intéressant que parmi les champignons des sols suppressifs on trouve notamment des souches saprophytes de *Fusarium oxysporum*. Des souches non pathogènes de *F. oxysporum* et *F. solani* ont été isolées à partir de sol de Châteaurenard en France et leur capacité à protéger des plantes de tomate contre la fusariose vasculaire a été démontrée [22,57].

L'effet protecteur d'une souche, *F. oxysporum* 47 (*Fo* 47) a été particulièrement étudié, et il a été reporté qu'il était dû à plusieurs mécanismes. Fuchs *et al* [11] ont montré que *Fo* 47 induisait des réactions de défense chez la tomate, ce qui indique une participation de la résistance induite dans la protection. Mais des mécanismes de compétition pour les nutriments au sol et la rhizosphère jouent aussi un rôle [11]. La présence de *Fo* 47 dans le sol était capable de protéger plusieurs espèces végétales comme le lin, le melon et la tomate contre ses respectives *formae speciales* [58].

De façon générale l'utilisation de souches protectives de *F. oxysporum* pour le contrôle du flétrissement vasculaire a été rapportée pour plusieurs plantes et souches fongiques, comme dans le cas du bananier, du concombre, du melon, du lin, d'épinard et de la pastèque [11]. Certaines études ont mis en évidence l'effet inhibiteur de nombreux autres agents microbiens, tels que: *Aspergillus niger*, *Penicillium digitatum*, *Penicillium oxalicum*, *Bacillus subtilis*, *Pseudomonas* spp fluorescents, *Trichoderma harzianum* et *Trichoderma viridae*.

CHAPITRE 2

MICROORGANISMES ANTAGONISTES

2.1. Généralités sur les microorganismes antagonistes

Depuis plus d'un siècle, la compréhension des interactions plantes-microorganismes dans la rhizosphère a suscité l'intérêt de nombreux chercheurs. Hiltner (1904) [59] fut le premier à définir la rhizosphère comme étant la zone de sol entourant la racine qui est directement ou indirectement influencée par cette dernière et qui présente une forte activité microbienne. La rhizosphère est le siège de nombreuses interactions entre les plantes et les divers microorganismes associés.

La densité des populations de la microflore associée aux racines est significativement plus élevée dans la rhizosphère que dans le sol nu [2, 14, 60, 61]. Ces modifications quantitatives de la microflore, ou 'effet rhizosphère', s'accompagnent également de modifications qualitatives. En effet, la diversité et la structure des communautés microbiennes dans la rhizosphère [2, 18, 19,20] et leur activité métabolique [12,13, 62] diffèrent de celles du sol nu. Les populations aptes à percevoir les variations de l'environnement rhizosphérique et à adapter leur physiologie, tirent profit de la perturbation et sont favorisées. Les composés organiques exsudés par les plantes dans la rhizosphère activent différents groupes de microorganismes et augmentent leur prolifération [16].

La microflore rhizosphérique est naturellement constituée d'un assemblage complexe de microorganismes procaryotes et eucaryotes [20,63]. Parmi ces microorganismes telluriques, certains champignons appelés PGPF (champignons promoteurs de la croissance des plantes) et bactéries PGPR (rhizobactéries promotrices de la croissance des plantes) pouvant être bénéfiques, en stimulant la croissance des plantes comme ils peuvent assurer un effet de bio contrôle en induisant une résistance systémique contre de multiples parasites. La croissance, la santé des plantes et leur diversité sont donc influencées par la diversité des populations microbiennes présentes dans la rhizosphère [2,10, 64,65].

La réduction ou l'élimination des applications des pesticides de synthèse dans l'agriculture est hautement désirée. L'un des moyens les plus promoteurs pour atteindre ce but est l'utilisation des méthodes basées sur les agents de biocontrôle (BCAs), ou leur intégration avec les produits chimiques pour réduire les doses afin de minimiser leur impact négatif sur l'environnement [66,67].

Afin d'optimiser les interactions favorables à la croissance et à la santé des plantes et développer des pratiques agricoles plus respectueuses de l'environnement et moins consommatrices d'intrants de synthèse, il est nécessaire de mieux connaître les mécanismes d'interactions entre les plantes et les microorganismes de la rhizosphère. Actuellement, l'utilisation de microorganismes pour améliorer la croissance et la santé des plantes repose principalement sur l'inoculation. La variabilité des résultats obtenue par l'utilisation d'organismes vivants est souvent supérieure à celle obtenue par l'application de produits de synthèse. De meilleures connaissances des mécanismes d'interaction plantes-microorganismes permettraient d'envisager de développer des pratiques autres que l'utilisation d'inoculant, comme par exemple, favoriser des populations déjà présentes dans la rhizosphère et qui sont bénéfiques pour les plantes.

2.1. 1. Effets bénéfiques des microorganismes antagonistes

En plus des effets bénéfiques assurés dans les interactions directes avec les agents pathogènes des plantes, certains BCA (biocontrol agent) sont capables de coloniser les surfaces des racines et causent des changements substantiels dans le métabolisme de la plante [66]. Il est mentionné que certaines souches peuvent promouvoir la croissance de la plante, augmenter la disponibilité des nutriments, améliorer la production et augmenter leur résistance aux maladies [66].

2.1.1.1. Stimulation de la croissance végétale

Beaucoup de BCAs, comme les champignons et les bactéries, peuvent non seulement contrôler les pathogènes qui causent les maladies de plantes, mais peuvent aussi promouvoir la croissance de la plante et son développement. La mise en évidence de cette stimulation a été rapportée dans différentes conditions expérimentales et à divers stades phénologiques [2].

Les mécanismes qui induisent ces gains de croissance sont souvent la conséquence d'une production ou d'un changement dans la concentration de certaines métabolites secondaires, tels que l'acide indolacétique (AIA) [40], l'acide gibbérellique [14], l'éthylène [12] l'acide succinique [13] et certaines vitamines [2].

Les champignons bénéfiques tels que *Trichoderma* spp. peuvent stimuler la croissance des plantes par l'augmentation des éléments nutritifs, par une efficacité dans l'utilisation de l'azote, et par la solubilisation des éléments nutritifs dans le sol. Harman *et al.*, [66] ont montré que *Trichoderma harzianum* 1295-27 solubilisait le phosphate et les micro-éléments impliqués dans la stimulation de la croissance végétale. Les effets de stimulation de la croissance proviennent de l'action directe des *Trichoderma* sur les plantes et ne sont pas directement liés aux antagonismes avec les pathogènes. Ces effets sont visibles aussi bien sur des substrats de culture non désinfectés que sur des substrats stériles. Les mécanismes de stimulation de croissance sont mal élucidés et pourraient être dû à la suppression des dommages oxydatifs sur les racines, à la sécrétion de facteurs de croissance par le champignon, à l'inhibition de la microflore gênante et à l'amélioration du transport des micronutriments. Les effets sont inégaux d'une souche à l'autre. Certaines souches possèdent des effets stimulateurs de croissance mais d'autres ont des effets inhibiteurs (par exemple: *Trichoderma viride* RF1 [57]).

2.1.1.2. Modifications des équilibres microbiens

L'utilisation des microorganismes antagonistes pour la lutte contre les maladies fongiques d'origine tellurique a fait l'objet de nombreuses études bibliographiques [2, 67, 68]. La plupart de ces travaux insistent sur le double effet

de ces germes, antibiose vis-à-vis de certains pathogènes et action stimulante sur la croissance des plantes via l'activation de leurs activités métaboliques. L'antibiose est le mécanisme le plus connu en phytopathologie ; l'antagonisme microbien est considéré comme une interaction directe entre deux ou plusieurs microorganismes qui occupent la même niche écologique, dont les actions de confrontation se réalisent et/ou par des actions directes (antibiose) par des actions indirectes (compétition).

2.1.1.3. Amélioration de l'alimentation minérale de la plante

L'amélioration de l'alimentation minérale de la plante est liée principalement au fer, au phosphore et au manganèse, Les gains en croissance induits par ces microorganismes sont la conséquence de synthèse de métabolites secondaires analogues aux phytohormones et à l'amélioration de l'alimentation hydrominérale de la plante [02].

Si l'excrétion des sidérophores par les rhizobactéries est abondante, la plante trouvera à sa disposition du Fe^{+++} chélaté qu'elle pourra assimiler facilement [69]. Demange *et al.*, [70] ont montré grâce à l'utilisation du Fe^{55} que la plante peut assimiler le complexe fer-sidérophores. Briat [71] a observé que la tomate absorbe le fer de façon efficace en présence de ce type de bactéries.

Certains *Pseudomonas* seraient capables de solubiliser le phosphore organique du sol, abondant mais inutilisable par les végétaux, soit par une minéralisation des phosphores organiques grâce à des phosphatases, soit par solubilisation des phosphates organiques sous l'effet des acides libérés [72].

Les *Pseudomonas* spp. fluorescents solubilisent le manganèse grâce à des agents chélateurs, tels que les composés phénoliques et les acides organiques qui forment avec le manganèse un complexe soluble qui évite sa précipitation [72]. La réduction du manganèse du sol par les *Pseudomonas* spp. fluorescents pourrait augmenter sa disponibilité et favoriser son assimilation par la plante [73].

Certaines espèces de *Pseudomonas* spp. fluorescents peuvent utiliser des oxydes d'azote; cette réduction est généralement inhibée en aérobie et les

nitrites formées sont rejetés dans le milieu et ils peuvent intervenir comme des accepteurs d'électrons et réduits en composés gazeux, tels que: les oxydes nitriques (NO), les oxydes nitreux (N₂O) et en azote libre (N₂); il s'agit de la dénitrification dissimulatrice profitable pour la plante [74].

2.1.1.4. Compétition trophique

La compétition trophique est un phénomène très largement répandu dans le sol, où elle participe à la régulation de la dynamique des populations microbiennes partageant une même niche écologique [75]. Elle s'exerce pour des éléments susceptibles d'être en quantité insuffisante pour satisfaire les besoins des protagonistes (eau, oxygène, les éléments nutritifs) ou pour des sites spécifiques [68]. Dans la vive compétition qui existe entre les microorganismes telluriques, au sein de la rhizosphère, les BCA possèdent un atout majeur car elles sont aptes à coloniser efficacement et rapidement le système racinaire. Même si le rôle de la compétition pour l'espace ne peut pas être complètement exclu, l'essentiel des travaux relatifs à la compétition exercée par les *Pseudomonas* spp fluorescents porte en particulier sur la compétition trophique pour le fer ionique [76,77, 78]. Ce dernier devient assimilable non seulement par la bactérie, qui en tire un avantage métabolique évident, mais aussi par la plante assurant à celle-ci un métabolisme énergétique plus actif, ce qui se répercute indirectement sur sa croissance et son développement [79]. Même s'il est évident de la simplicité de la mise en évidence de ces processus bactériens, en conditions expérimentales (facilité de culture, multiplication bactérienne rapide...), néanmoins leur exploitation pratique est étroitement liée aux conditions environnementales [2,80].

Les composés biotiques du sol environnant relèvent des effets sur l'activité de biocontrôle de *Trichoderma* contre les pathogènes des plantes. Bae et Knudsen [54], en utilisant le mutant *Gfp-tagged* ont montré que les taux élevés de la biomasse microbienne du sol induit un changement de la croissance mycélienne à la sporulation de *T.harzianum*, réduisant ainsi l'efficacité du biocontrôle. Cet effet peut être associé avec le phénomène de fungistase « fungistasis », qui est largement dépendant de la composition des communautés microbiennes du sol [50]. En particulier, la production des antibiotiques et la présence des bactéries appartenant au genre *Pseudomonas* apparaît essentiel

pour le développement de ce phénomène. Dans ce contexte, une étude détaillée des métabolites produits par les microorganismes présents dans le sol doit être établie dans l'ordre d'éviter la suppression des BCAs [50].

2.1. 2. Combinaison des microorganismes

Vue l'action non spécifique des souches antagonistes, la variabilité des réponses en fonction de l'environnement et la diversité de mécanismes impliqués font que l'efficacité doit être recherchée à travers l'association de souches aux propriétés variables [2, 80, 81]. La majorité de cas de biocontrôle résulte la combinaison des microorganismes antagonistes plutôt qu'une grande population d'un seul antagoniste. De même, l'application d'une mixture d'agents de biocontrôle doit être étroitement imitatrice de la situation naturelle et pourrait élargir le spectre d'activité de biocontrôle et améliorer l'efficacité et la fiabilité du contrôle [82].

L'application de la combinaison de trois souches de PGPR, *Bacillus pumilus* souche INR 7, *B. subtilis* souche GB03 et *Curtobacterium yaccumfaciens* souche ME1 comme un traitement de semence a abouti à la promotion intensive de la croissance et une réduction de la maladie que lorsqu'ils sont testés individuellement. Ceci peut être dû à différents mécanismes d'action pour chaque souche de PGPR [83].

De part la variabilité des modes d'action obtenus par des utilisations individualisées, l'efficacité peut être améliorée par des effets additifs ou synergiques [2, 80]. De plus, il est souhaitable d'utiliser des microorganismes ayant un spectre d'action positif relativement large, comme les *Pseudomonas* spp. fluorescents et les *Trichoderma* ssp. avec d'autres microorganismes plus dirigés vers des actions spécifiques des cultures à traiter [84]. Les chances de sélectionner des souches efficaces peuvent être meilleures en isolant des souches de même la niche écologique que la plante à traiter [83]. Cependant, dans certains cas, la mixture de différentes souches a un effet non synergétique. Plus loin, la combinaison améliorant l'efficacité dépend des conditions de la culture et de la plante hôte [85].

2. 2. Sols résistants

Bien que la notion des sols résistants à des maladies d'origine tellurique soit ancienne, sa compréhension et son exploitation restent relativement insuffisants et nécessitent plus d'investigations avec les avancées scientifiques actuelles. De nombreuses études consacrées aux sols résistants, ces dernières années, ont montré que le phénomène est assez répandu et se manifeste à l'encontre de plusieurs maladies. Ces sols ont été désignés par plusieurs qualificatifs : immunes, conductifs, suppressifs, résistants, « sensitifs soils », « pathogènes suppressifs soils », « diseases suppressives soils », « long life soils », « antagonistic soils », « biologically buffered », « competitive soils », « decline soils », fongistatique, « low pathogen », « intolérant » [86]. Le qualificatif de résistant s'applique à des sols qui limitent fortement ou suppriment la manifestation d'une maladie sur une culture sensible, en présence de conditions environnementales favorables à l'expression de l'agent pathogène présent ou introduit dans le sol [47].

2. 2.1. Type de résistance

La résistance d'un sol peut être spécifique ou générale en fonction des cibles biotiques inhibées, constitutive ou acquise selon les caractères biotiques ou abiotiques du sol et à long ou à court terme selon sa durabilité et sa longévité [87].

Dans un sol caractérisé par une résistance spécifique, la transmission de ce caractère, lié à la nature microbiologique, pour d'autres sols est une propriété fondamentale pour ce type de résistance [73, 88]. Dans ce cas, c'est une suppression où l'ensemble de la microflore n'est pas indispensable à la manifestation de la résistance, seulement une fraction fongique et / ou bactérienne, et spécifiquement *Fusarium oxysporum* non pathogène et *Pseudomonas spp.* fluorescent devraient jouer un rôle prépondérant [73]. Cette résistance a un spectre d'action spécifique, elle s'exerce vis-à-vis de l'ensemble des espèces de *Fusarium oxysporum* mais pas à l'encontre d'autres agents telluriques y compris les espèces fusariennes non vasculaires [89]. Il a été rapporté d'autres cas de sols dont leur résistance est spécifique vis-à-vis de *Geamonomyces graminis var. tritici*, ou de *Aphanomyce enteichtii*, ou de

Thielaviopsis basicola ou de *Phytophthora cinnamomi* ou de *Phytophthora infestans* ou de *Pythium splendens* ou de *Pythium ultimum* ou *Rhizoctonia solani* ou de *Streptomyces Scabies* ou de *Plasmodiophora brassicae* ou de *Ralstonia solanacearum* ou de *Pseudomonas solanacearum* [90].

La résistance d'un sol suppressif, considérée comme non transmissible est liée à la biomasse microbienne totale autochtone tellurique, qui entre en compétition avec les pathogènes nuisibles outre la composante microbienne antagoniste. L'activité de la biomasse tellurique est souvent stimulée par le type de cultures, la conduite culturale incluant la quantité et la qualité de fertilisants appliquée ainsi que les travaux du sol [91].

La résistance constitutive est conditionnée par un environnement biologique et physico-chimique défavorable dans lequel le pathogène ne peut pas s'exprimer, même s'il est autochtone ou se développer s'il est introduit. La résistance acquise peut s'observer dans un sol initialement permissif, progressivement avec la même culture « monoculture ».

La résistance à long terme, après plusieurs années de suite dans un sol contaminé où l'agent pathogène peut s'établir mais ne provoque pas la maladie ; il s'agit d'une résistance liée fortement à la stabilité des propriétés physico-chimiques et biologiques du sol [92]. Contrairement, la résistance à court terme s'observe uniquement pendant quelques cycles végétatifs seulement. Ce phénomène est le résultat d'un changement exogène rapide dans l'environnement physique, chimique et / ou biologique du sol (introduction des antagonistes, matière organique, engrais...). Les techniques culturales jouent également un rôle important dans l'installation d'une fraction particulière de la flore antagoniste ; ainsi le déclin du piétin échaudage n'a pas lieu dans les champs non labourés et semés directement sur chaumes [88]. Les rotations de cultures sont les plus anciennes mesures de lutte préventive contre les agents pathogènes, ayant pour effet la suppression des débris contaminés et des substrats favorables aux pathogènes, pour éviter l'accumulation de leur inoculum [92].

2.2. 2. Origines de la résistance

Une maladie d'origine tellurique est conditionnée par trois facteurs principaux : La plante hôte, le parasite et le sol. Le pouvoir pathogène du parasite peut être modifié par un ensemble de facteurs liés à l'environnement physico-chimique du sol qui agit sur le parasite lui-même ou sur la plante ; à cet égard les sols suppressifs aux flétrissements fusariens, causés par *Fusarium oxysporum*, ont été liés à l'influence des propriétés physiques et chimiques du sol (abiotique) [19], et /ou de la microflore du sol (biotique) [93].

2.2. 2.1. Origine abiotique

Certes, la suppression du sol est due à la balance microbienne totale et ses activités antagonistes [94], cependant l'explication des mécanismes mis en œuvre dans cette résistance sont liées aux propriétés abiotiques du sol. Dans de nombreuses études sur la réceptivité des sols aux maladies fongiques, il a été clairement mis en évidence le rôle de la structure et de la texture du sol, de l'humidité, du pH, de la matière organique et des oligo-éléments. Les agents fongiques concernés sont, entre autre : *Aphanomuces* sp, *Fusarium*, *Geaumanomyces*, *phytophthora*, *plasmodiaphora*, *Rhizoctonia*, *Sclerotium* sp, *streptomyces scabies*, *Thieloviopsis brasicola* et *Verticillium* sp. Ces facteurs ne sont pas la cause directe de la résistance mais ont tendance à créer un milieu défavorable pour la croissance, l'activité, la densité des agents pathogènes et pour la physiologie de la plante en lui conférant une résistance plus ou moins importante [95].

L'effet de la proportion et le type d'argile dans le sol sur la sévérité de la fusariose sont le plus souvent cités [91]. Walker [96], a montré que la fusariose du pois et du bananier sont plus sévères dans les sols sableux. La propriété suppressive des sols, serait d'après Semal [97], liée à la présence d'une teneur élevée en montmorillonite en plus de la balance microbienne. Alabouvette [75] a noté qu'après 225 jours de l'apport de *Fusarium oxysporum* f. sp. *lini* dans un sol sableux, on ne retrouve que 0,4% de la population initiale, alors qu'il en subsiste 46% dans le même sol enrichi en montmorillonite.

L'effet bénéfique de l'argile peut s'expliquer par sa capacité de stimuler l'activité bactérienne qui freine ou élimine le développement des *fusarium* pathogènes, l'accumulation des éléments nutritifs à l'interface des feuillets fournit des sites d'échanges pour l'azote ionique et relève le pH à un niveau favorable à la multiplication bactérienne [98]. L'argile peut aussi améliorer la résistance à la dessiccation en assurant une déshydratation plus régulière du contenu cellulaire et de diminuer la diffusion et les effets inhibiteurs des toxines et des antibiotiques en les absorbant [77].

Plusieurs cas d'induction de résistance ont été relatés, les uns font intervenir quelque oligo-élément (Fe, Zn, Mg), l'autre sont fondés sur l'influence favorable du Ca et du Br [93]. La variation du pH influence significativement le niveau de résistance des sols, le déclin du flétrissement fusarien a été associé à un pH alcalin [3], qui a affecté la disponibilité en fer, en calcium, et en aluminium [99]. La faible disponibilité du Fe, du Mn, et du Zn dans le sol alcalin a permis d'expliquer la faible incidence de la fusariose vasculaire du lin et de la tomate dans les sols chaulés ou naturellement alcalins [93]. Ces oligoéléments stimulent la synthèse de 2-4 diacétylphloroglucinol et des pyoverdines chez les *Pseudomonas* spp. fluorescent et inhibent la synthèse de l'acide fusarique chez *Fusarium oxysporum* pathogène [100].

2.2.2.2. Origine biotique

Bien que la nature biologique des sols suppressifs aux fusarioses présente naturellement, mais ce type de résistance ne se trouve que dans quelques zones géographiques limitée, comme la région de Chateaufrenard (France) et dans la vallée du Rhône et les îles Canaries [68]. Dans ces sols les mécanismes de résistance aux fusarioses vasculaires ont été souvent attribués à leur nature biologique (antagonistes microbiens). Depuis les premiers travaux de recherches, durant les années 1970, plusieurs autres travaux ont signalé l'existence des sols similaires dans d'autres régions du monde [3, 21,89]. Selon Waller [10], la détection des sols suppressifs ou résistants, nécessite de vérifier les étapes de stratégie suivante :

- Si les traitements biocides (chaleur humide, radiations, antibiotique) appliqués détruisent cette résistance corrélativement à une forte

diminution des populations microbiennes impliquées, la résistance peut être directement liée à l'activité microbienne du sol [3].

- Les agents microbiens, responsables du caractère suppressif du sol doivent inhiber *in vitro* fortement l'agent pathogène et confèrent ce caractère au substrat naturellement sensible après leur introduction.
- L'effet suppressif d'un sol traité par la chaleur peut être restauré par l'addition d'une petite quantité du sol suppressif (0,7 à 10%) [3]. Weller [10] a montré que le développement de *Fusarium oxysporum* f.sp. *cyclaminis* pourrait être freiné lorsque l'on incorporait à la tourbe, utilisée comme substrat de culture de l'œillet, 10 % d'une terre résistant à la fusariose du melon.
- Comme le phénomène de la résistance des sols aux maladies est le plus souvent la conséquence d'une activité microbienne intense et particulière, des caractérisations phénotypiques et génotypiques sont nécessaires pour identifier les groupements bactériens fonctionnels.

Beaucoup d'expérimentations ont montré que l'introduction simultanée de souches non pathogènes sélectionnées de *Fusarium oxysporum* et de *Pseudomonas* spp. fluorescents dans des sols conducteurs ou sur des substrats de culture augmente leur niveau de résistance [2]. Globalement cette coinoculation, utilisant différents types d'antagonistes, permettra la mise en action de divers mécanismes englobant à la fois, l'antagoniste par voie d'antibiose et la compétition pour l'espace et les nutriments.

Il a été démontré que des phénomènes de compétitions nutritives pour le fer conditionnent le niveau de la résistance des sols aux fusarioses vasculaires [101], dans lequel les *Pseudomonas* spp. fluorescents produisent des sidérophores. L'introduction de substances nutritives stimule la croissance des microorganismes antagonistes qui entrent en compétition pour ces substances avec l'agent pathogène, entraînant un renforcement de la fongistase. L'addition de certains amendements aux sols suppressifs diminue l'intensité de la compétition et accroît la réceptivité du sol aux maladies [85].

2.3. Rhizobactéries promotrices de la croissance des plantes

Dans la rhizosphère, les bactéries sont considérées comme les micro-organismes les plus abondants. Les rhizobactéries sont des bactéries compétentes de la rhizosphère qui colonisent intensivement les racines des plantes, elles peuvent se multiplier et coloniser toutes les niches écologiques racinaires à toutes les étapes de croissance de la plante, en dépit de la présence d'une flore microbienne concurrente [102].

La présence des rhizobactéries dans la rhizosphère peut avoir un effet neutre, nuisible ou bénéfique sur la croissance des plantes. Les rhizobactéries neutres n'ont probablement aucun effet sur la croissance, tandis que les rhizobactéries délétères sont présumés pour compromettre la croissance et le développement des plantes par la production des métabolites à effet phytotoxique, mais également par la concurrence pour des nutriments ou l'inhibition des activités microbiennes bénéfiques [103,104].

Il est bien connu qu'un nombre considérable d'espèces bactériennes rhizosphériques, puissent exercer un effet bénéfique sur la croissance des plantes. Par conséquent, leur utilisation comme bio fertilisants pour l'amélioration de l'agriculture a été l'objet de nombreuses études et recherches depuis plusieurs années [2, 74, 105]. Ce groupe de bactéries dénommé PGPR pour *Plant Growth-Promoting Rhizobacteria* [105], dès la fin des années 1970, renferme plusieurs genres bactériens comme *Pseudomonas*, *Azospirillum*, *Burkholderia*, *Bacillus*, *Enterobacter*, *Rhizobium*, *Erwinia*, *Serratia*, *Alcaligenes*, *Arthrobacter*, *Acinetobacter* et *Flavobacterium*.

Ces PGPR montrent non seulement un large spectre de diversité dans le type mais également dans le nombre d'antibiotiques produits [106, 107]. Par exemple, certaines souches de PGPR ont la capacité d'excréter des métabolites qui jouent un rôle important dans l'inactivation des facteurs de germination du pathogène ou dans la dégradation de leurs facteurs de pathogénicité comme les toxines. Ainsi, la capacité de certaines bactéries à parasiter et à dégrader les spores des pathogènes à travers la production d'enzymes détruisant la barrière cellulaire a été démontrée [10]. Une étude récente a démontré que l'espèce de la

plante hôte exerce une influence significative sur la dynamique, la composition et l'activité des espèces antagonistes indigènes spécifiques de *Pseudomonas* spp [74].

2.3.1 Les *Pseudomonas* spp. fluorescents

Les *Pseudomonas* forment un large groupe colonisant le sol, les plantes et l'eau. Ces bactéries Gram négatives, non sporulantes, sont aérobies obligatoires, à l'exception de certaines pouvant utiliser le NO_3 comme accepteur d'électrons. Leur mobilité est assurée par plusieurs flagelles polaires, et elles ont un métabolisme mésophile et chimioorganothorphe, la plupart étant saprophytes [72].

Les différentes espèces de *Pseudomonas* qui colonisent la rhizosphère possèdent plusieurs caractéristiques intrinsèques qui les rendent particulièrement intéressantes pour une utilisation comme agents de lutte biologique. Leur capacité à coloniser les racines et à y maintenir une forte densité de population est remarquable [73]. Cette grande rhizocompétence vient sans doute de leur taux de croissance plus élevé que celui de la plupart des autres rhizobactéries et de leur capacité à métaboliser efficacement plusieurs composés des exsudats racinaires [74]. De plus, ces bactéries sont très faciles à isoler et à cultiver au laboratoire et se prêtent aisément aux manipulations génétiques [75, 76].

Plusieurs études ont souligné le haut degré de diversité au sein des *P. spp.* fluorescents, ce qui a mené à la subdivision de cette espèce en différents biovars [72]. Les *Pseudomonas*, principalement l'espèce *P. fluorescens*, sont connues depuis longtemps pour leur aptitude à réduire l'incidence des maladies racinaires, ainsi qu'à inhiber la croissance d'un grand nombre d'agents phytopathogènes. Cette capacité d'inhibition peut se faire selon plusieurs mécanismes incluant la production d'une large gamme de métabolites à effet antagoniste vis-à-vis des microorganismes pathogènes ou délétères [77].

2.3.1.1. Modes d'action des *Pseudomonas*

Sommairement, les effets bénéfiques des rhizobactéries se présentent directement sur la plante, en stimulant sa physiologie et en améliorant sa croissance et/ou indirect par l'inhibition et l'élimination des effets néfastes de la flore racinaire pathogène (Tableau 2.1).

Tableau 2.1 : Exemples de suppression des fusarioses vasculaires par les *Pseudomonas spp fluorescents* [2].

<i>Pseudomonas</i> antagonistes	Formes spéciales de <i>Fusarium oxysporum</i>	Plantes hôtes
<i>Pseudomonas sp</i> Souche B10 Souche A12 <i>Pseudomonas fluorescents</i> Souche PF36	<i>Fusarium oxysporum</i> f.sp <i>lini</i>	Lin
<i>Pseudomonas putida</i> Souche A12 Souche N1R <i>Pseudomonas sp</i> Souche 346 Souche 712 et Souche B10	<i>Fusarium oxysporum</i> f.sp <i>cucumerinum</i>	Concombre
<i>Pseudomonas putida</i> Souche A12 <i>Pseudomonas fluorescents</i> Souche WCS374	<i>Fusarium oxysporum</i> f.sp <i>conglutinans</i>	Radis
<i>Pseudomonas putida</i> Souche A12 Souche N1R	<i>Fusarium oxysporum</i> f.sp <i>lycopersici</i>	Tomate
<i>Pseudomonas putida</i> Souche G8-32 Souche R17-FP2 <i>Pseudomonas sp</i> Souche C7 Souche QP-5	<i>Fusarium oxysporum</i> f.sp <i>radicis</i> <i>lycopersici</i>	Tomate

2.3.1.1.1. Biostimulation de la croissance végétale

Outre les activités de biocontrôle, plusieurs études ont montré la capacité des *Pseudomonas spp. fluorescents* dans la phytostimulation de diverses espèces végétales (Tableau 2.2).

Tableau 2.2 : Stimulation de la croissance des plantes et du rendement des cultures après leur inoculation par des souches de *Pseudomonas* spp. *fluorescens*. Adapté de Lemanceau [2].

Plante hôte	Conditions expérimentales		Augmentation (% du témoin)		Références
	Contrôlées	Production	Croissance	Rendement	
<i>Beta vulgaris</i>	x	X	20 à 69	21 à 77	[62] [62]
<i>Brassica campestris</i>	x	X	22 à 65	7 à 19	[129]
<i>Citrus</i> sp.	x		→ 116		[133]
<i>Cucumis sativus</i>	x		36 à 58		[134]
Espèces florales	x		18 à 41		[131]
<i>Lactuca sativa</i>	x x		38 à 86 20 à 73		[134] [132]
<i>Lycopersicon seculentum</i>	x x		25 à 93 26 à 30		[134] [132]
<i>Malus</i> sp. plantules porte-greffes fruits	x x	x x	23 à 40 2 à 121	10	[91] [91] [135]
<i>Oryza sativa</i>		X		3 à 160	[98]
<i>Phaseolus vulgaris</i>	x		4 à 28		[74]
<i>Raphanus sativus</i>	x	x		⇒ 567 200	[74]
	x	x	83 à 320	10 à 11	[74] [136]
	x	x	7 à 367	2 à 24	[136] [136]
<i>Solanum tuberosum</i>	x	x	→ 550	10 à 15	[136] [138]
	x	x x	47 à 500	1 à 17 17 à 37	[138] [139]
<i>Triticum</i> sp.		X x		2 à 26 6.2 à 39	[140] [141]
		X	21	16	[142]

x Indique le type de conditions expérimentales utilisé.

→ Indique la valeur maximale de l'augmentation.

Certaines souches de PGPR de genre *Pseudomonas* ont été décrites pour leur effet direct positif sur la croissance des plantes et l'augmentation du rendement de cultures herbacées, légumières et ornementales [108, 109, 110,111]. Ces souches peuvent favoriser la croissance des plantes hôtes par

divers mécanismes, tels que la fixation d'azote (N_2) et la solubilisation d'oligoéléments tels que le phosphate (P) [81], l'inhibition de la synthèse d'éthylène par la plante, la synthèse des phytohormones ou de vitamines [109], et en diminuant la toxicité des métaux lourds [95, 112].

Un des mécanismes directs par lesquels les PGPR favorisent la croissance de plantes est la production de régulateurs de croissance ou de phytohormones [105]. Frankenberger et Arshad [113] ont démontré le rôle des auxines, des cytokinines, des gibbérellines, de l'éthylène et de l'acide abscisic (ABA) qui, une fois appliqués aux plantes, améliorent le rendement et favorisent la croissance.

Certaines souches de ce groupe de rhizobactéries ont été examinées pour leur production de régulateurs de croissance, et établir un rapport entre l'induction de l'élongation racinaire et la production de concentrations élevées de cytokinines. Garcia de Salamone et Nelson [114] ont caractérisé la production de trois cytokinines par des *Pseudomonas* spp. fluorescents. Ces auteurs ont prouvé que la production d'une cytokinine par ces bactéries a été liée à la croissance des calls chez le tabac.

Des souches de *Pseudomonas* isolées de la rhizosphère de diverses cultures ont la capacité de produire des auxines en tant que métabolites secondaires [115], qui stimulent la croissance et le développement des plantes [116], en favorisant la croissance racinaire et le nombre des racines secondaires et des poils absorbants [117].

Dubeikoysky *et al.*, [118] ont constaté après l'inoculation d'espèces végétales différentes avec des *Pseudomonas* spp. fluorescents, que ces bactéries stimulent le développement racinaire avec une concentration optimale d'acide indolacétique (AIA) chez certaines plantes, tandis que le développement racinaire a été inhibé par des concentrations d'AIA inhibitrices chez d'autres plantes.

L'éthylène est une hormone qui est impliquée dans la régulation de plusieurs réponses physiologiques [119], elle est considérée comme une "hormone de stress" car sa synthèse au niveau des tissus végétaux augmente avec un certain nombre de stress biotiques et abiotiques. La production

d'éthylène a été souvent associée à la croissance réduite et à la sénescence prématurée, et peut donc être un indicateur de susceptibilité des plantes aux stress telles que la sécheresse et les fortes températures [120, 121]. Un des principaux mécanismes utilisés par les *Pseudomonas* pour stimuler la croissance des plantes est l'abaissement des concentrations d'éthylène par hydrolyse de l'acide 1-aminocyclopropane-1-carboxylic (ACC), le précurseur immédiat de l'éthylène dans les plantes. L'enzyme catalysant cette réaction (ACC deaminase) hydrolyse l'ACC en α -ketobutyrate et en ammoniac [122]. Il a été observé que les plantes inoculées avec des souches présentant l'ACC deaminase sont nettement plus résistantes aux effets délétères de l'éthylène du stress [123], engendré par la présence des métaux lourds [112, 120], la présence d'agents phytopathogènes [120], la sécheresse, et les teneurs élevées en sel [124, 125]. Ainsi, certains *Pseudomonas* produisent une ACC désaminase qui hydrolyse l'ACC exsudé par les racines et réduit la formation d'éthylène. Cela a pour conséquence de favoriser le développement racinaire, augmenter la nodulation et par conséquent l'efficacité de la fixation d'azote [126]. Les produits de la réaction, ammonium et α -cétoglutarate, peuvent de surcroît être utilisés par les bactéries mais aussi par les plantes [127].

Certaines souches appartenant au groupe des *Pseudomonas* spp. fluorescents, semblent améliorer la germination des graines lorsque les conditions d'environnement sont défavorables. Ainsi, Kloepper et al [74] ont montré que le taux de germination de graines de colza, semées dans un sol froid et battant, pouvait être significativement augmenté grâce à l'inoculation par certaines souches bactériennes. De même Höfte et al [128] ont enregistré une augmentation significative du taux de germination de semences de maïs soumises au froid après inoculation de deux souches de *Pseudomonas* fluorescents.

2.3.1.1.2. Antibiose

De nombreux scientifiques attribuent aux *Pseudomonas* spp fluorescents des actions d'antibiose sur la microflore pathogène ou délétère [129, 130]. La production des antibiotiques par ces rhizobactéries a été reconnue comme un facteur majeur dans leur aptitude à diminuer significativement le taux de plusieurs

pathogènes racinaires [98]. Chez les *Pseudomonas* spp fluorescents se sont surtout les antibiotiques ; tels que 2.4 diacetylphloroglucinol des phénazines, des pyoluteorines et des pyrrolnitrines [129, 131], des viscosinamides, des tiensines, amphisine et l'oomycine A et de la tropolone (Tableau 2.3) [131]. Certaines souches produisent des cyanides d'hydrogène [119] et des enzymes lytiques telles que les chitinases et les β 1-3 glucanases, capables de dégrader la paroi fongique et les composés toxiques tel que l'acide fusarique [132].

Tableau 2.3 : principales molécules antibiotiques produites par certaines souches de *Pseudomonas fluorescens*

Molécules antibiotiques	Références
Oomycine	[143]
Pyacheline	[144]
PCA (Phenazine 1- carboxylique acide)	[133]
Pyolnitune (3-chloro-(2-vitro 3 :chlorophenyl-pyrol)	[145]
Pyolutéorine (4,5- Dichloro-1-4 pyrol 2 YL-2,6-DI-OH-Phenyl cétone)	[133, 145]
Pseudobactine (Hexapeptide)	[130, 136, 145]
Tropolone (2-OH-2,4-cycloheptatrien 1-1)	[133]
Pyoverdine (A.i.A) Acide indol-3 acétique	[136]

Le rôle des antibiotiques dans l'inhibition du développement des microorganismes phytopathogènes a été mis en évidence grâce à l'utilisation de mutants déficients en synthèse d'antibiotiques par rapport aux souches sauvages [91, 129, 135]. Certaines souches ont été également manipulées génétiquement afin de leur permettre de produire plusieurs antibiotiques. L'utilisation de gènes rapporteurs et de sondes, pour mesurer l'expression des gènes impliqués dans la production d'antibiotiques, a permis de détecter l'activité de ces gènes lors de la colonisation des racines et directement dans la rhizosphère [135]. Les antibiotiques produits dans la rhizosphère et la spermosphère ont été reconnus

comme un facteur majeur dans la suppression de plusieurs maladies telluriques, telles que le piétin échaudage du blé [10], la pourriture blanche des racines du tabac [129] et la fusariose vasculaire de la tomate [68].

Plusieurs facteurs abiotiques (l'oxygène, la température, des sources spécifiques de carbone et d'azote, et des micro-éléments), biotiques (la plante hôte, le pathogène, la microflore indigène, et la densité de cellules de la souche productrice) et physiologiques tels que le quorum sensing ont été identifiés pour influencer la production des antibiotiques par les agents bactériens de biocontrôle.

2.3.1.1.3. Production de l'acide Cyanhydrique (HCN)

La production de l'HCN par certaines souches de *Pseudomonas* spp fluorescents peut être aussi un facteur inhibiteur des pathogènes des racines des plantes. Ce dernier peut agir directement sur les cellules de l'agent pathogène en bloquant le cytochrome oxydase dans la chaîne respiratoire. Il a été suggéré que la production d'HCN par la souche CHAO provoquerait sur la plante un stress auquel elle réagirait par une augmentation de son système racinaire et sa résistance naturelle [68]. Cependant, en plus d'une activité protectrice, ce composé peut également être nocif pour la plante.

La stimulation de la synthèse de l'acide cyanhydrique est associée au catabolisme de la glycine, ce dernier est considéré comme un précurseur de la synthèse bactérienne d'acide cyanhydrique. Cette stimulation de sa synthèse améliore l'efficacité des bactéries à réduire la gravité de la maladie. Au niveau de l'adaptation à la rhizosphère, la production d'HCN peut être avantageuse pour acquérir des nutriments par exemple, l'HCN cause une augmentation de l'exsudation de nutriments par les tissus de la plante [146].

2.3.1.1.4. Production des sidérophores

Le fer est un élément essentiel à la vie de tout organisme vivant, il est impliqué dans les réactions d'oxydoréduction qui se déroulent lors des réactions fondamentales comme la synthèse, la respiration, la fixation d'azote atmosphérique, la synthèse des désoxyribonucléotides, le transport d'oxygène et le transport des électrons [78]. Dans des conditions d'aérobie et de pH

physiologique alcalin, le fer se trouve sous formes oxydées et polymérisées d'hydroxyde de fer $\text{Fe}(\text{OH})_3$ totalement insoluble, ce qui rend son assimilation difficile [136].

Dans le sol rhizosphérique, la concentration de cet élément est généralement faible compte tenu des caractéristiques physico-chimiques des sols, de la forte densité microbienne dans la rhizosphère et des prélèvements de fer ferrique par la plante. Dans un milieu carencé en fer ; pour contourner ce problème de biodisponibilité, les *Pseudomonas* spp fluorescents comme la plupart des microorganismes, ont développé des stratégies spécifiques pour capter le fer et le stocker à l'intérieur de leurs cellules, en synthétisant des petites molécules appelées sidérophores pour le transporter à l'intérieur des cellules bactériennes [137]. Les sidérophores sont des métabolites secondaires synthétisés par plusieurs espèces de *Pseudomonas* spp fluorescents telles que *P. aeruginosa*, *P. fluorescens putida*, *P. ovalis*, *P. nildenbigii*, *P. gericulata* et *P. calciprecipitans* [136]. Les sidérophores (du Grec, porteur de fer) sont des composés organiques de faible poids moléculaire (500 à 1500Da) et de forte affinité pour le fer trivalent, a une constante de stabilité d'environ 10^{32} [136] se traduisent *in vitro* par l'émission d'un chromophore jaune-vert fluorescent sous rayonnement ultraviolet [138] caractéristique de ce groupe bactérien [138], qui sont des hydroxamates ou catéchols. Selon les auteurs, le pigment fluorescent est «fluoresceine » ou « pyoverdine » [136] ou pseudobactine [2,139] ; il est constitué d'une chaîne peptidique d'acide aminé lié à un chromophore fluorescent responsable de la fluorescence jaune vert caractéristique de ce pigment [70].

La diversité structurale entre les différents siderophores produits par les *Pseudomonas* spp. fluorescents est parfaitement considérable selon les espèces productrices [98], la nature chimique des groupes qui chélatent le fer ferrique et leurs sites de liaison. Les sidérophores sont classés en deux grandes familles : les hydroxamates qui possèdent une liaison amide N-hydroxylée et des catéchols chélateurs de Fe^{3+} et des groupements hydroxyles des catécholes [147]. Une autre structure intermédiaire comportant les deux types de groupement a été identifiée dans les siderophores des *Pseudomonas* spp. fluorescents [78].

Il a été montré que les pseudobactines produits par la souche WC S358 de *Pseudomonas putida* ont une très grande affinité pour chélater le Fe^{3+} [95]. Ainsi ce complexe Ferric-pyoverdine ou Ferric-pseudobactine est reconnu par des récepteurs externes de la membrane protéinique de la bactérie «Pup A » [95]. En effet les protéines membranaires des *Pseudomonas spp. Fluorescents* antagonistes seraient peu spécifiques ce qu'il lui permet d'utiliser les complexes Ferric-pyoverdine produits par d'autres souches de *Pseudomonas spp*, à l'inverse leurs complexe ferric-pyoverdines ne seraient reconnus que par un nombre limité de souches de *Pseudomonas spp* [2]. Des études ont montré que les PGPR possèdent les récepteurs de leurs propres siderophores et aussi ceux des souches délétères et même ceux de certains champignons [78].

La production des sidérophores, corrélativement au pouvoir antagoniste sont sensibles aux variations de la température, du pH du sol, de la disponibilité de l'azote, des teneurs en oxygène, en cuivre, en carbone, en phosphore et de la concentration en oligo-éléments notamment le fer [139, 141, 142].

La présence des sidérophores dans le milieu semble être indispensable à l'expression de l'antagonisme. L'activité antagoniste exercée par les pyoverdines est effectivement liée à la compétition pour le fer, puisqu'elle est annulée lors de l'apport de fer [74]. Cet élément est stimulé en diminuant la concentration de cet élément dans le milieu [89].

Il a été rapporté que les activités antagonistes chez plusieurs souches de *Pseudomonas spp. fluorescents* à l'encontre de divers agents pathogènes de genre *Fusarium*, *Rhizoctonia*, *Pythium*, *Erwinia* [77], dont le potentiel chélateur est nettement meilleur que celui des autres microorganismes [77].

2.3.1.1.5. Induction de la résistance des plantes

La reconnaissance par la plante de certaines bactéries de la rhizosphère peut conduire à une réaction d'immunisation lui permettant de mieux se défendre vis-à-vis d'une attaque ultérieure par un organisme pathogène. Ce phénomène d'induction de résistance systémique (ISR) par les rhizobactéries est considéré

comme une stratégie prometteuse dans la lutte biologique contre les maladies de cultures.

Les principes actifs responsables de l'activité biologique des souches des PGPR sont classés en trois catégories : les composés de la surface cellulaire, les métabolites régulés par le fer et les antibiotiques [148]. La mobilité et l'adhésion racinaire d'une rhizobactérie sont des éléments importants pour une colonisation effective de l'hôte. Ces propriétés dépendent en partie des lipopolysaccharides (LPS) et des flagelles présents à la surface des membranes bactériennes [149]. L'implication du flagelle dans le phénomène d'ISR a été démontrée en comparant les taux de protection observés après traitement par la rhizobactérie bénéfique avec leurs flagelles purifiés ou via l'utilisation des souches mutantes. C'est notamment le cas de *P. putida* WCS 358, dont les flagelles interviennent dans l'induction de la résistance chez *Arabidopsis* contre *P. syringae* [150]. L'activité biologique du flagelle peut être due à la partie N-terminale (Fig 22) de la flagelline qui est la protéine constituant le flagelle [151]. D'autre part, l'utilisation d'extraits d'enveloppe de cellules, de mutants ou de composés purifiés a aussi permis de montrer le rôle des LPS dans l'induction de la résistance. C'est le cas notamment lors de l'ISR induite par certaines souches de *P. fluorescens*, de *P. putida*, *Burkholderia cepacia* et *Rhizobium elti* dont les LPS ont été testés avec des résultats positifs avec les pathosystèmes aussi divers que *Arabidopsis* /*Fusarium oxysporum*, haricot/ *Botritis cinerea* et pomme de terre/ *Cyst nematode* [152, 153].

Parmi les métabolites régulés par le fer, les pyoverdines produites par les espèces fluorescentes de *Pseudomonas* sont des molécules chélatrices du fer ayant une forte affinité pour les ions Fe^{3+} . Les pyoverdines *P. fluorescens* WCS358 peuvent induire l'ISR chez *Arabidopsis*, le haricot, la tomate et l'eucalyptus [128]. Dans les conditions limitantes en fer, certains microorganismes peuvent produire de l'acide salicylique (SA) dont l'activité électrique a été montrée grâce à *P.aeruginosa* 7NSK2 et KMPCH [154] et à *P. fluorescens* P3 [155]. L'AS intervient aussi comme précurseur de la biosynthèse de la pyochéline, un autre sidérophore capable de stimuler une réponse défensive chez les plantes [156].

Les éliciteurs appartenant à la classe des antibiotiques sont principalement produits par des bactéries du genre *Pseudomonas*. Le 2,4- diacetylphoroglucinol (DAPG), synthétisé par *P. fluorescens* CHAO, est notamment l'un des premiers à avoir été mis en évidence pour son action contre *Perenospora parasitica* et le nématode *Meloidogyne javanicasur* via la stimulation des défenses de plants d'*Arabidopsis* et la tomate [157, 158]. La pyocyanine, composé de la famille des phénazines, est l'exemple d'un autre antibiotique ayant une activité électrique de résistance [153].

Il a été montré que les *Pseudomonas* ssp fluorescents peuvent jouer le rôle d'éliciteurs (Tableau 2.4) sur l'activation des gènes de défense des plantes [159]. La caractérisation des produits des gènes de défense chez les plantes a permis de montrer l'existence de deux catégories majeures de modifications systématiquement retrouvées : il s'agit d'une modification structurale de la paroi cellulaire et des changements physiologiques et biochimiques [49, 122]. Les plantes peuvent faire face à l'invasion d'un pathogène en ralentissant sa pénétration dans les tissus végétaux. Ce retardement est assuré par l'épaississement des parois par apposition de lignine ou de callose, sous forme d'une excroissance intracellulaire, ou papille, au niveau du site d'infection [160]. Par ailleurs, les précurseurs de la lignine ainsi que les radicaux libres produits pendant les réactions de polymérisation peuvent affecter la plasticité de la membrane ou inactiver les enzymes du pathogène. Dans les plantes pré-inoculées par des rhizobactéries, il a été noté une très intense stimulation des voies métaboliques secondaires conduisant notamment à l'accumulation des protéines PR « pathogenesis related proteins » (chitinases, β -1,3 glucanases), la synthèse des phytoalexines [101, 159, 161, 163], de peroxydases [164], de phenylalanine ammonialyase (PAL)[161] et de chalcone synthase [161].

Tableau 2.4 : molécules électrices de mécanismes de défense des plantes

Eliciteurs	micro organismes	références
Lipopolysaccharides (LPS) Sinorhizobium)	bactérie (Xanthomonas,Pseudomonas	[164]
Flagelline [peptide Flg22]	bactérie (Pseudomonas, Acidovorax)	[150, 151]
pyoverdines	bactérie (<i>Pseudomonas fluorescens</i>)	[128]
AS, pyocheline	bactérie (<i>P. fluorescens</i> , <i>P.putida</i>)	[156]
N-acylbenzylamine derivative	bactérie (<i>P.putida</i>)	[148]
2,4-diacetylphloroglucinol	bactérie (<i>Pseudomonas fluorescens</i>)	[157]
Pyocyanine	bactérie (<i>Pseudomonas aeruginosa</i>)	[153]
Massetolide A	bactérie (<i>Pseudomonas fluorescens</i>)	[148]
Surfactine,Fengycine	bactérie (<i>bacillus subtilis</i>)	[148]
Butandiol	bactérie (<i>bacillus subtilis</i> , <i>amyloliquefaciens</i>)	[165]
N-Acyl homoserinelactone	bactérie (<i>Serratia liquefaciens</i>)	[166]

2.4. Spectre de protection des PGPR

Le spectre de protection des PGPR contre les différents pathogènes par l'ISR dans les différentes cultures a gagné de l'importance [74, 167, 168, 169]. Le traitement des graines avec la souche de *P. fluorescens* WCS417 a protégé le radis par l'induction de la résistance systémique non seulement contre le pathogène des racines *F. oxysporum f.sp. riphani*, mais aussi contre La bactérie pathogène des feuilles *P. syringae* pv. *tomato* et les champignons pathogènes des feuilles *Alternaria brassicola* et *F. oxysporum* [169]. Ceci implique que la même souche de PGPR peut induire la résistance contre multiple pathogènes dans la même culture. Il a été également montré que la souche *P. fluorescens* Pf1 induit la résistance contre différents pathogènes dans différentes cultures, *Rhizoctonia solani* , *Colletotrichum falcatum* dans la canne à sucre et *Pythium aphanidermatum* dans la tomate [167].

2.5. PGPR endophytes

Les bactéries endophytes sont définies comme des bactéries résidentes des tissus vivants des végétaux sans être pathogène ou de tirer bénéfices autre que d'assurer son habitat [174]. En plus de la colonisation de la rhizosphère et le

rhizoplan, certaines PGPR sont localisées dans les espaces intercellulaires des cellules épidermiques des racines et des tissus vasculaires [49, 170, 171].

Plusieurs facteurs favorisent les bactéries endophytes comme des agents potentiels de l'ISR vu leur association intime et naturelle avec les plantes. Les tissus internes des plantes fournissent un environnement relativement uniforme et protégé par rapport à celui de la rhizosphère et le rhizoplan [170], où les bactéries ectophytes doivent entrer en compétition pour les substances nutritives avec d'autres microorganismes et supporter les fluctuations de température et d'humidité, aussi bien l'exposition au rayonnement ultraviolet sur les surfaces. L'application des bactéries endophytes par l'injection des tiges des plants de coton réduit la pourriture des racines causée par *Rhizoctonia solani* et le flétrissement vasculaire causé par *F. oxysporum* f. sp. *vasinfectum* [170]. Cette bactérie se déplace vers le haut et vers le bas du point d'application en colonisant les tissus internes, peut exclure l'entrée des pathogènes dans les vaisseaux vasculaires [175]. Le traitement des semences de tomate avec la bactérie endophyte *Bacillus pumilus* souche SE 34 empêche l'entrée de l'agent du flétrissement vasculaire *F. oxysporum* f. sp. *radicis lycopersici* dans les vaisseaux vasculaires en limitant sa croissance mycélienne à l'épiderme et au cortex extérieur de la racine [49]. L'application de la souche de *P. fluorescens* 63-28 a limité la croissance de *Pythium ultimum* dans le pois [49] et *F. oxysporum* f. sp. *radicis-lycopersici* dans la tomate [171].

L'utilisation des souches endophytes pour l'induction de la résistance systémique est plus bénéfique dans les cultures propagées végétativement comme le bananier et la canne à sucre. Viswanathan et Samiyappan [172] ont révélé l'utilité de la souche endophyte de *P. fluorescens* EP1 isolée dans les tissus de la tige de canne à sucre dans l'induction de la résistance systémique contre l'agent de la pourriture rouge *Colletotrichum falcatum*. De la même manière, l'inoculation prophylactique des arbres de chêne avec les souches *Pseudomonas denitrificans* 1-15 et *P. putida* 5-48 protège les arbres contre *Ceratocystis fagacearum* [173]. Plus loin, les bactéries endophytes présentes dans la graine survivent et se déplacent dans la partie végétative pour être végétativement

propagées, réduisant ainsi le besoin de l'application fréquente des souches bactériennes.

2.6. Système de sécrétion type III des *Pseudomonas* non pathogènes

Les systèmes de sécrétion permettent le transport de macromolécules (protéines ou nucléoprotéines) entre le cytoplasme bactérien et le milieu extérieur, à travers les membranes internes et externes des bactéries. Cinq types de systèmes de sécrétion sont couramment décrits chez les bactéries : type I (SST1), type II (SST2), type III (SST3), type IV (SST4) et type V (SST5). Ils sont classés selon leur composition en protéines, leurs similitudes en acides aminés et leurs mécanismes de fonctionnement [176]. Très récemment, un sixième type de système, SST6, a été décrit mais très peu de données le concernant sont encore disponibles [177].

La majorité des travaux rapportant la présence de SST3 chez des bactéries non pathogènes concerne des bactéries d'origine tellurique. Des espèces telluriques n'impliquant aucune pathogénie, telles que *Desulfovibrio vulgaris* (réductrice de sulfate), *Myxococcus xanthus*, *Verrumicrobium spinosum* et des bactéries du genre *Burkholderia*, possèdent ainsi un SST3 dont le rôle reste encore inconnu [83]. Plus récemment, la présence d'un gène de SST3 a été identifiée chez d'autres souches du genre *Burkholderia* [178].

Les T3SSs sont connues comme médiateurs des interactions de nature pathogène entre les cellules bactériennes et eucaryotes. Cependant, la présence de souches saprotrophes de *Pseudomonas* spp. fluorescents ayant un pouvoir de biocontrôle contre les pathogènes telluriques dans la rhizosphère [68], indique l'implication de ces systèmes dans des processus autre que pathogène, telles que les associations symbiotiques menant à l'augmentation du taux d'échange des nutriments au niveau des arbuscules mycorhiziens (AM) se développant sur les cellules corticales des racines [129].

Des SST3 ou des séquences homologues à des gènes codant des SST3 ont également été décrits chez des bactéries non symbiotiques appartenant au groupe des *Pseudomonas* spp. fluorescents et connues pour être non pathogènes voire bénéfiques pour la croissance et la santé des plantes. Un SST3 a été

défecté chez *P. fluorescens* PfG32R [84]. Cette souche, isolée de la rhizosphère de plantes de la famille des *Solanaceae* et de l'oignon, est capable de supprimer l'établissement de la BWT (pour bacterial wilt disease of tomato) [203]. Il a également été montré que PfG32R est capable de produire une large variété d'antibiotiques et de sidérophores [84].

La présence de séquences d'ADN caractéristiques du SST3 a été mise en évidence par Mazurier [82] chez *P. fluorescens* C7R12, une bactérie mutualiste connue pour ses effets bénéfiques sur la croissance et la santé des plantes. C7R12 possède des propriétés antagonistes de pathogènes d'origine tellurique, tels que *Fusarium oxysporum* responsable de la fusariose vasculaire [2] et *Pythium ultimum* provoquant des nécroses de la racine. Sanchez *et al* [180] ont montré que C7R12 était capable d'induire un effet de type PGPR par la mise en évidence d'une promotion de croissance sur des plantules de *Medicago truncatula*. Plus récemment, Pivato *et al* [181] ont montré que cette bactérie possédait également des propriétés promotrices de la mycorhization et pouvait donc être considérée comme une bactérie MHB (mycorhization helper bacteria).

Des travaux de Mazurier *et al* [82] ont montré que près de la moitié des souches d'une collection de *Pseudomonas* spp. fluorescents saprotrophes isolée de la rhizosphère possédait des gènes caractéristiques de la présence d'un SST3. Rezzonico *et al* [87] ont également décrit la présence d'un gène de SST3 chez de nombreuses souches de *Pseudomonas* spp. fluorescents de la rhizosphère. Ces souches comprenaient des bactéries non pathogènes saprotrophes, mais aussi des agents potentiels de lutte biologique, tels que *P. fluorescens* F113, Pf1 et KD. Notamment, *P. fluorescens* KD, est une souche connue pour être capable de protéger les plantes contre des pathogènes : le concombre contre *P. ultimum* et la tomate contre *F. oxysporum* f. sp. *radicis-lycopersici* [182]. Plus récemment, un gène marqueur de SST3 a été identifié chez plusieurs *Pseudomonas* non pathogènes, tels que *P. poae* BS053, isolés de la mycosphère de champignons ectomycorhizogènes [178].

2.6.1. Organisation génétique et structure du SST3

Preston *et al* [85] ont comparé l'organisation du cluster *hrp* d'une souche de *Pseudomonas* pathogène, *P. syringae* pv. *syringae* 61, avec celle de SBW25 (Figure 2.1). Les ORF (pour open reading frame) de SBW25 ayant un fort degré de similarité avec les gènes *hrp* de *P. syringae* ont été nommés *rsp* (pour rhizosphere-expressed secretion). Il a été montré que le cluster *rsp* de SBW25 présentait de fortes homologues avec le cluster *hrp* de *P. syringae*. En effet, l'arrangement et l'orientation des ORF de SBW25 sont très proches de ce qui a été décrit chez *P. syringae* pv. *syringae* 61. Toutefois, 4 différences principales ont été observées. Ainsi, une partie importante de l'opéron *hrcV* ainsi que l'intégralité de *hrpZ* du cluster *hrp* de *P. syringae* ne possèdent pas d'équivalent au sein du cluster *rsp* de *P. fluorescens* SBW25. De même, SBW25 ne possède qu'un seul homologue de régulateurs de réponse (*rspR*), au lieu de *hrpR* et *hrpS* chez *P. syringae*. Enfin, sur le cluster *rsp*, *ropE* se trouve à une localisation totalement opposée de son homologue *avrE* chez *P. syringae*.

Mulya *et al* [84] ont montré par hybridation, que *P. fluorescens* PfG32R possédait des séquences présentant de fortes homologues avec plusieurs régions du cluster *hrp* de phytopathogènes : *hrpRS* et *hrpF* de *P. syringae* pv. *phaseolicola* (signaux de forte intensité) et *hrpC* et *hrpD* de *P. syringae* pv. *tabaci* (signaux d'intensité moyenne). Des études ont permis de détecter par PCR et hybridation, la présence des gènes *hrcR* (partiel), *hrcS*, et *hrcT* (partiel) chez *P. fluorescens* C7R12 et F113 [82]. Il est intéressant de noter que la succession des gènes *hrcRST*, caractéristique des clusters *hrp* de la famille Hrp-I décrits pour les *Pseudomonas* pathogènes [183] a été retrouvée chez un grand nombre de *Pseudomonas* spp. fluorescents non pathogènes (*P. fluorescens* et *P. putida*) [82].

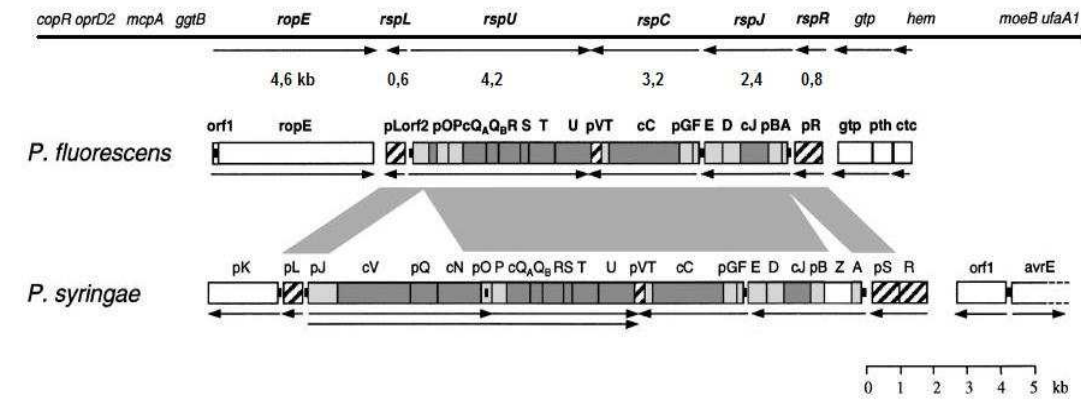


Figure 2.1 : Comparaison de l'organisation du cluster *rsp* de *P. fluorescens* SBW25 avec le cluster *hrp* de *P. syringae* pv. *syringae* 61 d'après Preston *et al.* (2001). La longueur des opérons a été déterminée approximativement d'après l'échelle et est indiquée en kilo-paires de bases. Les flèches noires indiquent l'organisation des différents opérons.

2.6.2. Induction et régulation des gènes de SST3

Chez les *Pseudomonas* non pathogènes comme pour les bactéries pathogènes, la présence d'un hôte eucaryote apparaît nécessaire à l'induction des gènes codant le SST3. Chez *P. fluorescens* SBW25, l'expression des gènes de SST3 est induite en présence des racines de la betterave à sucre (*Beta vulgaris*) [184]. L'expression du cluster *rsp* de SBW25 serait donc induite en réponse à des signaux spécifiques aux racines [85].

Cependant, la nature des hôtes eucaryotes avec lesquels la bactérie interagit n'est pas encore connue précisément. En effet, Rezzonico *et al* [87] ont montré que ce ne serait pas avec la plante que le SST3 de *P. fluorescens* KD interagirait mais avec un organisme fongiforme pathogène. La présence du SST3 induit une forte diminution de la production d'une polygalacturonase par *Pythium ultimum* ce qui protège le concombre contre la maladie induite par cet oomycète [87]. En effet, les pectinases, comme la polygalacturonase, contribuent à détériorer les pectines de la paroi cellulaire des plantes et sont importantes pour l'induction des maladies par les phytopathogènes [176].

Chez les *Pseudomonas* non pathogènes, la régulation transcriptionnelle des gènes de SST3 est proche du schéma de régulation des clusters Hrp-I du phytopathogène *P. syringae* [185]. En effet, chez *P. fluorescens* SBW25, l'étude

de l'expression des gènes de régulation a montré que la protéine RspR contrôle la transcription du facteur σ *rspL* et que la protéine RspL contrôle l'expression du cluster des gènes codant pour les protéines de SST3 [185]. L'organisation des gènes de SST3 des *Pseudomonas* non pathogènes étant similaire à celle des gènes de SST3 des *Pseudomonas* phytopathogènes.

2.6.3. Protéines effectrices des *Pseudomonas* non pathogènes

L'analyse des séquences du cluster *rsp* de *P. fluorescens* SBW25, a révélé la présence de deux protéines putatives sécrétées : RspA et RopE [85]. Ce travail a également permis de suggérer l'existence d'une troisième protéine sécrétée non identifiée sur le cluster *rsp*, au vu de l'observation de l'induction de la HR par la souche sauvage et les mutants *ropE* de SBW25. Greenberg et Vinatzer [186] ont montré que SBW25 possédait plusieurs gènes ayant des homologies avec des gènes de protéines effectrices d'autres pathogènes de plantes et d'animaux. Plus tard, Vinatzer [187] a confirmé que deux de ces gènes sont bien des gènes codant pour des protéines effectrices putatives : un gène homologue de *avrA* et un gène homologue de *exoY* de *P. syringae*. A notre connaissance, ces résultats sont les seuls existants concernant les protéines effectrices chez les bactéries non pathogènes non symbiotiques.

2.7. Communication bactérienne « Quorum sensing »

De nombreuses bactéries utilisent des signaux spécifiques nommés auto inducteurs pour établir une communication intercellulaire. L'expression de beaucoup de fonctions physiologiques et de comportements compte sur la taille de la communauté bactérienne, qui est mesurée par l'accumulation des signaux extracellulaires spécifiques autoproduits. Ce phénomène de communication contrôlant l'expression et la régulation de certains gènes bactérien est nommé le « quorum sensing » [100].

Le quorum sensing est un mécanisme régulateur qui joue un rôle central dans la physiologie et le développement des bactéries. Il permet à une population de coordonner l'expression des gènes cibles en fonction de sa densité ou des propriétés du milieu (diffusion, flux...) [188].

Le premier « QS » a été découvert chez la bactérie marine bioluminescente *Vibrio fischeri*, dans lequel LuxI est responsable de la biosynthèse du signal intercellulaire N-(3-oxohexanoyl)-homoserine lactone, et LuxR est un régulateur transcriptionnel [189]. Quand la concentration du signal du « QS » atteint le seuil, il interagit avec la protéine LuxR et le complexe LuxR-auto inducteur s'attache dans la région promotrice LuxICDABE et active la transcription des gènes cibles [189].

Chez les bactéries Gram négatif, le Quorum Sensing est basé sur la synthèse et la détection de petites molécules signal appelées N-acyl-homoserine lactones (AHLs) comme autoinducteurs (Figure 2.3) [110, 90] qui est généralement associé à leur comportement pathogène ou symbiotique [93, 190]. Les molécules de types acyl-homoserine lactones sont composées, comme leur nom l'indique, d'un anneau homoserine lactone d'une part, et d'une chaîne acyl variable d'autre part. Suivant l'espèce productrice, la chaîne acyl peut varier par sa longueur (de 4 à 18 carbones) [93, 190], sa saturation et la présence de différentes substitutions sur le troisième carbone (groupement carbonyle C=O, ou groupement hydroxyle CH-OH).

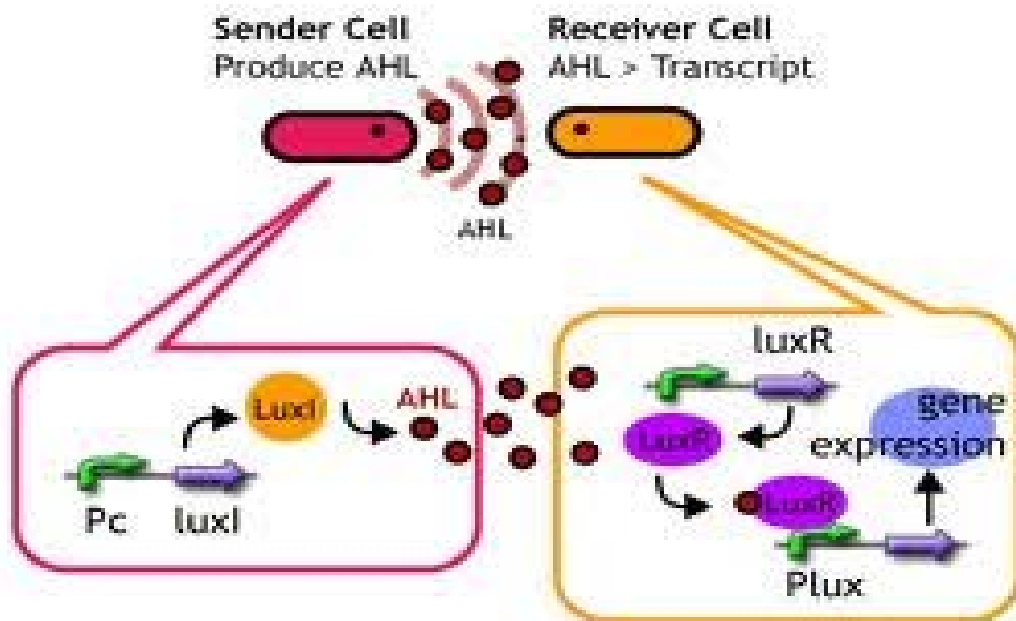


Figure 2.3 : schéma représentatif du système de « Quorum sensing »

Les AHLs sont synthétisées dans la cellule bactérienne par les AHL-synthases [191, 192]. Ces enzymes ont été classées en différentes familles en fonction de leurs séquences et des substrats utilisés lors de la synthèse des molécules signal. Trois types d'AHLs synthétase ont été décrits à ce jour: la famille LuxI [192], comprenant les homologues de l'enzyme LuxI [193] qui sont les AHL-synthases les plus répandues puisqu'elles sont conservées dans plus de 50 espèces bactériennes [194], et l'enzyme HdtS décrite chez *Pseudomonas fluorescens* et qui est responsable de la synthèse de trois types différents d'AHLs chez cette bactérie [195]. Un grand nombre de bactéries, ont été trouvées qu'elles sont capables de produire AHLs (ou activités semblables à AHL), parmi celles-ci, beaucoup de signaux de QS sont produits par les bactéries associées à des plantes et peu entre elles, sont les bactéries promotrices de la croissance des plantes et de biocontrôle comme *Pseudomonas aureofaciens*, *Pseudomonas putida* et *Pseudomonas fluorescens* [90]. Par exemple, chez *Pseudomonas aureofaciens* 30-84, un agent de biocontrôle bien caractérisé qui protège le blé d'une maladie causée par le champignon ascomycète *Gaeumannomyces graminis* var. *tritici*, le QS système PhzI –PhzR est employé pour réguler l'opéron *Phz FABCD* responsable de la synthèse de l'antibiotique phénazine [196]. Récemment, un second système de 'QS' a été identifié chez la souche *P. aureofaciens* 30-84, qui semble régler des propriétés cellulaires superficielles et joue un rôle dans la compétition rhizosphérique, mais pas pour la production de la phénazine [198]. Chez *P. putida* Isof, une souche de bioremédiation (dépollution) qui peut aussi promouvoir la croissance des plantes, le complexe PpuI-PpuR active *ppuA* et influence positivement la formation et le développement du biofilm [199].

L'inactivation ou la dégradation des AHLs présente une cible attractive pour la création d'une stratégie innovatrice de contrôle de maladies. Il a été montré que plusieurs plantes et composés microbiens ont une activité contre les AHLs. Récemment, deux protéines bactériennes dégradant l'AHLs ont été décrites. Chez les isolats du sol de l'espèce *Bacillus*, AHL-lactonase codé par le gène *aiiA* a été identifié [200, 201]. Une autre bactérie du sol *Variovorax paradoxus*, a été également identifiée qui neutralise AHLs par le clivage de la taille de l'acide gras

et la minéralisation de l'anneau homosérine lactone via la production d'un aminoacylase [202].

La première application de la perturbation du système « QS » dans le but de contrôle de maladies était par l'introduction du gène *aiiA* multiplié du *Bacillus* sp. dans le tabac transgénique et les plants de pomme de terre [200]. L'expression de ce gène et la production d'AHL lactonase par les plantes génétiquement modifiées a paralysé le système de « QS » de la bactérie pathogène *Erwinia carotovora*, aboutissant ainsi à l'augmentation de la résistance à la maladie [203].

2.7. PGPF ou champignons bénéfiques

Certains champignons peuvent stimuler les défenses de la plante et présenter une activité antagoniste envers différents phytopathogènes, ceci tout en stimulant directement la croissance de la plante [10]. Ces champignons bénéfiques ont été appelés PGPF pour "Plant Growth-Promoting Fungi". Ils peuvent être des champignons filamenteux [98] voire même des levures également appelées PGPY pour "Plant Growth-Promoting Yeasts" [192]. Les PGPF peuvent être naturellement présents chez diverses plantes, aussi bien chez des plantes herbacées [16] que des plantes ligneuses [142], notamment la vigne [176]. Chez ces plantes, les PGPF peuvent être épiphytiques et / ou endophytiques et sont même quelquefois à l'origine de symbioses remarquables comme c'est le cas avec les mycorrhizes [204].

Trichoderma spp. sont parmi les champignons les plus fréquents dans le sol et dans les écosystèmes des racines des plantes [205]. Ces champignons sont opportunistes, avirulents pour les plantes, symbiotiques et fonctionnent comme des parasites et antagonistes de nombreux champignons phytopathogènes, ce qui protège les plantes des maladies [205].

Le genre *Trichoderma* Pers. : Fr décrit par Persson en 1874 [133], est utilisé depuis les années 1930 dans la lutte biologique appliquée en agriculture. Différentes espèces de ce genre ont montré leur efficacité dans la lutte contre les agents phytopathogènes aériens et telluriques.

Le genre *Trichoderma* est caractérisé par une vitesse de croissance rapide et une sporulation abondante sur milieu de culture. Il est facilement reconnaissable en culture grâce à la couleur généralement verte des spores. Ce genre est caractérisé par des conidiophores fortement ramifiés selon une structure pyramidale et se terminant par une ou plusieurs phialides. Ces dernières peuvent être cylindriques ou subglobuleuses, regroupées en masse ou en solitaire. Les conidies sont hyalines, ellipsoïdes et lisses chez la plupart des espèces ; les conidies globuleuses sont rares. Certaines espèces peuvent produire des chlamydospores globuleuses, qui sont intercalaires ou terminales. Le système de ramification du conidiophore est hautement variable et dans certains cas peut ressembler superficiellement au genre *Verticillium* et *Gliocladium* [159].

2.7.1. Taxonomie

La division du genre *Trichoderma* en espèces a fait l'objet de nombreuses études et de beaucoup de polémiques. Dans le règne vivant les limites de «l'espèce» reposent sur la possibilité de croisement entre individus. Or, les champignons anamorphes du genre *Trichoderma*, en tant que tels, n'ont pas de reproduction sexuée connue, et ce caractère ne peut donc être utilisé pour leur systématique. On se base alors sur les aspects culturels et la morphologie des appareils sporogènes ainsi que sur le matériel génétique en s'appuyant sur des techniques de biologie moléculaires [159].

Au départ, la taxonomie de ce genre était basée en grande partie sur les caractères morphologiques et les résultats les plus importants ont été publiés par Rifai [206] et Bisset [207]. La première tentative de subdiviser le genre *Trichoderma* a été réalisée par Rifai [206] qui a subdivisé le genre *Trichoderma* en 9 espèces agrégats, tout en reconnaissant que les dernières espèces qu'il a décrit ne sont pas vraiment des espèces biologiques. Cet auteur a bien reconnu que chaque espèce agrégat est hétérogène et comprend plus qu'une espèce biologique, car il n'était pas possible de définir les limites des espèces biologiques individualisées.

Les neufs agrégats décrits par Rifai [206] sont :

1. *Trichoderma piluliferum* Webster et Rifai
2. *Trichoderma polysporum* (Link : Fr.) Rifai
3. *Trichoderma hamatum* (Bon) Bain
4. *Trichoderma Koningii* Oud
5. *Trichoderma aureoviride* Rifai
6. *Trichoderma harzianum* Rifai
7. *Trichoderma longibrachiatum* Rifai
8. *Trichoderma pseudokoningii* Rifai
9. *Trichoderma viride* Pers. : Fr.

En 1991, Bissett [207] propose la notion de « section » pour faire face au nombre croissant d'espèces nouvelles de *Trichoderma* sp., sans rapport avec les espèces agrégées. Se basant sur la morphologie des conidiophores et des phialides, il regroupe les espèces agrégées dans 5 sections (*Trichoderma*, *Pachybasium*, *Hypocreanum*, *Longibrachiatum* et *Saturnisporum*). Le système taxonomique de Bissett est aussi appuyé, entre autres, par des approches de biologie moléculaire (PCR), pour répondre au positionnement de nouvelles espèces de *Trichoderma* identifiées (dont les formes téléomorphes sont souvent non identifiées) et reste le plus fiable actuellement [207]. La méthodologie de cette taxonomie, repose sur des comparaisons de l'aspect morphologique, le profil métabolique, l'examen phylogénétique et la séquence d'ADN avec des bases de données de références internes au laboratoire de Bissett (Canada).

Les espèces de *Trichoderma* ainsi que leurs rares formes téléomorphes observées sont classées parmi les Ascomycètes (second plus important groupe fongique en nombre d'espèces) du genre *Hypocrea* [207].

Plus de 200 espèces du genre *Hypocrea* ont été identifiées, mais sont rarement cultivables, et de ce fait peu décrites en termes modernes. Sous certaines conditions, méconnues, les *Hypocrea* sp. (téléomorphes) se transforment « définitivement » en *Trichoderma* sp. (anamorphes). On pense alors que l'évolution a conduit à la disparition du mode sexué pour l'établissement d'un genre à reproduction exclusivement asexuée [207].

La biologie moléculaire nous révèle aujourd'hui que des espèces de *Trichoderma* génétiquement différentes, présentent des similitudes morphologiques spectaculaires et leurs caractéristiques se chevauchent ce qui, d'une part explique la longue controverse connue par ce genre auparavant et d'une autre part, montre que les seuls critères morphologiques ne suffisent plus pour une classification incontestable et rigoureuse des formes anamorphes de *Trichoderma* sp.[207].

La taxonomie actualisée des champignons a aboli l'embranchement des Deuteromycotina, auquel appartenait le genre *Trichoderma*. La position taxonomique actuelle des *Trichoderma* sp. se présente comme suit, selon Bissett, 2004 [207] :

Embranchement	Amastigomycota et/ou Eumycètes
Sous embranchement	Ascomycotina
Classe	Sordariomycètes
Ordre	Hypocréales
Famille	Hypocraceae
Genre	<i>Hypocrea mitosporique</i> (<i>Trichoderma</i>)

2.7.2. Utilisation du genre *Trichoderma* dans la lutte biologique

Le potentiel des espèces de *Trichoderma* comme agents de lutte biologique avait été observé pour la première fois par Weinding (1932) [133]. Ce dernier auteur a rapporté l'action mycoparasitaire de *T. lignorum* (Tode) Harz contre *Rhizoctonia solani* Kuhn. Il avait décrit avec détail l'enroulement des hyphes de l'agent antagoniste contre celles de l'agent pathogène, la pénétration, ainsi que la dissolution du cytoplasme de l'hôte. Deux années plus tard Weinding [133] avait rapporté que la souche de *T. lignorum* produisait une substance toxique contre *R. solani* et *Sclerotinia americana* et la nomma gliotoxine. Plus tard il avait démontré que l'espèce qui produisait la gliotoxine n'était pas *T. lignorum* mais plutôt *Gliocladium virens* Miller. Cette dernière est récemment renommée comme *T. virens* [133].

Dans les années qui suivent ces travaux, plusieurs exemples de succès de la lutte biologique ont été attribués aux mécanismes de mycoparasitisme et ou de l'antibiose, à la rhizosphère compétence, aux enzymes lytiques qui dégradent les polysaccharides, la chitine et le β -glucane telles que les chitinases et glucanases et à l'induction des mécanismes de la résistance des plantes [209]. Le renforcement des activités antifongiques a été montré chez les plantes et les microorganismes. Des plants de tabac et de tomate exprimant des chitinases recombinantes à partir de *Trichoderma harzianum* ont exprimé une grande résistance à l'égard d'un grand nombre d'agents phytopathogènes. Selon Migheli [210], la souche *T.longibrachiatum* (CECT2606) transformée par un gène codant pour le β -1,4 endoglucanase (over expression) est efficace que la souche sauvage.

2.7.3. Interaction *Trichoderma*-pathogènes

Le genre *Trichoderma* possède une batterie de mécanismes d'attaque potentiellement utilisables mais qui demeurent toutefois complexes. Il peut employer un ou plusieurs modes d'action en même temps pour maîtriser un agent pathogène.

Le déploiement des modes d'action varie également selon les partenaires en présence et les conditions physico-chimiques du milieu (températures, humidité, etc...). *Trichoderma* est efficace lorsqu'on lui permet de s'installer avant l'arrivée des champignons pathogènes. Son action est donc préventive. Il permet, au niveau des racines, de créer un manchon protecteur autour de celles-ci et ainsi contrer l'entrée des agents pathogènes à l'intérieur des racines. Une fois installée, *Trichoderma* peut avoir un effet stimulant pour la plante en absence de champignons pathogènes [211].

2.7.3.1. Mycoparasitisme et enzymes lytiques

Le processus complexe du mycoparasitisme consiste à plusieurs événements, incluant la reconnaissance de l'hôte, l'attaque et par conséquent la pénétration et la mort de l'hôte. Durant ce processus *Trichoderma* secrète des CWDEs (Cell wall degrading enzymes) qui hydrolysent la paroi des cellules de

l'hôte, relâchant par conséquence des oligomères de la paroi des cellules de l'hôte [28, 90]. Il a été montré que *Trichoderma* secrète des enzymes hydrolytiques à un taux constitutif et détecte la présence des autres champignons par la sensation des molécules relâchées de la dégradation enzymatique de l'hôte [28].

Les enzymes qui dégradent les parois cellulaires fongiques secrétées par *Trichoderma* spp. telles que les chitinases et les β glucanases sont considérées comme étant les déterminants majeurs de l'activité antagoniste [33,198]. Des données récentes indiquent clairement qu'en particulier les chitinases jouent un rôle principal [28]. Quelques enzymes chitinolytiques de *T.harzianum* ont été purifiées et caractérisées [34].

Les enzymes chitinolytiques de *Trichoderma* spp. sont secrétées de manière extracellulaire pour dégrader les substrats à base de chitine (exemple : le mycélium des champignons). Certaines de ces enzymes ont un rôle nutritionnel et peuvent être impliquées dans la lutte biologique [198]. Lorito [212] ont observé qu'une souche de *T.harzianum* efficace dans la lutte biologique agissait en premier lieu par la production d'antibiotiques pour tuer l'hôte, et beaucoup plus tard des enzymes chitinolytiques pour la colonisation saprophytique des tissus de la plante hôte déjà morte. Selon ces données, l'efficacité de la lutte biologique des souches de *Trichoderma* spp. serait associée à la production d'antibiotiques non volatils ou avec d'autres mécanismes autre que le mycoparasitisme [198]. Par contre, beaucoup de travaux ont montré l'implication importante des enzymes chitinolytiques dans le mycoparasitisme, l'antagonisme et la lutte biologique. Dans l'interaction mycoparasitaire *in vitro*, une induction de l'expression des enzymes chitinolytiques est induite dans les premières heures de contact avec le pathogène, ces enzymes apparaissent à être impliquées dans la pénétration et la mort de l'hôte [36]. Certains isolats de *Trichoderma* spp. commercialisés et utilisés dans la lutte biologique ne produisent pas d'antibiotiques non volatils [34], et une corrélation directe est trouvée entre l'activité chitinolytique *in vitro* et la capacité de biocontrôle de certains isolats de *T.harzianum* [33]. Certaines enzymes chitinolytiques de *Trichoderma* spp. et *Gliocladium* spp. peuvent être directement utilisées en combinaison avec les fongicides chimiques pour protéger les fruits au cours du stockage contre les maladies de conservation. Des

applications basées sur des préparations enzymatiques dans les serres ou en plein champ peuvent être utilisées, puisque les enzymes peuvent améliorer l'efficacité des fongicides systémiques et des bactéries antagonistes [35]. Ce qui est également prometteur pour la défense des plantes, et le transfert des gènes codant pour les enzymes chitinolytiques de différentes espèces végétales [41].

Concernant la dernière approche de lutte, de nombreux végétaux d'intérêt économique ont été génétiquement modifiés avec des chitinases d'origine diverse afin d'accroître leur résistance systématique antifongique et insecticide. Le renforcement des activités antifongiques est montré chez les plantes exprimant des chitinases recombinantes d'origine bactérienne et fongique [11].

Le gène codant pour l'endochitinase chit-42 est exprimé de manière constitutive dans les plants de tabac, de tomate, de pomme de terre et d'autre espèce. En effet, chez le tabac transgénique, le gène chit-42 maintenait son activité antifongique accumulée de manière extracellulaire dans les feuilles, dans les racines, les tiges et les fleurs. Il n'affecte pas l'interaction de la plante avec les champignons mycorhiziques [11]. L'endochitinase peut agir en synergie avec les PR-protéines des plantes pour inhiber la pénétration des champignons, et libérer les oligomères qui élicitent les défenses des plantes [11]. Par conséquent les lignées transgéniques des plants de tabac, de pomme de terre et de pomme ont montré une augmentation de la résistance aux champignons aériens et telluriques tels que *Alternaria alternata*, *Rhizoctonia solani* et *Venturia inaequalis* [11].

2.7.3.2. Antibiose et métabolites secondaires

La mise en évidence de la production de métabolites secondaires par les *Trichoderma* sp. a été rapportée pour la première fois par Weidling (1934), concernant un antifongique [133]. Depuis, les études successives ont démontré que ces micromycètes étaient virtuoses dans la biosynthèse de métabolites secondaires, processus régi par des interactions biochimiques extrêmement complexes et parfaitement coordonnées [34].

La littérature ne cite que les métabolites importants de *Trichoderma* sp. sont principalement des enzymes et des molécules bioactives. Ils sont classés selon Ghisalberti et Sivasithamparam [213] en trois groupes :

(i) Métabolites volatils: 6-pentyl pyrone, éthylène, cyanure d'hydrogène, alcools, aldéhydes [214].

(ii) Métabolites non volatils diffusibles: polyacétates (antifongiques, antibiotiques), trichotécènes (variété de toxines actives sur microorganismes et mammifères) notamment les trichodermines [213].

(iii) Métabolites polypeptidiques ciclosporines immunosuppresseurs anti-inflammatoire; (et les peptaïbols, qui sont généralement assimilés à des mycotoxines peptidiques) [214].

Les structures chimiques des antibiotiques de *Trichoderma* peuvent suggérer deux différents mécanismes d'action. La production des composés de faible poids moléculaire, non polaires et volatils résultant dans une grande concentration d'antibiotiques dans sol d'environnement, qui a relativement une gamme de longue distance d'influence sur la communauté microbienne. Au contraire, l'effet d'une courte distance peut être dû à des antibiotiques polaires et des peptaïbols agissant (activant) en proximité de la production des hyphes [212].

Lorito et al [212], démontrent que les peptaïbols inhibent l'activité de β -glucane synthétase dans les champignons hôtes, alors ils agissent en synergie avec le β -glucanase de *T.harzianum*. L'inhibition de glucane synthétase empêche la reconstruction des parois des cellules du pathogène, ceci facilite l'action disruptive des β -glucane.

La synergie existante entre les enzymes et les antibiotiques polaires est strictement en relation avec leurs mécanismes d'action [213]. Bien que le rôle et les effets des peptaïbols soient clairs, le mode d'action des autres métabolites secondaires et leurs synergies possibles avec d'autres composés n'est pas encore élucidé [214].

Selon le métabolite secondaire produit, Howell [133] divise les souches de *T.virens* en deux groupes : les souches « Q » qui produisent la gliotoxine et les

souches « P » qui produisent le composé gliovine au lieu de la gliotoxine [304]. La gliotoxine a un large spectre d'activité antibiotique, alors que la gliovirine est un spécifique inhibiteur des oomycètes et sa production est positivement en corrélation avec l'efficacité du biocontrôle du groupe de la souche « P » de contrôler *Pythium Damping-off* du coton [133]. Dans les substrats avec une haute ration C/N, les deux groupes « P » et « Q » de *T.virens* produisent une phytoalexine similaire à la viridine, nommé viridiole [213]. Les souches produisant les virioles peuvent être appliqué en sol comme bio-herbicide pour les mauvaises herbes, alors qu'ils n'affectent pas la plante cultivée en sol traité [133].

2. 7.4 Interaction *Trichoderma*-plantes

En plus des actions de biocontrôle qui se résument dans l'inhibition des capacités infectieuses des agents phytopathogènes, en inhibant leur croissance (antibiose) ou par des actions compétitives pour les niches écologiques. Certaines espèces de *Trichoderma* peuvent coloniser efficacement les racines des plantes et augmenter la résistance aux maladies via l'induction des mécanismes de défense de la plante.

2.7.4.1. Colonisation des racines des plantes

L'interaction physique entre *Trichoderma* et la plante a été observée par le microscope électronique pour être limitée dans les premières couches des cellules de l'épiderme de la plante et le cortex extérieur des racines [215]. Les hyphes des BCAs pénètrent dans le cortex racinaire mais la colonisation par *Trichoderma* est stoppée, probablement par la déposition des barrières de callose par l'encerclement des tissus de la plante [215]. Il apparaît que cette interaction développe une relation symbiotique plutôt qu'une relation parasitaire entre le champignon et la plante, par lequel le champignon occupe une niche nutritionnelle et la plante est protégée de la maladie.

Une active signalisation moléculaire s'effectue entre le champignon et la plante. Les éliciteurs de *Trichoderma* activent l'expression des gènes impliqués dans le système des réponses de défense, et la promotion de la croissance de la plante, le système racinaire et la disponibilité des nutriments. Cet effet a son tour

augmente la zone de colonisation et les nutriments disponibles pour les champignons de biocontrôle, par conséquent l'augmentation en général d'antagonisme des pathogènes des plantes [216]. Il a été montré que *Trichoderma virens* colonise les racines du coton et inhibe la croissance de *Macrophomina phaseolina* (pourriture des racines) apporté par le sol [215, 216].

2.7.4.2. Induction des mécanismes de défense

L'induction des réponses de défense des plantes par les champignons antagonistes a été très bien étudiée [215, 216]. Des plantes variées, des espèces mono et dicotylédones, ont montré une augmentation de leur résistance aux pathogènes lorsqu'elles sont prétraitées avec *Trichoderma* [216]. La colonisation des plantes par *Trichoderma spp.* réduit la maladie causée par un ou plusieurs différents pathogènes, au site d'inoculation (induced localized acquired resistance, LAR), aussi bien que lorsque le champignon est inoculé dans différents sites et temps (périodes) que celui du pathogène (induced systemic resistance ou ISR).

L'induction de la résistance des plantes par la colonisation de certaines espèces de *Trichoderma* est similaire à celle élicitée par les rhizobactéries, qui améliorent le système de défense mais elles n'impliquent la production des protéines PR (pathogenesis-related) [217, 218]. Il a été rapporté que *Trichoderma* induit les gènes qui sont associés au stress biotique et abiotique, aussi bien que l'ADN, l'ARN et les protéines de métabolisme. En particulier, les gènes codant pour l'extensine et les protéines similaires ont été trouvés induits par les BCA, mais non ceux codant pour les protéines appartenant à la famille PR-5 (thaumatin-like proteins), qui sont considérées comme le principal marqueur moléculaire de la SAR.

Durant l'interaction de *Trichoderma* avec la plante, différentes classes de métabolites peuvent agir comme des éliciteurs de l'induction de la résistance [219]. Ces molécules incluent : (i) protéines avec une activité enzymatique comme la xylanase [217] ; (ii) produits des gènes d'avirulence (avirulence like gene) capables d'induire des réactions de défense de la plante [216] ; (iii) des composés de faible poids moléculaire relâchés des parois des cellules des plantes ou des champignons par l'activité enzymatique de *Trichoderma* [216, 217, 218]. Certains

produits de faible poids moléculaires ont été purifiés et caractérisés et ils sont considérés comme des composés qui élicitent une réaction chez la plante lorsqu'ils sont appliqués au niveau des feuilles ou lorsqu'ils sont injectés dans les tissus des feuilles ou des racines. Plus loin, ils stimulent également la capacité de biocontrôle de *Trichoderma* en activant l'expression des gènes cascades de mycoparasitisme. Une autre protéine (Sm1) élicitrice secrétée par *T.virens* a été impliquée dans l'activation de mécanisme de défense et l'induction du système de résistance. En plus de leur effet antimicrobien inné, leur action peut aussi stimuler l'activité biologique des populations microbiennes antagonistes résidentes ou les souches de *Trichoderma* introduits, et promeuvent un effet d'ISR à la plante. D'autres métabolites secondaires (peptaiboles) peuvent agir comme éliciteurs des systèmes de défense des plantes contre les pathogènes. En fait, l'application de peptaiboles active une réponse de défense aux plantes de tabac [219].

CHAPITRE 3

MATERIELS ET METHODES

3.1. Matériel biologique

Les antagonistes testés dans notre expérimentation sont de deux natures différentes, une bactérie *Pseudomonas fluorescens* et un champignon *Trichoderma harzianum*. Ces tests ayant comme objectif d'expérimenter les différentes voies d'action de ce deux types de microorganismes. Concernant l'isolat pathogène, il s'agit de *Fusarium oxysporum* f.sp. *lycopersici* agent de flétrissement vasculaire de la tomate (Tableau 3.1).

3.1.1. Souche bactérienne

Nos travaux ont été conduit avec de la souche modèle *Pseudomonas fluorescens* C7R12, mutant de la souche C7, résistante à la rifampicine, isolée de la rhizosphère du lin cultivé dans le sol de Châteaurenard, agent de biocontrôle du flétrissement fusarien. Cette souche possède un système de sécrétion de type III (SST3) [82], présente des effets type PGPR [180], des effets antagonistes à l'encontre de pathogènes fongiques d'origine tellurique [02] et des propriétés de bactéries MHB (Mycorhization Helper Bacteria) [181]. A partir des cultures conservées sur le milieu B de King [220] (Appendice B), des repiquages ont été réalisés sur le même milieu dans des boites de Pétri pour vérifier la pureté des souches ; ainsi les cultures pures ont été conservées à 4°C.

3.1.2. Isolats cryptogamiques

Concernant les isolats cryptogamiques utilisés dans cette recherche (essais expérimentaux), nous avons :

- Un isolat antagoniste *Trichoderma harzianum* G4, isolé en Belgique ; il se caractérise par sa capacité d'attaquer les agents pathogènes via différents modes d'action [211].

- un isolat pathogène de *Fusarium oxysporum* f.sp. *lycopersici*, isolé en Belgique (collection de Gembloux), qui se caractérise par un pouvoir pathogène élevé en interaction avec plusieurs cultivars de tomate.

La pureté des isolats fongiques a été vérifiée par des cultures monosporiques obtenues sur le milieu eau agar (Appendice B) et repiqué individuellement sur le milieu PDA « potato dextrose agar » [221]. A partir de cette culture ; des inoculums fongiques ont été préparés avec des cultures âgées de 7 à 10 jours cultivés sur le milieu PDA à 25°C.

Tableau 3.1 : Origine des microorganismes testés

Microorganisme	origine Végétale	origine géographique	observations
C7R12	rhizosphère du lin	Châteaurenard France	Envoi du Pr.Lemanceau laboratoire de microbiologie et géochimie du sol (INRA) Dijon-France
G4	tomate	Belgique	collection microbiologique Gembloux (Belgique)
FOL	tomate	Dijon (France)	Envoi du Pr.Lemanceau laboratoire de microbiologie et géochimie du sol (INRA) Dijon-France

Il s'agit d'un mutant résistant à la rifampicine de la souche C7

3.1. 3. Matériel végétal

Les essais d'application d'activité antagoniste *in vivo* ont été effectués avec deux variétés de l'espèce végétale la tomate (*Lycopersicon esculentum* var Aicha et Heinz améliorée 1350), elles ont été choisies sur la base de leur sensibilité à *Fusarium oxysporum* f.sp. *lycopersici* et leur durée de végétation. Les graines des deux variétés ont été désinfectées par trempage dans une solution d'hypochlorite de sodium à 2% pendant 10 minutes, puis rincées abondamment à l'eau distillée stérile et séchées sur un papier filtre absorbant.

Les opérations de semis, d'élevage et de conduite des plants ont été réalisées dans un substrat composé de tourbe et de sol nature (1/2 tourbe, 2/3

sol). Le sol utilisé dans les essais d'antagonisme *in situ* a été prélevé au niveau de la station expérimentale de l'université de Blida (Département d'Agronomie). Après séchage et tamisage (4 mm de diamètre) afin d'éliminer les éléments grossiers, le sol a été désinfecté selon la méthode de Berjerac, en l'étalant sur une plaque en acier chauffée à une température avoisinant 200°C pendant 15 minutes. Le sol sur la plaque est remué de temps à l'autre en l'arrosant avec de l'eau. Cette opération vise à éliminer ou inhiber le maximum d'activité microbienne, des nématodes et les semences des plantes indésirables. Après désinfection, le sol a été mélangé avec la tourbe (1/3 de tourbe, 2/3 de sol). Les caractéristiques physicochimiques du sol ont été étudiées durant l'année 2005 au niveau du laboratoire de pédologie du département d'Agronomie de l'Université de Blida (Tableau 3.2).

Tableau 3.2 : caractéristiques physicochimiques du sol [222]

Caractéristiques	Taux (%)
pHeau	6.9
pHKCL	6.7
K ⁺	0.63%
Na ⁺	2.63%
Ca ²⁺ + Mg ²⁺	6.36%
S ⁺	9.65%
C.E	0.44
C.E.C (meq /100g de sol)	12.5
V (taux de saturation)	77.2
P2 O5 assimilable (ppm)	189.33
Ca CO3	0
Matière organique	1.89
Hcc (humidité pondérale à la capacité au champ)	10.45
Argile	16.36%
L (limon)	24.12%
LG (limon grossier)	16.26%
SF (sable fin)	14.28%
SG (sable grossier)	28.98%

3.2. Conditions de plantation et de culture

Notre expérimentation a été réalisée à la station expérimentale du Département d'agronomie de l'université de Blida, sous serre en verre à Charpente métallique, d'une hauteur de 4.5 mètres et de dimensions de (17.5 m × 22.5 m). L'aération est assurée par des fenêtres latérales et chauffée par des radiateurs à chauffage central.

- Le repiquage des graines a été réalisé dans des plaques d'alvéoles contenant 50% de tourbe et 50% de sol préalablement désinfecté.
- La transplantation de chaque variété de tomate a été effectuée lorsque cette dernière atteint le stade deux à trois feuilles bien étalées dans des sachets en polyéthylène rempli de 1/3 de tourbe et 2/3 de sol d'une contenance de 1kg.
- Les plants ainsi transplantés sont irrigués régulièrement avec l'eau de robinet.
- L'élevage de ces plants a duré environ 4 semaines.

3.3. Antagonisme *in vitro*

Ce test consiste en la vérification des activités antagonistes *in vitro* des microorganismes antagonistes sélectionnés vis-à-vis de L'agent phytopathogène étudié.

3.3.1. Inhibition de la croissance mycélienne

Le pouvoir antagoniste des souches C7R12 et G4 sur l'inhibition de la croissance mycélienne du pathogène FOL a été testé sur trois milieux gélosés : le milieu PDA favorable au développement des champignons, le milieu KB favorable au développement des bactéries et le milieu mixte composé de parts égales des deux premiers milieux (KB + PDA). Au début, des tests préliminaires ont été réalisés sur la croissance mycélienne, sur la germination des conidies et sur l'élongation des tubes germinatifs pour détecter d'éventuelles activités antagonistes.

3.3.1.1. Confrontation par contact direct sur milieux de culture

Cette technique consiste à placer, dans la même boîte de Pétri, à 5cm l'un de l'autre deux explants de 8 mm de diamètre provenant de deux cultures de champignons parasite et antagoniste (G4 et G7). Pour la souche de *Pseudomonas* C7R12, il s'agit de placer sur la même boîte de Pétri 5 pastilles de 5 mm de diamètre, l'une portant le pathogène au centre de la boîte et les autres portant l'antagoniste (C7R12) à la périphérie. Les pastilles gélosées des bactéries sont préparées à partir de cultures de 36 heures, alors que celle des champignons ont été préparées à partir de cultures âgés de 7 à 10 jours. Pour chaque interaction, trois répétitions sont prévues. Au terme de la période d'incubation, 8 à 10 jours à 25 °C, les diamètres des colonies fongiques sont mesurées en prenant en compte le diamètre des zones d'inhibition formées à la limite du développement entre le pathogène et l'antagoniste. Le pourcentage d'inhibition de la croissance mycélienne exercé par les antagonistes a été évalué selon la méthode de Sy [223].

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

IC : inhibition de la croissance

DT : croissance diamétrale du témoin

DPA: croissance diamétrale mycélienne du pathogène en présence de l'antagoniste.

3.3.2. Inhibition de la germination conidienne

3.3.2.1. Préparation des suspensions conidienne

Selon les techniques décrites par Schers et Backer [89], la production des conidies de l'isolat cryptogamique (FOL) est effectuée en déposant un disque mycélien dans un flacon de 100 ml contenant le milieu PDA et laissé en agitation continue pendant 20 jours à 25°C ± 2°C à l'obscurité. Après l'incubation, la vérification de la présence des conidies est réalisée par des observations microscopiques (G : 10x40).

3.3.2.2 Interaction antagonistes-pathogène

L'objectif de cet essai est de tester l'effet des agents antagonistes sur l'inhibition de la germination conidienne dans un milieu liquide. A cet égard, des confrontations ont été effectuées dans des tubes à essai contenant 5ml des trois milieux liquides PDA, KB ou (PDA+KB). Les suspensions antagonistes bactériennes et fongiques de la souche C7R12 et de l'isolat G4 ont été préparées successivement avec des cultures âgées de 36H et de 07 jours, par homogénéisation dans l'eau distillée stérile.

Dans chaque tube à essai, un volume de 3ml des suspensions antagonistes C7R12, G4 ou C7R12+G4 a été apporté et mis en incubation à 25°C, 24h avant l'addition de la suspension conidienne du FOL d'une concentration de 10^8 conidie/ml. Les témoins sont représentés par l'ensemencement du FOL dans les trois milieux liquides. Il est important de signaler que la concentration des suspensions antagonistes a été apportée à la même que celle du pathogène selon trois répétitions pour chaque traitement.

La lecture des résultats consiste à effectuer le comptage des conidies totales et les conidies germées aux différents temps T0, T1 et T2 afin de déterminer le taux d'inhibition de la germination conidienne.

- T0 : au même temps de l'introduction de la suspension conidienne du FOL.
- T1 : 6h après l'introduction de la suspension conidienne du FOL.
- T3 : 24h après l'introduction de la suspension conidienne du FOL.

3.3.3. Inhibition de l'élongation du tube germinatif

Le but de ce test est de vérifier le pouvoir inhibiteur des agents antagonistes sur l'élongation du tube germinatif vis-à-vis de l'isolat FOL (*Fusarium oxysporum* f.sp. *lycopersici*).

Sur les mêmes tubes à essai précédemment utilisés, en plus du comptage de nombres de conidies totales et germées, des mesures des tubes germinatifs ont effectués aux trois temps T0, T1 et T2. Ces dernières ont été précédées par l'étalonnage du microscope (G : 10x40x0.5), à l'aide de micromètre objet et du micromètre oculaire.

3.4. Inhibition du pathogène dans le sol

Ce test est porté sur l'action des agents antagonistes à l'égard des agents pathogènes et leur développement dans le sol. A cet effet, des confrontations ont été effectuées dans des boîtes de Pétri en verre (Ø14mm) (antagoniste - pathogène) contenant 100 g de sol stérilisé au préalable par autoclavage. Les inoculums bactériens, d'une concentration de 10^6 cfu /ml, ont été préparés dans de l'eau distillée stérile à partir de cultures bactériennes de 36 h cultivées sur le milieu KB. Les inoculums fongiques, d'une concentration de 10^6 conidies /ml, ont été préparés à partir de cultures de 7 à 10 jours cultivées sur le milieu PDA.

Dans chaque boîte, les 100g de sol sont imprégnés avec la suspension antagoniste C7R12, G4 ou (C7R12+G4) 24H avant l'addition de la suspension fongique pathogène (FOL) ou en même temps, après une légère agitation en mouvements circulaires pour homogénéiser la répartition dans le milieu. L'incubation a été effectuée à 25 °C pendant 10 à 15 jours.

A titre comparatif, Les témoins sont traités selon la même procédure, il s'agit de :

- Le témoin positif, représenté par des boîtes où le sol a été inoculé seulement avec l'agent pathogène.
- Le témoin négatif où les apports ont été remplacés selon les mêmes volumes avec de l'eau distillée stérile.
- Le troisième témoin où le sol a été inoculé uniquement avec l'antagoniste

Les observations de développement des agents microbiens ont été effectuées, selon trois répétitions de chaque traitement, après incubation de 10 à 15 jours à 25°C. La comparaison s'est basée sur le développement optimal du témoin positif.

Dans ces essais, nous avons étudié deux variantes :

- La première consiste à inoculer le sol avec l'antagoniste et le pathogène; ceci dans le but de permettre à l'antagoniste de s'adapter et d'initier sa croissance et ses activités métaboliques.
- Dans la deuxième variante, nous avons effectué des traitements où

l'antagoniste est représenté par une combinaison de deux souches antagonistes (C7R12+G4).

Selon le protocole de dénombrement établi au laboratoire d'écologie microbienne et pathologie des sols (IMR-INRA-Dijon-France), le calcul de la concentration de la solution mère se fait selon la formule suivante :

Concentration de la solution mère= Nombre de colonie/Volume x Dilution

3.5. Antagonisme *in situ*

Les essais d'antagonisme *in situ* ont été effectués avec l'application des antagonistes (C7R12 et G4) vis-à-vis du pathogène *Fusarium oxysporum* f.sp *lycopersici* (FOL) en interaction avec les deux variétés de tomate (Aïcha et Heinz).

3.5.1. Application des antagonistes et infestation du sol

L'inoculation des graines de tomate, préalablement désinfectés, a été effectuée par trempage dans une suspension de l'antagoniste préparée selon les mêmes techniques précédentes (cf.3.3.2.2). La tourbe stérile à été utilisée à titre de support dans la préparation finale de l'inoculum à appliquer. A cet effet, un volume de 50 ml de la suspension antagoniste est mélangé à 20 g de tourbe, pour obtenir une pâte qui s'adhère facilement sur les graines. Dans le cas du témoin, les semences sont placées dans la tourbe imbibée avec de l'eau distillée stérile.

Les semences enrobées avec la pâte de tourbe ont été laissées pendant une heure pour assurer une bonne adhésion des antagonistes. Le semis a été réalisé dans des plaques à alvéoles arrosées pour assurer une humidité suffisante à l'installation des antagonistes. L'infestation par le pathogène (10^8 conidie /g de sol) a été effectuée après la transplantation dans des sacs en polyéthylène, lorsque les plants atteignent le stade de trois feuilles bien étalées.

3.5.2 Dispositif expérimental

Les essais ont été conduits selon un dispositif expérimental en blocs aléatoires complets avec trois répétitions (Figures 3.1 et 3.2). Dans chaque bloc figure les dix traitements étudiés avec 15 plants par bloc, soit 45 plants par traitement.

Les traitements en question sont (Figure 3.2) :

- **T 1 et T6** : Témoins positifs (malades): plants de la variété Aicha et Heinz inoculés avec le pathogène FOL
- **T 2 et T7** : Témoins négatifs (sains): plants de la variété Aicha et Heinz inoculés avec l'eau distillée stérile.
- **T3, T4 et T5** : Plants de la variété Aicha traités respectivement par C7R12, G4 et C7R12+G4 et infestés par le FOL.
- **T8, T9 et T10** : Plants de la variété Heinz traités respectivement par C7R12, G4 et C7R12+G4 et infestés par le FOL.



Figure 3.1 : Dispositif expérimental des essais

	T4			T7				T10				T8			T3
	T2			T6				T1				T9			T5

BLOC1

	T1			T9				T2				T6			T10
	T3			T7				T8				T5			T4

BLOC2

	T9			T3				T7				T10			T1
	T2			T8				T4				T5			T6

BLOC 3

Variété Aicha

T1 : témoin positif
 T2 : témoin négatif
 T3 : C7R12+FOL
 T4 : G4 +FOL
 T5 : G4+C7R12+FOL

variété Heinz

T6 : témoin positif
 T7 : témoin négatif
 T8 : C7R12+FOL
 T9 : G4+FOL
 T10 : G4+C7R12+FOL

Figure 3. 2: Dispositif expérimental des essais d'antagonisme *in situ*

3.5.3. Paramètres analysés

Après les étapes de transplantation et d'inoculation, des observations quotidiennes ont été réalisées pendant 30 jours. Ces observations concernent l'apparition et le développement des symptômes typiques de la fusariose vasculaire (Figure 4.3) selon des échelles adaptées [80].

Fusariose vasculaire de la tomate :

0. pas de symptômes.
1. Jaunissement de quelques ou plusieurs feuilles.
2. Jaunissement généralisé.
3. Flétrissement latéral.
4. Mortalité du plant.

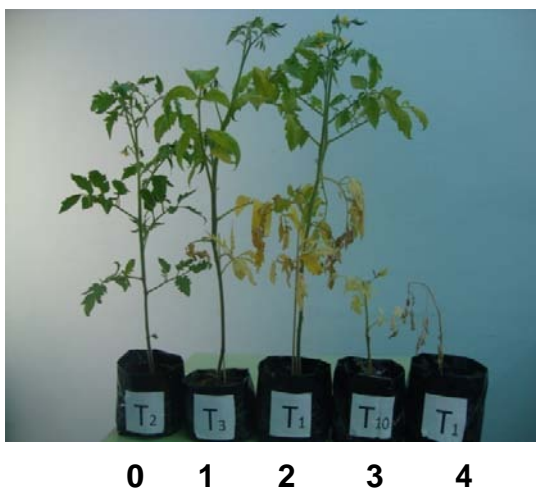


Figure 3.3 : Symptômes de la fusariose vasculaire de la tomate

Le suivi de l'évolution de la maladie est basé sur deux paramètres :

- Le taux d'infection (I %) qui correspond au pourcentage des plants malades.

$$I (\%) = (\text{total de plants malades} / \text{total de plants observés}) \times 100.$$

I (%) : Taux d'infection (en pourcentage).

- De plus la gravité de la maladie est prise comme critère pour évaluer la sévérité des attaques des pathogènes. Selon la formule décrite par Fuch [11], la gravité (S %) a été calculée comme suit :

$$S (\%) = \Sigma (E .a / N.T) 100.$$

S (%) : Sévérité de la maladie exprimée en pourcentage.

N : nombre total de plants observés.

T : valeur du degré le plus haut (4) de l'échelle.

E : classe de symptôme qui varie de 0 à 4 selon l'échelle.

A : nombre de plants malades à la classe considérée.

A la fin des notations, la longueur, le poids frais et sec des parties aériennes ont été évalués après passage à l'étuve à 105 °C (5 à 7 jours).

3.5.4. Paramètres de croissance

Au terme de l'expérience, les plants sont dépotés, les racines sont lavées pour les débarrasser du substrat y adhérent afin de mesurer leur longueur. Le poids frais et le poids sec de la biomasse racinaire de chaque plant sont ensuite déterminés.

3.5.4.1. Dosage des protéines totales

L'évaluation du taux des protéines totales dans les extraits des plants traités a été réalisée selon la méthode de Bradford [224]. Elle consiste à broyer un extrait foliaire de 0.1g de matière fraîche dans 6ml de NaOH (N=0.1 et PH=12.8). L'extrait foliaire a été laissé 30minutes avant sa centrifugation à 5000 tours /min pendant 10minutes. La lecture de l'absorbance a été réalisée avec les surnageant obtenus aux longueurs d'onde A280 et A260. La concentration des protéines est calculée comme suit :

$$\text{Protéines totales (mg /ml)} = 1.5 A_{280} - 0.76A_{260}.$$

3.5.4.2. Dosage de la chlorophylle

La chlorophylle totale a été dosée selon la technique de Francis; qui consiste en une macération des feuilles (0.1g) dans 10ml d'un mélange de l'acétone et de l'éthanol (75%et 25%) de volume et de (80% et40%) de concentration. le broyage est répété plusieurs fois afin d'extraire la totalité des pigments chlorophylliens. L'extrait obtenu a été conservé à l'étuve (25°C) et à l'abri de la lumière pendant 48 heure, avant sa centrifugation (2500 tours /mn) pendant 5 mn. La densité optique de la totalité des surnagents obtenus est mesurée à 645 nm, 663nm et à 470nm (spectrophotomètre Perkin Elmer 5UV). La détermination des teneurs en chlorophylle a, b et c a été effectuée par les formules suivantes :

$$\text{Chl a } (\mu\text{g/g MF}) = 12.7 \times \text{DO}_{(663)} - 2.59 \times V (1000 \times W).$$

$$\text{Chl b } (\mu\text{g/g MF}) = 22.9 \times \text{DO}_{(645)} - 4.68 \times V (1000 \times W).$$

$$\text{Chl c } (\mu\text{g/g MF}) = 1000 \times \text{DO}_{(470)} - [1.82 \text{ Chl a} - 85.02 \text{ Chl b } \times V] / 198.$$

V : le volume de l'extrait total en litre

W : la masse de la matière fraîche de l'échantillon en grammes

3.5.5. Vérification de la viabilité des agents microbiens

A la fin de notre expérimentation, des prélèvements des parties racinaires ont été utilisés pour vérifier la viabilité des microorganismes appliqués (l'antagoniste et le pathogène). A cet effet, des parties racinaires prélevées et débrasées du sol adhérent, ont été découpés à partir du collet, rincés plusieurs fois avec l'eau distillée stérile et séchés séparément sur un papier filtre avant les déposé sur les milieux nutritifs gélosés (PDA ou KB) et laissées en incubation à 25°C. Le développement des bactéries et des champignons a été observé après respectivement, 24 h et sept jours d'incubation.

CHAPITRE 4

RESULTATS ET DISCUSSION

4.1. Activités antagonistes directes

4.1.1. Inhibition de la croissance mycélienne

Les résultats des tests préliminaires concernant les activités antagonistes de la souche bactérienne de *Pseudomonas fluorescens* (C7R12) et l'agent fongique *Trichoderma harzianum* (G4), montrent des activités antagonistes appréciables vis-à-vis de la souche fongique phytopathogène *Fusarium oxysporum* f.sp *lycoparsici* (FOL) sur les trois milieux de culture.

L'estimation des taux d'inhibition de la croissance mycélienne de l'agent pathogène FOL, a montré des intensités inhibitrices qui varient seulement selon l'agent antagoniste mais non pas selon le milieu de culture (Tableau 4.1, Figure 4.1). Le diamètre de la souche fongique pathogène FOL en absence des antagonistes sur les milieux de culture PDA, KB et mixte sont respectivement $4,51 \pm 0,11$, $4,13 \pm 0,21$ et $4,72 \pm 0,21$.

Dans tous les essais, il a été constaté que la croissance mycélienne du pathogène est nettement inférieure par rapport aux témoins respectifs sur les trois milieux de culture.

L'analyse statistique des taux d'inhibition de la croissance mycélienne selon le test Student ($\alpha=5\%$ et $\alpha=1\%$), a révélé une différence hautement significative avec les agents antagonistes et non pas avec les milieux de culture (Appendice C). En présence des souches antagonistes des régressions de la croissance mycélienne induisant des taux d'inhibitions importants relativement élevés sur les trois milieux de cultures. Les interactions entre les antagonistes et le pathogène ont montré des taux d'inhibition allant de $26,65 \pm 2,94$ à $75,28 \pm 2,81$ (Tableau 4.2).

Tableau 4.1 : Activités antagonistes dans les trois milieux de culture

Interactions	Milieux	Répétitions		
		1	2	3
Témoin FOL	PDA	4,6*	4,4	4,5
	KB	4,3	3,9	4,2
	Mixte	5	4,7	4,7
G2-G4	PDA	+	+	+
	KB	+	+	+
	Mixte	+	+	+
G2-C7R12	PDA	+	+	+
	KB	+	+	+
	Mixte	+	+	+
G4-G2-G4	PDA	+	+	+
	KB	+	+	+
	Mixte	+	+	+

- : Absence d'inhibition; +: Présence d'inhibition; * diamètres des colonies (cm).

C7R12 : *Pseudomonas fluorescens*; G4 : *Trichoderma harzianum*; FOL: *F.oxysporum*.

Tableau 4.2 : Taux d'inhibition de la croissance mycélienne sur les trois milieux de culture.

Interaction	Milieux	Répétitions			Moyenne \pm ET*
		1	2	3	
G2-G4	PDA	63,29	57,12	66,37	62,26 \pm 04,71
	KB	23,26	28,58	28,10	26,65 \pm 02,94
	Mixte	74,00	73,34	78,50	75,28 \pm 02,81
G4-G2-G4	PDA	70,63	75,17	70,86	72,22 \pm 02,56
	KB	29,91	35,72	15,39	27,00 \pm 10,47
	Mixte	68,00	88,5	82,37	79,62 \pm 10,52
G2-C7R12	PDA	39,53	43,57	30,50	37,87 \pm 06,69
	KB	69,77	57,15	55,65	60,86 \pm 07,76
	Mixte	62,00	60,00	62,00	61,33 \pm 01,15

KB : milieu B de King ; PDA: milieu potato-dextrose-agar; M : milieu mixte; * : écart type ; C7R12 : *Pseudomonas fluorescens* ; G4 : *Trichoderma harzianum* ; FOL: *F.oxysporum*.

Les meilleures performances de la souche bactérienne C7R12 ont été enregistrées sur les milieux KB et le milieu mixte, en provoquant des taux d'inhibition appréciables dépassant les 60%. Quant à l'isolat fongique *Trichoderma harzianum*, les taux les plus appréciables ont été observés sur le milieu mixte (75%) après quatre jours seulement d'incubation, dont la boîte a été complètement envahie par la souche *Trichoderma harzianum*, alors que la souche fongique pathogène FOL n'occupe qu'une surface réduite ne dépassant pas les 25%. Au-delà de cette période et après six jours, *T. harzianum* envahit les colonies de *Fusarium oxysporum* FOL et sporule même sur celle-ci, révélant ainsi son pouvoir hautement mycoparasitaire (Figure 4.2).

La comparaison des actions inhibitrices des deux agents antagonistes à l'égard de l'agent phytopathogène sur les différents milieux de cultures a révélé une différence plus ou moins significative ; en comparant l'interaction de la souche C7R12 avec le FOL sur le milieu KB et mixte; l'agent pathogène semble plus sensible aux effets de la souche C7R12, en montrant des taux d'inhibition allant de $60,86 \pm 7,76$ sur le KB à $61,33 \pm 1,15$ sur le milieu mixte, alors qu'il montre une certaine résistance sur le milieu PDA avec taux d'inhibition relativement faible ne dépassant pas $37,87 \pm 6,69\%$.

Lorsqu'on compare l'interaction de l'isolat fongique *T. harzianum* avec le FOL, nous remarquons que le FOL est plus sensible sur le milieu mixte que sur le milieu PDA, ce qui correspond à un taux de réduction de croissance plus important que celui sur PDA. Alors que le milieu KB semble plus favorable au développement du FOL avec une croissance plus rapide que celle de *Trichoderma*, correspondant ainsi à un taux d'inhibition faible qui est de $26,65 \pm 2,94\%$.

Il a été également constaté, que les taux d'inhibitions les plus élevés ont été enregistrés avec l'isolat *T. harzianum* par rapport à ceux provoqués par la souche bactérienne C7R12.



Figure 4.1 : Inhibition *in vitro* du FOL par C7R12



Figure 4.2 : Inhibition *in vitro* du FOL par G4.

4.1.2. Inhibition de l'élongation du tube germinatif

Le comportement noté sur les milieux de culture liquides des trois interactions C7R12+FOL, G4+FOL et C7R12+G4+FOL a montré une hétérogénéité de l'élongation de tube germinatif et de la germination conidienne de l'agent pathogène FOL. Des taux d'inhibition variables ont été enregistrés, selon l'agent antagoniste appliqué et le milieu de culture.

En effet, après 24h d'incubation, l'élongation moyenne de tube germinatif du FOL en présence d'antagonistes est significativement inférieure à celui du témoin. L'élongation moyenne de tube germinatif du témoin sur les milieux PDA, KB et le milieu Mixte est respectivement de $18,56 \pm 3,12\%$, $10,94 \pm 5,43\%$ et $16,59 \pm 5,29\%$ (Tableau 4.3).

L'analyse statistique des taux d'inhibitions de l'élongation de tube germinatif, selon le test de Student ($\alpha=5\%$), a mis en évidence des différences significatives avec les milieux de culture et également avec les agents antagonistes (Appendice C). En présence des agents antagonistes, des diminutions de l'élongation de tube germinatif du FOL ont été constatées, traduisant ainsi des taux d'inhibition importants, dont le taux le plus élevé a été enregistré avec l'interaction du FOL avec la souche bactérienne C7R12 sur le milieu KB ($58,22 \pm 5,43\%$) suivi de celui de l'interaction avec la combinaison C7R12+*Trichoderma* sur le milieu mixte ($57,02 \pm 7,13\%$) (Tableau 4.4).

Concernant l'effet des milieux de culture, il a été noté que chaque antagoniste réagit différemment sur chaque milieu de culture. Selon le test de Tukey ($\alpha=5\%$), trois groupes (sous ensembles homogènes) ont été mis en évidence ; un premier groupe représenté par le milieu PDA qui semble plus favorable à l'action de l'agent antagoniste fongique *Trichoderma harzianum* montrant ainsi des taux d'inhibitions appréciables allant de $48,35 \pm 1,07\%$ à $52,9 \pm 0,56\%$. A l'encontre du premier groupe, le deuxième groupe représente le milieu KB qui est plus favorable à la souche bactérienne C7R12, traduisant ainsi des taux d'inhibitions élevés allant de $48,69 \pm 0,45\%$ à $58,22 \pm 0,2\%$. Quant au milieu mixte caractéristique du troisième groupe, une susceptibilité du FOL à l'action des deux antagonistes fongique et bactérien a été enregistré où les taux d'inhibitions sont importants ($35,68 \pm 1,9\%$, $49,72 \pm 0,93\%$ et $57,02 \pm 1,23\%$) respectivement pour les interactions : FOL+C7R12, FOL+G4 et FOL+G4+C7R12.

Tableau 4.3 : Elongation du tube germinatif de l'isolat FOL (en mm)

Traitement	PDA			KB			Mixte		
	T0	T1	T2	T0	T1	T2	T0	T1	T2
FOL	10,01	12,86	18,56	7,66	8,54	10,94	9,91	12,08	16,59
FOL-C7R12	8,27	9,2	13,35	3,93	4,13	4,57	6,90	8,16	10,67
FOL-G4	5,17	6,11	9,05	5,54	5,89	7,37	5,48	6,08	8,34
FOL-G4-C7R12	6,43	7,33	10,25	5,07	6,56	7,10	5,33	5,47	7,13

T0 :00h T1 :06h T2 :24h

Tableau 4.4 : Taux d'inhibition de l'élongation du tube germinatif de l'isolat FOL

Traitement	PDA			KB			Mixte		
	T0	T1	T2	T0	T1	T2	T0	T1	T2
FOL-C7R12	17,38	23,7	28,07	48,69	51,63	58,22	30,37	32,45	35,68
FOL-G4	48,35	52,48	52,9	27,67	31,03	32,63	44,7	49,66	49,72
FOL-G4-C7R12	35,76	43	44,77	33,8	34,89	35,1	46,21	54,71	57,02

T0 :00h T1 :06h T2 :24h



Figure 4.3 : Isolat fongique témoin



Figure 4.4 : Inhibition de l'élongation du FOL par G4

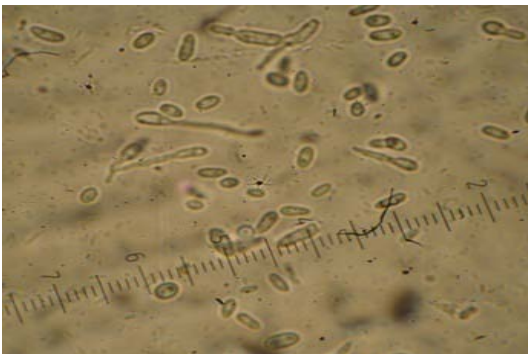


Figure 4.5 : Inhibition de l'élongation du FOL par C7R12

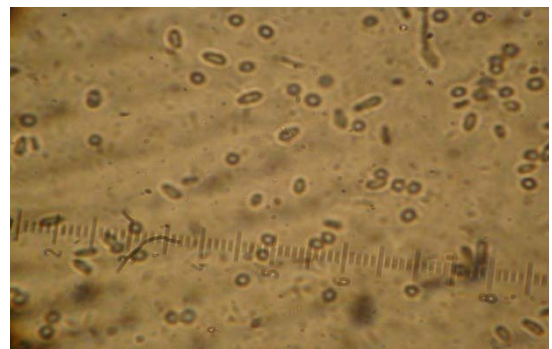


Figure 4.6: Inhibition de l'élongation du FOL par G4+C7R12

4.1.3. Inhibition de la germination conidienne

En plus de l'inhibition de l'élongation du tube germinatif, un décroissement de la germination conidienne en confrontation avec les antagonistes a été également signalé, qui est variable selon les milieux de culture utilisés et la souche antagoniste (Appendice C).

Après 24h d'inhibition, en comparant l'effet d'inhibition de la germination conidienne, il en ressort que les deux souches antagonistes présentent une apparence hétérogène dans leur activité. En effet, les taux de germination des conidies de *Fusarium oxysporum* sur le milieu PDA confronté à C7R12, *T. harzianum* et C7R12+*T.harzianum* sont respectivement de $33,18 \pm 1,9\%$, $11,88 \pm 1,38\%$ et $26,26 \pm 2,11\%$, en le comparant au témoin ($47,13 \pm 2,99$). La souche *Trichoderma harzianum* G4 a montré plus d'antagonisme avec Les taux de germination les plus faibles sur les milieux PDA et mixte ($11,88 \pm 1,38\%$ et $13,07 \pm 2,09\%$) (Tableau 4.5), suivi de la combinaison C7R12+*T.harzianum* qui a montré une efficacité sur les trois milieux de culture.

Tableau 4.5 : Taux de la germination conidienne de l'isolat FOL

Traitement	PDA			KB			Mixte		
	T0	T1	T2	T0	T1	T2	T0	T1	T2
FOL	26,16	38,77	47,13	18,75	22,3	25,32	16,8	24,89	32,33
FOL-C7R12	25,58	27,09	33,18	13,08	14,11	14,89	15,75	16,00	18,22
FOL-G4	11,62	11,73	11,88	16,67	17,09	17,86	12,78	12,99	13,07
FOL-G4-C7R12	13,90	16,14	16,26	11,46	12,04	13,95	10,8	12,73	13,82

T0 :00h T1 :06h T2 :24h

4.1.4. Inhibition du pathogène dans le sol

Dans les sols inoculés uniquement avec le pathogène, un développement mycélien abondant a été constaté après 10 jours de l'infestation des échantillons du sol. Contrairement, dans les sols où les antagonistes ont été apportés, le développement mycélien était faible ou nul (Tableaux 4.6, 4.7, Figure 4.7). Globalement dans les essais où un seul antagoniste ou la combinaison de la souche bactérienne C7R12 avec *Trichoderma harzianum* étaient apportés 24h avant l'infestation du sol par le pathogène, il a été noté une meilleure activité inhibitrice allant jusqu'à l'inhibition totale du pathogène, par rapport aux essais où le ou les antagonistes ont été apportés au même temps que le pathogène (Tableau 4.8). A travers les résultats obtenus, il en ressort de meilleures activités inhibitrices dans les situations où il y a la combinaison des deux antagonistes *Trichoderma harzianum* + C7R12.

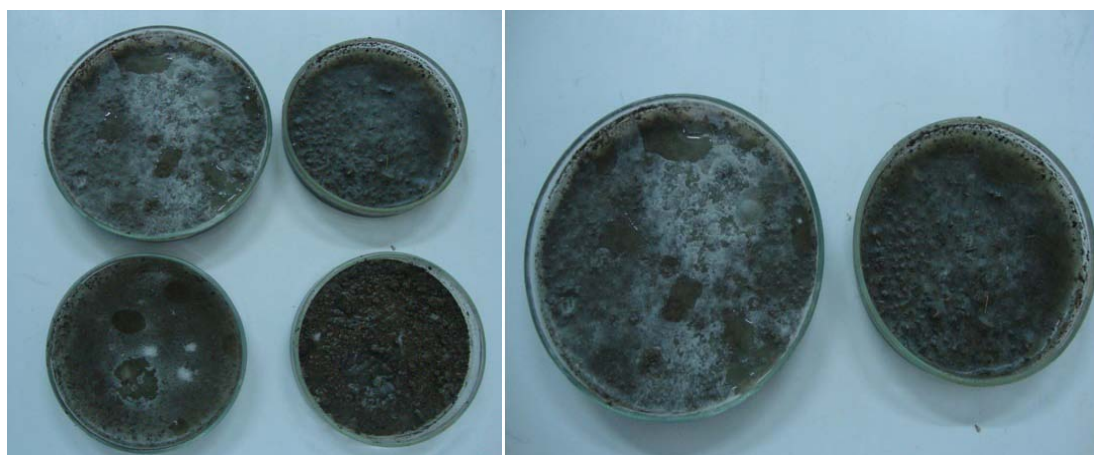


Figure 4.7 : Inhibition du pathogène dans le sol

Tableau 4.6 : Effet des traitements sur le développement du pathogène dans le sol

Traitements	couleur	texture de la colonie	croissance
FOL témoin+	blanche	mycélium ras au centre et aérien à la périphérie (100%)	+++
C7R12	beige	répartition d'une crème bactérienne	-
G4	verte	répartition d'un mycélium verdâtre ras	-
FOL+C7R12	blanche	mycélium ras abondant à la périphérie (50%)	+
FOL+G4	blanche	mycélium ras et subaérien et abondant à La périphérie (80%)	++
FOL+C7R12+G4	blanche	mycélium subaérien et très abondant (90%)	+++

Couleur : couleur de la colonie ; - pas de croissance du pathogène ; + : légère croissance ; +++ : croissance importante ; C7R12 : *Pseudomonas fluorescens* ; G4 : *Trichoderma harzianum* ; FOL: *F.oxysporum*.

Tableau 4.7 : Effet des traitements sur le développement du pathogène dans le sol (24 heures d'intervalle).

Traitements	couleur	texture de la colonie	croissance
FOL témoin+	blanche	mycélium ras au centre et aérien à la périphérie (100%)	+++
C7R12	beige	répartition d'une crème bactérienne	-
G4	verte	répartition d'un mycélium verdâtre ras	-
FOL+C7R12	beige	répartition d'une crème bactérienne sur 75% de La superficie de la boîte avec un mycélium périphérique	-
FOL+G4	verdâtre	mycélium vert ras au centre de la boîte sur 80% de la superficie de la boîte avec un mycélium Périphérique blanchâtre.	-
FOL+C7R12+G4	verdâtre	mycélium vert sur environ toute la boîte avec des Colonies bactériennes au dessous	-

Couleur : couleur de la colonie ; - pas de croissance du pathogène ; + : légère croissance ; +++ : croissance importante ; C7R12 : *Pseudomonas fluorescens* ; G4 : *Trichoderma harzianum* ; FOL: *F.oxysporum*

Tableau 4.8 : Effet des antagonistes sur le développement du champignon pathogène dans le sol

Interactions	croissance	
	au même temps	avant 24h
FOL-C7R12	+*	+*
FOL-G4	+	-
FOL-C7R12-G4	+	-

*: léger développement ; C7R12 : *Pseudomonas fluorescens* ; G4 : *Trichoderma harzianum* ; FOL: *F.oxysporum*

L'effet des antagonistes appliqués sur la sporulation de l'agent pathogène FOL dans le sol, nous a permis de constater que la densité de la population pathogène a été réduite de 10^6 conidie/g du sol à 10^5 conidie/g du sol en présence des antagonistes suite à leur application 24h avant l'inoculation du sol par le pathogène (FOL) (Tableau 4.9, Figures 4.8, 4.9).

Tableau 4.9 : Effet des antagonistes sur la densité du pathogène par gramme du sol.

Interactions	Nombre des conidies /g du sol	
	Au même temps	24h avant
FOL témoin+	$7,2 \cdot 10^6$	$7,6 \cdot 10^6$
FOL+C7R12	$3,6 \cdot 10^6$	$3,1 \cdot 10^5$
FOL+G4	$4,8 \cdot 10^6$	$2 \cdot 10^5$
FOL+C7R12+G4	$2,5 \cdot 10^6$	$1 \cdot 10^5$

Afin de confirmer l'appartenance des populations obtenues au *Fusarium* sp., des observations au microscope ont révélé la présence des formes caractéristiques de mycélium et des fructifications conidienne de *F.oxysporum*.

Selon les résultats obtenus (Tableau 4.9), il a été constaté que la densité fusarienne est en étroite relation avec l'agent antagoniste. Elle est la moindre à très faible dans les prélèvements du sol traité avec *Trichoderma harzianum* suivi des ceux du sol traité avec la souche bactérienne C7R12.

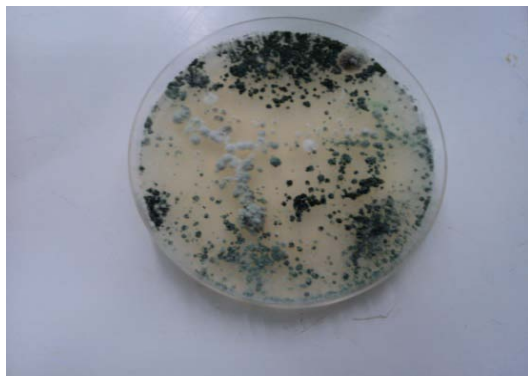


Figure 4.8 : Inhibition de *Fusarium* par *Trichoderma*



Figure 4.9 : Inhibition de *Fusarium* par C7R12

4.1.5. Interprétation des résultats

Avant la mise en œuvre d'une stratégie de lutte contre les champignons phytopathogènes à l'aide des produits biologiques, il est nécessaire de connaître le comportement des agents antagonistes et leurs interactions avec le pathogène. Même si les performances évaluées *in vitro* souvent ne sont pas corrélées aux activités biologiques naturelles, néanmoins ce genre de test reste comme un outil indicateur dans la sélection et le criblage des souches performantes.

Les essais d'antagonisme *in vitro* vis-à-vis de *Fusarium oxysporum* f.sp *lycopersici* ont mis en évidence des effets inhibiteurs suite à l'application des antagonistes. Ces tests ont permis de confirmer les potentialités inhibitrices des deux souches C7R12 et G4.

Des réductions appréciables en croissance de l'agent pathogène, de la germination conidienne ainsi que de l'élongation du tube germinatif ont été enregistrées avec les différentes interactions sur les trois milieux de culture et ce malgré leur composition chimique variée. L'antagonisme entre les deux souches a révélé que la souche G4 a exercé une forte activité antagoniste sur les trois milieux de culture par rapport à celle obtenue par la souche bactérienne C7R12.

Le principal mécanisme mis en cause dans l'effet antagoniste des souches de *Pseudomonas* fluorescents *in vitro* pourrait être liée à la synthèse des sidérophores qui chélatent les ions de fer trivalent, suite à la production de pigments fluorescents [90]. Le fer est un facteur limitant pour le développement

des microorganismes et leurs activités biologiques [78], il a un rôle important dans la régulation de plusieurs métabolites extracellulaires produits par les *Pseudomonas* spp. fluorescents, notamment les siderophores et les antibiotiques [145], autres métabolites fongistatiques [2] et des composés volatils (HCN) [2]. Plusieurs études ont montré qu'il y a une corrélation entre l'intensité de la synthèse de siderophores par les *Pseudomonas* spp. fluorescent *in vitro* et leur aptitude à réduire la germination des chlamydospores de *Fusarium* dans le sol [98, 147, 148, 225]. Cette aptitude s'explique par la forte affinité des pyoverdines pour le fer ferrique (1024 à 1032 moles /l) par rapport aux fusarinines, siderophores synthétisés par *Fusarium* [89, 105, 136], qui sont incapables de se procurer dans un milieu carencé en fer, cet élément nécessaire à la germination des chlamydospores et à l'élongation des tubes germinatifs [148, 225]. Des essais réalisés *in vitro* ont mis en évidence l'importance des pyoverdines sur la réduction de la croissance de nombreux champignons telluriques, surtout les espèces du genre *Fusarium* et *Pythium* [136].

Nos résultats montrent que sur les deux milieux PDA et mixte qui ne sont pas favorables à la production de pigments fluorescents, la souche bactérienne se caractérise par des activités antagonistes importantes. Ceci peut s'expliquer par l'implication d'autres mécanismes d'action, en montrant que la fluorescence indice de synthèse des siderophores, n'est pas subordonnée obligatoirement à l'activité antagoniste.

Même lorsque la synthèse de siderophores est réprimée à la suite de l'enrichissement en fer du milieu de culture, certaines souches de *Pseudomonas* spp. fluorescents continuent à exercer leurs activités antagonistes à l'encontre de divers microorganismes [10]. Ceci s'expliquerait par l'aptitude des *Pseudomonas* à produire d'autres substances inhibitrices qui sont capables de limiter et même de stopper le développement de l'agent pathogène. Ces substances peuvent être des antibiotiques [68, 132], des enzymes et des substances volatiles [2]. Dans ce même sens, plusieurs auteurs ont montré que la production de ces métabolites varie selon le milieu de culture [131].

Des mutants, de la souche CHAO, déficients en synthèse de siderophores ou d'antibiotiques phenaziniques, ont perdu leurs facultés inhibitrices dans des

essais *in vitro* et *in situ*. Cette faculté d'antagonisme a pu être restaurée après insertion plasmidique des séquences géniques codant pour ces métabolites [90]. Ce type d'inhibition a été réalisé également avec d'autres composés comme le 2.4-déacetylphloroglucinol, la pyrrolnitrine, la pyoluteorine et le HCN [2]. L'utilisation de mutants permet d'assurer de façon directe l'implication de tel ou de tel métabolite dans le processus de biocontrôle. Globalement le phénomène d'antibiose peut se manifester soit par une inhibition de la germination des spores des champignons (mycostase), soit par une lyse mycélienne (mycolyse) [61]. L'antibiose exercée par certains *Pseudomonas* spp. fluorescents a d'abord été mise en évidence *in vitro* et plusieurs études ont montré que le 2.4-déacetylphloroglucinol a des propriétés antifongiques [129]. De même Howell et Stipanovic [133], ont mis en évidence l'effet antagoniste de la pyrrolnitrine à l'encontre de *Rhizoctonia solani*. *In vitro* la production de PCN (phénazine-1-carboxamide) a un rôle dans la distorsion de la croissance polarisée des hyphes mycéliens en inhibant leur élongation et leur ramification [226]. La production d'acide cyanhydrique est également impliquée dans l'inhibition de la croissance de plusieurs champignons phytopathogènes via son activité volatile.

Des études ont porté sur le mode d'action des *Pseudomonas fluorescents* mais aussi sur leur capacité à se développer et se maintenir dans les sols et la rhizosphère. Ainsi, grâce à l'obtention de mutants de *P. fluorescents* C7R12 affectés dans la synthèse de pyoverdine et de nitrate réductase, respectivement par mutagenèse aléatoire et dirigée, le rôle de ces deux composés dans la compétence saprophyte de cet agent de lutte biologique dans le sol et la rhizosphère a été démontré [198], de même que le rôle de la pyoverdine dans l'antagonisme microbien et la protection de la tomate contre la fusariose vasculaire.

Les autres métabolites, qui peuvent intervenir dans l'antagonisme microbien, peuvent être la compétition pour les nutriments [10] et pour l'espace [2], ainsi que l'augmentation de la concentration de glucose dans le milieu de culture peut induire une réduction des taux d'inhibition de certains champignons.

Pour le test d'inhibition de l'élongation du tube germinatif des conidies, des microconidies et des macroconidies de *Fusarium oxysporum* présentent des

vitesse de germination et de croissance différentes. La vitesse de croissance est en fonction du nombre de cellules qui composent les spores. Les microconidies unicellulaires germent et croissent lentement; au bout de 6 heures, les tubes germent et atteignent à peine 0,2 mm. Les microconidies bicellulaires germent plus rapidement après 3 heures, leurs tubes dépassent 0,2 mm. La germination des macroconidies est pendant les premières heures, identiques à celle des microconidies bicellulaires, mais, ensuite, l'allongement des hyphes est bien plus rapide [227].

Dans les conditions de carence en fer, la germination et/ou l'élongation des tubes germinatifs des chlamydospores de *F. oxysporum* est très faible en présence de certaines souches de *Pseudomonas* et de leurs pseudobactines purifiées ou de l'EDDHA (éthylène, diamine o-hydroxyphényl, acide acétique). L'ion Fe^{3+} est donc un facteur limitant pour le développement de *Fusarium oxysporum* et des *Pseudomonas* spp. fluorescents; ces dernières sont les plus compétitifs [41, 43, 50].

L'envahissement du mycélium du pathogène par *T. harzianum* a été observé par Benhamou et Chet [49] en réalisant une confrontation directe sur milieu de culture entre cet antagoniste et un autre champignon tellurique *Pythium ultimum*, au bout de quatre à cinq jours après l'inoculation. Cependant, Daami-Remadi et El Mahjoub [228] ont signalé, en testant l'activité antagoniste de *T. harzianum* vis-à-vis de deux espèces de *Pythium*, que pendant les trois premiers jours la boîte de Pétri est totalement envahie par *Pythium* spp et que *T. harzianum* ne commence à exercer son activité antagoniste qu'à partir du 4ème jour d'incubation. Ce même isolat de *T. harzianum* a été testé sur *F. solani* var *coerulum*, *F. solani* var *sambucinum* et *F.roseum* var *graminearum*, responsables des pourritures sèches sur tubercules de pomme de terre envers lesquels ils induisent également une lyse importante au niveau du mycélium des ces pathogènes. Il en est de même des mycéliums de *pythium* spp. en présence du même antagoniste [228]. De même sens, Benhamou [49] a signalé une altération du mycélium de *Sclerotinium rolfsii* causée par *T.harzianum*, se traduisant par une agrégation, une rétraction et une vacuolisation du cytoplasme qui illustre bien le pouvoir hautement myco-parasitaire que possède *T.harzianum*.

Il en ressort que malgré l'absence d'un contact direct entre les isolats de *Fusarium* testés et *T. harzianum*, ce dernier a pu exercer une activité inhibitrice sur le développement des colonies de *Fusarium oxysporum f.sp. radicis-lycopersici*. Ceci s'expliquerait par l'aptitude de *Trichoderma* à produire des substances volatiles qui sont capables de limiter ou même de stopper le développement de l'agent pathogène [228]. Des observations microscopiques réalisées au niveau du mycélium de *F.oxysporum f.sp. radicis-lycopercisi* en présence de *T.harzianum* ont révélé la présence d'une lyse importante et une transformation en cordons du mycélium du pathogène et ce comparativement au témoin non traité. Cela confirme les observations de la confrontation directe. Ces résultats rejoignent ceux obtenus par Chérif et Benhamou [49] qui ont signalé la présence d'altérations avec une perte cytoplasmique du mycélium de *F.oxysporum f.sp. radicis-lycopercisi* suite à l'action du *T.harzianum*, malgré l'absence de contact direct entre les deux champignons.

D'après Comporata [229], cette interprétation favorise 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 mycoparastaire *in vitro*, une induction de l'expression des enzymes chitinolytiques est induite dans les premières heures de contact avec le pathogène, ces enzymes apparaissent à être impliquées dans la pénétration et la mort de l'hôte [230]. Une corrélation directe est signalée entre l'activité chitinolytique *in vitro* et la capacité de biocontrôle de certains isolats de *T. harzianum*. Lorito *et al* [218] ont observé qu'une souche de *Trichoderma harzianum* efficace dans la lutte biologique agissait en premier lieu par la production d'antibiotiques pour tuer l'hôte et beaucoup plus tard produit des enzymes chitinolytiques pour la colonisation saprophytique des tissus de la plante hôte déjà morte.

4.2. Effet de bioprotection

4.2.1. Antagonisme *in situ*

Au cours de la période d'expérimentation, le matériel végétal inoculé avec *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* a montré des réactions variables se caractérisant avec des degrés d'attaque allant de 0 à 100%. Il a été constaté une nette régression de la maladie au niveau des plantes traitées avec les deux antagonistes bactérien et fongique par rapport aux témoins malades (Tableau 4.11). D'après les résultats obtenus, nous avons constaté une variation selon les traitements appliqués (un seul ou une combinaison d'antagonistes) et les variétés de tomate utilisées; dans certains cas nous avons remarqué que les plants traités ayant un développement végétatif plus important ou montrant de légers jaunissements des feuilles basales et des premières feuilles et un système racinaire bien développé, presque similaire à celui des plants témoins.

Les notations individuelles réalisées sur chaque plante ont permis d'exprimer en pourcentage l'évolution de la maladie durant 4 semaines d'observation. Le traitement des plants de tomate, conduite en sol désinfecté par la souche pathogène et l'antagoniste (s) n'a pas engendré de fortes attaques. En effet, le taux d'infection de ces plants n'a pas dépassé 48% et quelques plants seulement ont atteint l'indice 03 de l'échelle symptomatologique appliquée. Pour les plants inoculés uniquement avec le pathogène (témoin malade), l'indice de l'ordre 03 a été observé sur la totalité des plants, même l'indice 04 correspondant à la mortalité de plante.

L'analyse de la variance (ANOVA), en considérant l'essai factoriel ($\alpha=5\%$) des taux d'inhibitions de l'infection, a mis en évidence des différences significatives avec les différents traitements appliqués (Appendice C). En présence des souches antagonistes, des régressions des taux d'infections ont été constaté, traduisant ainsi des taux d'inhibitions importants allant de 51,22 % chez la variété Aicha traitée avec *Trichoderma harzianum* à 65,58 % chez la variété Heinz traité avec l'association de *T.harzianum* avec la souche bactérienne C7R12.

La comparaison des taux d'infection en fin des notations (30 jours) a permis de dégager deux groupes de réponses, en se basant sur la plus petite amplitude significative (PPAS) du test Newman-keuls :

- Le groupe (a) avec les taux d'inhibition les plus élevés, il regroupe les plants de la variété Aicha inoculés avec la souche C7R12
- Le groupe (b) représenté par les plants des deux variétés traités avec les autres traitements.

L'apport de la souche bactérienne antagoniste C7R12 a engendré un retard dans l'apparition des symptômes typiques de la fusariose vasculaire, en réduisant ainsi intensément la cinétique de l'évolution de l'infection par rapport aux témoins malades, dont l'évolution était très rapide avec un taux allant de 45% dans la première semaine à 100% dans la quatrième semaine chez la variété Aicha et de 28,94% à 92% chez la variété Heinz. Ces résultats révèlent une certaine inhibition de l'infection chez de la variété Heinz au *Fusarium oxysporum* par rapport à la variété Aicha (Tableau 4.10).

Tableau 4.10 : Evolution de l'infection (%) de la fusariose vasculaire de la tomate

Traitements	Durée (semaine)			
	1 ^{ère}	2 ^{ème}	3 ^{ème}	4 ^{ème}
Variété Aicha				
FOL	45,00	67,50	97,50	100
FOL -C7R12	00,00	11,36	18,18	36,36
FOL -G4	19,51	34,14	46,34	48,78
FOL -C7R12-G4	16,66	40,00	33,33	36,66
Variété Heinz				
FOL	28,94	57,89	86,84	92,10
FOL -C7R12	00,00	34,14	39,02	39,02
FOL -G4	13,51	29,72	32,34	32,43
FOL -C7R12-G4	09,75	26,82	26,82	31,70

C7R12 : *Pseudomonas fluorescens* ; G4 : *Trichoderma harzianum* ; FOL: *F.oxysporum*.

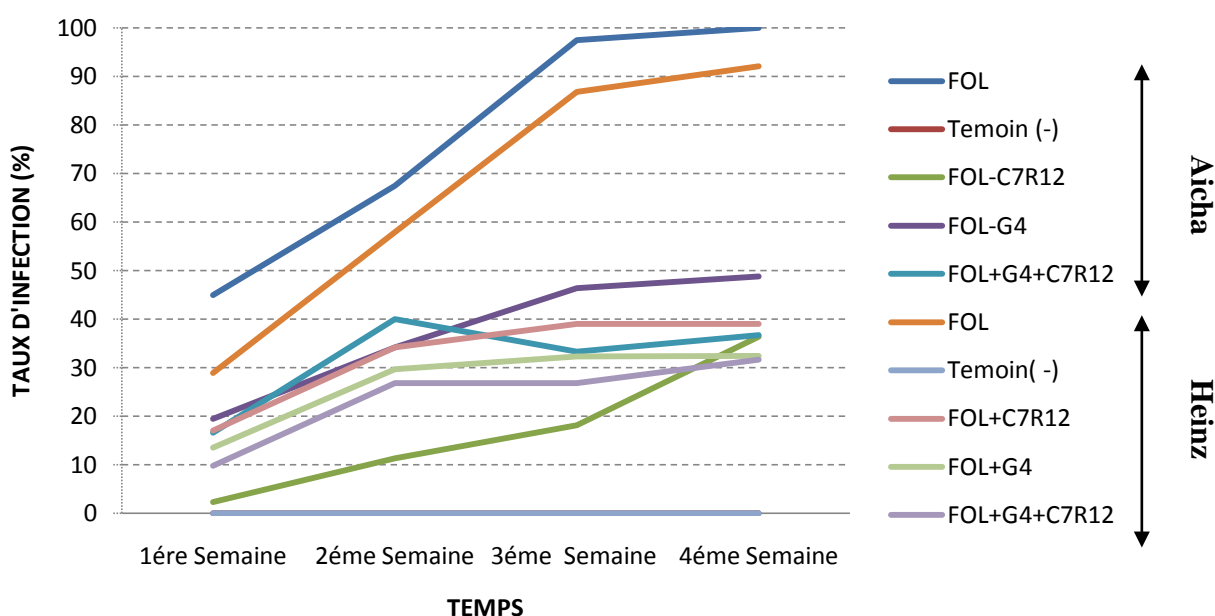


Figure 4.10: Evolution de l'infection (%) de la fusariose vasculaire de la tomate

Bien que la déclaration de la maladie chez les jeunes plants traités avec les autres traitements (G4 et G4+C7R12) ait commencé au même temps que les témoins positifs, des taux d'infection très faibles ont été enregistrés au début de la maladie, dont les moins importants ont été obtenus chez la variété Heinz traitée avec l'association G4+C7R12 au taux de 9,75% suivi de ceux traités avec *T.harzianum* (G4) au taux de 13,51%.

En fin d'expérimentation, après 30 jours, l'association de l'isolat fongique *Trichoderma harzianum* avec la souche bactérienne antagoniste C7R12 a permis d'observer les meilleures performances avec des taux d'infection relativement faibles ne dépassant pas les 31,7% chez la variété Heinz et les 36,66% chez la variété Aïcha. En plus de ces résultats, il en ressort aussi la souche C7R12 a montré une certaine affinité avec la variété Aïcha en permettant d'enregistrer des taux importants d'inhibition de l'infection qui dépasse 63%, alors que l'isolat *T.harzianum* a montré plus de compatibilité avec la variété Heinz avec des taux d'inhibitions similaires à ceux obtenus avec la combinaison (C7R12+*T.harzianum*).

L'estimation de la sévérité de la maladie est calculée sur la base de l'échelle symptomatologique adoptée, a montré une diminution significative de la gravité de la maladie où les antagonistes sont appliqués individuellement ou en

combinaison (Figure 4.10). Comparativement aux témoins malades. La sévérité de la maladie s'est déclarée chez les témoins malades dès le début d'infection avec des taux de 16,87 % et 13,75 % respectivement pour les deux variétés Aicha et Heinz et atteignent les taux de 44,91% et 43,18 % au bout de 21 jours, pour atteindre les taux de 51,25 % et 53,81 % à la fin des notations. Chez les plants traités uniquement avec la souche C7R12, l'apparition de la maladie n'a commencé qu'à partir de la deuxième semaine pour atteindre lentement les taux de 9,09 % et 10,38 % après 30 jours de suivi. Quant aux autres traitements, la sévérité dès la première semaine était moins accentuée par rapport aux témoins malades, allant de 3,04 % à 5 % pour atteindre au maximum le taux de 14,42 % à la fin de l'expérimentation.

Tableau 4. 11 : Effet des traitements sur le développement de la fusariose de la tomate après 30 jours de plantation.

Traitement	infection(%)	sévérité(%)	Inhibition par rapport au témoin positif	
			Infection (%)	sévérité(%)
Variété Aicha				
FOL	100	51,25	-	-
FOL-C7R12	36,36	09,09	63,64	82,26
FOL-G4	48,78	12,19	51,22	76,21
FOL-C7R12-G4	36,66	10,00	63,34	78,94
Variété Heinz				
FOL	92,10	53,81	-	-
FOL-C7R12	39,02	11,55	57,63	78,53
FOL-G4	32,43	14,42	64,78	73,20
FOL-G4-C7R12	31,70	10,38	65,58	80,76

C7R12 : *Pseudomonas fluorescens*; G4 : *Trichoderma harzianum*; FOL: *F.oxysporum*

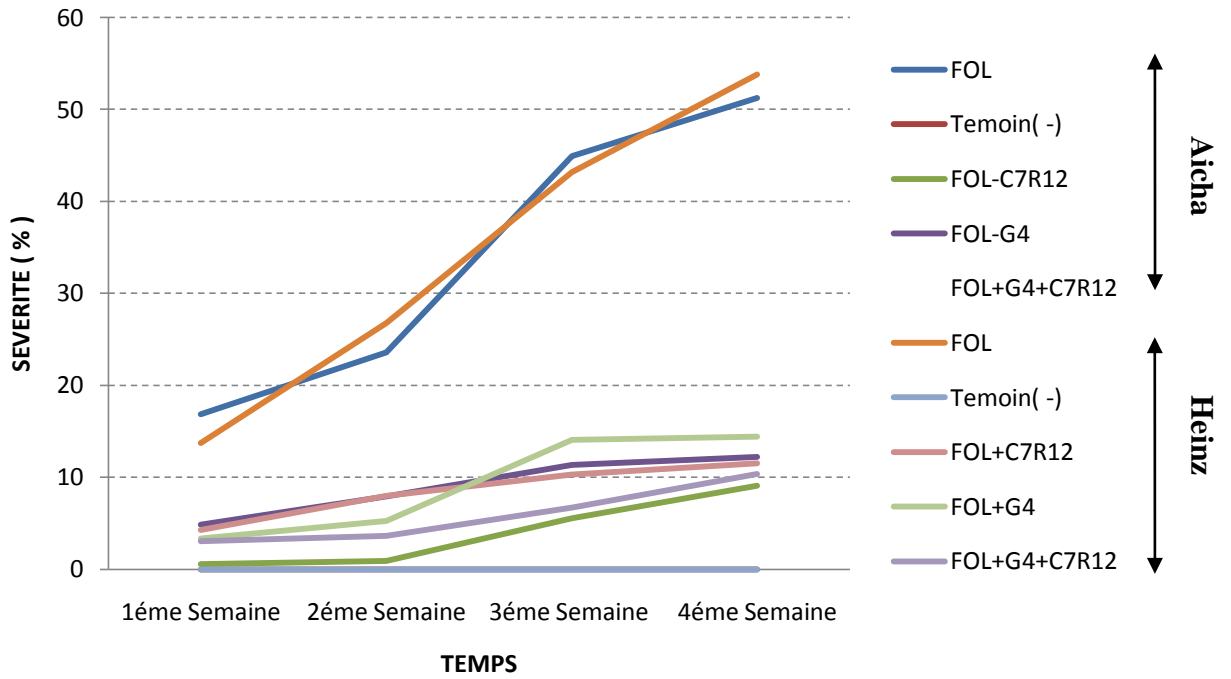


Figure 4.11: Evolution de la sévérité (%) de la fusariose vasculaire de la tomate.

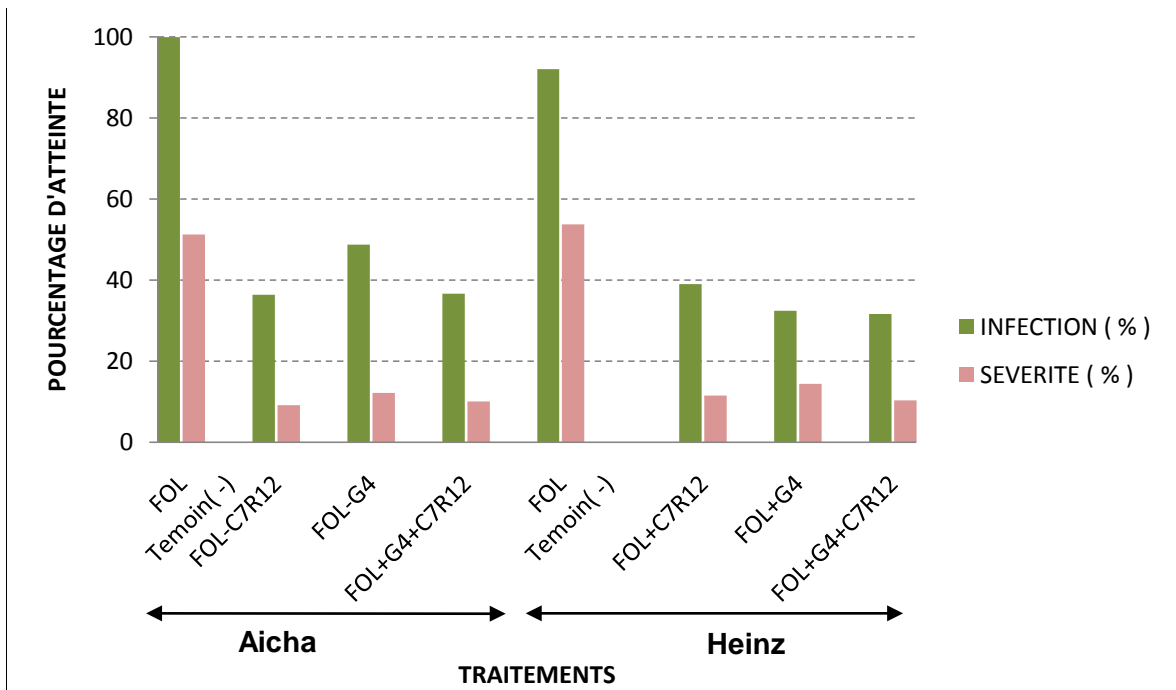


Figure 4.12 : Effet des traitements sur le développement de la fusariose vasculaire de la tomate.

4.2.2. Effet de phytostimulation

4.2.2.1. Paramètres de croissance

4.2.2.1.1. Cinétique de la croissance

Selon les résultats obtenus, il a été constaté une différence dans la cinétique de croissance entre les différents traitements étudiés. Il a été remarqué une croissance plus rapide chez les plants de la variété Aicha traités par la souche de *Pseudomonas* C7R12, et par la combinaison des deux souches C7R12 de *Pseudomonas* et G4 de *Trichoderma harzianum*, quant à la variété Heinz, la croissance était plus rapide avec la souche G4 et par la combinaison C7R12 et G4. Cette cinétique est plus apparente pendant la deuxième et la troisième semaine, où nous avons enregistré des hauteurs de 32.45 cm et de 46.12 cm chez les plants bactérisés par la souche C7R12. A la quatrième semaine de culture, les plants traités par l'interaction C7R12-G4 ont enregistré les meilleures hauteurs 55,6cm et 49,12cm, respectivement, pour les deux variétés Aicha et Heinz. Les autres traitements étudiés ont présenté des croissances supérieures par rapport aux témoins.

4.2.2.1.2. Hauteur des tiges

L'estimation des hauteurs des tiges chez les plants traités avec les antagonistes a mis en évidence une meilleure élévation de la partie aérienne par rapport aux témoins, dont les hauteurs maximales ont été enregistrées chez les deux variétés suite leur traitement avec la combinaison C7R12-G4, (49,12 cm) et (55,16 cm) respectivement pour les variétés Heinz et Aicha, contre 38,78 cm et 42,74 cm chez les témoins sains non traités (Tableau 4.12, Figure 4. 13).



Figure 4.13 : Vue comparative entre plant traité et non traité (témoin négatif).

4.2.2.1.3. Poids sec et frais de la partie aérienne

Pour le poids frais, Les meilleures performances ont été enregistrées chez les plants de la variété Heinz traités par la souche de *Trichoderma harzianum* G4, qui a révélé les poids les plus élevés (36,37g), comparativement au témoin (15,64g), Alors que les plants de la variété Aicha ont montré les meilleurs poids avec leur interaction avec la souche de *Pseudomonas* C7R12 (35,15g). Les autres interactions entre la souche C7R12 et G4 avec les deux variétés Aicha et Heinz ont montré des poids supérieurs à celui du témoin (Tableau 4.12).

Les pesées en poids sec ont montré des différences significatives très notables entre les plants traités et ceux non traités (témoins). Les effets maximums ont été enregistrés chez la variété Aicha avec les deux souches C7R12 et G4 en enregistrant des valeurs qui dépassent le 5g, comparativement au témoin qui a enregistré la valeur de 3,7g. La combinaison (C7R12+G4) a montré des résultats rapprochés aux témoins sains chez les deux variétés.

Tableau 4.12: Hauteur (cm), poids frais et sec(g) de la partie aérienne

	Hauteur	poids frais	poids sec
Variété Aicha			
FOL	17,61 ± 4,66*	16,39 ± 0,83	0,83 ± 0,24
Témoin-	42,74 ± 2,50	27,14 ± 4,21	3,70 ± 0,74
FOL-C7R12	48,02 ± 6,06	35,15 ± 3,70	5,33 ± 0,45
FOL-G4	42,05 ± 2,61	29,74 ± 6,82	5,14 ± 0,31
FOL-C7R12-G4	55,16 ± 5,81	33,84 ± 2,02	3,90 ± 0,67
Variété Heinz			
FOL	20,25 ± 2,34	15,64 ± 2,52	0,99 ± 0,34
Témoin-	38,78 ± 5,51	31,29 ± 4,40	3,35 ± 0,39
FOL-C7R12	47,01 ± 3,32	24,15 ± 0,41	1,96 ± 0,45
FOL-G4	48,00 ± 4,28	36,37 ± 0,24	4,66 ± 0,56
FOL-C7R12-G4	49,12 ± 4,40	34,01 ± 0,39	3,71 ± 0,24

(*): écart type issu d'une trentaine de répétition ; C7R12: *Pseudomonas fluorescens* ; G4 : *Trichoderma harzianum* ; FOL: *F.oxysporum*

4.2.2.1.4. longueur des racines

Les mensurations relatives à la longueur des racines montrent des variances notables chez les plants traités par les antagonistes, par rapport à leurs témoins respectifs. La longueur maximale moyenne (27,37 cm) a été notée chez les plants de la variété Aicha bactérisés avec la souche C7R12, suivie de ceux traités avec la combinaison C7R12-G4. Chez la variété Heinz, les meilleures longueurs ont été enregistrées avec leur traitement avec la souche G4 de *Trichoderma* (Figure 4.14).

4.2.2.1.5. Poids sec et frais de la partie racinaire

La comparaison des poids des systèmes racinaires montre des différences significatives entre les plants traités et ceux non traités. Ce constat est rapporté chez les deux variétés. Les poids frais racinaires les plus importants ont été obtenus chez les racines de la variété Aicha bactérisées avec la souche C7R12 (Tableau 4.13).

Les observations concernant les poids secs des racines ont montré des différences significatives pour les trois traitements appliqués sur les deux variétés, chez la première variété (Aicha), les meilleurs poids ont été observés avec la souche C7R12 et la combinaison C7R12-G4. Chez la deuxième variété (Heinz), Nous constatons que les effets des traitements sont presque similaires avec leurs témoins sains, sauf la souche G4 qui a montré un poids supérieur à celui du témoin (3,57g).



Figure 4.14 : Vue comparative des racines d'un plant traité (C7R12) et non traité

Tableau 4.13: Longueur (cm), poids frais et sec(g) de la partie racinaire

	Longueur	Poids frais	Poids sec
Variété Aicha			
FOL	09,67 ± 0,40	08,89 ± 2,19	01,34 ± 0,12
Témoin-	15,33 ± 5,50	18,33 ± 3,20	02,63 ± 0,55
FOL-C7R12	27,37 ± 0,06	26,13 ± 4,31	03,27 ± 0,65
FOL-G4	14,45 ± 3,13	19,55 ± 2,12	02,97 ± 0,21
FOL-C7R12-G4	22,10 ± 4,34	22,53 ± 1,33	03,09 ± 1,37
Variété Heinz			
FOL	07,25 ± 2,14	07,72 ± 2,52	01,02 ± 0,27
Témoin-	12,48 ± 7,01	19,14 ± 4,24	02,35 ± 0,39
FOL-C7R12	17,02 ± 5,10	23,22 ± 3,05	02,46 ± 0,35
FOL-G4	24,00 ± 5,18	25,40 ± 3,58	03,57 ± 0,08
FOL-C7R12-G4	15,97 ± 1,19	21,59 ± 2,27	02,71 ± 0,14

C7R12 : *Pseudomonas fluorescens* ; G4 : *Trichoderma harzianum* ; FOL: *F.oxysporum*

4.2.2.2. Dosage des protéines totales

L'analyse des protéines totales foliaires a montré une variabilité selon les traitements appliqués (Tableau 4.14). Comparativement aux témoins malades, tous les traitements leur restent supérieurs. Même en comparant certains traitements au témoin sain, nous constatons des gains significatifs, particulièrement chez les plants traités avec l'interaction C7R12-G4 où les gains sont de 10,59%, synonyme d'une stimulation du métabolisme général de la plante.

4.2.2.3. Dosage de la chlorophylle

Le dosage de la chlorophylle montre une différence significative entre les traitements étudiés. Des teneurs très appréciables en chlorophylle (a) ont été obtenues chez tous les plants traités, sauf ceux de la variété Heinz traités par la combinaison C7R12-G4 qui restent inférieurs au témoin sain. Concernant les teneurs en chlorophylle (b), tous les plants traités par les antagonistes ont montré des valeurs supérieures comparativement aux témoins sains. Chez les plants de la variété Heinz, les antagonistes ont induit des teneurs en la chlorophylle (c)

supérieurs comparativement aux témoins sains, contrairement aux plants de la variété Aicha qui montrés des teneurs supérieures aux témoins malades mais inférieures par rapport aux témoins sains (Tableau 4.14).

Tableau 4.14: Effet des traitements sur la phytostimulation des plants de tomate

Traitement	Chlorophylle (mg/g MF)			Protéines totales (mg/ml de l'extrait)
	Chl(a)	chl(b)	chl(c)	
Variété Aicha				
FOL	1,59 ± 0,18	0,079 ± 0,01	0,73 ± 0,01	0,67 ± 0,32
Témoin(-)	2,09 ± 0,11	0,40 ± 0,08	1,56 ± 0,10	1,51 ± 0,52
FOL-C7R12	2,01 ± 0,11	0,33 ± 0,03	0,87 ± 0,01	1,49 ± 0,94
FOL-G4	1,88 ± 0,20	0,20 ± 0,01	0,89 ± 0,01	1,32 ± 0,50
FOL-C7R12-G4	1,90 ± 0,37	0,31 ± 0,05	0,82 ± 0,02	1,67 ± 0,14
Variété Heinz				
FOL	1,49 ± 0,12	0,025 ± 0,02	0,71±0,01	0,76 ± 0,25
Témoin (-)	1,80 ± 0,10	0,32 ± 0,02	0,78±0,01	1,09 ± 0,93
FOL-C7R12	1,84 ± 0,14	0,16 ± 0,01	0,78±0,03	1,04 ± 0,84
FOL-G4	1,86 ± 0,20	0,20 ± 0,06	1,49±0,12	1,08 ± 0,47
FOL-C7R12-G4	1,69 ± 0,15	0,10 ± 0,01	1,50±0,15	1,18 ± 0,04

C7R12 : *Pseudomonas fluorescens* ; G4 : *Trichoderma harzianum* ; FOL: *F.oxysporum*

4.2.3. Quantification des gains

La quantification des gains, après étude comparative entre les traitements et leurs témoins, montre que les effets sont très notables à la fin des observations, c'est-à-dire après 4 semaines de suivi. En effet, nous constatons que les effets de bioprotection, assurés par les antagonistes appliqués, procurent aux plants de tomate une activation physiologique. Cette phytostimulation s'est traduite à travers les accroissements enregistrés, par rapport aux témoins, notamment en terme de gains en biomasse aérienne et racinaire (poids frais et sec), la stimulation de l'activité chlorophyllienne (chlorophylle a, b et c) et protéique. Ces activités physiologiques stimulées peuvent être le fruit de la régression ou de l'élimination du symptôme, tout en activant la physiologie générale de la plante et son métabolisme.

Pour l'ensemble des paramètres de croissance évalués, les taux de gains varient selon les traitements appliqués, sachant bien que les conditions dans lesquelles nos essais ont été réalisés (la conduite en pot), ne sont pas assez favorables pour une croissance végétale optimale.

Nos résultats montrent l'obtention de gains en phytomasse aérienne, qui varient de l'absence des gains à 29,05 et de 21,22 % à 26,66% respectivement pour les variétés Aicha et Heinz en hauteur ; de 9,57% à 29,51 % en poids frais, et de 5,40% à 44,05 % en poids secs (Figure 4.15).

La phytostimulation a été aussi notable au niveau de la partie souterraine. Les gains en volume racinaire sont assez appréciables, atteignant des niveaux en longueur (92,30 %), en poids frais (42,55 %) et en poids sec (51,91 %) (Figure4.16).

Même si la phytostimulation a été enregistrée sur la partie aérienne, le constat général fait ressortir que les effets de biostimulation sont plus importants au niveau de la partie souterraine.

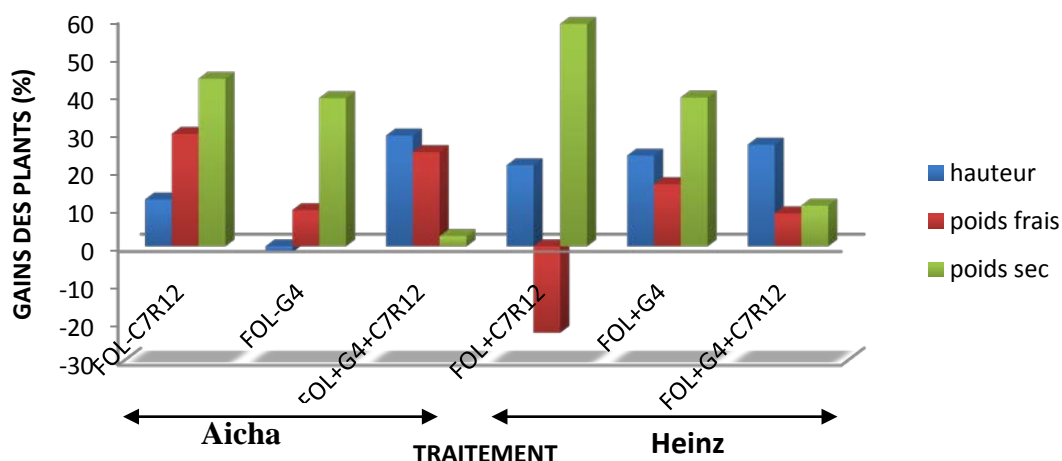


Figure 4. 15 : Gains en hauteur, en poids sec et frais des plants de tomate.

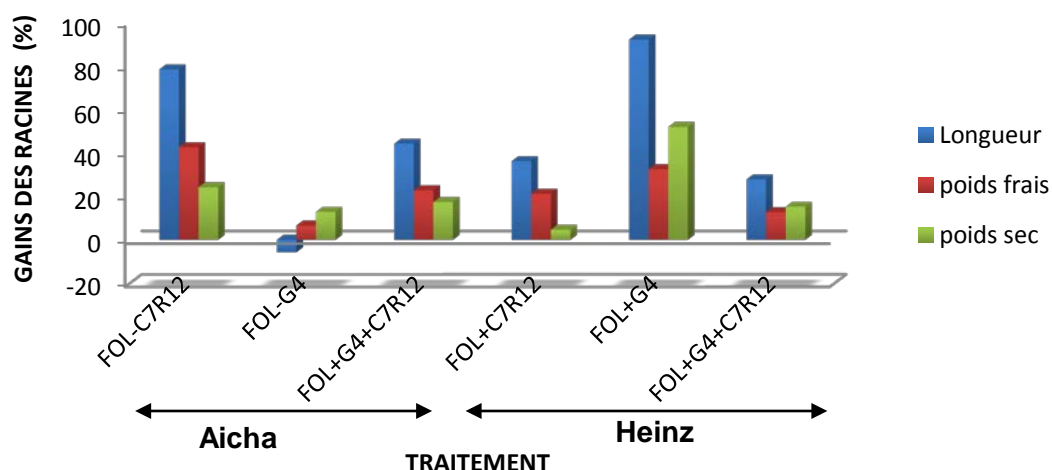


Figure 4.16: Gains en longueur, en poids frais et sec des racines des plants

4.3. Vérification de la viabilité des agents microbiens

Les vérifications sur des échantillons de sol, aléatoirement prélevés des différents traitements, ont montré que les agents fongiques sont toujours actifs et présentent un développement important.

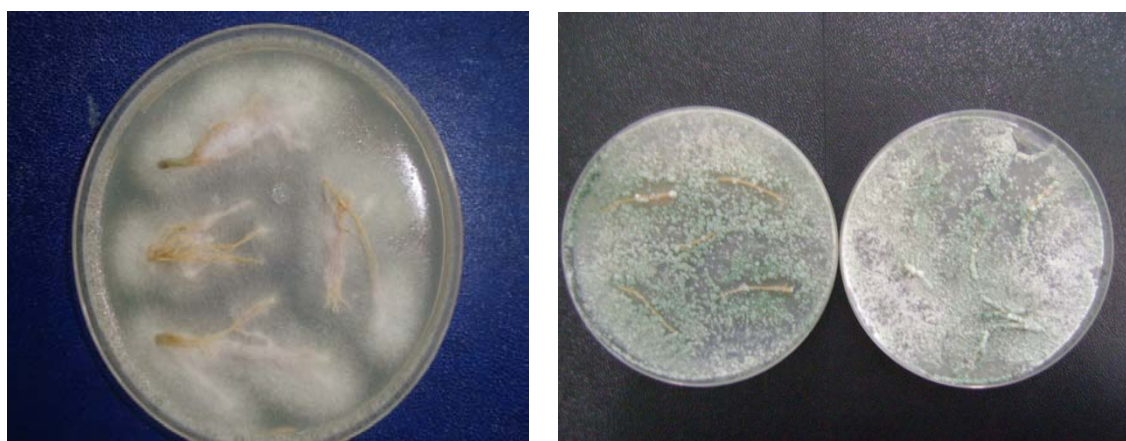


Figure 4.17 : Fragments de racines de tomates traités après 4 jours d'incubation.

Les observations effectuées sur les fragments racinaires, après 72 heures d'incubation à 27°C, révèlent la présence de nombreuses colonies de *Pseudomonas fluorescens* C7R12 autour de ces fragments (Figure 4.14).



Figure 4.18: Fragments des racines de tomate bactérisés par *Pseudomonas fluorescens* C7R12 après 24 heures d'incubation.

Sur la base des concentrations initiales apportées dans le sol, nous avons constaté pour la souche de *Pseudomonas fluorescens* C7R12, une nette évolution de leurs populations bactériennes avec des degrés de colonisation appréciables (Figure 4.19). En effet, nous avons noté des concentrations bactériennes très élevées, de l'ordre de 10^9 CFU/g de sol, par rapport à la concentration initialement introduite qui est de 10^8 CFU/g de sol.



Figure 4. 19 : Boite présentant des colonies bactériennes sur le milieu King B après 24 heures d'incubation.

4.4. Interprétation des résultats

Les essais d'antagonisme *in situ* ont mis en évidence la capacité des souches antagonistes utilisées (C7R12 et G4) à induire aux plants de tomate des effets bénéfiques significatifs, de protection vis-à-vis *Fusarium oxysporum* f.sp. *lycopercisi* et de phytostimulation. Cette bioprotection s'est traduite par une nette réduction de l'infection et de la sévérité des symptômes. Cette dernière est variable selon les souches antagonistes appliquées et leurs associations ainsi que la variété de la tomate utilisée.

L'analyse des résultats ont révélé le pouvoir inhibiteur des souches antagonistes, en montrant que le pourcentage des plants malades, la sévérité des symptômes ainsi que la cinétique de leur évolution sont toujours inférieurs par rapport aux témoins. Les meilleures performances de protection ont été obtenues avec l'association des deux antagonistes (C7R12+G4). Les effets de protection de la souche G4 étaient meilleurs chez la variété Heinz, contrairement à la variété Aicha où la souche bactérienne C7R12 a induit une meilleure protection.

La réduction de la sévérité de la maladie, provoquée par la souche C7R12, peut s'expliquer par les divers mécanismes connus chez cette souche, telle que la synthèse des siderophores (pyocheline et pyoverdine) et d'antibiotiques.

La croissance de divers champignons, en présence de souches de *Pseudomonas* spp. fluorescents, a été réduite à cause des carences en fer constatées. Ainsi l'introduction de la souche WCS358 dans le sol provoque une diminution du taux de germination de chlamydospores de plusieurs espèces des *Fusarium* par la synthèse des sidérophores [231]. L'activité antagoniste exercée par la pyoverdine est effectivement liée à la compétition pour le fer, puisqu'elle est annulée lors de son apport [174, 136]. A l'inverse, l'activité antagoniste des *Pseudomonas* spp fluorescents a été plus importante en abaissant la concentration en fer disponible, à la suite de l'introduction d'un puissant ligand du fer : (EDDHA) éthylène, diamine [(o-hydroxyphényl), acide acétique] [89, 225].

La compétition pour le fer n'est cependant pas le seul mode d'action chez ces rhizobactéries; même lorsque la synthèse de sidérophores est réprimée chez

la souche CK400 (=CHAO, sid-) déficient en synthèse de siderophores, Son antagonisme reste appréciable à l'encontre de divers pathogènes telluriques. D'après Defago [68], cette souche synthétise également des composés antibiotiques, tels que le 2,4 - diacétylphloroglucinol et la pyolutéorine souvent associés à la bioprotection exercée par cette bactérie [129]. Le 2,4 - diacétylphloroglucinol synthétisé par la souche CHAO est en partie responsable de son activité antagoniste à l'encontre de *Geaumanomyces graminis* var. *tritici*. La production de pyrrolnitrine par *P. fluorescens* est impliquée dans le contrôle de certains agents pathogènes racinaires comme *Rhizoctonia solani*, *Verticillium dahliae*, *Geaumanomyces graminis* et *Fusarium oxysporum* [232, 233]; d'ailleurs un dérivé de cette molécule a été développé comme fongicide agricole (fludoixonil). En outre, la pyolutéorine est produite par plusieurs espèces de *Pseudomonas* mais son rôle dans la suppression des agents phytopathogènes a été étudié surtout chez les souches CHAO et Pf 5 de *P. fluorescens*. D'après les travaux de Thomashow [91], la tropolone produit par les *Pseudomonas* manifeste des propriétés antagonistes à l'encontre de plusieurs champignons des genres *Alternaria*, *Cladosporium*, *Diplodia*, *Fusarium*, *Helminthosporium*, *Pythium*, *Rhizoctonia* et *Pyricularia*. Enfin la production de l'acide cyanhydrique (HCN) par la souche CHAO est responsable de l'inhibition des maladies causées par *P. ultimum* et *Thielaviopsis basicolae* [68], il agit directement sur les cellules de l'agent pathogène en bloquant les cytochromes oxydases dans la chaîne respiratoire [234].

L'implication de certains métabolites secondaires confère également une meilleure adaptation écologique à la bactérie [88, 134], Ainsi au niveau de la rhizosphère, la production d'HCN peut être avantageuse, du fait que cet élément cause une augmentation de l'exsudation racinaire. Ce métabolite peut aussi contribuer dans l'acquisition de quelques ions métalliques en formant des complexes avec ceux-ci. L'avantage de la production de phénazines pour la colonisation et la survie dans la rhizosphère a également été démontré en comparant le comportement des souches parentales et des souches mutantes [91].

De nombreux travaux ont utilisé *T.harzianum* dans des essais réalisés sous serres où en plein champs ont montré son efficacité antagoniste vis-à-vis de plusieurs formes spéciales de *Fusarium oxysporum* et d'autres champignons pathogènes [17]. L'effet bénéfique du *T.harzianum* a été signalé par Sivan *et al* [235] qui ont montré que l'enrobage des semences de tomate à l'aide de cet antagoniste a réduit de 80% l'attaque de la fusariose des racines et du collet de la tomate. De plus, l'application de *T.harzianum* dans le substrat de culture réduit significativement l'incidence de la maladie durant la saison de culture et par conséquent une augmentation significative de 18,8% du rendement total est obtenue. Des résultats similaires ont été obtenus par Hjeljord *et al* [236], qui ont montré que l'application des conidies quiescentes de *T.harzianum* sur les fleurs de fraisier permettait une réduction de plus de 85% des attaques de *Botrytis cinerea* à une température de 24°C. La bioprotection assurée par cette souche en quantité reste assez proche de celle des antagonistes bactériens, mais en qualité peut être différente. Cette différence réside dans la nature des modes d'action développés par ce champignon antagoniste. Globalement les effets bénéfiques réalisés chez cet isolat impliqués dans le biocontrôle des fusarioses vasculaire s'expliquent selon trois mécanismes majeurs: compétition pour les nutriments, l'occupation des sites d'infection, l'induction de la résistance systémique et l'antibiose. Davet *et al* [237] ont montré que lors de l'inoculation du sol par *Trichoderma*, il est nécessaire d'introduire l'inoculum avec un support qui lui fourni une base nutritive suffisante pour échapper, au moins temporairement, à la compétition des autres microorganismes telluriques. Ainsi, la tourbe, adhérant aux racines des plantules, est utilisée comme support physique afin de permettre à l'inoculum de *Trichoderma* de se multiplier au cours des premiers jours loin de l'influence des populations microbiologiques du sol.

Les résultats obtenus dans notre expérimentation, mettent en évidence également des effets significatifs appréciables de phytostimulation des plants de tomate. Cette stimulation de la croissance s'est traduite par des gains en cinétique de croissance, en phytomasse aérienne et racinaire et en teneur de la chlorophylle et de protéines totales.

La biostimulation induite par les PGPR est la conséquence de synthèse de métabolites secondaires analogues aux phytohormones et à l'amélioration de l'alimentation hydrominérale de la plante [238]. Les *Pseudomonas* spp. fluorescents peuvent agir directement sur la plante en modifiant positivement sa physiologie, tout en améliorant son bilan minérale, et son métabolisme en induisant meilleure résistance [225]. Les *Pseudomonas* spp. fluorescent peuvent provoquer une très intense stimulation des voies métaboliques secondaires conduisant notamment à la production de quantités importantes en composés protéiques liés aux mécanismes de défense de la plante hôte [2], notamment la production de l'acide salicylique [74, 239] de jasmonate [240] et de l'éthylène [24].

Les mécanismes proposés par lesquels les PGPR stimulent la croissance des plantes, incluent la synthèse bactérienne d'hormones analogue à ceux des végétaux, tels que l'AIA [78]; les cytokinines, les gibbérellines et même des vitamines [241]. En cas de manque en éthylène produit par la plante, il peut être remplacé par l'ACC (Aminocyclopropane-1-carboxylate désaminase) d'origine bactérienne [105]. L'acide gibbérellique agit en permettant la croissance d'un plus grand nombre de germes [242].

L'amélioration des acquisitions hydrominérales se réalise par l'évaluation de la disponibilité des éléments nutritifs assimilables par les plantes, surtout que la tomate se classe parmi les plantes très exigeantes en fer, en phosphore et en manganèse.

Le fer ionique est considéré parmi les mécanismes susceptibles d'être influencé par la présence des PGPR dans le sol. Pour la plante, les besoins en cet élément sont considérés comme les plus élevés, entre les oligoéléments; allant à des niveaux de 100 g/ha et qui peut être bloqué en cas de fortes alcalinité ou acidité dans le sol [244]. L'intervention des sidérophores microbiens, et en particulier ceux des *Pseudomonas* fluorescents, peuvent influencer directement l'alimentation de la plante en fer. Si l'excrétion de sidérophores par les rhizobactéries est abondante, la plante trouvera à sa disposition du Fe⁺⁺⁺ chélaté qu'elle pourra assimiler facilement [244] sous forme de complexe fer-sidérophore [70].

Dans les sols agricoles, la dissolution des phosphates inorganiques est étroitement liée à l'activité des microorganismes du sol [244]. Le phosphore est souvent immobilisé sous forme de phosphates insolubles (phosphates de calcium, de fer ou d'aluminium...) [244]. La souche (P221) de *Pseudomonas fluorescens* est capable, en conditions contrôlées, de transformer le phosphore total en phosphate assimilable par les céréales [245]. De son côté, Lemanceau [2] pense que les *Pseudomonas* spp. fluorescents, augmenteraient la concentration en phosphore soluble dans le sol, soit par minéralisation des phosphates organiques, grâce à des phosphatases, soit par solubilisation des phosphates inorganiques sous l'effet d'acides libres. La réduction du manganèse dans le sol par les *Pseudomonas* spp. fluorescents pourrait augmenter sa disponibilité et favoriser son assimilation par la plante [2].

Le dosage des protéines totales a révélé des concentrations plus importantes dans les extraits foliaires des plantes traitées par les antagonistes appliqués, ce qui suggère la présence des métabolites protéiques associés aux mécanismes de défense de la plante. L'accumulation de produits d'origine protéique a été associée à l'activation des systèmes de défense suite à la bactérisation des plants par les *Pseudomonas* spp. fluorescents du pois contre la fusariose vasculaire sous forme de protéines PR, de glucanases β -1-3 et des endochitinases [101]. En effet les familles des glucanases β 1-3 et des chitinases semblent agir en synergie, pour une meilleure efficacité de leur potentiel destructeur de l'agresseur [10].

Les résultats du test de viabilité microbienne, dans les essais de la phytostimulation des plants de tomate montrent que la souche bactérienne inoculée C7R12 et l'isolat fongique G4 ont réussi à coloniser intensivement le sol expérimenté. D'ailleurs cette souche, C7R12, est utilisée dans de nombreuses études relatives à la compétence rhizosphérique. Selon Raaij-makers *et al* [231], une bonne colonisation rhizosphérique se traduit par une densité de 10^5 cfu /g de sol. La colonisation intensive de la surface de la plante et de la rhizosphère par les rhizobactéries, améliore la croissance et le développement des plantes [231]. La colonisation rhizosphérique peut empêcher les agents pathogènes de s'installer sur ou dans les plantes. Cependant, les interactions directes et indirectes, entre

les rhizobactéries et les pathogènes, réduisent le développement et la sévérité des maladies [10].

Les PGPR doivent être présents sur les racines en nombre suffisant pour induire des effets bénéfiques sur les plantes afin de pouvoir instaurer une compétition pour les nutriments dans la rhizosphère [14]. Outre la vitesse de croissance intrinsèque, les autres propriétés renforçant le potentiel colonisateur d'une souche, telles que la mobilité (présence d'un flagelle) [101], le chimiotactisme et la faculté d'utilisation des composés excrétés par les racines, en tant que sources de carbone et d'azote, sont des caractéristiques recherchées chez les souches bactériennes bénéfiques [171]. D'après Digat [145], une souche bactérienne stimulatrice pour qu'elle soit efficace, elle doit pouvoir parvenir à coloniser efficacement la spermosphère et/ou la rhizosphère. Donc, la capacité de coloniser les racines par les PGPR est considérée comme un critère déterminant, de l'efficacité de l'inoculum dans la stimulation de la croissance et le biocontrôle des maladies [91]. La compétence rhizosphérique chez les *Pseudomonas*. spp. fluorescents dépend de leurs caractéristiques intrinsèques, donc génotypiques et des conditions rhizosphériques. Ces dernières sont déterminées par le sol, la plante et la flore tellurique. D'ailleurs, la colonisation rhizosphérique dépend, aussi bien de la concentration bactérienne apportée que de la technique de bactérisation utilisée. La nature du support des inoculums bactériens, introduits au niveau de la rhizosphère ou sur les semences, joue un rôle important dans le maintien de la viabilité des bactéries [80]. Généralement la durabilité de la résistance pour les PGPR diffère d'une culture à une autre et aussi selon les souches bactériennes appliquées [120].

L'observation de l'état des plants inoculés par le pathogène et par l'antagoniste, comparativement à ceux du témoin sain, montre que les plants traités avec *Trichoderma harzianum* présentent un développement végétatif plus important. De même la comparaison du système racinaire des plants traités par l'antagoniste et le pathogène à celui des plants témoins inoculés par le pathogène seul, montre une nette différence entre les deux. En effet, pour les plants traités par *T.harzianum*, le système racinaire se développe normalement et aucun brunissement ou pourriture sont observés [228]. Windham *et al* [246] ont montré

que l'addition de *T. harzianum* et de *T.koningii* à un sol préalablement autoclavé a augmenté le pourcentage de germination des semences de tomate et de tabac en le comparant au témoin et que l'application de ces deux espèces au substrat de culture a amélioré le poids sec des racines ainsi que la partie aérienne de ces deux espèces qui représentait 213% à 291% de celui du témoin non traité. De même sens, Yedidia *et al* [215] ont rapporté que l'application de *T.harzianum* à une culture hydroponique de melon a entraîné un meilleur développement des plants traités par rapport aux plants non traités par le *Trichoderma*. Cela s'explique par une activation de système de défense de la plante, une augmentation de l'activité chitinase et peroxidase et un accroissement de l'activité enzymatique dans les feuilles induisant ainsi une résistance systémique chez ces plants. *Trichoderma* spp peuvent stimuler la croissance des plantes par l'augmentation des éléments nutritifs, par une efficacité dans l'utilisation de l'azote, et par la solubilisation des éléments nutritifs dans le sol [216]. Il a été montré que *Trichoderma harzianum* 1295-27 solubilisait le phosphate et les micro-éléments impliqués dans la stimulation de la croissance végétale [255]. Les mécanismes de stimulation de croissance pourraient être dus à la suppression des dommages oxydatifs sur les racines, à la sécrétion de facteurs de croissance par le champignon [216].

4.5. Discussion générale

Dans les systèmes de production des matières premières d'origine végétale, ce sont essentiellement les pesticides de synthèse qui sont utilisés pour lutter contre les agents phytopathogènes. Ces dernières années, Il est clairement considéré, et même mis en cause que ces produits chimiques constituent une menace sérieuse pour l'environnement et la santé humaine. Actuellement, un intérêt particulier s'est porté sur l'exploitation des ressources microbiennes bénéfiques dans la gestion des écosystèmes et dans les pratiques agronomiques. Le recours aux ressources biologiques renouvelables est considéré comme un potentiel important alternatif à ces pratiques indésirables. Les rhizobactéries "PGPR" et champignons "PGPF" renferment une source de microorganismes qui peuvent stimuler la croissance des plantes, tout en assurant leur bioprotection. D'ailleurs des formulations à base de ces microorganismes commencent à connaître des issues commerciales après ces dernières décennies d'expérimentation.

Les résultats obtenus de notre expérimentation menée avec les deux souches *Pseudomonas* et *Trichoderma*, ont mis en évidence les effets bénéfiques assurés en bioprotection et en phytostimulation. Ainsi, nous avons enregistré des taux d'inhibition notables de l'infection et de la sévérité de la fusariose vasculaire de la tomate, tout en empêchant l'expression de *Fusarium oxysporum* sur les deux variétés de tomate. Khalid *et al.* [247] ont montré que les réponses de la croissance et la protection des plantes à l'inoculation avec des rhizobactéries dépendent du génotype végétal, des souches de PGPR, et des conditions environnementales.

Les mécanismes par lesquels les PGPR favorisent la croissance des plantes, incluent la capacité de produire les phytohormones [248], la fixation non symbiotique d'azote [249], la solubilisation des phosphates minéraux et d'autres éléments nutritifs [250] et la protection contre les infections par les phytopathogènes. Les rhizobactéries bénéfiques ont la capacité d'agir sur l'inactivation des facteurs de germination du pathogène et/ou l'inhibition de leur croissance et de leur pathogénicité [74]. D'autre part, les *Pseudomonas* spp. fluorescents, sécrètent une gamme variée de substances antifongiques, comme

l'HCN, la pyoluteorine, le 2,4-diacetyl, le phloroglucinol, la pyrrolnitrine, les phenazines et les butyrolactones qui sont impliquées directement dans le biocontrôle de nombreux pathogènes [231].

Un autre aspect dans l'intérêt des PGPR et PGPF réside dans leur possibilité d'assurer une bioprotection des plantes, d'une façon indirecte, par la stimulation de mécanismes de défense inductibles chez la plante; ce qui peut rendre l'hôte beaucoup plus résistant à d'éventuelles agressions par des agents pathogènes [16]. Une meilleure connaissance, du point de vue moléculaire, de toutes les étapes du phénomène est nécessaire pour mieux comprendre la combinaison des facteurs qui sont à l'origine de cette spécificité. Le principal avantage des PGPR et des PGPF est qu'une fois la résistance systémique est induite, les mécanismes de défense naturels de la plante deviennent opérationnels [14]. Cette réduction est associée typiquement avec la diminution de la croissance du pathogène et réduit la colonisation du tissu infecté en permettant à la plante de mieux résister aux attaques du pathogène. Cependant, l'abaissement ou le ralentissement du développement de la maladie peut au moins augmenter le rendement de la culture [251].

Dans les sols associés aux PGPR et PGPF, plusieurs changements chimiques peuvent avoir lieu. Certaines souches activent la physiologie de la plante par la synthèse d'hormones similaires à celles de la plante, alors que d'autres augmentent l'acquisition des minéraux et la disponibilité de l'azote dans le sol. L'identification des signaux chimiques bactériens qui déclenchent la stimulation de la croissance a été limitée, en partie, à la compréhension de la façon par laquelle les plantes répondent aux stimuli externes [251].

L'efficacité des effets bénéfiques des *Pseudomonas fluorescens* et de *Trichoderma harzianum* dans le champ, dépend d'une colonisation racinaire réussie qui nécessite une bonne compréhension de la localisation, de l'organisation, de l'activité et de la viabilité des colonies dans la rhizosphère le long de la racine [252]. Plusieurs facteurs biotiques et abiotiques contribuent au processus de la colonisation par les *Pseudomonas* dans la rhizosphère. Ces facteurs s'étendent du type et de la quantité des exsudats racinaires produits par les plantes et la capacité des bactéries d'utiliser ces sources pour leur mobilité

[253]. Le type et la quantité d'exsudats racinaires sont influencés par l'espèce et l'âge de la plante, la zone d'excrétion [252], ainsi que les conditions environnementales [68]. Ceci peut supprimer ou stimuler la croissance de certaines bactéries, influencer la composition bactérienne en espèce, aussi bien que la proportion de cellules viables et mortes [252].

Selon le type d'exsudats et la zone d'excrétion, Dandurant et *al.* [254], ont observé la formation des colonies bactériennes sur les racines du pois après inoculation avec *Pseudomonas fluorescens* 2-79RN10 et *Pseudomonas fluorescens* 2-79B44. Les colonies ont été localisées uniformément sur la longueur des parois cellulaires de la racine, bien que la densité bactérienne diminuée vers le bout, jusqu'à absence des bactéries au bout de la racine.

Bloemberg et Lugtenberg [255] ont montré que la compétition et le potentiel de colonisation sont liés à des gènes qui sont impliqués dans la colonisation rhizosphérique. Rainey [256] a décrit une méthode qui a permis l'isolement des gènes de *Pseudomonas fluorescens* qui ont montré des niveaux élevés de l'expression dans la rhizosphère. Cette méthode a identifié 20 gènes qui ont été induit dans la colonisation rhizosphérique. Quatorze gènes ont montré une homologie significative, ils sont impliqués dans l'acquisition des éléments nutritifs et la réponse aux différents stress, six gènes n'ont montré aucune homologie, et sept gènes de l'induction rhizosphérique (*rhi*) ont une homologie pour connaître les gènes non-*Pseudomonas*. La grande capacité de quelques souches de *Pseudomonas fluorescens* à coloniser la rhizosphère des plantes, a permis son utilisation dans la rhizoremediation [257].

Les résultats de notre expérimentation mettent en évidence que les associations d'antagonistes assurent une meilleure protection des plantes. Ceci peut être expliqué par l'effet synergique de la combinaison de *Trichoderma* avec *Pseudomonas*. Cette hypothèse s'accorde avec d'autres déductions similaires [2, 57, 252] qui ont observé que l'effet synergique résultant entre la souche WCS358 de *P. putida* et de F047 de *Fusarium* est due principalement aux compétitions pour le carbone réalisé par l'isolat fongique et pour le fer réalisé par la souche bactérienne [78]. Il serait intéressant d'utiliser en combinaison des souches qui se caractérisent par des mécanismes différents et complémentaires.

L'optimisation des interactions plantes-microorganismes est nécessaire pour développer cette pratique plus respectueuse de l'environnement et moins consommatrice d'énergie que l'utilisation d'intrants de synthèse. Toutefois, ces interactions complexes entre organismes vivants doivent être mieux comprises pour être mieux gérées.

La formulation et les méthodes d'application restent des questions clés qui influent sur l'efficacité des produits commerciaux, la recherche sur ces thèmes devrait être axée sur le dépassement des contraintes environnementales, qui sont les principales raisons de l'échec et sur le manque de cohérence des agents de lutte biologique en plein champ. Le génie génétique peut fournir un outil utile pour l'amélioration de la performance de ces agents de lutte biologique.

Face à la grande diversité des PGPF et PGPR et de leurs pouvoir antagoniste vis-à-vis les agents phytopathogènes, il serait de même importance de les classer selon le type d'antagonisme. De nombreuses travaux ont porté sur d'ISR induite par les PGPR, il serait intéressant d'axer les recherches sur les caractéristiques biochimiques conduisant à la promotion de la croissance de la plante et enfin, associer le changement de son métabolisme avec l'acquisition de la résistance vis-à-vis des différents agents phytopathogènes.

CONCLUSION

Notre expérimentation s'est intéressée à l'application des deux agents antagonistes ; l'agent bactérien *Pseudomonas fluorescens* C7R12 et l'isolat fongique *Trichoderma harzianum* G4 vis-à-vis de *Fusarium oxysporum* f.sp. *lycopersici* agent de flétrissement vasculaire de la tomate. L'application de ces antagonistes a été évalué à deux niveaux ; en premier lieu, *in vitro* sur différents milieux de culture solides et liquides et en second lieu, *in situ* en interaction avec la plante hôte, à savoir la tomate.

Dans les essais *in vitro*, les tests de confrontation directe entre l'agent pathogène FOL et les souches antagonistes G4 et C7R12 sur trois différents milieux de culture solides (PDA, KB et PDA+KB), ont permis de mettre en évidence les potentialités d'antagonisme, en inhibant la croissance et la sporulation du pathogène. En effet, des taux d'inhibition appréciables de la croissance ont été enregistrés, dépassant parfois les 75%, ce qui confirme le haut pouvoir antagoniste des deux souches. La différence dans la composition des milieux de culture, prouve que ces agents antagonistes possèdent divers mécanismes d'action vis-à-vis du pathogène, notamment les antibiotiques et les substances volatiles qui sont capables d'arrêter ou d'inhiber à distance le développement de l'agent pathogène. En plus le pouvoir mycoparasitaire et la compétition trophique dont leur déploiement varie selon les partenaires cibles et les conditions physico-chimiques du milieu (température, humidité, éléments disponibles...) sont mis en partie dans l'action globale. Les tests réalisés en milieux de culture liquides, ont permis d'observer des effets antagonistes sur la germination des structures conidiennes ainsi que l'élongation des tubes germinatifs de l'agent pathogène, en provoquant des inhibitions appréciables atteignant le seuil de 58%.

Dans la deuxième partie de notre travail expérimental, il a été démontré que l'interaction des agents antagonistes avec la plante hôte tomate a empêché

fortement l'expression de *Fusarium oxysporum* f.sp.*lycopersici*, en atténuant par conséquence les niveaux d'infection et de la sévérité de la maladie. Cette bioprotection s'est traduite par une nette réduction du nombre de plants atteints et la gravité des symptômes. Mieux encore, l'addition de ces antagonistes même en présence de l'agent pathogène, a permis d'obtenir des gains appréciables très prononcés en terme de paramètres de croissance, notamment la longueur, la biomasse végétative et la teneur en protéines totales. Cela suggère que ces souches antagonistes présentent une bonne colonisation rhizosphérique et participent directement dans l'amélioration des acquisitions hydrominérales et dans l'induction de la résistance systémique qui active les capacités défensives de la plante.

L'utilisation des PGPR et des PGPF comme phytostimulateurs de la croissance végétale et de biocontrôle, et leur inoculation dans la rhizosphère peuvent avoir un impact sur la communauté microbienne rhizosphérique, ce qui peut influencer les effets bénéfiques des antagonistes. Pour cela, il est nécessaire de mieux comprendre les mécanismes de communication entre les rhizobactéries (Quorum sensing), qui sont impliqués dans les interactions plante-bactérie. Il est indispensable de sélectionner des souches douées de potentialités stables, reproductibles et adaptées aux différentes conditions telluriques. L'actualité de la recherche sur l'exploitation des PGPR et PGPF dans la phytostimulation et le biocontrôle, se focalise sur les mécanismes moléculaires régissant le métabolisme secondaire bactérien d'une part, et d'autre part sur les signaux de transduction interactifs avec la perception de la plante hôte.

Les PGPR et les PGPF possèdent plusieurs avantages pour une utilisation à grande échelle, ils colonisent efficacement les racines de plantes génétiquement très éloignées, Il faut aussi souligner l'importance des effets de bioprotection obtenus suite à l'association de plusieurs antagonistes, même s'il s'agit de deux types différents (champignon et bactéries). Cette association peut procurer d'une part une complémentarité dans les effets, en plus du cumul, voire même des actions synergiques pour de meilleures actions de biocontrôle. De plus, les nombreuses connaissances acquises sur leur production commerciale, leur physiologie et leur génétique s'ajoutent à ces avantages. La formulation des

inoculums de bactéries et des champignons sélectionnés, destinés aux applications pratiques comme biofertilisants, constitue une solution économiquement rentable afin de minimiser l'application de fertilisants chimiques, maximiser la croissance et la nutrition des plantes.

APPENDICE A

Liste des abréviations

ANOVA	: analyse de la variance
BCA	: agent de biocontrôle "biocontrol agent"
CWDEs	: enzymes dégradants la paroi des cellules
Chl	: chlorophylle
DO	: densité optique
E.T	: écart type
Fe ³⁺	: fer ferrique
ISR	: induction de la résistance systémique
KB	: milieu king de B
Kg	: kilogramme
LPS	: lypopolysaccharide
PDA	: milieu potato-dextrose-agar
PF	: poids frais
PGPF	: champignons promoteurs de la croissance des plantes
PGPR	: rhizobactéries promotrices de la croissance des plantes
PS	: poids sec
SAR	: systemic acquired resistance
UFC	: unite formant colonies (colony forming unit)
VCG	: groupe de compatibilité végétative

f.sp	: forme spéciale
g	: gramme
h	: heure
L	: litre
m	: mètre
ml	: millilitre
mm	: millimètre
mn	: minute
µg	: microgramme
var	: variété

APPENDICE B

Milieux de culture

Milieu B de King (KB) (King et al., 1954)

Peptone (Difco)	20 g
Glycerole (Prolabo)	15 ml
K ₂ Hpo ₄ (Sigma)	1, 5 g
MgSO ₄ (Sigma)	1, 5 g
Agar (Sigma)	15 g
Eau distillée	1000 ml

pH = 7,2 autoclavage 20 minutes à 120° C

Milieu B de King (KB) liquide :

Milieu B de King (KB) [428] sans Agar

Milieu PDA (potato Dextrose Agar) (Jonsthon et Booth, 1983)

Pomme de terre	200g
Dextrose	20 g
Agar	15g
Eau distillée	1000ml

pH = 7,2 autoclavage 20 minutes à 120° C

Milieu PDA liquide :

Milieu PDA [429] sans agar

APPENDICE C

Analyse de la variance

1. Inhibition de la croissance mycélienne

ANOVA

TAUX_INHIBITION / MILIEU

	Somme des carrés	ddl	Moyenne des carrés	F	Signification
Inter-groupes	1291,810	2	645,905	,644	,548
Intra-groupes	9023,678	9	1002,631		
Total	10315,488	11			

TAUX_INHIBITION/ TRAITEMENT

	Somme des carrés	ddl	Moyenne des carrés	F	Signification
Inter-groupes	7081,361	3	2360,454	5,839	,021
Intra-groupes	3234,126	8	404,266		
Total	10315,488	11			

Sous-ensembles homogènes

	TRAITEMENT	N	Sous-ensemble pour alpha = 0.05	
			1	2
Student-Newman-Keuls ^a	FOL	3	,0000	
	G2-C7R12	3		53,3533
	G2-G4	3		54,7300
	G4-G2-G4	3		59,4800
	Signification		1,000	,927
Test de Tukey ^a	FOL	3	,0000	
	G2-C7R12	3		53,3533
	G2-G4	3		54,7300
	G4-G2-G4	3		59,4800
	Signification		1,000	,981

Les moyennes des groupes des sous-ensembles homogènes sont affichées.

a. Utilise la taille d'échantillon de la moyenne harmonique = 3,000.

2. Elongation du tube germinatif

ANOVA

MOY-ELONGATION/TRAIEMENT

	Somme des carrés	ddl	Moyenne des carrés	F	Signification
Inter-groupes	1,951	3	,650	7,405	,001
Intra-groupes	2,811	32	,088		
Total	4,762	35			

Sous-ensembles homogènes

MOY_ELONGATION

		N	Sous-ensemble pour alpha = 0.05	
traitement			1	2
Student-Newman-Keuls ^a	FOL-G4	9	2,5623	
	FOL-G4-C7R12	9	2,5861	
	FOL-C7R12	9	2,6586	
	FOL	9		3,1337
	Signification		,772	1,000
Test de Tukey ^a	FOL-G4	9	2,5623	
	FOL-G4-C7R12	9	2,5861	
	FOL-C7R12	9	2,6586	
	FOL	9		3,1337
	Signification		,901	1,000

Les moyennes des groupes des sous-ensembles homogènes sont affichées.

a. Utilise la taille d'échantillon de la moyenne harmonique = 9,000.

MOY_ELONGATION/ MILIEU

	Somme des carrés	ddl	Moyenne des carrés	F	Signification
Inter-groupes	,939	2	,469	4,051	,027
Intra-groupes	3,824	33	,116		
Total	4,762	35			

Sous-ensembles homogènes

MOY_ELONGATION				
milieux		N	Sous-ensemble pour alpha = 0.05	
			1	2
Student-Newman-Keuls ^a	KB	12	2,5197	
	MIXTE	12	2,7775	2,7775
	PDA	12		2,9084
	Signification		,072	,353
Test de Tukey ^a	KB	12	2,5197	
	MIXTE	12	2,7775	2,7775
	PDA	12		2,9084
	Signification		,168	,618

Les moyennes des groupes des sous-ensembles homogènes sont affichées.

a. Utilise la taille d'échantillon de la moyenne harmonique = 12,000.

3. Germination conidienne

ANOVA

MOY-GERMINATION/ TRAITEMENT

	Somme des carrés	ddl	Moyenne des carrés	F	Signification
Inter-groupes	2,669	3	,890	11,165	,000
Intra-groupes	2,550	32	,080		
Total	5,219	35			

MOY-GERMINATION/ MILIEU

	Somme des carrés	ddl	Moyenne des carrés	F	Signification
Inter-groupes	,788	2	,394	2,933	,067
Intra-groupes	4,431	33	,134		
Total	5,219	35			

Sous-ensembles homogènes

MOY-GERMINATION

		N	Sous-ensemble pour alpha = 0.05
milieux			1
Student-Newman-Keuls ^a	MIXTE	12	3,4589
	KB	12	3,4678
	PDA	12	3,7770
	Signification		,100
Test de Tukey ^a	MIXTE	12	3,4589
	KB	12	3,4678
	PDA	12	3,7770
	Signification		,100

Les moyennes des groupes des sous-ensembles homogènes sont affichées.

a. Utilise la taille d'échantillon de la moyenne harmonique = 12,000

4. Taux d'infection

ANOVA

TAUX D'INFECTION

	Somme des carrés	ddl	Moyenne des carrés	F	Signification
Inter-groupes	9,404	7	1,343	3,938	,005
Intra-groupes	8,188	24	,341		
Total	17,592	31			

Sous-ensembles homogènes

TAUX D'INFECTION

	traitement	N	Sous-ensemble pour alpha = 0.05	
			1	2
Student-Newman-Keuls ^a	FOL1-C7R12	4	3,1411	
	FOL2-C7R12-G4	4	3,7720	3,7720
	FOL2-G4	4	3,9313	3,9313
	FOL1-C7R12-G4	4	4,0960	4,0960
	FOL2-C7R12	4	4,1175	4,1175
	FOL1-G4	4	4,2496	4,2496
	FOL2	4		4,7959
	FOL1	4		4,9942
	Signification			,116
Test de Tukey ^a	FOL1-C7R12	4	3,1411	
	FOL2-C7R12-G4	4	3,7720	3,7720
	FOL2-G4	4	3,9313	3,9313
	FOL1-C7R12-G4	4	4,0960	4,0960
	FOL2-C7R12	4	4,1175	4,1175
	FOL1-G4	4	4,2496	4,2496
	FOL2	4		4,7959
	FOL1	4		4,9942
	Signification			,176

Les moyennes des groupes des sous-ensembles homogènes sont affichées.

REFERENCES

01. Conrath, U., Pieterse, C.M.J. and Mauch-Mani, B., (2002). "Priming in plant-pathogen interactions", *Trends Plant Sci.* 7, 210-216.
02. Lemanceau, P., Offre, P., Mougel, C., Gamalero, E., Dessaux, Y., Moenne-Loccoz, Y. et Berta, G. (2006). Microbial ecology of the rhizosphere. Dans "Microbiological methods for assessing soil quality", Bloem, J., Hopkins, D.W. et Benedetti, A. (Eds). CABI publishing, Massachusetts, Cambridge, MA, Etats-Unis, p. 228-230.
03. Louvet, J. (1979). General aspects of soil disinfestations. In: D. Mulder soil disinfestations. Elsevier. 3-7.
04. Curtis, T.P., Sloan, W.T. et Scannell, J.W. (2002). Estimating prokaryotic diversity and its limits. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA*, 99: 10494-10499.
05. Leake, J.R., Johnson, D., Donnelly, D.P., Muckle, G.E., Boddy, L. et Read, D.J. (2004). Networks of power and influence: the role of mycorrhizal mycelium in controlling plant communities and agroecosystem functioning. *Canadian Journal of Botany*, 82: 1016-1045.
06. Smith, S.E. et Read, D.J. (2008). Mycorrhizal symbiosis. 3ème edition, Academic Press, New-York, Etats-Unis, 787 p.
07. Kowalchuk, G.A., Yergeau, E., Leveau, J.H.J., Sessitsch, A. et Bailey M. (2010). Plant-associated microbial communities. Dans "Environmental molecular microbiology", Liu, W-T. et Jansson, J.K. (Eds). Caister Academic Press, Norfolk, Royaume-Uni, p 131-148.
08. Högborg, P., Nordgren, A., Buchmann, N., Taylor, A.F.S., Ekblad, A., Hogberg, M.N., Nyberg, G., Ottosson-Löfvenius, M. et Read, D.J. (2001). Large-scale forest girdling shows that current photosynthesis drives soil respiration. *Nature*, 411: 789-792.
09. Rillig, M.C. et Mummey, D.L. (2006). Mycorrhizas and soil structure. *New Phytologist*, 171: 41-53.
10. Weller, D.M., Raaijmakers, J.M., McSpadden Gardener, B.B. et Thomashow, L.S. (2002). Microbial populations responsible for specific soil suppressiveness to plant pathogens. *Annual Review of Phytopathology*, 40: 309-348.
11. Fuchs, J.G., Moëne-Loccoz, Yand Défago, G., (1997). "Nonpathogenic *Fusarium oxysporum* strain Fo47 induces resistance to *Fusarium* wilt in tomato", *Plant Dis.*, 492-496.
12. Pinton, R., Varanini, Z. et Nannipieri, P. (2001). The rhizosphere as a site of biochemical interactions among soil components, plants, and microorganisms. Dans "The rhizosphere", Pinton, R., Varanini, Z. et Nannipieri, P. (Eds). Marcel Dekker, Inc., Etats-Unis, p. 1-17.

13. Nannipieri, P., Ascher, J., Ceccherini, M.T., Landi, L., Pietramellara, G., Renella, G. et Valori, F. (2008). Effects of root exudates in microbial diversity and activity in rhizosphere soils. Dans "Soil biology: molecular mechanisms of plant and microbe coexistence", vol. 15, Nautiyal, C.S. et Dion, P. (Eds). Springer, Berlin Heidelberg, Allemagne, p. 339-365.
14. Van Loon, L.C. (2007). Plant responses to plant growth-promoting rhizobacteria. *European Journal of Plant Pathology*, 119: 243-254.
15. Spadaro, D., Gullino, M.L., (2005). "Improving the efficacy of biocontrol agents against soilborne pathogens" *Crop Protection*, 24, 601–613.
16. Bais, H.P., Park, S. W et Weir, T. L., Callaway, R. M and. Vivanco, J.M., (2004). "How plants communicate using the underground information superhighway", *Trends Plant Science*, 9 (1), 26-32.
17. Ozbay, N et. Newman, S.E., (2010), «Evaluation of *Trichoderma harzianum* Strains to Control Crown and Root Rot of Greenhouse Fresh Market Tomatoes.
18. Latour, X., Delorme, S., Mirleau, P. et Lemanceau, P. (2009). Identification of traits implicated in the rhizosphere competence of fluorescent pseudomonads: description of a strategy based on population and model strain studies. Dans "Sustainable agriculture", part. 3, Lichtfouse, E., Navarrete, M., Debaeke, D., Souchère, V. et Alberola, C. (Eds). Springer, Pays-Bas, p. 285-296.
19. Garbeva, P., van Elsas, J.D. et van Veen, J.A. (2008). Rhizosphere microbial community and its response to plant species and soil history. *Plant Soil*, 302: 19-32.
20. Cardon, Z.J. et Gage, D.J. (2006). Resource exchange in the rhizosphere: molecular tools and the microbial perspective. *Annual Review of Ecology, Evolution and Systematics*, 37: 459-488.
21. Nelson, P.E., Toussoun T.A., Marasas, W.F.O. (1983). *Fusarium* species. An illustrated manual for identification. The Pennsylvania State University Press, 193.
22. Fravel, D., Olivain, C., Alabouvette, C. (2003). *Fusarium oxysporum* its biocontrol. *New Phytologist*, 157: 493–502.
23. Schippers, B., van Eck, W.H. (1981). Formation survival of chlamydospores in *Fusarium*. In *Fusarium* diseases, Biology Taxonomy (Eds. Nelson, P.E., Toussoun, T.A., Cook, R.J.), The Pennsylvania State University Press, University Park London.250-260.
24. Abadie, C., Edel V. et Alabouvette C., (1998). soil suppressiveness to *Fusarium* wilt: Influence of a cover-plant on density and diversity of *Fusarium* populations. *Soil biol. Biochem* –Vol.30, No.5, pp 634-649.
25. Djerbi, M. (1988). Les maladies du palmier dattier. Projet régional de lutte contre le Bayoud. Alger .127p.
26. Tivoli, B., (1988)- guide d'identification des différentes espèces de *Fusarium* rencontrées en France sur la pomme de terre dans son environnement. *Agronomie* 8: 211-222.
27. Armstrong, G.M. and Armstrong, J.K. (1981), « Formae speciales and races of *Fusarium oxysporum* causing wilt diseases », in: Nelson, P.E., Toussoun, T.A. and

- Cook, R. J. (Eds.) *Fusarium: Diseases, Biology, and Taxonomy*, The Pennsylvania State University Press, University Park, PA, USA. 391-399
28. Bouhot, D., Rouxel, F., et Louvet, J., (1972). "Première observation de la fusariose vasculaire de la tomate en France", *Ann. Phytopathologie*, 412, 187-191.
 29. Ito, S, Nagata A., Kai, T., Takahara H., Tanaka, S., (2005). "Symptomless infection of tomato plants by tomatinase producing *Fusarium oxysporum* formae speciales nonpathogenic on tomato plants", *Physiological and Molecular Plant Pathology*, 66, 183-19.
 30. Walker, J. C., "plant pathologie", 3rd edit, (1961). 819p.
 31. Pecault, P., Latterot, H., (1966). "perspectives sur la sélection de variétés de tomate résistantes aux maladies", *Genetica Agraria*, 20, 110- 120.
 32. Ailton, R., Costa, H., Leonardo, Boiteux, S., Carlos, A., (2005). "Lopes First Report of *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* Race 3 on Tomato in Brazil Fitopatol", *Bras*, 30(4), 426- 428.
 33. Booth, C. (1971). "The Genus *Fusarium*". Commonwealth Mycological Institut, Kew, Surrey, England.
 34. Alexander, D.B and Zuberer, D.A, (1991). "Use of chrome azurol S reagents to evaluate siderophore production by rhizosphere bacteria", *Biol. Fertil. Soils*, 12, 39-45.
 35. Grattidge, R., and O'Brien, R. G., (1982)." Occurrence of a third race of *Fusarium* wilt of tomatoes in Queensland. *Plant Dis.* 66:165-166.
 36. Volin, R.B., and Jones, J. P. (1982). "A new race of *Fusarium* wilt of tomato in Florida and sources of resistance". *Proc. Fla. State Hortic. Soc.*95:268-270
 37. Cai, G., L. Rosewich Gale, R. W. Schneider, H. C. Kistler, R. M. Davis, K. S. Elias, and E. M. Miyao, (2003)."Origin of Race 3 of *Fusarium oxysporum* f. sp. *Lycopersici* at a Single Site in California.
 38. Toussoun, T.A., "Fusarium-suppressive soils", See Ref. 31, 145p.
 39. Beckman, C.H., (1989). "Colonization of the system of plants by fungal with pathogens: a basis of modelling the interactions between host and parasite in time and space, in vascular wilt diseases of plants", (Tjamos, E. C. and Beckman, GH, Edsl. Springer-verlag, Heidelberg, Berlin., 19-32.
 40. phytologique Laterot, H., Rouxel, F., Davet, P., Mirleau, P., "Rieuf, Présence de la race 2 de *Fusarium oxysporum* f.sp. *lycopersici* dans les culttures de tomate au maroc", Premier congrée de l'union méditerranéenne pathogène, 421-433.
 41. Couteandier Y., (1992). "Competition for carbon in siol and rhizosphere, a mechanism involved in biological control of *Fusarium* wilts", ùIn Tjamos EC, Papavizas AC, Cook RJ, Eds, *Biological control of plant disease*, 99-104.
 42. Beliaro, A., Luong, L., Balma, V., Pezza, L., orazza, L., (1998). "Fusarium ilt of inter meon", *Plnt. Pathol.*, 80:252.
 43. Powell, J.f., Vargas, J.M, Nair, M.G, Detweiler, A.R, Chandra ,A., (2000). " Management of dollar spot on creeping bentgrass with metabolites of *Pseudomonas aureofaciens* (TX-1)", *Plant Disease* 84, 19-24.

44. Haglund, W.A., Kraft, J.M. (2001). Fusarium wilt. In "Compendium of Pea Diseases Pests", (Eds. Kraft, J.M., Pfleger, F.L.) American Phytopathological Society Press, St. Paul, USA, 13.
45. Katan, T., Shlevin, E., Katan, J. (1997). Sporulation of *Fusarium oxysporum* f.sp. *lycopersici* on stem surfaces of tomato plants aerial dissemination of inoculum. *Phytopathology*, 87: 712–719.
46. Barna, B., A., Sarhan., R.T., Kiraly, Z., (1983). "The influence of nitrogen nutrition on the sensitivity of tomato plants to culture filtrates of *Fusarium* and to fusaric acid", *Physiological Plant pathology*, 23, 257-263.
47. Anchisi, M., Genanari, M., Matta., (1985). "Retardation of *Fusarium* Wilt symptom in tomato by pre- and post- inoculation treatments of the roots and aerial parts of the host in hot water", *physiological plant pathology*, 26, 175-183.
48. Maraitre, H., Meyer, J.A., et al, (1973). " la fusariose de la tomate. Symptôme race physiologique, lutte chimique et résistance variétale ", *Ann. Phytopathol.*, 52, 187-202.
49. Benhamou, N., Richard, R., Patrice Reyb, B., Oligandrin, Y.T., "the elicitor-like protein produced by the mycoparasite *Pythium oligandrum*, induces systemic resistance", (2001).
50. Diener, A.C., Ausubel, F.M. (2005). Resistance to *Fusarium oxysporum* a dominant Arabidopsis disease-resistance gene is not race-specific. *Genetics* 171: 305-321.
51. Gueldener, U., Mannhaupt, G., Muensterkoetter, M., Haase, D., Oesterheld, M., Stuempflen, V., Mewes, H.W., Adam, G. (2006). FGDB: a comprehensive fungal genome resource on the plant pathogen *Fusarium graminearum*. *Nucleic Acids Res.*, 34, Database issue.
52. Simons, G., Groenendijk, J., Wijbri, J., Reijans, M., Groenen, J., Diergaarde, P., Van der Lee, T., Bleeker, M., Onstenk, J., de Both, M., Haring, M., Mes, J., Cornelissen, B., Zabeau, M., Vos, P. (1998). Dissection of the *Fusarium* I2Gene Cluster in Tomato Reveals Six Homologs One Active Gene Copy. *Plant Cell*, 10: 1055-1068.
53. Mes, J.J., van Doorn, A.A., Wijbrandi, J., Simons, G., Cornelissen, B.J.C., and Haring, M.A. (2000). Expression of the *Fusarium* resistance gene I-2 colocalizes with the site of fungal containment. *Plant Journal*, 23: 183–193.
54. Rep, M., van der Does, H.C., Meijer, M., van Wijk, R., Houterman, P.M., Dekker, H.L., de Koster, C.G., Cornelissen, B.J.C. (2004). A small, cysteine-rich protein secreted by *Fusarium oxysporum* during colonization of xylem vessels is required for I-3-mediated resistance in tomato. *Molecular Microbiology*, 53:1373-1383.
55. Bolwerk, A., Lagopodi, A. L., Wijffes, A. H., Lamers, G. E., Chin, A. W. T., Lugtenberg, B. J. J., Bloemberg, G. V. (2003). Interactions in the tomato rhizosphere of two *Pseudomonas* biocontrol strains with the phytopathogenic fungus *Fusarium oxysporum* f. sp. *radicislycopersici*. *Molecular Plant Microbe Interactions*, 16: 983-993.
56. Dekkers, L. C., Mulders, I. H. M., Phoelich, C. C., Chin-A-Woeng, T. F. C., Wijffes, A. H. M., Lugtenberg B. J. J. (2000). The sss colonization gene of the tomato-

- Fusarium oxysporum* f. sp. *radicis-lycopersici* biocontrol strain *Pseudomonas fluorescens* WCS365 can improve colonization of other wild-type *Pseudomonas* spp. bacteria. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 13:1177-1183.
57. Alabouvette, C., Schippers, B., Lemanceau, P and Bakker, P.A.H.M., (1998), "Biological control of fusarium wilts: towards development of commercial products", *Plant-Microbe Interactions and Biological Control* (G.J. Boland and L.D. Kuykendall, eds), 15-36.
 58. Aimé, S., Cordier, C., Alabouvette, C., Olivain, C. (2008). Comparative analysis of PR gene expression in tomato inoculated with virulent *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* the biocontrol strain *F. oxysporum* Fo 47. *Physiological Molecular Plant Pathology*, 73: 9–15.
 59. Hiltner, L. (1904). Über neuere Erfahrungen und Problem auf dem Gebiet der Bodenbakteriologie und unter besonderer Berücksichtigung der Grundungung und Brache. *Arbeite und Deutsche Landwirtschaft Gesellschaft*, 98: 59-78.
 60. Morgan, J.A.W., Bending, G. D. et White, P. J. (2005). Biological costs and benefits to plant–microbe interactions in the rhizosphere. *Journal of Experimental Botany*, 56: 1729–1739.
 61. Curl, E.A. et Truelove, B. (1986). The rhizosphere. Springer-Verlag, New York, Etats-Unis, 288 p.
 62. Bending, G.D. (2003). The rhizosphere and its microorganisms. Dans "Encyclopaedia of applied plant sciences", Thomas, B., Murphy, D.J. et Murray, B.G. (Eds). Academic Press, Londres, Royaume-Uni, p. 1123–1129.
 63. Kent, A.D. et Triplett, E.W. (2002). Microbial communities and their interactions in soil land rhizosphere ecosystems. *Annual Review of Microbiology*, 56: 211-236.
 64. Whipps, J.M. (2001). Microbial interactions and biocontrol in the rhizosphere. *Journal of Experimental Botany*, 52: 487-511.
 65. Bloemberg, G.V. et Lugtenberg, B.J. (2001). Molecular basis of plant growth promotion and biocontrol by rhizobia. *Current Opinion in Plant Biology*, 4: 343-350.
 66. Harman, G.E., Howell, C.R., Viterbo, A., Chet, I., Lorito, M., 2004. Trichoderma species-opportunistic, avirulent plant symbionts. *Nature Review Microbiology* 2, 43–56.
 67. Bergsma-Vlami, M., Prins, M. E. and Raaijmakers, J.M. (2005). Influence of plant species on population dynamics, genotypic diversity and antibiotic production in the rhizosphere by indigenous *Pseudomonas* spp. *FEMS Microbiol. Ecol.* 52(1):59-69.
 68. Défago, G., and Hass, D., (1990). "Pseudomonads as antagonists of soil borne plant pathogens: Mode of actions and genetic analysis", *Soil Biochemistry*, 6, 249-291.
 69. Palleroni, N.J., (1984). "Gram-negative aerobic rods and cocci: family / *Pseudomonadaceae*",. Krieg, Holt, William and Wilkings .Eds., *In Bergey's manual of bacteriology*, 1, William & Wilkins, Baltimore. 141-168.
 70. Demange, P., Wendenbaum, S., Bateman, A., Dell, A., Abdallah, M.A., (1987), "Structure and physiochemical properties of pyoverdins and related compounds", *Iron transport in microbes, plants and animals*, Weinheim : VCH, 167-187.

71. Briat, J.F., Vert, G., (2004). "Acquisition et gestion du fer par les plantes", *Cahiers d'agriculture*, 13(2), 183-201.
72. Rahman, K.M., Majid-Khan, S., (2002). "Effects of root-dip treatment with certain phosphate solubilizing microorganisms on the fusarial wilt of tomato", *Bioresource Technology*, 85, 213-215.
73. Welle, D.M., Raaijmakers, J.M., Gardener, M., and Thomashow, L.S., (2002). "Microbial populations responsible for specific soil suppressiveness to plant pathogens", *Annu. Rev. Phytopathol.*, 40, 309-348.
74. Kloepper, J.W., Tuzun, S., Zehnder, G.W., Wei, G., (1997). Multiple disease protection by rhizobacteria that induce systemic resistance- Historical precedence. *Phytopathology* 87, 136-137.
75. Alabouvette, C. (2001). La lutte biologique contre les parasites du sol. Possibilités, spécificités et pour l'instant rareté. *Phytoma* 52 pp.
76. Heming, B.C., (1986). "Microbial-iron interactions in the plant rhizosphere", An overview, *J Plant Nutr.*, 9, 505-521.
77. Leong, J., (1986). "Siderophores: Their biochemistry and possible role in the biocontrol of plant pathogens", *Annu. Rev Phytopathol*, 24, 187-208.
78. Loper, J.E, Buyer, J.S., (1991). "Siderophores in microbial interactions on plant surfaces", *Mol Plant- Microbe Interac* 4, 5-13.
79. Vestberg, M., Kukkonen, S., Saari, K., Parikka, P., Huttunen, J., Tainio, L Devos, N., Weekers, F., Keversd, C., Thonart, P., Lemoine, M.C., Cordier, C., Alabouvette, C., Gianinazzi S., (2004). "Microbial inoculation for improving the growth and health of micropropagated strawberry", *Applied Soil Ecology*, 27, 243-258.
80. Benchabane, M., (2005), "Caractérisation des effets d'antagonisme Microbienne et De promotion de la croissance végétale de souches de *Pseudomonas* spp. fluorescents", Thèse Doctorat d'état, FSBUTHB, Alger, 235p.
81. Alfano, J.R., Charkowski, A.O., Deng, W.L., Badel, J.L., Petnicki-Ocwieja, T., van Dijk, K.et Collmer, A. (2000). The *Pseudomonas syringae* Hrp pathogenicity island has a tripartite mosaic structure composed of a cluster of type III secretion genes bounded by exchangeable effector and conserved effector loci that contribute to parasitic fitness and pathogenicity in plants. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA*, 97: 4856-4861.
82. Mazurier, S., Lemunier, M., Siblot, S., Mougél, C. et Lemanceau, P. (2004). Distribution and diversity of type III secretion system-like genes in saprophytic and phytopathogenic fluorescent pseudomonads. *FEMS Microbiology Ecology*, 49: 455-467.
83. Pallen, M.J., Beatson, S.A. et Bailey, C.M. (2005). Bioinformatics, genomics and Pieterse, C.M.J., Van Wees, S.C.M., Hoffland, E., Van Pelt, J.A. and Van Loon, L.C., "Systemic resistance in *Arabidopsis* induced by biocontrol bacteria is independent of salicylic acid accumulation and pathogenesis-related gene expression", *Plant Cell*, 8, (1996), 1225-1237. *Microbiology Reviews*, 29: 201- 229.

84. Mulya, K., Takikawa, Y. et Tsuyumu, S. (1996). The presence of regions homologous to *hrp* cluster in *Pseudomonas fluorescens* PfG32R. *Phytopathological Society of Japan*, 62: 355-359.
85. Preston, G.M., Bertrand, N. et Rainey, B. (2001). Type III secretion in plant growth-promoting *Pseudomonas fluorescens* SBW25. *Molecular Microbiology*, 41: 999-1014.
86. Pieterse, C.M.J., Van Wees, S.C.M., Hoffland, E., Van Pelt, J.A. and Van Loon, L.C., (1996), "Systemic resistance in *Arabidopsis* induced by biocontrol bacteria is independent of salicylic acid accumulation and pathogenesis-related gene expression", *Plant Cell*, 8, 1225-1237.
87. Rezzonico, F., Binder, C., Défago, G. et Moëgne-Loccoz, Y. (2005). The type III secretion system of biocontrol *Pseudomonas fluorescens* KD targets the phytopathogenic chromista *Pythium ultimum* and promotes cucumber protection. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 18: 991-1001.
88. Cook, R.J., Thomashow, L.S., Weller, D.M., Fujimoto, D., Mazzola, M., Bangera, G. et Kim, D.S. (1995). Molecular mechanisms of defense by rhizobacteria against root disease. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA*, 92: 4197-4201.
89. Schers, F.M., and Backer, R. (1982). Effects of *Pseudomonas putida* and a synthetic iron chelator on induction of soil suppressiveness to fusarium wilt pathogens. *Phytopathology* 72: 1567-1573.
90. Pierson E.A., Wood D.W., Cannon J.A., Blachere F.M. and Pierson L.S. III (1998). Interpopulation signaling via N-acylhomoserine lactones among bacteria in the wheat rhizosphere. *Mol. Plant Microbe Interact.* 11: 1078 –1084.
91. Thomashow, L.S., Bonsall, R.F., et Welter, D.M., (1997). "Antibiotic production by soil and rhizosphere microbes in situ", *Manual of environmental microbiology*, Hurst, C.J., Washington, D.C, 493-500.
92. Parsek. M. R and Greenberg. E. P. (2000). «Acyl-homoserine lactone quorum sensing in Gram-negative bacteria: a signaling mechanism involved in associations with higher organisms». *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. N°97, pp.8789–8793.
93. Miller. M.B, Bassler. B.L, (2001). «Quorum sensing in bacteria». *Annu. Rev. Microbiol.* N°55, pp.165–199.
94. Waters. C. M, and Bassler. B. L, (2005). «Quorum sensing: cell-to-cell communication in bacteria». *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* N°21, pp.319–346.
95. Becker, J.O, Cook, R.J., ((1988). "Role of siderophores on suppression of *Pythium* species and production of increased-growth response of wheat by fluorescent pseudomonads", *Phytopathology*, 78, 778-782.
96. Walker, J. C., "plant pathologie", 3rd edit, (1961). 819p.
97. Semal, J., (1989). "Traité de pathologie végétale", Gembloux Belgique; Presses agronomiques de Gembloux, 621p.104.
98. O'Sullivan, D.J., and O'Gara, F., (1992). "Traits of fluorescent *Pseudomonas* spp. Involved in suppression of plant root pathogens", *Microbiol Rev.*, 56, 662-676.

99. Geraats, B.P.J., Bakker, P.A.H.M., Lawrence, C.B., Achuo, E.A., Höfte, M. and Van Loon, L.C., ((2003). "Ethylene-insensitive tobacco shows differential altered susceptibility to different pathogens", *Phytopathology*, 93 , 813-821
100. Fuqua. C, Parsek. M. R and Greenberg. E. P, (2001). «Regulation of gene expression by cell-to-cell communication: acyl-homoserine lactone quorum sensing». *Annu. Rev. Genet.* N°35, pp.439–468.
101. Duijff, B.J., Recorbet, G., Bakker, P.A.H.M., Loper, J.E., Lemanceau, P., (1999). "Microbial antagonism at the root level is involved in suppression of *Fusarium* wilt by the combination of non pathogenic *Fusarium oxysporum* Fo47 and *Pseudomonas putida* WCS358", *Phytopathology*, 89, 1073-1079.
102. Antoun. H, and Kloepper. J. W, (2001). «Plant growth-promoting rhizobacteria (PGPR) ». In: *Encyclopedia of Genetics*, Brenner. S, and Miller. J.H, eds. Academic Press, N.Y. pp. 1477-1480.
103. Nehl. D. B, Allen. S. J, and Brown. J. F, (1996). «Deleterious rhizosphere bacteria: an integrating perspective». *Appl. Soil Ecol.* N°5, pp.1-20.
104. Sturz. A. V, and Christie. B. R, (2003). «Beneficial microbial allelopathies in the root zone: the management of soil quality and plant disease with rhizobacteria». *Soil Til. Res.* N°72, pp.107-123.
105. Glick. BR, (1995). «The enhancement of plant growth by free-living bacteria». *Canadian Journal of Microbiology.* N°41, pp.109–117.
106. Bergsma-Vlami, M., Prins, M. E. and Raaijmakers, J.M. (2005). Influence of plant species on population dynamics, genotypic diversity and antibiotic production in the rhizosphere by indigenous *Pseudomonas* spp. *FEMS Microbiol. Ecol.* 52(1):59-69.
107. Raaijmakers, J.M., Leeman, M., Van Oorschot, M.M.P., van der Sluis, I., Schippers, B. and Bakker, P.A.H.M. (1995). Dose-response relationships in biological control of *Fusarium wilt* of radish by *Pseudomonas* spp. *Phytopathology.* 85(10):1075-1081.
108. Esitken. A, Karlidag. H, Ercisli. S and Sahin. F, (1995). «Effects of foliar application of Frankenberger». W.T.Jr and Arshad. M, "Phytohormones in soils: Microbial production and function. Marcel Dekker" Inc. NewYork, NY, 503p.
109. Dobbelaere. S, Vanderleyden. J, and Okon. Y, (2003). «Plant Growth-Promoting Effects of Diazotrophs in the Rhizosphere». *CRC Crit. Rev. Plant Sci.* Vol. 22, N° 2, pp.107-149.
110. Lee. J.P, Lee. S.W, Kim. C.S, Son. J.H, Song. J.H, Lee. K.Y, Kim. H.J, Jung. S.J, and Moon. B.J, (2006). «Evaluation of formulations of *Bacillus licheniformis* for the biological control of tomato gray mold caused by *Botrytis cinerea*». *Biol. Control.* Vol .37, N° 3, pp. 329-337.
111. Orhan. E, Esitken. A, Ercisli. S, Turan. M, and Sahin. F, (2006). «Effects of plant growth promoting rhizobacteria (PGPR) on yield, growth and nutrient contents in organically growing raspberry». *Sci. Hortic.* Vol. 111, N° 1, pp.38-43.
112. Burd. G. I, Dixon. D.G, and Glick. B. R, (1998). «A plant growth promoting bacterium that decreases nickel toxicity in seedlings». *Appl. Environ. Microbiol.* N° 64, pp.3663-3668.

113. Frankenberger. W.T.Jr. and Arshad. M. (1995). «Phytohormones in soils: Microbial production and function». Marcel Dekker, Inc. NewYork, NY, 503p.
114. García de Salamone. I. E and Nelson. L. M, (2000). «Effects of cytokinin-producing *Pseudomonas* PGPR strains on tobacco callus». Auburn University WebSite, Available: www.ag.auburn.edu/argentina/pdfmanuscripts/garciadesalamone.pdf [Accessed 12/20/2004].
115. Loper, J.E, Buyer, J.S., (1991). "Siderophores in microbial interactions on plant surfaces", *Mol Plant- Microbe Interac* 4, 5-13.
116. Patten. C, and Glick. B.R, (1996). «Bacterial biosynthesis of indole-3-acetic acid». *Canadian Journal of Microbiology*. N° 42, pp. 207-220.
117. Steenhoudt. O and Vanderleyden. J, (2000). «*Azospirillum*, a free-living nitrogen fixing bacterium closely associated with grasses: genetic, biochemical and ecological aspects». *FEMS Microbiology reviews*. N° 24, pp.487-506.
118. Dubeikovsky. A.N, Mordukhova. E.A, Kochetkov. V.V, Polikarpova. F.Y and Boronin. A.M, (1993). «Growth promotion of blackcurrant softwood cuttings by recombinant strain *Pseudomonas fluorescens* BSP53a synthesizing an increased amount of indole-3-acetic acid». *Soil Biology and Biochemistry*. N° 25, pp.1277-1281.
119. Arshad. M, and Frankenberger Jr. W. T, (2002). «Ethylene: Agricultural Sources and Applications». New York, Kluwer Academic Publishers. 342 p.
120. Wang. C, Knill. E, Glick. B. R, and Defago. G, (2000). «Effect of transferring 1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid (ACC) deaminase genes into *Pseudomonas fluorescens* strain CHAO and its *gac A* derivative CHA96 on their growth promoting and disease-suppressive capacities ». *Can. J. Microbiol*. N° 46, pp. 898-907.
121. Morgan. P. W, and Drew. M. C, (1997). «Ethylene and plant responses to stress». *Plant Physiol*. N° 100, pp.620-630.
122. Glick. B. R, Penrose. D. M, Li. J, (1998). «A model for the lowering of plant ethylene concentration by plant growth promoting bacteria». *J. Theor. Biol*. N° 190, pp. 63-68.
123. Grichko. V. P and Glick. B. R, (2001). «Amelioration of flooding stress by ACC deaminase-containing plant growth promoting bacteria». *Plant Physiol. Biochem*. N° 39, pp. 11-17.
124. Mayak. S, Tirosh. T and Glick. B. R, «Plant growthpromoting bacteria confer resistance in tomato plants to salt stress». *Plant Physiol. Biochem*. N° 42, 2004a, pp.565-572.
125. Saravanakumar. D, and Samiyappan. R, (2007). «ACC deaminase from *Pseudomonas fluorescens* mediated saline resistance in groundnut (*Arachis hypogea*) plants». *Journal of Applied Microbiology*. N° 102, pp.1283-92.
126. Ma. W.B, Sebestianova. S.B, Sebestian. J, Burd. G.I, Guinel. F.C and Glick. B.R, (2003). «Prevalence of 1-aminocyclopropane-1-carboxylate deaminase in *Rhizobium* spp». *Journal of General and Molecular Microbiology*. N°83, pp.285-291.

127. Belimov. A.A, Safronova. V.I, Sergeyeva. T.A, Egorova. T.N, Matveyeva. V.A, Tsyganov. V.E, Borisov. A.Y, Tikhonovich. I.A, Kluge. C, Preisfeld. A, Dietz. K.J and Stepanok. V.V, (2001). «Characterization of plant growth promoting rhizobacteria isolated from polluted soils and containing 1-aminocyclopropane-1-carboxylate deaminase». *Can. J. Microbiol.* Vol 47, N° 7, pp. 642–652.
128. Höfte M. & Bakker P.A.H.M., (2007). Competition for iron and induced systemic resistance by siderophores of plant growth promoting rhizobacteria. *In: Soil biology: Microbial siderophores*. Heidelberg, Germany: Springer- Verlag Berlin, 121-133.
129. Keel, C., Schnider, U., Maurhofer, M., Voisard, C., Laville, J., Burger, U., Wirthner, P., Haas, D., et Défago, G., (1992). “Suppression of root diseases by *Pseudomonas fluorescens* CHAO: Importance of the bacterial secondary metabolite 2,4-diacetylphloroglucinol”, *Mol. Plant. Microbe Interact.*, 5, 4-13.
130. Baker. R., Elad Y., Sneh B. (1986). Physical, biological and host factors in iron competition in soils. 77-84. *In: T. R. Swin Burne “Iron, Siderophores and competition in soils plant diseases”*. NATOADU. Res. Work shop, U. K Plenum. Press. New York and London.
131. Nielsen, T.H., Christophersen, C., Anthoni, U., Serensen, J., (1999). “A new cyclic depsipeptide with surfactant and antifungal properties produced by *Pseudomonas fluorescens* DR54”, *J Appl Microbiol.*, 87, 80-90.
132. Glandorf, D.C.M., Verheggen, P., Jansen, T., Thomashow, L.S., Leeflang, P., Smit, E., Wernars, K., Bakker, P.A.H.M. and Van Loon, L.C., (1998). “Field release of genetically modified *Pseudomonas putida* WCS358r to study effects on the indigenous soil microflora”, *In: Workshop Proceedings Leeuwenhorst Congress Centre Noordwijkerhout, the Netherlands, Coordination Commission Risk Assessment Research (CCRO)*, 5-6, 41-46.
133. Howell, C.R., (2006). Understanding the mechanisms employed by *Trichoderma virens* to effect biological control of cotton diseases. *Phytopathology* 96, 178–180.
134. Nowak-Thompson, B., Chaney, N., Wing, S., Gould, S., Loper, J.E., (1999). “Characterization of the pyoluteorin biosynthetic gene cluster of *Pseudomonas fluorescens* Pf-5”, *J Bacteriol*, 181, 2166-2174.
135. Chin-A-Woeng, T., Bloemberg, G.V., Van der Bij, A., Van der Drift, K.M.G.M., Schripsema, J., Kroon, B., Scheffer, R.J., Keel, C., Bakker, P.A.H.M., Tichy, H.V., De Bruijn, F.J., Thomas-Oates, J.E. and Lugtenberg, B.J.J., (1998). “Biocontrol by phenazine-1-carboxamide-producing *Pseudomonas chlororaphis* PCL1391 of tomato root rot caused by *Fusarium oxysporum* f.sp. *radicis-lycopersici*”, *Mol. Plant- Microbe Interact*, 11, 1069-1077.
136. Meyer, J.M., Stinzi, A., Poole, K., (1999). “The ferripyoverdine receptor FpvA of *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 recognizes the ferripyoverdines of *P. aeruginosa* PAO1 and *P. fluorescens* ATCC 13525”, *FEMS Microbiol Lett*, 170, 145-150.
137. Jesu, S, M.B., Van Der, D.K.M.G.M., Olsson, P.E., Thomas-Oates, J.E., Van Loon, L.C Bakker, P.A.H.M., (2001). “Analysis of the *pmsceab* gene cluster involved in biosynthesis of salicylic acid and the siderophore pseudomonine in the

- strain *Pseudomonas Fluorescens Wcs374*", Journal Of Bacteriology, (6), 183, 1909-1920.
138. Palleroni, N.J., (1992). "Introduction to the family *Pseudomonadaceae*", The prokaryotes, Springer Verlag, New York, 3071-3085.
 139. Teintze, M., Hossain, M.B., Barnes, C.L., Leong J., Van der, H.D., (1981). "Structure of ferripseudobactin, a siderophore from plant growth promoting *Pseudomonas B10*", Biochemistry, 20, 6446-6457.
 140. Mercado-Blanco, J., Van der Drift, K.M.G.M., Olsson, P.E., Thomas-Oates, J.E., Van Loon, L.C., Bakker, P.A.H.M., (2001). "Analysis of the *pmsCEAB* gene cluster involved in biosynthesis of salicylic acid and the siderophore pseudomonine in the biocontrol strain *Pseudomonas fluorescens WCS374*", J. Bacteriol, 183 , 1909-1920.
 141. Burr, T.J., Schroth, M.N., and Suslow, T., (1978). "Increased potato yields by treatment of seedpieces with specific strain of *Pseudomonas fluorescens* and *P. putida*", Phytopathology, 68, 1377-1383.
 142. Sharma, A., Johri, B.N., (2003). "Combat of iron-deprivation through a plant growth promoting fluorescent *Pseudomonas* strain GRP3A IN MUNG BEAN *Vigna radiata* L. Wilzeck", Microbiol Res., 158, 77-81.
 143. Gutterson, N. (1990). Microbial fungicides: recent approaches to elucidating mechanisms, Crist. Rev. Biotechnol 10, 69-91.
 144. Cox, C. D., Rinehart, K. I., Moore, M. L. and Cook, J. C. (1981). Pyochelin: Novel structure of a non chelating growth promoter of *Pseudomonas aenginoso* proc. Nath. Acad. Sei. U.S.A. 78 : 4256-4260.
 145. Digat, B., (1994). "Les bactéries stimulatrices de la croissance des plantes : Le cas des *Pseudomonas* .The plant growth promoting rhizobacteria", An example with *Pseudomonas*, C.R. Acad. Agric., Fr, 80, (2), 125-140.
 146. Ellis, R.J., T.M. Timms-Wilson, and M.J.Bailey. (2000). Identification of conserved traits in fluorescent *Pseudomonas* with antifungal activity. Environ. Microbiol.2: 274.284.
 147. Neilands, J.B., (1995). "Siderophores: Structure and function of microbial iron Transport compounds", J. Biol. Chem., 270, 26723-26726.
 148. Ongena M. et al., (2007). Surfactin and fengycin lipopeptides of *Bacillus subtilis* as elicitors of induced systemic resistance in plants. Environ. Microbiol., 9, 1084-1090.
 149. Persello-Cartieaux F., Nussaume L. & Robaglia C., (2003). Tales from the underground: molecular plantrhizobacteria interactions. Plant Cell Environ., 26, 189- 199.
 150. Meziane H. et al., (2005). Determinants of *Pseudomonas putida* WCS358 involved in inducing systemic resistance in plants. Mol. Plant Pathol., 6, 177-185.
 151. Gomez-Gomez L. & Boller T., (2002). Flagellin perception: a paradigm for innate immunity. Trends Plant Sci., 7, 251-256.
 152. Reitz M. et al., (2002). Importance of the O-antigen, coreregion and lipid A of rhizobial lipopolysaccharides for the induction of systemic resistance in potato to *Globodera pallida*. Nematology, 4, 73-79.

153. De Vleeschauwer D., Cornellis P. & Höfte M., (2006). Redox-active pyocyanin secreted by *Pseudomonas aeruginosa* 7NSK2 triggers systemic resistance to *Magnaporthe grisea* but enhances *Rhizoctonia solani* susceptibility in rice. *Mol. Plant-Microbe Interactions*, **19**, 1406-1419.
154. De Meyer G. & Höfte M., (1997). Salicylic acid produced by the rhizobacterium *Pseudomonas aeruginosa* 7NSK2 induces resistance to leaf infection by *Botrytis cinerea* on bean. *Phytopathology*, **87**, 588-593.
155. Maurhofer M. et al., (1998). Salicylic acid biosynthetic genes expressed in *Pseudomonas fluorescens* strain P3 improve the induction of systemic resistance in tobacco against tobacco necrosis virus. *Phytopathology*, **88**, 678- 684.
156. Audenaert K., Pattery T., Cornelis P. & Höfte M., (2002). Induction of systemic resistance to *Botrytis cinerea* in tomato by *Pseudomonas aeruginosa* 7NSK2: Role of salicylic acid, pyochelin, and pyocyanin. *Mol. Plant- Microbe Interactions*, **15**, 1147-1156
157. Iavicoli A., Boutet E., Buchala A. & Metraux J.P., (2003). Induced systemic resistance in *Arabidopsis thaliana* in response to root inoculation with *Pseudomonas fluorescens* CHA0. *Mol. Plant-Microbe Interactions*, **16**, 851-858.
158. Siddiqui I.A. & Shaukat S.S., (2003). Suppression of rootknot disease by *Pseudomonas fluorescens* CHA0 in tomato: importance of bacterial secondary metabolite, 2,4-diacetylphloroglucinol. *Soil Biol. Biochem.*, **35**, 1615-1623.
159. Soyulu, S., Bennett, M.H., Mansfield. J.W., (2002), "Induction of Phytoalexin Accumulation in Broad Bean (*Vicia faba*L.) Cotyledons Following Treatments with Biotic and Abiotic Elicitors", *Turk J Agric For.*, 26, 343-348.
160. Huckelhoven R., (2007). Cell wall. Associated mechanisms of disease resistance and susceptibility. *Annu. Rev. Phytopathol.*, **45**, 101-127.
161. Zdor, R.E., Anderson, A .J., (1992). "Influence of root colonizing bacteria on the defense responses of bean", *Plant Soil*, 140, 99-107.
162. Viebahn, M., (2005). "Field release of genetically modified *Pseudomonas putida* WCS358r: Molecular analysis of effects on microbial communities in the rhizosphere of wheat", Ph.D, Thesis Utrecht University, ISBN, 90-393.
163. Van Peer, R., Niemann, C.J, Schippers, B., "Induced resistance and phytoalexin accumulation in biological control of *Fusarium* wilt of carnation by *Pseudomonas* sp strain WCS417r", *Phytopathology*, 81, (1991),728-734.
164. Erbs G. & Newman M.A., (2003). The role of lipopolysaccharides in induction of plant defence responses. *Mol. Plant Pathol.*, **4**, 421-425.
165. Ryu C.M. et al., (2004). Bacterial volatiles induce systemic resistance in *Arabidopsis*. *Plant Physiol.*, **134**, 1017- 1026.
166. Tran H. et al., (2007). Role of the cyclic lipopeptide massetolide A in biological control of *Phytophthora infestans* and in colonization of tomato plants by *Pseudomonas fluorescens*. *New Phytol.*, **175**, 731-742.
167. Ramamoorthy, V., Samiyappan, R., (1999). Inducing systemic resistance by PGPR in crop plants. In XI Southern Regional Conference on Microbial Inoculants, Guntur, India February 19th-20th. (Abstr.).

168. Wei, L., Kloepper, J.W., Tuzun, S., (1996). Induced systemic resistance to cucumber diseases and increased plant growth by plant growth promoting rhizobacteria under field conditions. *Phytopathology* 86, 221-224.
169. Hoffland, E., Bakker, P.A.H.M., Van Loon, L.C., (1997). Multiple disease protection by rhizobacteria that induce systemic resistance-reply. *Phytopathology* 87, 138.
170. Chen, C., Bauske, E.M., Musson, G., Rodriguez-Kabana, R., Kloepper, J.W., (1995). Biological control of *Fusarium* wilt on cotton by use of endophytic bacteria. *Biol. Control* 5, 83-91.
171. M'Piga, P., Belanger, R.R., Paulitz, T.C., Benhamou, N., (1997). "Increased resistance to *Fusarium oxysporum* f sp. *radicis lycopersici* in tomato plants treated with the endophytic bacterium *Pseudomonas fluorescens* strain 63-28", *Physiol. Mol. Plant Pathol.*, 50, 301-320.
172. Viswanathan, R., Samiyappan, R., (1999a). Induction of systemic resistance by plant growth promoting rhizobacteria against red rot disease caused by *Collectotrichum falcatum* in sugarcane. *Proceedings of Sugar Technology Association of India*, Vol. 61, pp. 24-39.
173. Brooks, D.S., Gonzalez, C.F., Apple, D.N., Filer, T.H., (1994). Evaluation of endophytic bacteria as potential biological control agents for oak wilt. *Biol. Control* 4, 373-381.
174. Kado, C.I., (1992). Plant pathogenic bacteria. In: Balows, A., Truper, H.G., Dworkin, M., Harder, W., Schleifer, K.H. (Eds.), *the Prokaryotes*. Springer, New York, pp. 660-662.
175. Pleban, S., Ingel, F., Chet, I., (1995). Control of *Rhizoctonia solani* and *Sclerotium rolfsii* in the greenhouse using endophytic *Bacillus* spp. *Eur. J. Plant Pathol.* 101, 665-672.
176. Agrios, G.N., (2005). *Plant Pathology*. 5th Ed. Elsevier Academic Press, USA UK
177. Bingle, L.E.H., Bailey, C.M. et Pallen, M.J. (2008). Type VI secretion: a beginner's guide. *Current Opinion in Microbiology*, 11: 3-8.
178. Warmink, J.A. et van Elsas, J.D. (2008). Selection of bacterial populations in the mycosphere of *Laccaria proxima*: is type III secretion involved? *ISME Journal*, 2: 887-900.
179. Ogiso, H., Teraoka, T., Hosokawa, D. et Watanabe, M. (1991). Studies on the biological control of bacterial wilt disease of tomato by *pseudomonas fluorescens*. *Annals of the Phytopathological Society of Japan*, 58: 104.
180. Sanchez, L., Weidmann, S., Arnould, C., Bernard, A.R., Gianinazzi, S. et Gianinazzi-Pearson, V. (2005). *Pseudomonas fluorescens* and *Glomus mosseae* trigger *DMI3*-dependent activation of genes related to a signal transduction pathway in roots of *Medicago truncatula*. *Plant Physiology*, 139: 1065-1077.
181. Pivato, B., Offre, P., Marchelli, S., Barbonaglia, B., Mougel, C., Lemanceau, P. et Berta, G. (2009). Bacterial effects on arbuscular mycorrhizal fungi and mycorrhiza development as influenced by the bacteria, fungi, and host plant. *Mycorrhiza*, 19: 81-90.

182. Sharifi-Tehrani, A., Zala, M., Natsch, A., Moënne-Loccoz, Y. et Défago, G. (1998). Biocontrol of soil-borne fungal plant diseases by 2,4-diacetylphloroglucinol-producing fluorescent pseudomonads with different restriction profiles of amplified 16S rDNA. *European Journal of Plant Pathology*, 104: 631-643.
183. Hueck, C.J. (1998). Type III protein secretion systems in bacterial pathogens of animals and plants. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 62: 379-433.
184. Rainey, P.B. (1999). Adaptation on *Pseudomonas fluorescens* to the plant rhizosphere. *Environmental Microbiology*, 1: 243-257.
185. Jackson, R.W., Preston, G.M. et Rainey, P.B. (2005). Genetic characterization of *Pseudomonas fluorescens* SBW25 *rsp* gene expression in the phytosphere and *in vitro*. *Journal of Bacteriology*, 187: 8477-8488.
186. Greenberg, J.T. et Vinatzer, B.A. (2003). Identifying type III effectors of plant pathogens and analyzing their interaction with plant cells. *Current Opinion in Microbiology*, 6: 20-28.
187. Vinatzer, B.A., Jelenska, J. et Greenberg, J.T. (2005). Bioinformatics correctly identifies many type III secretion substrates in the plant pathogen *Pseudomonas syringae* and the biocontrol isolate *P. fluorescens* SBW25. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 18: 877-888.
188. Uzureau, S. (2007). «Quorum Sensing chez *Brucella melitensis* : caractérisation du régulateur transcriptionnel VjbR et de son régulon». Thèse de Doctorat en sciences, Facultés Universitaires Notre-Dame de la Paix, Belgique, 167p.
189. Hanzelka B.L. and Greenberg E.P. (1995). Evidence that the N-terminal region of the *Vibrio fischeri* LuxR protein constitutes an autoinducer-binding domain. *J. Bacteriol.* 177: 815 –817.
190. Whitehead. N. A, Barnard. A. M, Slater. H, Simpson. N. J and Salmond. G. P, (2001). «Quorum-sensing in Gram-negative bacteria». *FEMS Microbiol. Rev.* N°25, pp.365–404.
191. More´. M. I, Finger. L. D, Stryker. J. L, Fuqua. C, Eberhard. A, and Winans. S. C, (1996). «Enzymatic synthesis of a quorum-sensing autoinducer through use of defined substrates». *Science.* N°272, pp.1655–1658.
192. Parsek. M. R, Val. D. L, Hanzelka. B. L, Cronan. J. E. J and Greenberg. E. P, (1999). «Acyl homoserine-lactone quorum-sensing signal generation». *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* N°96, pp.4360–4365.
193. Bassler. B.L, Wright. M, Showalter. R.E and Silverman. M.R, (1993). «Intercellular signalling in *Vibrio harveyi*: sequence and function of genes regulating expression of luminescence». *Mol. Microbiol.* N° 9, pp.773-786.
194. Nasser. W and Reverchon. S, (2006). «New insights into the regulatory mechanisms of the LuxR family of quorum sensing regulators». *Anal. Bioanal. Chem.* Vol.387, N°2, pp.381-390.
195. Laue. B.E, Jiang. Y, Chhabra. S.R, Jacob. S, Stewart. G.S, Hardman. A, Downie. J.A, O'Gara. F, and Williams. P, (2000). «The biocontrol strain *Pseudomonas fluorescens* F113 produces the *Rhizobium* small bacteriocin, N-(3-hydroxy-7-cis-tetradecenoyl) homoserine lactone, *via* HdtS, a putative novel N-acylhomoserine lactone synthase». *Microbiology.* Vol.146, pp.2469-2480.

196. Zhang Z. and Pierson L.S. III (2001). A second quorum-sensing system regulates cell surface properties but not phenazine antibiotic production in *Pseudomonas aureofaciens*. *Appl. Environ. Microbiol.* 67: 4305–4315.
197. Wood D.W., Gong F., Daykin M.M., Williams P. and Pierson L.S. (1997). N-acyl-homoserine lactone-mediated regulation of phenazine gene expression by *Pseudomonas aereofaciens* 30- 84 in the wheat rhizosphere. *J. Bacteriol.* 179: 7663–7670.
198. Wood D.W., Gong F., Daykin M.M., Williams P. and Pierson L.S. (1997). N-acyl-homoserine lactone-mediated regulation of phenazine gene expression by *Pseudomonas aereofaciens* 30- 84 in the wheat rhizosphere. *J. Bacteriol.* 179: 7663–7670.
199. Steidle A., Allesen-Holm M., Riedel K., Berg G., Givskov M., Molin S. and Eberl L. (2002). Identification and characterization of an N-acylhomoserine lactone-dependent quorum-sensing system in *Pseudomonas putida* Strain IsoF. *Appl. Environ. Microbiol.* 68: 6371–6382.
200. Dong, Y.H., Wang, L.H., Xu, J.L., Zhang, H.B., Zhang, X.F. and Zhang, L.H. (2001) Quenching quorum-sensing-dependent bacterial infection by an N-acyl homoserine lactonase. *Nature* 411, 813-817.
201. Reimmann, C., Ginet, N., Michel, L., Keel, C., Michaux, P., Krishnapillai, V., Zala, M., Heurlier, K., Trianda & Ilu, K., Harms, H., De.fago, G. and Haas, D. (2002) Genetically programmed autoinducer destruction reduces virulence gene expression and swarming motility in *Pseudomonas aeruginosa* PAO1. *Microbiology* 148, 923-932.
202. Leadbetter, J.R. and Greenberg, E.P. (2000) Metabolism of acyl-homoserine lactone quorum-sensing signals by *Variovorax paradoxus*. *J. Bacteriol.* 182, 6921-6926.
203. Mae, A., Montesano, M., Koiv, V. and Palva, E.T. (2001) Transgenic plants producing the bacterial pheromone N-acyl-homoserine lactone exhibit enhanced resistance to the bacterial phytopathogen *Erwinia carotovora*. *Mol. Plant-Microbe Interact.* 14, 1035-1042.
204. Thrane, U. (2001) Developments in the taxonomy of *Fusarium* species based on secondary metabolites. In: *Fusarium*. (Eds. Summerell B.A., Leslie J.F., Backhouse D., Bryden W.L., Burgess L.W.), APS Press St. Paul, USA.
205. Salmond. G.P. C, Bycroft. B.W, Stewart. G.S.A.B and Williams. P, (1995). «The bacterial 'enigma': cracking the code of cell-cell communication». *Molec. Microbiol.* N°16, pp. 615-624.
206. Rifai, M.A. (1969). A revision of the genus *Trichoderma*. *Mycol. Papers*, 116: 1-56
207. Bisset, J.A revision of the genus *Trichoderma*. II. Infrageneric classification. (b) *Can. J. Bot.*, 1991, 69 : 2357-2372
208. Djerbi, M. (1988). Les maladies du palmier dattier. Projet régional de lutte contre le Bayoud. Alger .127p.
209. Laue. B.E, Jiang. Y, Chhabra. S.R, Jacob. S, Stewart. G.S, Hardman. A, Downie. J.A, O'Gara. F, and Williams. P, (2000). «The biocontrol strain *Pseudomonas fluorescens* F113 produces the *Rhizobium* small bacteriocin, N-(3-hydroxy-7-cis-

- tetradecenoyl)homoserine lactone, *via* HdtS, a putative novel N-acylhomoserine lactone synthase». *Microbiology*. Vol.146, pp.2469-2480.
210. Migheli, Q., Gonzalez-Candelas, L., Dealessi, L., Camponogara, A. and Ramon-vidal, D. (1998). Transformants of *Trichoderma longibrachiatum* overexpressing the β -1,4- endoglucanase gene egII show enhanced biocontrol of *Pythium ultimum* on cucumber. *Phytopathology* 88: 673-677.
 211. Caron., (2002). phytopathologiste Horti-Protection inc. conférence présentée lors des journées horticoles régionales à St-Rémi. Champignons phytopathogènes du sol. *Bull. Soc. Pharm.* 144: 211-224.
 212. Lorito, M., Woo, S.L., Iaccarino, M., Scala, F., (2006). Microrganismi antagonisti. In: Iaccarino, M. (Ed.), *Microrganismi Benefici per le Piante*. Idelson Gnocchi s.r.l., Napoli, Italia, pp. 146–175.
 213. Sivasithamparam, K., Ghisalberti, E.L., (1998). Secondary metabolism in *Trichoderma* and *Gliocladium*. In: Harman, G.E., Kubicek, C.P. (Eds.), *Trichoderma and Gliocladium*, Vol. 1. Taylor and Francis Ltd., London, pp. 139-191.
 214. Ghisalberti, E.L., Sivasithamparam, K., (1991). Antifungal antibiotics produced by *Trichoderma* spp. *Soil Biology & Biochemistry* 23, 1011–1020.
 215. Yedidia, I., Benhamou, N., Chet, I., (1999). Induction of defence responses in cucumber plants (*Cucumis sativus* L.) by the biocontrol agent *Trichoderma harzianum*. *Applied Environmental Microbiology* 65, 1061–1070.
 216. Harman, G.E., Howell, C.R., Viterbo, A., Chet, I., Lorito, M., (2004). *Trichoderma* species-opportunistic, avirulent plant symbionts. *Nature Review Microbiology* 2, 43–56.
 217. Woo, S.L., Lorito, M., (2007). Exploiting the interactions between fungal antagonists, pathogens and the plant for biocontrol. In: Vurro, M., Gressel, J. (Eds.), *Novel Biotechnologies for Biocontrol Agent Enhancement and Management*. IOS, Springer Press, Amsterdam, the Netherlands, pp. 107–130 (Chapter 6).
 218. Lorito, M., Woo, S.L., Iaccarino, M., Scala, F., (2006). Microrganismi antagonisti. In: Iaccarino, M. (Ed.), *Microrganismi Benefici per le Piante*. Idelson Gnocchi s.r.l., Napoli, Italia, pp. 146–175.
 219. Lotan, T., Fluhr, R., (1990). Xylanase, a novel elicitor of pathogenesis-related proteins in tobacco, uses a nonethylene pathway for induction. *Plant Physiology* 93, 811–817.
 220. King, E.O., Ward, M.K., Raney, D.E., (1954). "Two simple media for the demonstration of pyocyanin and fluorescin", *JLab Clin Med*, 301-307.
 221. Jonsthorpe, A., Booth, C., (1982). "Plant pathologist's pocket book". 2nd ed Commonwealth, Mycological Institute, Kew Surrey, England, 439p.
 222. Chennaoui, N., "actions des rhizobactéries bénéfiques sur l'amélioration de la stimulation de la croissance des plantes : Importance de la compétence rhizosphérique chez les *Pseudomonas* spp. fluorescents». Thèse Magister. USD. Blida. (2008), 161.

223. Sy .A.A., (1976) - Contribution à l'étude de *Pyricularia oryzae* Cav. Recherche in vitro d'antagonistes dans une perspective de lutte biologique. Thèse Doct. Ingénieur INP Toulouse, n°534, 236 p.
224. Clive,G., Jones. J., Daniel Hare. et Steve. J. Compton. (1988). Measuring plant protein with the Bradford assay. *Journal of chemical ecology*, vol 15, no. 3, 1989
225. Van Peer. R., Van Kuik, A.J., Rattink. H., Schippers. B., (1990). "Control of *Fusarium* wilt in carnation grown on rockwool by *Pseudomonas* sp strain WCS417r and by Fe-EDDHA". *Neth J Plant Patho*196, 119-132.
226. Leeflang, P., Smit, E., Glandorf, D.C.M., Van Hannen, E.J. and Wernars, K., (2002). "Effects of *Pseudomonas putida* WCS358r and its genetically modified phenazine producing derivative on the *Fusarium* population in a field experiment, as determined by 18S rDNA analysis", *Soil Biol. Biochem*, 1021-1025.
227. Bounaga, N., (1975). "Germination de microconidies et macroconidies de *Fusarium oxysporum* f.sp. *albedinis*", *Bulletin de la Société d'Histoire Naturelle d'Afrique du Nord*, 39-44.
228. Daami- Remadi M., El Mahjoub M., (2001). Lutte biologique contre la pourriture aqueuse des tubercules de pomme de terre par *Trichoderma harzianum*. *Ann. l'INRAT* 74, p. 167–186.
229. Comporata ,(1985). « Antagonisme *in vitro* de *Trichoderma spp* vis à vis de *Rhizoctinia solani*, pp. 613-620. INRA Paris (FR).
230. Mirleau, P., Delorme, S., Philippot, L., Meyer, J.M., Mazurien. S., Lemanceau, P. Fitness in soil in and rhizosphere of *Pseudomonas fluorescens* C7R12 compared with a C7R12 mutant affected in pyoverdine synthesis and uptake *FEMS Microbiol Ecol* 34: 35-44.
231. Raaijmakers, J.M., Leeman, M., Van Oorschot, M.M.P., van der Sluis, I., Schippers, B. and Bakker, P.A.H.M. (1995). Dose-response relationships in biological control of *Fusarium wilt* of radish by *Pseudomonas* spp. *Phytopathology*. 85(10):1075-1081
232. De Boer, M., Van der Sluis, I., Van Loon, L.C., Bakker, P.A.H.M., (1997). "In vitro compatibility between fluorescent *Pseudomonas* spp. strains can increase effectivity of *Fusarium* wilt control by combinations of these strains. In: *Plant Growth-Promoting Rhizobacteria - Present Status and Future Prospects*", (A. Ogoshi, K. Kobayashi, Y. Homma, F. Kodama, N. Kondo and S. Akino, eds.), 380-382.
233. Stipanovic, R.D., (1979). "Control of *Rhizoctonia solani* on cotton seedlings with *Pseudomonas fluorescens* and with an antibiotic produced by the bacteria", *Phytopathology*, 69, 480-482. 111
234. Laville, J, Blumer, C., von Schroetter, C, Gaia,V., Défago, G., Keel, C., Haas D., (1998). "Characterization of the hcnABC gene cluster encoding hydrogen cyanide synthase and anaerobic regulation by ANR in the strictly aerobic biocontrol agent *Pseudomonas fluorescens* CHAO", *J Bacteriol*, 180, 3187-3196.
235. Sivan, A., Chet, I., (1989).The possible role of competition between *Trichoderma harzianum* and *Fusarium oxysporum* on rhizosphere colonization. *Phytopathology* 79, 198–203.

236. Hjeljord GL., Stensvand A., Tronsmo A. (2001). Antagonism of nutrient-activated conidia of *Trichoderma harzianum* (atroviride) P1 against *Botrytis cinerea*. *Phytopathology* 91, p. 1172-1179.
237. Davet, P., "Vie microbienne du sol et production végétale", INR, Paris, 383 p.
238. Van Wees S.C.M. et al., (1997). Differential induction of systemic resistance in *Arabidopsis* by biocontrol bacteria. *Mol. Plant-Microbe Interactions*, **10**, 716-724.
239. Wei, L., Kloepper, J.W., Tuzun, S., (1996). Induced systemic resistance to cucumber diseases and increased plant growth by plant growth promoting rhizobacteria under field conditions. *Phytopathology* 86, 221-224.
240. Neilands, J.B., "Siderophores: Structure and function of microbial iron Transport compounds", *J. Biol. Chem.*, 270, (1995), 26723-26726.
241. Dobbelaere. S, Vanderleyden. J, and Okon. Y, (2003). «Plant Growth-Promoting Effects of Diazotrophs in the Rhizosphere». *CRC Crit. Rev. Plant Sci.* Vol. 22, N° 2, pp.107-149.
242. Crowley E., Reid C.P.P, Szaniszlo P.J. (1987). «Microbial siderophores as iron sources for plants» –In: Iron transport in microbes, Plants and animals (G. Winhelmann, D. Vander- Helm, J.B. Neilands eds.). V.CH. Weinheim, pp375 -385.
243. Berthelin J., Leyval C., Laheurte F., De Guidici P. (1991). « Some consideration on the relation between phosphate solubilizing rhizobacteria and their effect on seedlings and plants growth related to phosphorus mobilization», pp 359-364 in: plant Growth-Promoting Rhizobacteria: Progress and Prospects. C. Keel, B. Koller, and G. Défago, eds. *Int. Org. Biol. Control Noxious Anim. plants/West. Palaerctic Reg. Sec. Bull.* 1418.
244. Sundara, B., Natarajan, V., Hari, K. (2002). «Influence of phosphorus solubilizing bacteria on the changes in soil available phosphorus and sugarcane and sugar yields». *Field Crops Research*. N°77, pp 43-49
245. Jofre, E. Lagares, A. and Mori, G. (2004). «Disruption of dTDP-rhamnose biosynthesis modifies lipopolysaccharide core, exopolysaccharide production, and root colonization in *Azospirillum brasilense*». *FEMS Microbiol. Lett.* vol 231, N°2, pp: 267-275.
246. Windham, M.T., Y. Elad, and R. Baker. (1986). A mechanism for increased plant growth induced by *Trichoderma* spp. *Phytopathology* 76: 518-52.
247. Khalid. A, Arshad. M and Zahir. Z.A, (2004). «Screening plant growth-promoting rhizobacteria for improving growth and yield of wheat». *J. Applied Microbiol*, N° 29, pp. 473-480.
248. Egamberdiyeva. D, (2007). «The effect of plant growth promoting bacteria on growth and nutrient uptake of maize in two different soils». *Appl. Soil. Eco*, vol.36, pp.184-189.
249. Salantur. A, Ozturk. A and Akten. S, (2006). «Growth and yield response of spring wheat (*Triticum aestivum* L.) to inoculation with rhizobacteria». *Plant Soil Environ*, N° 52, pp. 111-118.
250. Cattelan. A.J, Hartel. P.G and Fuhrmann. J.J, (1999). «Screening for plant growth-promoting rhizobacteria to promote early soybean growth». *Soil Sci.Soc.Am. J.*, vol.63, pp.1670–1680.

251. Ryu, C.M., Hu, C.H., Reddy, M.S. and Kloepper, J.W. (2003). «Different signaling pathways of induced resistance by rhizobacteria in *Arabidopsis thaliana* against two pathovars of *Pseudomonas syringae*». *New Phytol.* Vol 160, N°2, pp:413-420.
252. Gamalero. E, Lingua. G, Tombolini. R, Avidano. L, Pivato. B, and Berta. G, (2005). «Colonization of tomato root seedlings by *Pseudomonas fluorescens* 92rkG5: spatio-temporal dynamics, localization, organization, viability, and culturability». *Microbial Ecology*, N° 50, pp. 289-297.
253. Rincon. A, Ruiz-Diez. B, Garcia-Fraile. S, Garcia. J, Fernandez-Pascual. M, Pueyo. J, and de Felipe. M, (2005). «Colonization of *Pinus halepensis* roots by *Pseudomonas fluorescens* and interaction with ectomycorrhizal fungus *Suillus granulatus*». *FEMS Microbial Ecology*, N° 51, pp. 303-311.
254. Dandurand. L. M, Schotzko. D. J, and Knudsen. G. R, (1997). «Spatial patterns of rhizoplane populations of *Pseudomonas fluorescens*». *Applied and Environmental Microbiology*, N° 63, pp. 3211-3217.
255. Bloemberg. G.V. and Lugtenberg. B.J.J, (2001). «Molecular basis of plant growth promotion and biocontrol by rhizobacteria», *Curr. Opin. Plant Biol.* Vol 4,N°4, pp 343-350.
256. Rainey. P.B, (1999). «Adaptation of *Pseudomonas fluorescens* to the plant rhizosphere». *Environ. Microbiol*, N° 3, pp. 243-257.
257. Karlson. U, Dowling. D, O'Gara. F, Rivilla. R, Bittens. M, Francesconi. S, Pritchard. H, and Pedersen. H.C, (1998). «Development of self-contained plant/GMM systems for soil bioremediation», p. 23-31. *In de Vries. G.H (ed.), Past, present and future risk assessment when using GMOs.* Overschild, The Netherlands.

