

	<b>GLOSSAIRE</b> .....	i
	<b>LISTE DES ABREVIATIONS</b> .....	iii
	<b>LISTE DES FIGURES</b> .....	v
	<b>LISTE DES TABLEAUX</b> .....	vi
	<b>LISTE DES ANNEXES</b> .....	vii
	<b>INTRODUCTION</b> .....	1
	<b>SYNTHESE BIBLIOGRAPHIQUE</b>	
I.	<b>GENERALITES SUR LA RHIZOSPHERE</b> .....	4
I.1.	Définition .....	4
I.2.	Exsudation racinaire .....	5
I.3.	Les microorganismes rhizosphériques et leurs effets sur la plante .....	5
I.3.1.	<i>Les Bactéries</i> .....	6
I.3.2.	<i>Les Champignons</i> .....	6
I.3.3.	<i>Les Actinomycètes</i> .....	7
II.	<b>INTERACTIONS BIOLOGIQUES ANTAGONISTES DANS LA RHIZOSPHERE</b> .....	8
II.1.	La compétition.....	8
II.2.	L'antagonisme .....	10
II.2.1.	<i>Antibiose</i> .....	10
II.2.2	<i>Parasitisme et prédation</i> .....	11
III.	<b>GENERALITES SUR LES CHAMPIGNONS PHYTOPATHOGENES</b> .....	11
III.1.	<b>Evolution générale de l'infection d'une plante par les champignons phytopathogènes</b> .....	12
III.1.1.	<i>Contamination</i> .....	12
III.1.2.	<i>La pénétration</i> .....	13
III.1.3.	<i>L'infection</i> .....	13
III.1.4.	<i>La dissémination du pathogène</i> .....	14
III.1.5.	<i>La conservation et la vitalité du pathogène</i> .....	14

III.2.	<b>Exemple de champignon phytopathogène.....</b>	15
III.2.1.	<i>Fusarium spp</i> .....	15
III.2.1.1.	<i>Systématique</i> .....	15
III.3.	<b>Lutte biologique contre les phytopathogènes.....</b>	16
III.3.1.	<i>Définition</i> .....	16
III.3.2.	<i>Mécanisme d'action des agents de lutte biologique</i> .....	17
III.3.3.	<i>Exemples d'agents de lutte biologique contre les champignons phytopathogènes</i> .....	18
III.3.4.	<i>Avantages de l'utilisation des agents de lutte biologique</i> .....	18
III.3.5.	<i>Côtés négatifs des agents de lutte biologique</i> .....	19
III.4.	<b>Autres moyens de lutte contre les champignons phytopathogènes.....</b>	19
III.4.1.	<i>Pratiques culturales</i> .....	19
III.4.2.	<i>Utilisation de fongicides</i> .....	20

## **MATERIELS ET METHODES**

I.	<b>MATERIELS</b> .....	21
I.1.	Matériels Biologiques .....	21
I.1.1.	Isolats utilisés .....	21
I.1.1.1.	<i>Isolat fongique pathogène</i> .....	21
I.1.1.2.	<i>Isolats bactériens</i> .....	21
I.1.1.3.	<i>Réactivation des isolats</i> .....	21
I.1.2.	Les plantes utilisées.....	22
II.	<b>METHODES</b> .....	23
II.1.	<b>Isolement des champignons phytopathogènes</b> .....	23
II.1.1.	Techniques d'isolement.....	23
II.1.1.1.	<i>Isolement sans désinfection préalable</i> .....	23
II.1.1.2.	<i>Isolement avec désinfection préalable</i> .....	24
II.1.2.	Identification des isolats.....	24
II.1.3.	Conservation des isolats .....	25
II.2.	<b>Test de virulence de <i>Fusarium sp.</i> sur la germination des plantes</b> .....	26
II.2.1.	Revivification des isolats de champignon.....	26
II.2.2.	Stérilisation des graines.....	26
II.2.3.	Dispositif du test de virulence .....	26
II.2.3.1.	<i>Contamination en pré-levée</i> .....	27

II.2.3.2.	<i>Contamination en post-levée</i> .....	27
II.2.4.	Evaluation des résultats .....	27
II.3.	<b>Test de virulence de <i>Fusarium</i> sp. sur la croissance végétative des plantes</b> .....	28
II.4.	<b>Les isolats microbiens antagonistes de champignons phytopathogènes.</b>	29
II.4.1.	Identification et purification des isolats .....	30
II.4.2.	Conservation des isolats .....	30
II.4.2.1.	<i>Gélose inclinée à 4°C</i> .....	30
II.4.2.2.	<i>Conservation à -80°C</i> .....	30
II.5.	<b>Test d'antagonisme des <i>Pseudomonas</i> et des Actinomycètes vis-à-vis de <i>Fusarium</i> sp.</b> .....	31
II.5.1.	<b>Test <i>in vitro</i></b> .....	31
II.5.1.1.	Déroulement de la confrontation.....	31
II.5.1.2.	Evaluation des résultats .....	32
II.5.2.	<b>Bioprotection de la tomate contre la fonte de semis causée par <i>Fusarium</i></b> .....	33
II.5.2.1.	Préparation d'inoculum de <i>Fusarium</i> .....	33
II.5.2.2.	Préparation d'inoculum de <i>Pseudomonas</i> et d'Actinomycète .....	33
II.5.2.3.	Traitement des graines de plante avec les isolats de <i>Pseudomonas</i> et d'Actinomycète .....	34
II.5.2.4.	Traitement du sol avec les isolats de <i>Fusarium</i> .....	34
II.5.2.5.	Déroulement du test .....	34

## **RESULTATS ET INTERPRETATIONS**

I	<b>Isolement et caractérisation morphologique des champignons phytopathogènes</b> .....	35
I.1.	Les isolats de champignons phytopathogènes.....	35
I.2.	Caractéristiques morphologiques des isolats.....	36
I.2.1.	Isolats <i>Fo-01</i> et <i>Fo-02</i> .....	36
I.2.2.	Isolat <i>Alt 01</i> .....	36
I.2.3.	Isolat <i>Rh-01</i> .....	37
I.2.4.	Isolat <i>Ni-01</i> .....	38
I.2.5.	Isolat <i>Hel-01</i> .....	38
I.2.6.	Isolat <i>Pn-01</i> .....	39

II.	<b>Virulence des isolats de <i>Fusarium</i> sur la germination des graines <i>in vitro</i></b> .....	40
II.1.	Virulence des isolats <i>in vitro</i> .....	40
II.1.1.	Effet de <i>Fo-01</i> et <i>Fo-02</i> sur la germination des graines <i>in vitro</i> .....	40
II.1.2.	Effet de <i>Fo-01</i> et <i>Fo-02</i> sur la croissance racinaire des plantes.....	41
III.	<b>Virulence des isolats de <i>Fusarium in vivo</i></b> .....	41
III.1.	Virulence de l'isolat <i>Fo-01</i> .....	41
III.2.	Virulence de l'isolat <i>Fo-02</i> .....	42
IV.	<b>Isolement des isolats d'Actinomycète et de <i>Pseudomonas</i></b> .....	45
V.	<b>Inhibition du développement de l'isolat <i>Fo-02</i> par les isolats de <i>Pseudomonas</i> et d'Actinomycète <i>in vitro</i></b> .....	46
VI.	<b>Inhibition de la virulence de <i>Fusarium Fo-02</i> par le <i>Pseudomonas Ps16</i> et l'Actinomycète <i>Ac66 in vivo</i></b> .....	49
	<b>DISCUSSION</b> .....	51
	<b>CONCLUSION ET PERSPECTIVES</b> .....	56
	<b>REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES</b>	
	<b>ANNEXES</b>	

## ***GLOSSAIRE***

**Abiotique :** Milieu qui ne permet pas la vie, ou d'un facteur qui ne concerne pas directement la vie

**Antibiotique :** Produit d'origine microbienne ou un dérivé, qui tue les microorganismes sensibles ou inhibe leur développement.

**Appressorium :** Extrémité d'un hyphe ou d'un tube germinatif permettant la fixation d'un champignon sur son hôte et sa pénétration.

**Biomasse :** La masse totale des organismes vivant mesurée dans une population.

**Biotique :** Ce qui est relatif à la vie

**Chancre :** Lésion nécrotique plus ou moins localisée.

**Chlamydospore :** Spore issu de la multiplication asexuée, disposant d'une paroi épaisse assurant sa protection et sa conservation en condition défavorable.

**Compétition :** Interaction entre deux organismes cherchant à utiliser les mêmes ressources (alimentaire, spatiale ou autres).

**Contamination :** Première étape du développement d'une maladie durant laquelle l'agent pathogène pénètre dans l'hôte à partir de ses propres ressources.

**Désinfection :** Destruction, inhibition ou élimination des microorganismes pathogènes, se rapporte le plus souvent au traitement des objets par des produits chimiques.

**Dissémination :** Etape finale d'une maladie durant laquelle les spores vont être libérées par divers moyens, et servira à la contamination de plantes saines.

**Ecosystème :** Complexe dynamique formé de communautés de plantes, d'animaux et de microorganismes et de leur environnement non vivant qui, par leur interaction, forment une unité fonctionnelle.

**Enzyme :** Protéine catalytique spécifique de la réaction catalysée et des substrats.

**Fongicide :** Agent d'origine chimique ou biologique qui tue les champignons (inférieur ou supérieur).

**Hyphe :** Filament mycélien qui constitue l'appareil végétatif des champignons.

**Microflore :** Ensemble des organismes microscopiques correspondant essentiellement aux bactéries et aux champignons.

**Microorganisme procaryote :** Microorganisme dépourvu de noyau véritable entouré d'une membrane.

**Microorganismes hétérotrophes :** Organismes exigeant la présence de composés organiques pour leur croissance et multiplication. Ces composés organiques sont utilisés comme sources de carbone et d'énergie.

**Mycélium :** Appareil végétatif du champignon constitué d'un ensemble de filaments appelés hyphes.

**Parasite :** Entité étrangère, uni ou pluricellulaire, vivant aux dépens d'un hôte et dont la multiplication comporte plusieurs stades accomplis chez un même hôte ou, parfois, de manière indispensable, chez plusieurs hôtes.

**Sidérophore :** Élément chimique sécrété par les microorganismes et capable de chélater l'ion Fer.

**Spore :** organe de conservation ou de propagation des champignons issu de la multiplication asexuée (conidie..) ou sexuée (ascospore, basidiospore...).

**Téliospore :** Spore épaisse à partir de laquelle se forme les basides chez les Urédinales.

**Toxine :** Produit ou composé qui, à faible concentration, peut endommager une autre cellule ou organisme. Souvent, ce terme se rapporte à une protéine toxique, mais les toxines peuvent être des lipides ou d'autres substances.

**Trachéomyose :** Maladie vasculaire de certaines plantes supérieures causée par une infection fongique des tissus conducteurs.

# LISTE DES ABREVIATIONS

<b>Ac:</b>	Actinomycètes
<b>ADN:</b>	Acide DésoxyriboNucléique
<b>Alt:</b>	<i>Alternaria</i> sp.
<b>C:</b>	Cytosine
<b>Fo:</b>	<i>Fusarium</i> sp.
<b>FOFIFA:</b>	Foibe Fikarohana ampiharina amin'ny Fampanandrosoana ny eny Ambanivohitra
<b>G:</b>	Guanine
<b>HCN:</b>	Hydrogen cyanide
<b>Hel:</b>	<i>Helminthosporium</i> sp.
<b>L<sub>Te</sub>:</b>	Accroissement moyen des racelles témoins.
<b>L<sub>Tr</sub>:</b>	Accroissement moyen des racelles traitées.
<b>MgSO<sub>4</sub>:</b>	Sulfate de magnésium
<b>Mi:</b>	Mesure de la croissance mycélienne de champignon phytopathogène influencée.
<b>Mo:</b>	Mesure de la croissance mycélienne normale représentant le rayon opposé à la colonie du germe testé.
<b>Ni:</b>	<i>Nigrospora</i> sp.
<b>PCA:</b>	Potato carrot agar
<b>PDA:</b>	Potato dextrose Agar
<b>PGPR:</b>	Plant Growth Promoting Rhizobacteria
<b>PG<sub>Te</sub>:</b>	Pourcentage de germination des graines témoins

<b>PG<sub>Tr</sub>:</b>	Pourcentage de germination des graines traitées
<b>PI:</b>	Pourcentage d'inhibition de la croissance mycélienne de champignon phytopathogène par le germe antagoniste
<b>PICR:</b>	Pourcentage d'inhibition de la croissance racinaire
<b>PIG:</b>	Pourcentage d'inhibition de la germination
<b>Pn:</b>	<i>Penicillium</i> sp.
<b>Ps:</b>	<i>Pseudomonas fluorescents</i>
<b>R:</b>	Nombre de microorganismes dans la <b>R</b> hizosphère
<b>Rh:</b>	<i>Rhizopus</i> sp.
<b>rpm:</b>	Révolution par minute
<b>S:</b>	Nombre de microorganismes dans le <b>S</b> ol non rhizosphérique
<b>SNA:</b>	Synthetic nutrient poor agar
<b>sp:</b>	Species
<b>UFC/ml:</b>	Unité formant colonie par millilitre d'échantillon.
<b>V/V:</b>	Volume sur volume.

## LISTE DES FIGURES

<b>Figure 1</b> : Fonctionnement et structure de la rhizosphère. ....	4
<b>Figure 2</b> : Cycle de développement d'un actinomycète du genre <i>Streptomyces</i> sur milieu solide.....	8
<b>Figure 3</b> : Cycle général de la maladie de flétrissement vasculaire causée par <i>F.oxysporum</i> sp. <i>Lycopersici</i> chez la tomate.....	12
<b>Figure 4</b> : Dispositif expérimental d'isolement de champignons phytopathogènes.....	25
<b>Figure 5</b> : <i>Fusarium</i> sp. ; (A) : Caractères morphologiques ; (B) : sous microscope .....	36
<b>Figure 6</b> : <i>Alternaria</i> sp. ; (A) : Caractères morphologiques ; (B) : sous microscope .....	37
<b>Figure 7</b> : <i>Rhizopus</i> sp. ; (A) : Caractères morphologiques ; (B) : sous microscope .....	37
<b>Figure 8</b> : <i>Nigrospora</i> sp. ; (A) : Caractères morphologiques ; (B) : sous microscope.....	38
<b>Figure 9</b> : <i>Helminthosporium</i> sp. ; (A) : Caractères morphologiques ; (B) : sous microscope .....	39
<b>Figure 10</b> : <i>Penicillium</i> sp. ; (A) : Caractères morphologiques ; (B) : sous microscope.....	39
<b>Figure 11</b> : Taux de jeunes plantes d'haricot malades après la contamination par <i>Fo-01</i> au niveau du système racinaire.....	42
<b>Figure 12</b> : Taux de jeunes plantes d'haricot malades et mortes après la contamination par <i>Fo-02</i> au niveau du système racinaire (A) et du collet (B) .....	43
<b>Figure 13</b> : Taux de jeunes plantes de tomate malades et mortes après la contamination par <i>Fo-01</i> au niveau du système racinaire .....	43
<b>Figure 14</b> : Taux de jeunes plantes de tomate malades et mortes après la contamination par <i>Fo-02</i> au niveau du système racinaire (A) et du collet (B) .....	44
<b>Figure 15</b> : Taux de jeunes plantes de concombre malades après la contamination par <i>Fo-01</i> au niveau du système racinaire .....	44
<b>Figure 16</b> : Taux de jeunes plantes de concombre malades et mortes après la contamination par <i>Fo-02</i> au niveau du système racinaire (A) et du collet (B) .....	44
<b>Figure 17</b> : Souches pures d'Actinomycètes sur milieu Waksman et <i>Pseudomonas</i> .....	45

## LISTE DES TABLEAUX

<b>Tableau n°1</b> : Exemples de souches de <i>Fusarium oxysporum</i> et de leurs plantes hôtes .....	16
<b>Tableau n°2</b> : Les isolats fongiques isolés selon l'organe végétal d'isolement et identifiés selon les caractères morphologiques. ....	35
<b>Tableau n°3</b> : Taux de mortalité des graines contaminées par les isolats <i>Fo-01</i> et <i>Fo-02</i> .....	40
<b>Tableau n°4</b> : Croissance racinaire des plantules contaminées par les isolats <i>Fo-01</i> et <i>Fo-02</i> .....	41
<b>Tableau n°5</b> : Isolats d'Actinomycète et de <i>Pseudomonas</i> fluorescent isolés à partir des sols rhizosphériques. ....	46
<b>Tableau n°6</b> : Inhibition du développement de <i>Fusarium Fo-02</i> par les isolats de <i>Pseudomonas</i> fluorescent et d'Actinomycète isolés du sol rhizosphérique .....	47
<b>Tableau n°7</b> : Taux de mortalité des jeunes plantes contaminées par <i>Fo-02</i> et traitées ou non avec le <i>Pseudomonas Ps 16</i> et l'Actinomycète <i>Ac 66 in vivo</i> .....	49
<b>Tableau n°8</b> : Biomasse aérienne des jeunes plantes lors du test d'antagonisme de <i>Pseudomonas Ps 16</i> et d'Actinomycète <i>Ac 66</i> au <i>Fusarium Fo-02 in vivo</i> . ...	50

## **LISTE DES ANNEXES**

**Annexe I** : Composition des milieux de culture.

**Annexe II** : Solutions et colorant

# INTRODUCTI ON





Animaux ravageurs, plantes parasites, insectes, nématodes et micro-organismes phytopathogènes (bactéries, champignons, mycoplasmes, virus) sont responsables, chaque année, de la perte d'environ 20 à 40% du rendement des cultures avant récolte (Riba & Silvy, 1989) et de 1 et 20% après récolte à Madagascar (Milasoia & Bart, 2003). Parmi les agents phytopathogènes qui causent beaucoup de dégâts aux cultures, les champignons responsables de la pourriture racinaire telle que *Fusarium* spp. s'avèrent plus dangereux du fait de leur caractère ubiquiste et peuvent poser de gros problèmes en agriculture et en horticulture (Hofte et al., 1992). Pour tout type de sol, la monoculture constitue l'un des facteurs énormément favorables au développement de ces champignons. C'est le cas observé souvent au niveau des cultures maraîchères où des rotations de culture sont rarement observées dans certaines parcelles. Pourtant, les maladies causées par ces champignons sont difficiles à diagnostiquer et se répandent facilement, constituant ainsi l'origine d'une importante perte pour les cultivateurs. Un tel cas a été également observé en Tunisie où la production de tomate est toujours freinée par certaines maladies dont la fusariose des racines et du collet qui cause d'importantes pertes dans les cultures sur ou hors sol (Ozbay & Newman, 2004). Dû à leurs facilités de dissémination et à leurs persistances dans le sol, la lutte contre ces maladies reste limitée à des mesures prophylactiques (Benhamou et al., 1997).

Durant les cinquante dernières années, la méthode la plus utilisée pour contrôler ces maladies est la fumigation du sol par des pesticides de synthèse telle que le bromure de méthyle. Ce genre de produit chimique qui a un faible coût d'utilisation, est plus efficace par rapport à l'utilisation du fongicide traditionnel, surtout quand on a affaire à des organismes phytopathogènes difficiles à atteindre. Les différents éléments de ces substances ont, pourtant, des conséquences néfastes sur l'environnement, dont entre autres, l'accumulation de résidus entraînant la pollution des sols (Hibar et al., 2007), l'apparition et la généralisation des mécanismes de résistance chez les pathogènes (Reid et al., 2002), le déséquilibre écologique dû au fait que beaucoup de ces composés de synthèse ont un large spectre d'action, détruisant non seulement les agents nuisibles, mais également les autres populations de l'écosystème (Benhamou et al., 2002). Tout récemment, il a été démontré que l'efficacité des fongicides de synthèse est assez sélective vis-à-vis de la nature des plantes cultivées et dépend largement des conditions de culture et ou d'application (Rioux et al., 2011).

Au regard de ces inconvénients, l'utilisation ou l'exploitation de la microflore tellurique non pathogène en vue d'éliminer les ravageurs de cultures constitue une

technologie émergente et écologiquement compatible tout en diminuant l'emploi de pesticides de synthèse. On parle ainsi de lutte biologique.

Globalement, l'effet protecteur conféré par ces agents de lutte biologique est basé sur la compétition pour les nutriments essentiels, sur l'activité antagoniste vis-à-vis de la croissance des pathogènes via la production d'antibiotiques ou d'enzymes et/ou sur leur capacité à stimuler des systèmes de défense chez l'hôte végétal. Parmi ces microorganismes, les Actinomycètes sont les plus connus et classés parmi les plus actifs (Antoun *et al.* 1980, Crawford *et al.* 1993). Par contre, les bactéries du genre *Pseudomonas* se sont montrées également capables d'initier l'expression des mécanismes de défense dans tous les organes de la plante, lui permettant de mieux se défendre vis-à-vis d'une agression ultérieure (Curl et Tmelove 1986). En milieu naturel, la rhizosphère des plantes saines abrite des *Pseudomonas* et/ou des Actinomycètes capables, de façon durable, d'assurer la défense de ces plantes contre les agents fongiques phytopathogènes. Pourtant, certaines pratiques agricoles (monoculture, utilisation abusive de pesticides chimiques...) et/ou activités anthropiques (activités industrielles,...) perturbent le fonctionnement de l'écosystème induisant ainsi le dysfonctionnement de ces microorganismes et l'apparition de différents types de peste de culture.

L'objectif principal de ce travail est de décrire la potentialité des microorganismes rhizosphériques des plantes maraîchères à limiter le développement des agents phytopathogènes responsables de la perte de la production tels que les champignons du genre *Fusarium*. En prenant comme modèle d'étude des bactéries du groupe des *Pseudomonas* fluorescents et des Actinomycètes antagonistes des champignons phytopathogènes d'une part et les *Fusarium* spp. d'autre part, les activités de recherche entreprises ont suivi les étapes suivantes :

- isolement de champignons phytopathogènes à partir de différents types d'organes malades de plantes maraîchères ;
- isolement des isolats d'actinomycètes et de *Pseudomonas* du groupe des fluorescents à partir des sols rhizosphériques de plantes maraîchères saines ;
- évaluation de l'antagonisme des isolats vis-à-vis du développement des *Fusarium* spp. *in vitro* et *in vivo*.

A chaque étape de l'étude, différents paramètres relatifs au développement des champignons phytopathogènes (développement mycélien, virulence, conservabilité,...), caractéristiques des isolats rhizosphériques (activité antifongique, conservabilité,...) ou liés au développement des plantes (germination, croissance racinaire,...) ont été considérés. Les travaux réalisés sont présentés dans ce document en trois parties : la synthèse bibliographique, les matériels et méthodes et enfin les résultats. Ces trois parties sont précédées d'une introduction générale et sont terminés par la discussion et la conclusion.

Le présent travail a bénéficié des apports matériels, techniques et scientifiques du Laboratoire de Microbiologie de l'Environnement (LME) du Centre National de Recherches sur l'Environnement (CNRE) notamment du projet **Madasym** (avec la participation du Laboratoire des Symbioses Tropicales et Méditerranéennes, LSTM/IRD) et a été réalisé dans le cadre de son programme de recherche en collaboration avec le Laboratoire de Biotechnologie-Microbiologie du Département de Biochimie de la Faculté des Sciences de l'Université d'Antananarivo.

# Synthese bibliograp hique





## I. GENERALITES SUR LA RHIZOSPHERE

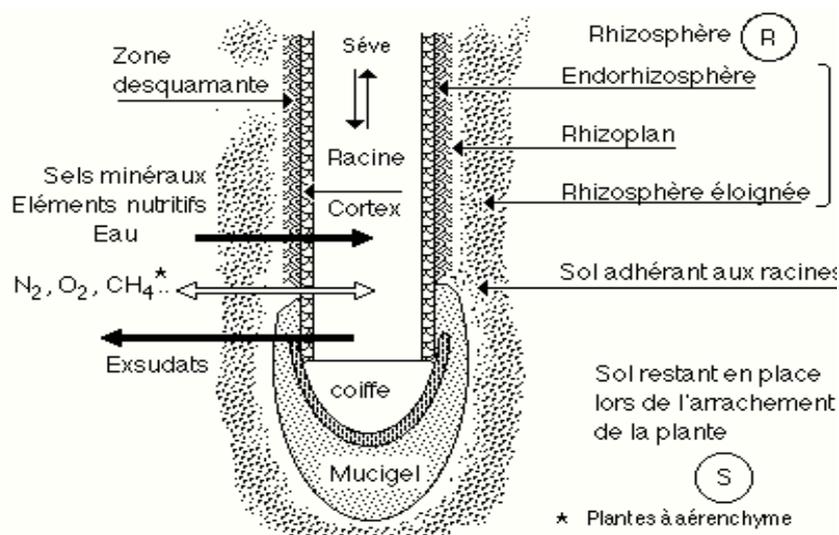
### I.1. Définition

Ayant observé une accumulation de microorganismes au voisinage des racines, HILTNER en 1904 employa le terme rhizosphère (du grec *rhiza*, la racine et de sphère, domaine d'influence) pour désigner une portion du sol soumise à l'action du système racinaire du végétal, que celui-ci soit un cryptogame vasculaire ou un phanérogame (Hinsinger, 1998).

Depuis, le terme rhizosphère a pris un sens plus général : elle est définie comme étant la microrégion du sol en contact direct avec les racines où les organismes vivants sont influencés par la croissance des plantes (Hinsinger, 1998). Elle se limite au(x) premier(s) millimètre(s) de sol situé(s) autour des racines (Hinsinger, 1998) et elle est notamment liée à la libération ou l'exsudation par les racines de composés organiques qui stimulent l'activité microbienne (Rahajaharitombo, 2004). Le sol rhizosphérique est notamment caractérisé par une flore fongique et bactérienne très spécifique (Walker et *al.*, 2003).

Généralement, la rhizosphère est composée de trois parties (Figure 1) :

- **La rhizosphère éloignée** qui est la fine couche de sol adhérant aux racines
- **La rhizoplan** qui est la surface même de la racine
- **La zone rhizosphérique intra-racinaire (endorhizosphère)** qui correspond aux tissus corticaux des racines âgées (Dommergues et *al.*, 1970).



**Figure 1** : Fonctionnement et structure de la rhizosphère. (Source : Chaillou, 2008)

## **I.2. Exsudation racinaire**

Les racines de plantes exsudent continuellement des quantités importantes de composés solubles dans le sol (Bais et *al.*, 2001 ; Gleba et *al.*, 1999). Ces exsudats racinaires sont constitués par des composés minéraux comme des ions, des protons et des électrons, de l'oxygène, de l'eau (Bertin et *al.*, 2003) et essentiellement de composés organiques (Uren, 2000). Parmi les composés organiques de faible poids moléculaire, se trouvent les sucres simples, les acides aminés, les acides organiques, une faible proportion de phénol, de lipide, d'alcool, ainsi que de métabolites secondaires (Nguyen, 2003 ; Verpoorte, 2000 ; Grayston et *al.*, 1996). En ce qui concerne les composés organiques de haut poids moléculaire, les plantes exsudent des sucres complexes, des polypeptides, des protéines (notamment des enzymes), des flavonoïdes, des hormones, des acides gras ainsi que des vitamines (Bertin et *al.*, 2003 ; Nguyen, 2003 ; Uren, 2000).

L'exsudation de molécules est dominée par les composés solubles de faible poids moléculaire qui sont présents en forte concentration dans le cytoplasme (Farrar et *al.*, 2003). Des exsudats sont aussi libérés par des cellules de la coiffe, qui se détachent ensuite et demeurent viables quelque temps dans l'environnement rhizosphérique.

Ces exsudats racinaires sont reconnus pour être une source essentielle d'énergie pour les microorganismes du sol. Ces derniers peuvent avoir en retour de multiples effets, positifs ou négatifs sur la plante (à travers les racines) et sur les autres microorganismes du sol. L'action positive des microorganismes telluriques sur la plante se manifeste par l'amélioration de l'acquisition des nutriments et surtout la protection sanitaire contre les agents phytopathogènes. En effet, certains microorganismes stimulent la croissance racinaire ou améliorent directement la nutrition minérale de la plante, en produisant par exemple des enzymes impliquées dans la minéralisation des matières organiques et la production d'ions phosphate, sulfate, nitrate ou ammonium (Bais et *al.*, 2004a, 2006 ; Walker et *al.*, 2003). Cependant, certains exsudats peuvent favoriser le développement des microorganismes phytopathogènes (Alabouvette et *al.*, 2004).

## **I.3. Les microorganismes rhizosphériques et leurs effets sur la plante**

Dans le sol, l'activité microbienne est intense en particulier dans la zone sous l'influence des racines des plantes, *la rhizosphère*, qui constitue un véritable réservoir très important de microorganismes. Cette microflore dense est également très diversifiée. Elle est

estimée à plus d'un milliard par gramme de sol sec dont la densité diminue de la rhizosphère vers le sol distant des racines (Rengel 1997). Ce phénomène est communément désigné sous le terme : *effet rhizosphérique*, et peut être apprécié par le calcul du rapport R/S (Nombre de microorganismes dans la rhizosphère/nombre de microorganismes dans le sol non rhizosphérique).

La microflore rhizosphérique est composée en général de 3 grandes catégories suivant l'ordre de taille et de complexité croissante à savoir : les bactéries, les champignons et les actinomycètes.

### ***1.3.1. Les Bactéries***

En général, les bactéries constituent l'essentiel de la microflore rhizosphérique, elles sont alors extrêmement nombreuses et plus variées avec la densité de l'ordre de 10 millions à 1 milliard par gramme de sol (Dommergues et Mangenot 1970). Elles sont les plus fréquemment stimulées par l'effet rhizosphérique que les Actinomycètes, les champignons et les autres microorganismes (Dommergues et Mangenot 1970). Certaines de ces bactéries, telles *Pseudomonas* fluorescents sont capables de coloniser efficacement le système racinaire et influencent de manière bénéfique la plante en stimulant sa croissance et/ou en la protégeant contre des infections par des agents phytopathogènes tels que *Fusarium* sp., *Pythium* sp., etc. (Weller, 1988 ; Kloepper, 1993) et sont exploitables pour la lutte biologique contre les maladies de la plante. Ces bactéries de la rhizosphère sont alors reprises sous le terme PGPR (Plant Growth-Promoting Rhizobacteria) (Haas et Defago 2005). La plupart des souches bactériennes exploitées comme biopesticides appartiennent aux genres *Agrobacterium*, *Bacillus* et *Pseudomonas* (Haas et Defago 2005).

### ***1.3.2. Les Champignons***

Les champignons sont des microorganismes eucaryotes, c'est à dire des microorganismes dont les chromosomes sont séparés du cytoplasme par une membrane cellulaire. Tout comme les bactéries, ils sont présents en masse dans le sol ainsi que dans la rhizosphère (Rakotoarimanga, 2010). Leur densité est estimée à  $10^5$  par gramme de sol (Brahim, 1998). Certains champignons sont unicellulaires (les levures), mais la plupart sont filamenteux et ils se présentent généralement sous forme d'hyphes et/ou de spores germés ou non dans le sol (Andrianandrasana, 2009).

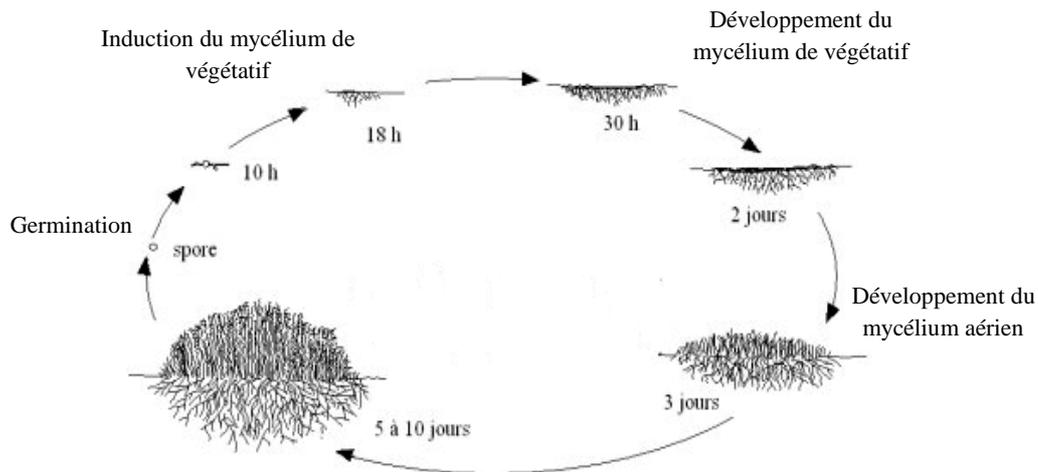
Les champignons jouent des rôles importants dans l'écosystème du sol, particulièrement au niveau de la rhizosphère. Alors que certains d'entre eux peuvent influencer positivement la croissance des plantes, d'autres peuvent nuire à leur santé. En effet, la plupart des agents causant les maladies de la plante à partir de la rhizosphère sont des champignons telluriques dont entre autres les espèces du genre *Fusarium*, *Agrobacterium*, *Phytophthora*, *Pythium* et *Nigrospora*.

### ***1.3.3. Les Actinomycètes***

Ce sont des microorganismes procaryotes hétérotrophes présentant des similitudes avec les eubactéries et les champignons. Les Actinomycètes sont largement répandus dans tous les sols et plus particulièrement dans la rhizosphère. Ils sont moins nombreux que les bactéries mais sont en nombre important que les champignons et leur densité peut atteindre jusqu'à  $10^6$  unités par gramme de terre sèche. Les Actinomycètes sont Gram positifs et la fréquence de la séquence guanine-cytosine (GC) de leur ADN est supérieure à 55%. Leur croissance est plus lente que celle des autres bactéries. Les Actinomycètes sont capables de produire des substances telles que les vitamines, la biotine et l'acide folique (Dommergues et al, 1970) qui sont utiles pour le développement et la survie de la plante, ainsi que des antibiotiques dont les plus connues sont la streptomycine, la chlorotétracycline, l'oxytétracycline et la cycloheximide (Dommergues et al., 1970 ; Morel, 1996) qui jouent un rôle majeur dans la protection de la plante contre des agents pathogènes.

Les Actinomycètes se multiplient par fragmentation pseudobactérienne ou par la production des conidies (Figure 2).

Ce sont les genres *Streptomyces*, *Nocardia*, *Micromonospora* qui se rencontrent les plus fréquemment au niveau du sol de la rhizosphère où le genre *Streptomyces* couvre à lui seul 95,34% des souches d'Actinomycètes isolées (Lechevalier et Lechevalier, 1967).



**Figure 2 :** Cycle de développement d'un Actinomycète du genre *Streptomyces* sur milieu solide (Hosdong, 1992).

## II. INTERACTIONS BIOLOGIQUES ANTAGONISTES DANS LA RHIZOSPHERE

Plusieurs interactions biologiques se déroulent au niveau de la rhizosphère : interactions plantes-microorganismes, interactions entre les microorganismes. Parmi les interactions bénéfiques pour la plante se trouve l'interaction antagoniste entre les microorganismes rhizosphériques qui est souvent à l'origine de la protection de la plante contre les pathogènes. Cette interaction peut se résumer aux phénomènes de compétition et/ou d'antagonisme.

### II.1. La compétition

Dans certains cas, la compétition bénéfique pour la plante se manifeste par la colonisation importante des racines par des bactéries bénéfiques, réduisant le nombre de sites habitables pour les micro-organismes pathogènes et entraînant alors l'inhibition de leur croissance (Reyes et *al.*, 2004 ; Piano et *al.*, 1997). Cependant, cette corrélation entre l'importance de la population de PGPR sur les racines et la protection observée n'est dans certains cas pas vérifiée et ne peut donc pas être considérée comme une règle générale.

L'idée qu'une rhizobactérie à croissance rapide pourrait éliminer les pathogènes fongiques par la compétition pour le carbone et les sources d'énergie est beaucoup discutée. En effet, le PGPR doit être présent sur les racines en nombre suffisant pour avoir un effet

bénéfique pour les plantes et pour être capable d'instaurer une compétition pour les nutriments disponibles dans la rhizosphère (Haas et Defago 2005). Outre la vitesse de croissance intrinsèque, les autres propriétés renforçant le potentiel colonisateur d'une souche sont la mobilité (présence d'une flagelle) (Jofre et al. 2004), le chimiotactisme et la faculté d'utilisation des composés excrétés par les racines en tant que source de carbone et d'azote (Grover 2004 ; Gupta 2003 ; Berggren et al. 2001).

Une illustration de l'effet de la compétition pour l'espace concerne la lutte biologique contre le pathogène *Ceratocytis paradoxa* qui est responsable de la maladie de la pourriture noire sur les fruits d'ananas. On a observé que cette maladie a seulement été réduite dans les fruits prétraités avec l'eau de lavage de fruits d'ananas contenant la levure *Pichia guilliermondii*. Ce traitement permet de réduire la germination des spores, la longueur des germes et le poids sec du pathogène *C. paradoxa*. Les résultats montrent que le mode d'action de *P. guilliermondii* serait basé sur la compétition pour l'espace et les nutriments parce qu'on n'a observé aucun effet antagonisme de cette levure lorsqu'elle est appliquée après l'inoculation du pathogène (Reyes et al., 2004).

Un cas particulier de compétition pour les nutriments repose sur la compétition pour le fer. Certains micro-organismes ont la capacité de synthétiser des sidérophores qui sont des molécules chélatrices du fer nécessaire à leur croissance. Ces composés ont une grande affinité pour le  $Fe^{3+}$ . En s'appropriant des ions ferriques présents dans la rhizosphère, ces microorganismes les rendent ainsi non disponibles pour le champignon pathogène, ce qui provoque une diminution du développement du pathogène. Par exemple, certaines bactéries du genre *Pseudomonas* ont un grand pouvoir de chélation du fer. Ces bactéries peuvent reconnaître et utiliser les sidérophores produits par d'autres souches, alors que ces dernières ne sont pas capables d'utiliser le sidérophore qu'elles produisent. Cette particularité peut favoriser la souche dans le processus de la colonisation et la compétition pour le substrat mieux que d'autres habitants microbiens de la rhizosphère (Ongena et al. 2002b). Cependant, malgré que la production des sidérophores soit un mécanisme important pour l'activité des PGPR, elle est rarement essentielle dans le biocontrôle (Meziane et al., 2005 ; Ongena et al., 2000). Un grand nombre de facteurs environnementaux (pH, température et source de carbone) influence la production des sidérophores (Valdebenito et al., 2006 ; Duffy et Défago 1999).

## **II.2. L'antagonisme**

### **II.2.1. Antibiose**

L'antibiose est le mécanisme le plus connu et le plus important utilisé par les microorganismes pour limiter l'invasion de pathogènes dans les tissus de la plante hôte. Il consiste en une inhibition directe de la croissance du pathogène via la production de métabolites aux propriétés antifongiques et/ou antibiotiques. Parmi les bactéries, de nombreux genres tels que *Bacillus* et *Pseudomonas* sont capables de produire une variété de métabolites antifongiques puissants, par exemple : des lipopeptides de la famille des surfactine, iturine et fengycine (Rahman et al., 2007 ; Lin et al., 2005 ; Bonmatin et al., 2003 ; Peypoux et al., 1999) et aussi des enzymes hydrolytiques ( $\beta$ -1,3 glucanase) qui peuvent dégrader les parois cellulaires fongiques (Leelasuphakul et al. 2006). En effet, Ongena et al (2005b) ont montré l'effet protecteur de *B. subtilis*, contre la fonte des semis des plantes d'haricot provoquée par *Pythium ultimum*, par la production des lipopeptides ainsi que l'effet protecteur contre la moisissure grise de la pomme après la récolte (Touré et al., 2004).

Chez le genre *Pseudomonas*, d'autres molécules antifongiques comme le HCN, la viscosamide, la pyoluteorine, le 2,4 diacetylphloroglucinol, la pyrrolnitrine, les phenazines et les butyrolactones sont impliquées dans le biocontrôle (Haas et Defago, 2005 ; Haas et Keel 2003 ; Raaijmakers et al., 1995).

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 déclencher la production des antibiotiques par les agents bactériens de biocontrôle, exemple le cas de *Pseudomonas*.

Ces PGPR montrent non seulement un large spectre de diversité dans le type mais également dans le nombre d'antibiotiques produits (McGowan et al., 2005 ; Raaijmakers et al., 2002). Certaines souches de PGPR ont, par exemple, la capacité d'excréter des métabolites qui jouent un rôle important dans l'inactivation des facteurs de germination du pathogène ou la dégradation de leurs facteurs de pathogénicité comme les toxines. 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 également démontrée (Whipps 2001). Une étude récente a montré que l'espèce de la plante hôte a une influence significative

sur la dynamique, la composition et l'activité des espèces antagonistes de *Pseudomonas* spp. (Bergsma et al., 2005).

### ***II.2.2 Parasitisme et prédation***

L'hyperparasitisme est l'attaque directe d'un micro-organisme par un autre dans un but nutritionnel (Gagné, 1984). La rhizosphère qui héberge une large variété de populations microbiennes, constitue un milieu favorable pour l'apparition du parasitisme.

Le parasitisme existe entre certaines bactéries dans le sol, par exemple entre les *Bdellovibrio* qui se fixent sur la membrane d'autres bactéries, pénètrent dans leur cytoplasme, s'y multiplient et font éclater la cellule hôte en libérant des bactéries filles (Curl et Truelove, 1986).

Le parasitisme chez les champignons est connu par le terme mycoparasitisme où un champignon est parasité par un autre champignon. Le cas le plus connu est celui du champignon du genre *Trichoderma* qui parasite les champignons phytopathogènes *Rhizoctonia solani* et *Sclerotium rolfsii* (Chet, 1990).

## **III. GENERALITES SUR LES CHAMPIGNONS PHYTOPATHOGENES**

La phytopathologie a été connue depuis les origines de l'agriculture il y a environ 9000 ans. Toutefois, le champignon phytopathogène a été découvert pour la première fois en 1665 par R. Hook. Cet auteur avait isolé le genre *Phragmidium mucronatum*, un agent de la rouille de rosier.

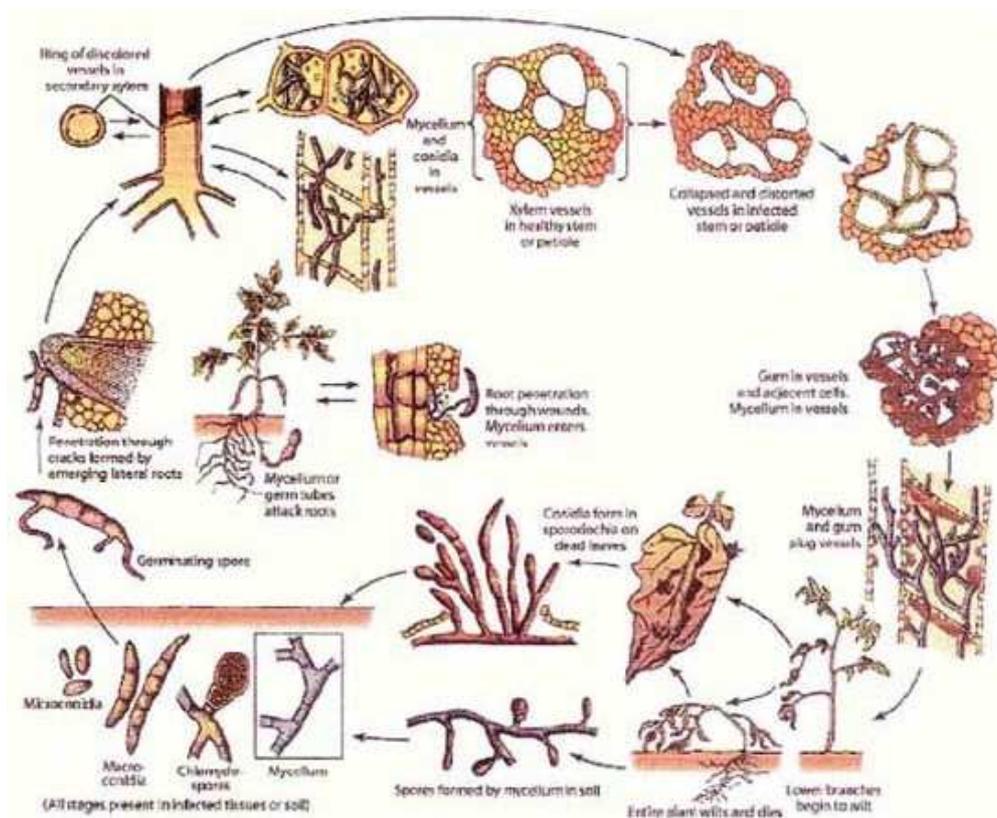
Etymologiquement, le terme **phytopathogène** vient de trois mots grecs : le mot **phyton** qui signifie la plante, le mot **pathos** qui veut dire la souffrance et le mot **gennan** correspond au verbe engendrer. Ainsi, le mot **phytopathogène** est utilisé pour des agents biotiques classiques (champignons, bactéries, virus, insectes,...) généralement parasites causant alors des maladies à une plante (Thrower, 1966).

Les champignons microscopiques renferment à eux seuls environ 95% des formes de maladies cryptogamiques (Roger, 1951). Cela est sans doute dû à cause de la propriété parasitaire de ces champignons.

### III.1. Evolution générale de l'infection d'une plante par les champignons phytopathogènes

Pour que la maladie d'une plante se développe, trois composantes sont nécessaires : la plante et le pathogène, qui doivent se mettre en contact et s'interagir, et les conditions de l'environnement qui favorisent la prolifération du pathogène (Bouزيد, 2002).

L'évolution complète de l'infection d'une plante comprend le cycle de vie du pathogène constitué par cinq étapes successives (Figure 3). Ces étapes sont la contamination, la pénétration, l'infection proprement dite, la dissémination du pathogène et la conservation du pathogène (Bouزيد, 2002).



**Figure 3 :** Cycle général de la maladie de flétrissement vasculaire causée par *F.oxysporum* sp. *lycopersici* chez la tomate (Agrios 2005).

#### III.1.1. Contamination

La contamination est réalisée quand les spores du champignon pathogène en état de germination, sont déposées sur des organes de la plante susceptibles de permettre leur développement ; ou bien quand un fragment végétatif de ce pathogène, capable d'assurer la propagation, se met en contact avec une région infectible du végétal (Roger, 1951).

Pour certains champignons pathogènes, il semble que les blessures occasionnées au niveau des axes caulinaires ou racinaires sont essentiellement les voies de contact et de pénétration (Vigouroux, 1985 ; Tawil et *al.*, 1982 ; Ferrari et Pichenot, 1974). Pourtant, beaucoup de champignons pathogènes établissent un contact de manière fortuite. Des vecteurs divers (Webster, 1969 ; Hickman et Ho, 1966) sont aussi impliqués dans la réalisation de ce contact tels que les insectes, les nématodes et les exsudats de racine.

Les propagules du champignon pathogène (spores, sclérotés, fragments mycéliens,...) qui se déposent sur la plante sont appelées inoculum. Un inoculum en conservation provoque une contamination primaire.

### ***III.1.2. La pénétration***

Le fragment mycélien ou le tube germinatif d'une spore germée pénètre la plante directement, ou passe à travers les ouvertures naturelles (stomates, lenticelles,...) et les blessures.

Dans le cas de la pénétration directe, après le contact avec la plante, la spore ou la propagule (ou le plus souvent une structure spécialisée appelée "appressorium" produite par le tube germinatif) devient très adhérente à la surface de la plante et une pointe de pénétration se forme. La pointe formée passe à travers la cuticule (si elle est présente), ensuite à travers la paroi cellulaire jusqu'au protoplasme.

Les champignons, qui pénètrent dans la plante à travers la blessure, sont des pathogènes de blessure (wound pathogens). Ils se développent seulement dans les tissus morts ou en voie de nécrose.

La plupart des champignons responsables des rouilles entrent généralement par les stomates, puis se développent entre les cellules, en produisant des structures de pénétration spécialisées : les haustoria.

### ***III.1.3. L'infection***

L'infection proprement dite commence quand le pathogène s'installe dans les cellules ou dans les tissus sensibles de la plante hôte et s'en procure les éléments nutritifs. Ainsi, le pathogène se multiplie de façon à envahir la plante plus ou moins rapidement. Quand l'infection s'installe, les symptômes, qui sont les changements visibles dus à la maladie,

apparaissent. La période entre l'inoculation et l'apparition des symptômes externes est appelée incubation. De nombreuses substances telles que les enzymes, les toxines et certains régulateurs de croissance sont libérées par les pathogènes dans les cellules de la plante hôte. Ces substances affectent l'intégrité structurale et les processus physiologiques des cellules hôtes.

Pour réagir face aux pathogènes, les plantes hôtes répondent par divers mécanismes de défense, aboutissant à différents degrés de protection allant de la sensibilité à la résistance.

#### ***III.1.4. La dissémination du pathogène***

Les spores du champignon sont activement disséminées à partir du lieu de leur production par l'air ou les vents pouvant les porter à de très grandes distances. Le sol assure également une active dissémination, par l'intermédiaire des liquides ou des être vivants qui y circulent. Les eaux du sol sont très favorables au transport des parasites émettant des zoospores (Roger, 1951). Ainsi Pour la plupart des cas, les spores sont passivement transportés par différents vecteurs tels que l'eau, l'air, les semences, les animaux, l'homme, etc.

#### ***III.1.5. La conservation et la vitalité du pathogène***

Avant de commencer un nouvel cycle de vie, les pathogènes se conservent principalement sous forme de spores, mais aussi sous forme de fragments mycéliens et de sclérotés. Ils se conservent dans le sol, dans les débris des plantes infectées et dans les semences. Les spores de dissémination, tels que les conidies, se conservent quelques semaines tandis que les spores de conservation (chlamydospores, téliospores) peuvent se conserver pendant plusieurs années. Les spores de dissémination sont produites activement par les champignons durant la saison favorable pour propager la maladie tandis que les spores de conservation sont produites par les champignons pour surmonter la saison défavorable (Bouزيد, 2002).

### **III.2. Exemple de champignon phytopathogène**

#### ***III.2.1. Fusarium spp.***

Les champignons microscopiques du genre *Fusarium* qui vivent dans le sol, attaquent de nombreuses plantes (Amzelloug, 1999). Le genre *Fusarium* est constitué par plusieurs espèces selon la plante hôte (Tableau 1).

##### ***III.2.1.1. Systématique***

Règne :	PLANTEA
Embranchement :	FUNGI
Division :	DEUTEROMYCOTINA
Classe :	HYPHOMYCETES
Groupe :	PHRAGMOSPORES
Genre :	<i>Fusarium</i> sp.

Les champignons du genre *Fusarium* sont connaissables par leur appareil végétatif incolore ou faiblement teinté. Leurs conidies sont hyalines et suivant leur taille, ils peuvent être des microconidies ou des macroconidies. Les macroconidies sont les caractéristiques de conidies de *Fusarium*. Ces conidies s'attachent souvent en groupes en tête du conidiospore et sur culture pure, ils se trouvent parfois réunis en petites masses humides et glaireuses appelées « pionnotes ».

Le genre *Fusarium* comprend de nombreux phytopathogènes ubiquistes car ils peuvent se développer sur différents substrats. Toutefois le pouvoir pathogène de ces champignons est variable et altérable. En effet leur virulence augmente ou diminue par le passage de l'espèce sur un hôte déterminé, par l'absence de support habituel ou par la culture sur un milieu nutritif synthétique.

Les manifestations des actions pathogènes des champignons du genre *Fusarium* peuvent se diviser en trois groupes selon les syndromes : les pourritures, les trachéomycoses et les chancres. Ces syndromes sont englobés dans la dénomination « fusariose ». En effet, le mot fusariose est utilisé pour désigner tous les syndromes causés par les champignons du genre *Fusarium*.

Les trachéomycoses provoquent les plus grandes pertes pour les plantes cultivées, telles que les légumes, les fleurs, et les cultures tropicales (Agrios, 2005). La plupart de ces syndromes est causée par *Fusarium oxysporum* selon les exemples présentés dans le tableau suivant (Tableau 1).

**Tableau 1 :** Exemples de souches de *Fusarium oxysporum* et de leurs plantes hôtes (Armstrong et Armstrong, 1981).

Souches	Plantes hôtes	
	Nom vernaculaire	Nom scientifique
<i>F. oxysporum</i> f. sp. <i>lycopersici</i>	Tomate	<i>Lycopersicon</i> spp
<i>F. oxysporum</i> f. sp. <i>cucumerinum</i>	Concombre	<i>Cucumis</i> spp.
<i>F. oxysporum</i> f. sp. <i>pisi</i>	Pois	<i>Pisum</i> spp.
<i>F. oxysporum</i> f. sp. <i>ciceri</i>	Pois chiche	<i>Cicer arietinum</i>
<i>F. oxysporum</i> f. sp. <i>melonis</i>	Melon	<i>Cucumis</i> spp.
<i>F. oxysporum</i> f. sp. <i>phaseoli</i>	Haricot	<i>Phaseolus vulgaris</i>
<i>F. oxysporum</i> f. sp. <i>cubense</i>	Banane	<i>Musa</i> spp.
<i>F. oxysporum</i> f. sp. <i>coffea</i>	Café	<i>Coffea</i> spp.
<i>F. oxysporum</i> f. sp. <i>asparagi</i>	Asperge	<i>Asparagus</i> spp.
<i>F. oxysporum</i> f. sp. <i>albedinis</i>	Palmier dattier	<i>Phoenix dactylifera</i>
<i>F. oxysporum</i> f. sp. <i>raphani</i>	Radis	<i>Raphanus</i> spp.
<i>F. oxysporum</i> f. sp. <i>cepae</i>	Ognion	<i>Allium</i> spp.
<i>F. oxysporum</i> f. sp. <i>niveum</i>	Pastèque	<i>Citrullus</i> spp.
<i>F. oxysporum</i> f. sp. <i>batatas</i>	Patate douce	<i>Ipomoea batatas</i>
<i>F. oxysporum</i> f. sp. <i>conglutinans</i>	Chou	<i>Brassica</i> spp.

### III.3. Lutte biologique contre les phytopathogènes

#### III.3.1. Définition

En générale plusieurs définitions de la lutte biologique ont été proposées mais aucune n'est adoptée par tous les acteurs concernés. La lutte biologique est définie comme «l'utilisation d'organismes vivants, ou des produits de leurs gènes, pour limiter ou supprimer les activités et les populations de pathogènes». Parmi ces organismes vivants, les agents de lutte biologique sont soit des bactéries, des champignons, des levures, et même des virus. Ils

sont employés dans le monde entier dans des cultures en champ et en serre pour réduire de multiples maladies sur diverses céréales, légumineuses, fruits, fleurs et plantes d'ornement (Fravel, 2005 ; Paulitz and Bélanger, 2001).

### ***III.3.2. Mécanisme d'action des agents de lutte biologique***

Les mécanismes par lesquels les agents de lutte biologique peuvent prodiguer leur effet protecteur sont multiples et peuvent varier pour un microorganisme donné en fonction du pathosystème (couple hôte végétal/pathogène). Toutefois, l'efficacité en lutte biologique d'une souche donnée est basée sur son potentiel à coloniser efficacement le système racinaire et la couche environnante du sol (rhizosphère). Cela signifie qu'elle doit être dominante par rapport aux autres populations microbiennes et qu'elle persiste sous les faibles ressources nutritionnelles disponibles dans le microenvironnement. Plusieurs propriétés intrinsèques contribuent au pouvoir colonisateur des microorganismes telles que la mobilité, la faible exigence nutritionnelle, le changement de phase ou la vitesse de croissance (Van Den Broek et al., 2003 ; Bloemberg et al., 2001). La microflore du sol tire profit des aliments sécrétés par les racines et en contrepartie, certaines souches influencent avantageusement l'hôte végétal par la stimulation directe de la croissance (fixation de l'azote, solubilisation de phosphate, et production des phytohormones) ou/et en le protégeant contre l'infection par des phytopathogènes. En raison de l'effet global qu'elles procurent, ces souches sont désignées également sous le terme de rhizobactéries promotrices de la croissance des plantes ou Plant Growth Promoting Rhizobacteria (PGPRs) (Mercado-Blanco and Bakker, 2007).

Une fois installés dans la rhizosphère, les microorganismes d'intérêt peuvent intervenir favorablement tout d'abord en privant les organismes potentiellement infectieux des ressources nutritives (substrats carbonés, oligoéléments essentiels) et des espaces nécessaires à leur développement. Ils peuvent également agir par antagonisme, c'est-à-dire en inhibant directement ou indirectement la croissance des pathogènes par la production d'antibiotiques et/ou d'enzymes lytiques. Cette antibiose est probablement le mécanisme le plus connu et peut-être le plus important employé par les agents de biocontrôle pour limiter l'invasion des microbes pathogènes dans les tissus végétaux (Raaijmakers et al., 2002). Certaines interactions antagonistes plus spécifiques entre agent bénéfique et infectieux peuvent aussi intervenir comme le parasitisme des hyphes des pathogènes fongiques ou l'inactivation par le PGPR des facteurs de germination et de pathogénicité. Cependant, l'isolement de certaines souches de PGPR protectrices mais n'agissant par aucun de ces

mécanismes a permis de mettre en lumière le fait qu'elles puissent agir indirectement en renforçant la plante vis-à-vis d'une attaque ultérieure.

### ***III.3.3. Exemples d'agents de lutte biologique contre les champignons phytopathogènes***

La lutte biologique contre les agents phytopathogènes se fait principalement *via* des bactéries du genre *Streptomyces* et *Pseudomonas* et des champignons du genre *Candida* et *Trichoderma*. Ainsi, Howell et Stipatovic en 1979 identifiaient une substance appelée « pyrrolnitrine » produite par une souche de *Pseudomonas fluorescens* et inhibe la croissance de *Rhizoctonia solani*, un agent pathogène racinaire. De même Thomashow et Weller, en 1988 ont démontré l'implication d'un antibiotique produit par *Pseudomonas fluorescens* isolé de la rhizosphère de blé dans la suppression de *Gaeumannomyces graminis*. L'antibiotique est constitué par l'acide phénazine carboxylique.

De nombreux agents de bio-contrôle sont actuellement disponibles dans le commerce.

### ***III.3.4. Avantages de l'utilisation des agents de lutte biologique***

Tout comme les autres agents de lutte biologique, les biopesticides microbiens sont plus respectueux de l'environnement que les produits chimiques. De plus, ils ont une spécificité accrue vis-à-vis des pathogènes contre lesquels ils sont dirigés. Ils sont par conséquent moins dommageables pour les organismes non ciblés de la microflore endogène qui exerce une action bénéfique sur les plantes. De plus, les biopesticides sont souvent efficaces en faible quantité et leurs activités protectrices peuvent relever de mécanismes multiples déclenchant rarement ainsi des phénomènes de résistance chez le pathogène à cause d'une faible pression de sélection. En outre, ils peuvent compléter les pesticides conventionnels une fois utilisés dans les programmes intégrés de la gestion des parasites (Fravel, 2005 ; Thakore, 2006). Par exemple, l'intégration du contrôle biologique dans l'utilisation des fongicides, les pratiques culturales, et dans d'autres mesures peuvent contribuer au contrôle de la rouille sur la tomate (Lourenco Junior et *al.*, 2006). Les biopesticides peuvent donc être complémentaires du traitement chimique, mais peuvent aussi être utilisés dans des situations pour lesquelles aucune solution de contrôle utilisant des produits de synthèse n'est actuellement disponible. Ces agents microbiens sont utilisés à travers le monde dans les champs et dans les serres (Saravanakumar et *al.*, 2007 ; Ji et *al.*,

2006; Lee et *al.*, 2006; Minuto et *al.*, 2006), pour combattre un grand nombre de maladies causées par des pathogènes du sol, et foliaires (Paulitz et Bélanger 2001 ; Fravel 2005).

### ***III.3.5. Côtés négatifs des agents de lutte biologique***

Malgré les avantages que peuvent présenter l'utilisation des agents de lutte biologique, le marché des biopesticides reste toujours limité à cause de certaines contraintes dont entre autres :

- l'effet protecteur est parfois insuffisant par rapport aux produits chimiques (Shishkoff et McGrath, 2002) ou n'est parfois pas constant, dépendant notamment des conditions du milieu (la température, sol, humidité, la plante hôte, pH, etc...) (Mendoza Garcia et *al.*, 2003 ; Larkin et Fravel, 2002).

- le coût et le délai de la production sont très élevés, pour la plupart des agents de biocontrôle (Fravel et *al.*, 1999).

- le conditionnement et la formulation sont très difficiles pour des espèces non sporulantes et même parfois pour les espèces sporulantes (Hjeljord et *al.* ; 2000 ; Collins et Jacobsen, 2003).

D'autre part, les pesticides chimiques peuvent offrir rapidement une activité beaucoup plus efficace, tandis que les biopesticides nécessitent dans certains cas un temps d'incubation considérable après leur application avant de commencer à agir. Il est également important de se rappeler que la plupart des biopesticides sont composés d'organismes vivants qui ont un spectre relativement restreint de ravageurs cibles.

## **III.4. Autres moyens de lutte contre les champignons phytopathogènes**

Différents moyens de lutte existent pour combattre les champignons phytopathogènes, cependant la prévention reste la meilleure arme contre les épidémies en champ.

### ***III.4.1. Pratiques culturales***

La production de spores infectieuses à partir des déchets végétaux présents dans les champs est la première étape du cycle infectieux du champignon phytopathogène, Il convient donc de ne pas réutiliser sans traitement préalable les déchets végétaux pour fumer les cultures (Hatsch, 2004).

Au niveau du semis, il est recommandé de semer les céréales dans un sol bien préparé. Idéalement le sol doit favoriser une germination rapide et un haut pourcentage de levées. De cette manière la jeune plante peut être plus robuste pour faire face à une infection (Conseil canadien du canola, 2005).

Une pratique d'alternance de culture apporte des effets bénéfiques compte tenu de la préservation nécessaire des ressources du sol. De plus, elle induit une variation naturelle de la flore favorable à la résistance aux pathogènes. Ainsi, la culture de variétés résistantes est à privilégier (Hatsch, 2004).

#### ***III.4.2. Utilisation de fongicides***

De nombreux fongicides sont disponibles pour lutter contre les champignons phytopathogènes. Pour empêcher la fonte des semis des céréales, les semenciers enrobent, lors du conditionnement, les graines par le fongicide (captane ou thirame). La graine bénéficie alors d'une protection lors de la germination ainsi que lors du début de la croissance de la plantule.

# **Materiels et methodes**





## **I. MATERIELS**

### **I.1. Matériels biologiques**

#### **I.1.1. Isolats utilisés**

##### ***I.1.1.1. Isolat fongique pathogène***

L'isolat fongique pathogène utilisé a été des *Fusarium* spp., isolés à partir des organes végétaux pourris récoltés dans la pépinière du FOFIFA – Ambatobe, Département de Recherche Agronomique et identifiés par l'équipe du même laboratoire.

La souche a été récupérée sous la forme d'une pure culture sur milieu PDA solide.

Le choix de ces isolats est basé sur deux critères :

- leur potentialité compétitive élevée,
- et leur potentialité infectieuse vis-à-vis des graines en germination et/ou à des stades plus avancés du développement végétal.

##### ***I.1.1.2. Isolats bactériens***

Dans ce travail, des isolats de *Pseudomonas* fluorescent et d'Actinomycètes isolés à partir de la rhizosphère des trois plantes maraichères d'étude ont été utilisés comme des agents de lutte biologique contre les *Fusarium*. Les raisons du choix de ces deux groupes de microorganismes résident sur plusieurs critères dont entre autres :

- la grande capacité d'adaptation aux différentes conditions climatiques ;
- la vitesse de croissance rapide et la capacité à utiliser différents substrats ;
- les rôles importants que jouent ces microorganismes dans la protection et la stimulation du développement des plantes;
- les effets connus de ces microorganismes comme antagonistes de plusieurs agents phytopathogènes ;
- la capacité de produire des métabolites primaires et secondaires diversifiés.

##### ***I.1.1.3. Réactivation des isolats***

Les isolats bactériens ont été prélevés à l'aide d'une anse en platine et repiqués dans des boîtes de Pétri contenant préalablement le milieu King B pour les *Pseudomonas* fluorescents et milieu Waksman pour les Actinomycètes, puis incubées à 30°C pendant 4 à 9 jours selon la vitesse de leur croissance.

La même méthode de réactivation est adoptée pour les isolats fongiques pathogènes.

### **I.1.2. Les plantes utilisées**

Pour vérifier notre hypothèse de recherche, trois plantes maraichères ont été utilisées à savoir *Phaseolus vulgaris* (Haricot), *Solanum lycopersicum* (Tomate) et *Cucumis sativus* (Concombre). Ces plantes ont été cultivées périodiquement dans la pépinière du Laboratoire de Microbiologie de l'Environnement.

Le haricot (*Phaseolus vulgaris*) est une plante herbacée annuelle à croissance déterminée. A la germination, la plante est généralement à racines pivotantes mais peu après des racines adventives longues de 10 à 15 cm se développent sur toute la racine principale. A l'issue de la germination, épigée, il y a formation de deux feuilles opposées simples puis des feuilles trifoliées à folioles cordiformes. Les fleurs sont portées en grappes axillaires et terminales. Elles peuvent être blanches, roses ou violettes.

La tomate (*Solanum lycopersicum*) est une plante autogame de la famille des Solanaceae, elle est d'origine américaine particulièrement d'Amérique centrale et du sud (Mexique, Pérou, Equateur, etc.). La tige de la tomate est vigoureuse et ramifiée. La feuille est composée et velue. Elle répand une odeur caractéristique, due à la solanine, si on la froisse. Les fleurs sont de couleur jaunâtre, regroupées en cyme. Le fruit est une baie charnue et contient plusieurs loges. La maturité du fruit peut continuer même après la cueillette, c'est un fruit climactérique. Quant aux graines, elles sont de couleur blanchâtre, aplaties et velues.

Le concombre (*Cucumis sativus*.) est une plante annuelle rampante de la famille des Cucurbitaceae. Elle est originaire de la région tropicale de l'Inde où l'on retrouve jusqu'à ce jour sa forme sauvage. Les fleurs mâles sont séparées des fleurs femelles mais portées par un même pied (la plante est dite monoïque). Certaines variétés sont gynoïques (fleurs uniquement femelles) ou parthénocarpiques (ne nécessitant pas de pollinisation). Pour les variétés classiques (monoïques), la pollinisation est assurée par les insectes. Les feuilles sont alternes, opposées aux vrilles, cordiformes.

## **II. METHODES**

Les champignons phytopathogènes qui ont fait l'objet de notre étude ont été isolés à partir d'organes végétaux présentant des symptômes de la maladie fongique. Les microorganismes, tels les *Pseudomonas* du groupe des fluorescents et les Actinomycètes susceptibles d'être antagonistes de ces champignons ont été isolés à partir du sol rhizosphérique de la culture maraîchère en utilisant des milieux de culture spécifiques. Les expériences sur l'efficacité de chaque isolat isolé à limiter le développement des champignons phytopathogènes ont été réalisées *in vitro* et *in vivo* en utilisant des plantes maraîchères infestées préalablement.

### **II.1. Isolement des champignons phytopathogènes**

L'isolement des champignons phytopathogènes a été fait respectivement à partir des fragments de fruit de tomate, de tubercule de pomme de terre et de gousse d'haricot présentant des symptômes externes des maladies fongiques. Ces organes végétaux ont été récoltés dans la pépinière du FOFIFA – Ambatobe, Département de Recherches Agricoles. L'objectif de cet isolement étant d'avoir un isolat de champignon pathogène pur provenant directement des plantes malades.

Avec une humidité élevée, ou sur des milieux de culture de champignons, les propagules de champignons responsables de la maladie des plantes se trouvant dans la partie pourrie de la plante malade se développent rapidement en émettant des hyphes abondants. Ces hyphes seront repiqués et multipliés sur des milieux de culture convenables au développement de champignon.

#### **II.1.1. Techniques d'isolement**

Deux méthodes d'isolement ont été adoptées : la première consiste à utiliser la partie malade de la plante sans traitement préalable et la seconde utilise les organes malades préalablement désinfectés.

##### ***II.1.1.1. Isolement sans désinfection préalable***

Les fragments de fruits de tomate, de tubercule de pomme de terre ou de gousse de haricot présentant des symptômes de maladie fongique telle que la pourriture et la nécrose (Fig 4), ont été immergés dans des boîtes de pétri contenant de l'eau distillée stérilisée (121°C, 20min à l'autoclave) puis incubés à la température ambiante. L'observation des

hyphes émis par le champignon a été faite sous loupe binoculaire toutes les 24 heures. Les hyphes ont été repiqués sur des boîtes de Pétri contenant du milieu de culture solide PDA dont la composition est donnée en annexe 1.

#### ***II.1.1.2. Isolement avec désinfection préalable***

Afin d'éliminer les bactéries à croissance rapide qui peuvent gêner le développement ou l'apparition des hyphes du champignon provenant du fragment végétal malade, le fragment a été désinfecté superficiellement à l'aide de l'hypochlorite de sodium 10% pendant 10 min ou de l'alcool éthylique 50% pendant 3min. Il a été ensuite rincé abondamment à l'eau distillée stérile avant d'être séché dans une double épaisseur de papier filtre stérilisé (120°C, 20min à l'autoclave). Le fragment est déposé directement dans des boîtes de pétri contenant du milieu de culture solide PDA. La culture a été incubée à 25<sup>0</sup>C pendant 3 à 4 jours.

L'observation a été effectuée quotidiennement sous loupe binoculaire jusqu'à l'apparition du mycélium caractéristique des agents pathogènes. Le mycélium ainsi observé a été repiqué sur de milieu de culture PDA neuf jusqu'à l'obtention de mycélium pur.

#### **II.1.2. Identification des isolats**

L'examen microscopique des isolats fongiques a été effectué après étalement entre lame et lamelle d'une culture pure et coloration de la préparation au Bleu Coton (Annexe 2). Généralement, un examen à l'objectif 40 fois est suffisant pour mettre en évidence la plupart des éléments importants de diagnose (Cahagnier et Richard-Mollard, 1998).

L'identification des isolats fongiques a été effectuée en utilisant un schéma taxonomique basé sur les caractères morphologiques décrits par Bennett en 1958. Ces caractères englobent l'aspect des spores qui sont les produits de la reproduction asexuée pouvant être endogènes (endospores) ou exogènes (conidies) et des hyphes qui, ensemble, forment le thalle filamenteux ou le mycélium. Le thalle peut être siphonné (éléments tubulaires peu ou pas ramifiés, de diamètre large et irrégulier, non cloisonné) ou septé (cloisonné, constitué de filaments de diamètre étroit et régulier, divisé par des cloisons en articles uni ou pluricellulaires).

L'examen des spores et de leur organisation constitue une étape importante de l'identification fongique (Campbell et *al.*, 1996).

### **II.1.3. Conservation des isolats**

En général, la plupart des champignons phytopathogènes sont très instables en culture, plus particulièrement sur les milieux synthétiques riches en carbone comme le milieu PDA. Ils peuvent dégénérer rapidement et à long-terme perdre leur pouvoir pathogène.

Pour maintenir le pouvoir pathogène des isolats, avant de les utiliser, ceux-ci sont conservés pendant une courte durée dans des tubes à essais ou dans des boîtes de pétri contenant des substrats pauvres en éléments nutritifs, le milieu SNA (annexe 1) dans une étuve à température 25°C.

Avant de procéder au repiquage pour une conservation suivante, l'isolat a été mis en culture de nouveau sur le milieu PDA et a fait l'objet de tests d'antagonisme, d'inoculation, et d'observation des caractéristiques macroscopiques en culture, telles que la couleur et des caractéristiques microscopiques.



**Figure 4** : Dispositif expérimental d'isolement de champignons phytopathogènes ; A : Pomme de terre ; B : Tomate ; C : Haricot vert sur le milieu PDA

## **II.2. Test de virulence de *Fusarium* sp. sur la germination des plantes, par exemple : concombre, tomate et haricot**

L'objectif de ce test est de montrer l'éventuelle virulence des isolats de champignon sur les graines des plantes. La virulence se manifeste par l'inhibition de la germination des graines.

La méthode adoptée est celle décrite par Dorrance et *al.*, (2004) qui consiste à déposer une rondelle du champignon phytopathogène au centre de la boîte de pétri et à faire germer des graines de plante à la périphérie de la même boîte. La même expérience est refaite sans champignon phytopathogène en guise de témoin. Les boîtes de Pétri sont examinées après 7 jours d'incubation.

Cette méthode est réalisable, avec des isolats de champignon jeunes et viables et aussi des graines de plante qui ne présentent pas une source de contamination microbienne ou fongique.

### **II.2.1. Revivification des isolats de champignon**

Les isolats multipliés sur milieu PDA sont prélevés à l'aide d'une lame bistouri stérile. Ils sont ensuite repiqués de nouveau sur le milieu PDA stérile (121°C, 20mn à l'autoclave), puis incubés à 30°C pendant 72 heures.

### **II.2.2. Stérilisation des graines**

Des graines de tomate, de concombre et d'haricot ont été stérilisées superficiellement avec de l'alcool éthylique à 95% pendant une minute puis rincées 5 fois à l'eau distillée stérilisée. Les graines sont ensuite trempées dans l'hypochlorite de sodium dilué à 30 % pendant 5 min, puis rincées abondamment à l'eau distillée stérile afin d'en éliminer les traces de fongicides de conservation. (Benhamou et *al.*, 1997). Les graines sont séchées sur compresse de gaze stérilisée préalablement à l'autoclave à la température 121°C pendant 20min.

### **II.2.3. Dispositif du test de virulence**

Une rondelle du champignon phytopathogène prélevée sur une culture âgée de 3 jours est placée au centre de boîtes de Pétri de 9 cm de diamètre contenant du milieu de culture PDA (une bouture / boîte). Quinze graines de plante (tomate, concombre, ou haricot)

stérilisées superficiellement ont été repiquées à la périphérie de chaque boîte. Deux types de test ont été réalisés : test de contamination en pré-levée et test de contamination en post-levée.

### ***II.2.3.1. Contamination en pré-levée***

Le champignon est repiqué bien avant les graines et envahit tout le milieu de culture. Ainsi, les graines de tomate sont déposées sur les filaments mycéliens.

### ***II.2.3.2. Contamination en post-levée***

Les implantations des graines et du champignon sur le milieu de culture se font en même temps. Les graines ont, ainsi, le temps de germer avant d'être atteintes par les filaments mycéliens du champignon.

Dans les 2 cas, la même expérience est refaite en absence du champignon en guise de témoin et les boîtes de Pétri sont incubées à 30°C pendant sept jours. Dix répétitions ont été réalisées pour chaque traitement.

## **II.2.4. Evaluation des résultats**

Le nombre de graines ayant germées est noté et le pourcentage de germination est ainsi calculé. Une graine germée est celle qui parvient à émettre une radicule. La virulence du champignon phytopathogène est estimée par le pourcentage d'inhibition de la germination selon la formule suivante :

$$PIG = \frac{G_{te} - G_{tr}}{G_{te}} \times 100$$

$G_{te}$  : Nombre des graines germées témoins

$G_{tr}$  : Nombre des graines germées traitées

PIG : pourcentage d'inhibition de la germination

La croissance des racinelles est mesurée afin de déterminer le pourcentage d'inhibition de la croissance racinaire. La longueur de chaque radicule est ainsi évaluée après 7 jours. Le pourcentage d'inhibition est par la suite calculé comme suit :

$$PICR = \frac{L_{te} - L_{tr}}{L_{te}} \times 100$$

$L_{te}$  : Accroissement moyen des racines témoins.

$L_{tr}$  : Accroissement moyen des racines traitées.

PICR : Pourcentage d'inhibition de la croissance racinaire

Le taux de mortalité des plantules est également pris en considération lors de la notation. Il fait état du pourcentage des plantules mortes ou vouées à la mort suite à la présence des racines nécrosées.

### **II.3. Test de virulence de *Fusarium* sp. sur la croissance végétative des plantes**

Après le test de virulence de *Fusarium* sur les graines, l'impact de son développement sur les parties végétatives des plantes a été évalué.

Des graines de tomate, de concombre, ou d'haricot ont été désinfectées superficiellement à l'aide de l'hypochlorite de sodium dilué à 30% pendant 10 min, puis rincées abondamment à l'eau distillée stérilisée. Elles ont été pré-germées dans des cuvettes remplies de sable stérilisé à l'autoclave sous la température de 121°C pendant une heure. Elles ont été arrosées tous les deux jours avec de l'eau distillée stérilisée.

Après 5 jours, les plantules ont été repiquées dans des pots d'un (1) litre contenant du sol sableux stérilisé.

L'infection des plantules a été réalisée en plaçant deux morceaux de 5 mm de diamètre de culture de *Fusarium*, au niveau de la racine ou au niveau du collet, juste après leur repiquage sur pots (Rey et al., 1998 ; Forbes & Davet, 1990). L'inoculum de *Fusarium* est prélevé à partir du front des colonies de 3 jours poussant sur milieu PDA. Les plantules témoins sont traitées de la même manière avec des morceaux du milieu de culture PDA sans *Fusarium*. Les plantules sont réparties à raison de trois plantules par pot et six pots par traitement et par plante. Toutes les plantules sont arrosées tous les deux jours avec de l'eau distillée stérilisée.

## **II.4. Les isolats microbiens antagonistes de champignons phytopathogènes**

Deux groupes de microorganismes du sol ont été ciblés : Actinomycètes et *Pseudomonas* fluorescents. Ces groupes sont connus par la capacité de la plupart des microorganismes qui les constituent à produire d'antibiose (Domergue et *al.*, 1970 ; Morel, 1996).

Ces microorganismes ont été isolés à partir des sols rhizosphériques de tomate, de concombre et de haricot. La technique d'isolement se base sur l'utilisation des milieux de cultures spécifiques. En effet, se développant sur un milieu de culture pauvre en fer, les *Pseudomonas* fluorescents produisent un pigment fluorescent appelé pyoverdine, c'est un sidérophore. La teneur élevée en phosphate du milieu de culture favorise la production de pyoverdine. Pour les Actinomycètes, il s'agit de microorganismes gram positif et à croissance lente. L'utilisation d'antibiotique permet d'éliminer les microorganismes à croissance rapide et favorise le développement des Actinomycètes sur un milieu gélosé.

Le sol directement adhérent aux systèmes racinaires des plantes a été collecté et séché à l'air libre puis tamisé avec un tamis à maille de 2mm de diamètre après un broyage avec un mortier. Cinq gramme du sol sec a été dilué dans 45ml de sulfate de magnésium ( $MgSO_4$  0,1M) préalablement stérilisé à l'autoclave (121°C ; 20min), puis agité au vortex deux fois pendant 1 minute, cette suspension constitue à la fois la solution mère et la dilution  $10^{-1}$ . Une série de dilutions d'intervalle de 10 fois allant de  $10^{-2}$  à  $10^{-4}$  (dilution en cascade) a été préparée à partir de cette solution mère.

Deux types de milieux de culture gélosés ont été ensuiteensemencés avec les différentes solutions diluées à raison de 100µl par boîte. Les *Pseudomonas* fluorescents sont identifiables sur le milieu de culture King B (King et al, 1954) par l'apparition de pigment fluorescent après 48h d'incubation tandis que les Actinomycètes sont facilement reconnaissables par leurs caractéristiques morphologiques après 7 jours d'incubation sur le milieu Waksman (Waksman, 1961).

Afin d'inhiber la croissance de champignons contaminants, 16.6 mg/l de cyclohexymide ont été ajoutés à tous les milieux de culture.

#### **II.4.1. Identification et purification des isolats**

L'identification des colonies de *Pseudomonas* se fait sous lumière ultra violette de longueur d'onde 254 nm. En effet, sous cette longueur d'onde la pyoverdine, un pigment fluorescent qui représente la majeure partie des sidérophores produits par ces bactéries fluoresce. Les colonies émettant de la fluorescence sont alors récupérées à l'aide de cure-dents stérilisés et repiquées individuellement sur des boîtes de pétri neuves contenant le milieu King B.

L'identification des isolats d'Actinomycètes a été effectuée après 7 jours d'incubation à l'aide de culture pure. Toutes les colonies d'aspect différent de chaque échantillon ont été isolées et purifiées individuellement sur boîte de Pétri neuve contenant du milieu Waksman. Une caractérisation simple des colonies sous la loupe binoculaire a permis de classer les isolats suivant leur aspect, leur forme, leur taille, la couleur du mycélium végétatif et la couleur du mycélium aérien ainsi que d'autres caractères comme la production de pigment diffusible (Joffin et Leyral, 2001).

#### **II.4.2. Conservation des isolats**

Les isolats purifiés d'Actinomycètes et de *Pseudomonas* sont conservés selon deux méthodes à savoir : la conservation sur la gélose inclinée à 4°C et la conservation sous une température de - 80°C.

##### ***II.4.2.1. Gélose inclinée à 4°C***

Les isolats ont été cultivés sur milieu gélosé incliné dans un tube fermé hermétiquement. Après incubation à 28°C pendant 7 jours pour l'Actinomycète et pendant 4 jours pour le *Pseudomonas*, les cultures sont conservées à 4°C. Les milieux de culture utilisés ont été toujours de King B pour les *Pseudomonas* et de Waksman pour les Actinomycètes. Un repiquage a été réalisé tous les deux mois sur les mêmes milieux de culture inclinés.

##### ***II.4.2.2. Conservation à -80°C***

Une colonie de chaque isolat a été cultivée sur milieu King B liquide pour les *Pseudomonas* et milieu Waksman liquide pour les Actinomycètes. Ces cultures en milieu liquide ont été ensuite incubées à 28°C dans un bain marie avec agitation pendant 4 jours pour les *Pseudomonas* et pendant 7 jours pour les Actinomycètes. Un millilitre de chaque culture a été prélevé par la suite à l'aide d'une micropipette stérile et introduit dans un cryotube stérile

contenant 1 ml de glycérol à 20% (V/V) stérilisée à l'autoclave (121°C ; 20min) (Isik et *al.*, 1999). Les cryotubes contenant la culture ont été introduits dans le congélateur à -80°C.

## **II.5. Test d'antagonisme des *Pseudomonas* et des Actinomycètes vis-à-vis de *Fusarium* sp.**

### **II.5.1. Test *in vitro***

Ce test a pour objectif de sélectionner le ou les isolats d'Actinomycètes et de *Pseudomonas* capables d'inhiber la croissance de l'isolat de *Fusarium* utilisé, par la méthode de confrontation par contact direct sur milieu de culture.

L'antagonisme de *Pseudomonas* et d'Actinomycète vis-à-vis de *Fusarium* se manifeste par l'inhibition de la croissance mycélienne de *Fusarium* lorsqu'ils sont cultivés ensemble. En effet, le test est mené sur un même milieu en confrontant directement *Fusarium* avec *Pseudomonas* ou Actinomycète à la distance «d» l'un de l'autre et symétriquement par rapport au centre de la boîte de petri.

Pour que le test soit fiable, l'utilisation des isolats jeunes et actifs de *Fusarium* est impérative. De ce fait, une revivification des isolats de *Fusarium* a été effectuée en les cultivant dans des boîtes de Pétri contenant un milieu de culture PDA. Pour cela, sous une hotte à flux laminaire, les isolats de *Fusarium* sont prélevés à l'aide d'une lame bistouri stérile puis repiqués sur le milieu PDA. Les cultures sont incubées à 25°C pendant 72 heures avant utilisation. Ce sont ces isolats de 72 heures qui ont été confrontés avec les isolats d'Actinomycète et de *Pseudomonas* isolés à partir du sol.

#### **II.5.1.1. Déroulement de la confrontation**

Pour tous les tests de confrontation, le milieu de culture utilisé a été le milieu solide PDA.

Dans le cas de *Pseudomonas*, chaque isolat de *Pseudomonas* et de *Fusarium* a été déposé simultanément sur le même milieu de culture à l'aide de transfert tube suivant un axe diamétral et distant de 3 cm l'un de l'autre symétriques par rapport au centre de la boîte (Benhamou, Chet, 1996). Cette expérience a été incubée à 25°C.

Le témoin négatif a été constitué par l'isolat de *Fusarium* repiqué au centre d'une autre boîte de Pétri contenant toujours du milieu de culture PDA et incubée à 25°C.

Etant donné que la croissance des Actinomycètes est plus lente que celle des autres bactéries, la culture de chaque isolat d'Actinomycète et de *Fusarium* dans une même boîte de Pétri n'a pas été effectuée en même temps. L'ensemencement du PDA par l'isolat d'Actinomycètes précède celui du *Fusarium*. Le délai de déphasage choisi, est de 4 jours suite aux résultats de tests préliminaires relatifs à la croissance des isolats. Ainsi, une colonie d'Actinomycète a été prélevée à l'aide d'une anse stérile et mise en culture sur milieux PDA, en faisant des stries à peu près sur la moitié de la boîte de pétri. Puis après 4 jours d'incubation à 30°C, un morceau de culture de *Fusarium* a été déposé à l'aide de transfert tube à la distance  $d=3\text{cm}$  de la culture d'isolat de *Fusarium* et symétriquement par rapport au centre de la boîte de Pétri. Une autre culture de *Fusarium* sans Actinomycète a servi de témoin négatif. L'incubation a été réalisée à 30°C.

Le test a été arrêté lorsque les deux isolats en confrontation se rencontrent, ou bien quand le mycélium de *Fusarium* du témoin négatif atteint le bord de la boîte de Pétri.

Des mesures diamétrales des colonies de *Fusarium* ont été effectuées tous les deux jours selon deux directions perpendiculaires. De plus, des observations microscopiques relatives à l'effet direct de l'agent antagoniste sur l'état du mycélium de *Fusarium* ont été effectuées.

#### **II.5.1.2. Evaluation des résultats**

L'évaluation de l'inhibition exercée par des germes antagonistes est estimée par le calcul du pourcentage d'inhibition de la croissance mycélienne par rapport au témoin selon la formule suivante (Hmouni et al., 1996) :

$$PI = \frac{M_o - M_i}{M_o} \times 100$$

PI (mm): Pourcentage d'inhibition de la croissance mycélienne de champignon phytopathogène par le germe antagoniste.

Mo (mm): Mesure de la croissance mycélienne normale représentant le rayon opposé à la colonie du germe testé.

Mi (mm): Mesure de la croissance mycélienne de champignon phytopathogène influencée.

### **II.5.2. Bioprotection de la tomate contre la fonte de semis causée par *Fusarium***

Cette étape a pour objectif de vérifier *in vivo* l'efficacité des isolats d'Actinomycète et de *Pseudomonas*, révélés antagonistes de *Fusarium* lors du test *in vitro* pour la protection biologique des plantes contre la fonte de semis causée par *Fusarium*.

Cette technique consiste à appliquer directement l'inoculum de *Pseudomonas* ou d'Actinomycète aux semences afin d'inhiber précocement la croissance de *Fusarium* inoculé sur le sol de culture.

Avant de faire germer les graines de plante traitées avec des isolats de *Pseudomonas* ou d'Actinomycète, le sol a été inoculé avec l'isolat de *Fusarium*.

#### **II.5.2.1. Préparation d'inoculum de *Fusarium***

La préparation de l'inoculum de *Fusarium* est inspirée des travaux de Hwang (1993) et Howell (2002). L'isolat de *Fusarium* a été cultivé sur milieu PDA dans des boîtes de Pétri de 9cm. Après une semaine d'incubation à 30°C, 30 millilitres de l'eau distillée stérilisée sont versés sur une boîte de *Fusarium*. Le mycélium et les spores sont mis en suspension en grattant avec une anse de platine stérile ; la solution obtenue n'est pas filtrée et la concentration finale correspond à  $2.5 \times 10^7$  spores/ml pour infecter les trois plantules.

#### **II.5.2.2. Préparation d'inoculum de *Pseudomonas* et d'Actinomycète**

Avant chaque expérience, des étalements de chaque isolat de *Pseudomonas* et d'Actinomycète sur chaque milieu de culture spécifique respectif permettent de vérifier la pureté de l'isolat. La préparation de l'inoculum se fait, par la suite, par ensemencement de 100ml de milieu liquide (Bowers & Parke, 1993) stérile contenus dans un erlenmeyer de 250ml par les colonies de *Pseudomonas* ou d'Actinomycète. Les milieux de culture liquide sont respectivement de King B pour les *Pseudomonas* et de Waksman pour les Actinomycètes. La culture est incubée sous agitation continue (100 tours/min) à 28°C pendant

48h. La densité de la suspension est ajustée à  $10^8$  ufc/ml par estimation de la densité initiale puis dilution (Lou et *al.*, 2000).

### **II.5.2.3. Traitement des graines de plante avec les isolats de *Pseudomonas* et d'Actinomycète**

Des graines de tomate, de concombre et d'haricot ont été également utilisées pour ce test. Les graines désinfectées superficiellement sont trempées dans la suspension de *Pseudomonas* ou d'Actinomycète pendant 30min. Les graines qui servent de témoins ont été traitées uniquement avec du milieu de culture liquide stérilisé (121°C; 20min).

### **II.5.2.4. Traitement du sol avec les isolats de *Fusarium***

Le sol sableux stérilisé à l'autoclave (121°C ; 60min) a été arrosé par l'inoculum de *Fusarium* à raison de 30ml par pot de volume de 500ml.

### **II.5.2.5. Déroulement du test**

Les graines traitées avec l'isolat de *Pseudomonas* ou d'Actinomycète ont été germées sur des sols traités avec l'inoculum de *Fusarium* à raison de 5 graines par pots. Pour chaque lot du test composé du traitement avec l'isolat de *Pseudomonas*, du traitement avec Actinomycètes, du traitement avec le milieu de culture King B liquide et du traitement avec le milieu de culture Waksman liquide, 5 répétitions ont été préparés. Les pots ont été arrosés tous les deux jours avec une solution nutritive diluée dont la composition est donnée en annexe 2.

Dès le 3<sup>e</sup> jour de l'expérimentation jusqu'au 21<sup>e</sup> jour, le nombre des plantes saines, les plantes qui flétrissent et les plantes mortes est compté. Les graines qui n'ont pas germé durant cette période sont exclues de la notation (Besnard et Davet, 1993).

**Resultats  
et  
interpréta  
tions**





## I. Isolement et caractérisation morphologique des champignons phytopathogènes

### I.1. Les isolats de champignons phytopathogènes

A partir des échantillons d'organe végétal infecté, l'examen macroscopique et microscopique des colonies fongiques, ont permis d'identifier les champignons selon les caractères morphologiques établis par Bennett (1958). En effet, on a pu obtenir 7 isolats fongiques suivant l'organe source d'isolement :

- trois isolats isolés à partir du tubercule de pomme de terre et codés respectivement par *Fo-01*, *Ni-01* et *Rh-01*
- deux isolats obtenus à partir du fruit de tomate et codés *Fo-02* et *Hel-01*
- deux isolats isolés à partir des gousses d'haricot et codés *Alt-01* et *Pn-01*.

**Tableau n°2 :** Les isolats fongiques isolés selon l'organe végétal d'isolement et identifiés selon les caractères morphologiques.

Isolats fongiques	Organes infestés			Nombre d'isolats
	Fruit de Tomate	Gousse d'Haricot	Tubercule de Pomme de terre	
<i>Alternaria sp.</i>		<i>Alt-01</i>		01
<i>Fusarium sp.</i>	<i>Fo-02</i>		<i>Fo-01</i>	02
<i>Helminthosporium sp.</i>	<i>Hel-01</i>			01
<i>Nigrospora sp.</i>			<i>Ni-01</i>	01
<i>Penicillium sp.</i>		<i>Pn-01</i>		01
<i>Rhizopus sp.</i>			<i>Rh-01</i>	01
<b>Total</b>	02	02	03	07

## **I.2. Caractéristiques morphologiques des isolats**

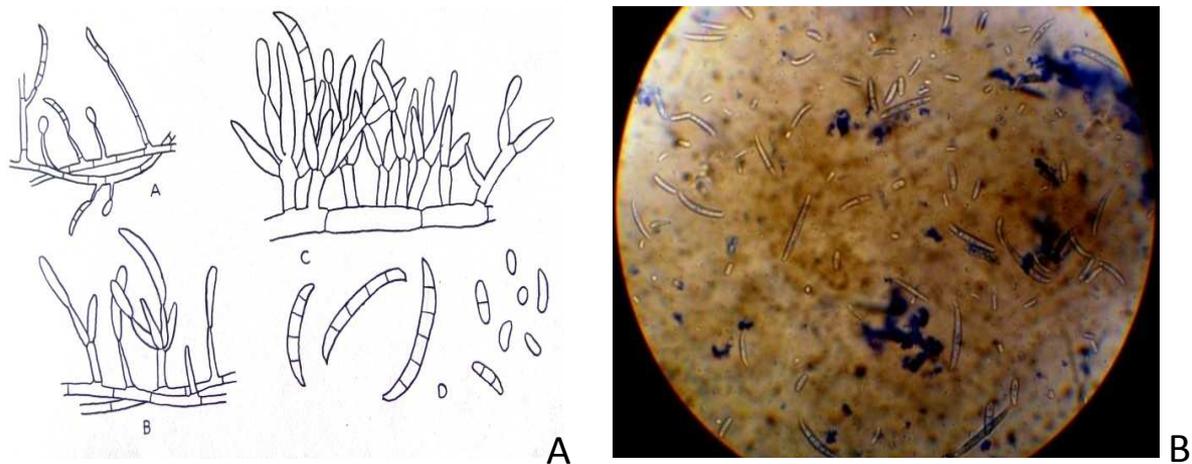
### **I.2.1. Isolats *Fo-01* et *Fo-02***

Les isolats *Fo-01* et *Fo-02* sont caractérisés par l'abondance de mycélium aérien et de couleur blanche. Pourtant cette couleur devient bleue lorsque les chlamydospores sont abondantes. La croissance mycélienne est rapide pour ces deux isolats.

Les microconidies sont abondantes, de forme ovoïde, portés par des phialides simples et courtes. Elles ne sont jamais formées en chaîne.

Les macroconidies sont fusiformes (fusoïdes), légèrement curvées et pointues aux extrémités. Les cellules basales sont pédicellées. Les chlamydospores sont terminales ou hyalins à paroi lisse ou rugueuse.

Les microconidies identifiées présentent 1 à 2 cloisons tandis que les macroconidies en ont 3 à 5 (Figure 5B). Ces caractères morphologiques correspondent à celles d'une espèce de *Fusarium* (Figure 5A).



**Figure 5 :** *Fusarium* sp. ; (A) : Caractères morphologiques ; (B) : sous microscope

### **I.2.2. Isolat *Alt 01***

L'isolat *Alt 01* se présente sous forme de colonies de couleur brune noirâtre. Les conidiophores sont solitaires (Figure 6B) ou formant de petits groupes, simples ou ramifiés, et de couleur olivâtre à brune dorée. Les conidies se forment en longueur, souvent branchées en chaîne jusqu'à 10 conidies par chaîne, ovoïdes, de couleur pale à brune dorée, lisses ou

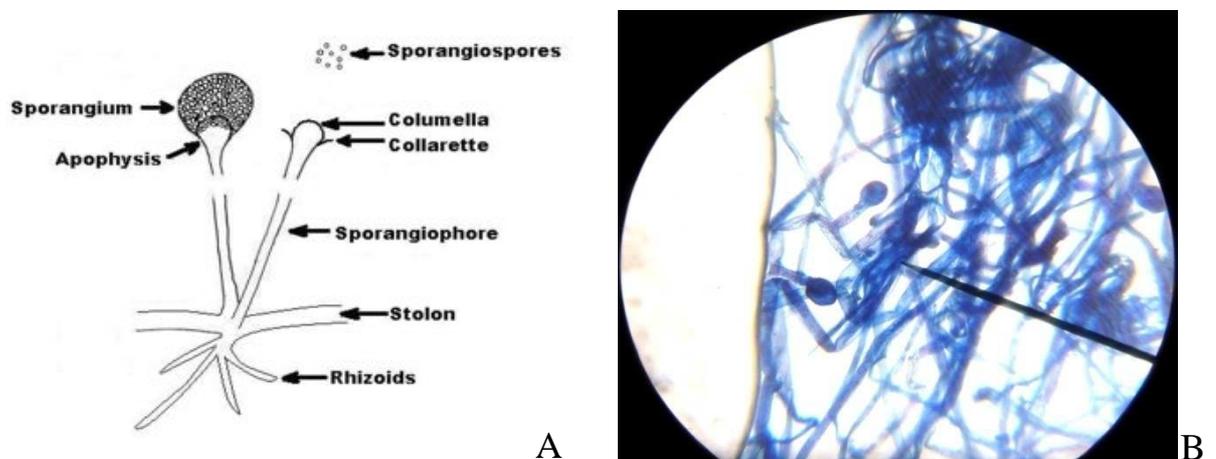
verruculeuses, avec 8 cloisons transversales. Ces descriptions morphologiques sont caractéristiques de champignon du genre *Alternaria* (Figure 6A).



**Figure 6 :** *Alternaria* sp. ; (A) : Caractères morphologiques ; (B) : sous microscope

### I.2.3. Isolat *Rh-01*

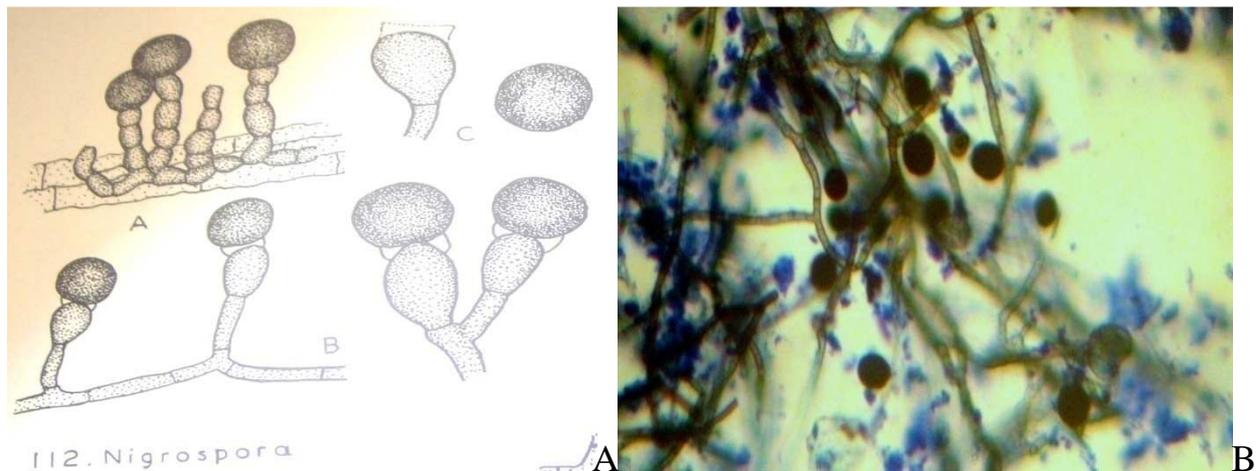
L'isolat *Rh 01* se présente comme une colonie de couleur noire grisâtre, avec un revers de couleur presque transparente. Le mycélium aérien est très développé et non cloisonné. Le sporocystophore se termine par une columelle autour de laquelle se différencient les spores dans un sporocyste (Figure 7B). Ces caractères sont attribués aux champignons du genre *Rhizopus* (Figure 7A).



**Figure 7 :** *Rhizopus* sp. ; (A) : Caractères morphologiques ; (B) : sous microscope

#### **I.2.4. Isolat *Ni-01***

Les Hyphes sont cloisonnés, et légèrement pigmentés. Les conidiophores et les conidies sont visualisés. Les cellules conidiogènes des conidiophores sont gonflées et portent une conidie unique à leur sommet (Figure 8B). Les conidies sont de couleur noire, solitaires, unicellulaires et légèrement aplaties horizontalement. Ces caractères sont attribués aux champignons du genre *Nigrospora* (Figure 8A).



**Figure 8 :** *Nigrospora* sp. ; (A) : Caractères morphologiques ; (B) : sous microscope

#### **I.2.5. Isolat *Hel-01***

Pour l'isolat *Hel-01*, les spores sont brunes claires et parfois dorées foncées. Ces spores sont droites, cylindriques arrondies aux deux extrémités et présentent une légère constriction au niveau des cloisons. Elles peuvent présenter jusqu' à 7 ou 8 cloisons mais en ont souvent 4 ou 5 (Figure 9B) et mesurent  $60-125 \times 11-20 \mu\text{m}$  (Champion, 1997). Ces caractères sont comparables aux champignons du genre *Helminthosporium* (Figure 9A).

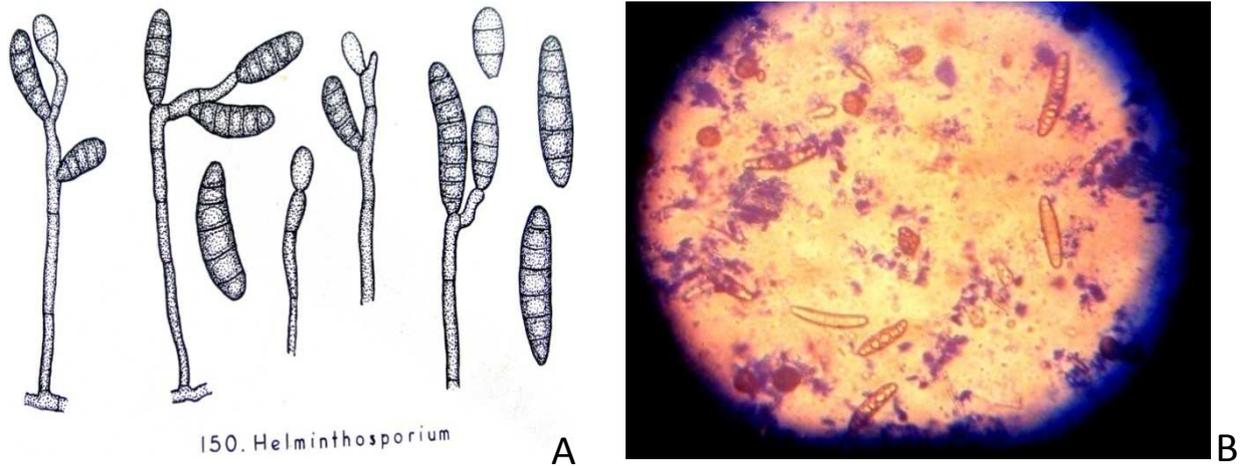


Figure 9 : *Helminthosporium* sp. ; (A) : Caractères morphologiques ; (B) : sous microscope

### I.2.6. Isolat Pn-01

Les colonies de *Pn-01* sont de couleur verte avec un mycélium septé. Le conidiophore est droit, généralement non ramifié, avec des verticilles au sommet. Les conidies sont en chaînes, avec une forme globuleuse et sont à paroi lisse (Figure 10B). Ces caractères morphologiques sont liés aux champignons du genre *Penicillium* (Figure 10A).

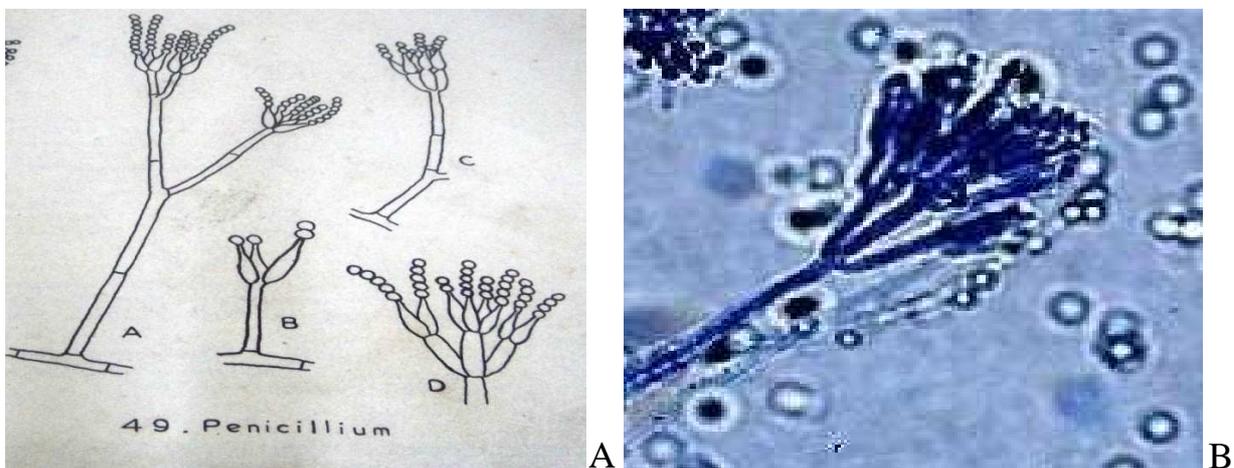


Figure 10 : *Penicillium* sp. ; (A) : Caractères morphologiques ; (B) : sous microscope

## II. Virulence des isolats de *Fusarium* sur la germination des graines *in vitro*

Parmi les isolats de champignons phytopathogènes obtenus, seuls les isolats de *Fusarium* ont fait l'objet d'étude de virulence. Les isolats de *Fusarium Fo-01* et *Fo-02* ont été conservés durant 2 à 4 mois sur le milieu de culture SNA dans une étuve à température 25°C. Durant ces périodes, ils ne perdent pas leur virulence et aucune réduction de croissance n'est observée.

### II.1. Virulence des isolats *in vitro*

#### II.1.1. Effet de *Fo-01* et *Fo-02* sur la germination des graines *in vitro*

Les deux isolats de *Fusarium Fo-01* et *Fo-02* ont inhibé de manière significative la germination des graines de concombre, de haricot, et de tomate (Tableau 3). En effet, la virulence de ces deux isolats est encore plus élevée lors de la contamination en pré-levée par rapport à celle enregistrée lors de la contamination en post-levée. Cette virulence se manifeste par l'augmentation du nombre de graines non germées avec la contamination en pré-levée (Tableau 3).

**Tableau n°3** : Taux de mortalité des graines contaminées par les isolats *Fo-01* et *Fo-02*.

Graines	Graines non germées en (%)				
	Témoin	<i>Fo-01</i>		<i>Fo-02</i>	
		Contamination Pré-levée	Contamination Post-levé	Contamination Pré-levée	Contamination Post-levée
<b>Concombre</b>	10,66a	56b	18,66a	68b	16a
<b>Haricot</b>	8a	45,33b	22,66ab	52b	20ab
<b>Tomate</b>	8a	78,66b	13,33a	72b	14,66a

Les traitements suivis par une même lettre (a ou b) constituent un groupe statistiquement homogène, au seuil de probabilité 0,05, selon le test de Newman-Keuls.

### II.1.2. Effet de *Fo-01* et *Fo-02* sur la croissance racinaire des plantes

Contrairement au cas de la virulence sur la germination de graine, l'inhibition de la croissance racinaire des trois espèces de plante provoquée par les deux isolats de *Fusarium* ne présente pas de différence significative entre les deux méthodes de contamination (pré-levée et post-levée) (Tableau 4).

**Tableau n°4** : Croissance racinaire des plantules contaminées par les isolats *Fo-01* et *Fo-02*.

Plantule	Longueur de racicelle (cm)				
	Témoin	<i>Fo-01</i>		<i>Fo-02</i>	
		Contamination Pré-levée	Contamination Post-levé	Contamination Pré-levée	Contamination Post-levé
<b>Concombre</b>	5,26b	0,53a	2,8a	0,22a	2,06a
<b>Haricot</b>	3,35b	0,58a	1,38a	0,52a	0,95a
<b>Tomate</b>	4,77b	0,2a	2,09a	0,25a	2,32a

Les traitements suivis par une même lettre (a ou b) constituent un groupe statistiquement homogène, au seuil de probabilité 0,05, selon le test de Newman-Keuls.

Par contre, la longueur du système racinaire des plantules infectées par chacune des deux méthodes est significativement faible par rapport à celle des plantules témoins. Cette inhibition de la croissance racinaire exprime la virulence des isolats fongiques (Tableau 4).

### III. Virulence des isolats de *Fusarium in vivo*

Au niveau de la croissance végétale des trois plantes d'étude, la virulence des deux isolats a été testée selon deux méthodes : la contamination au niveau du collet et la contamination au niveau des systèmes racinaires.

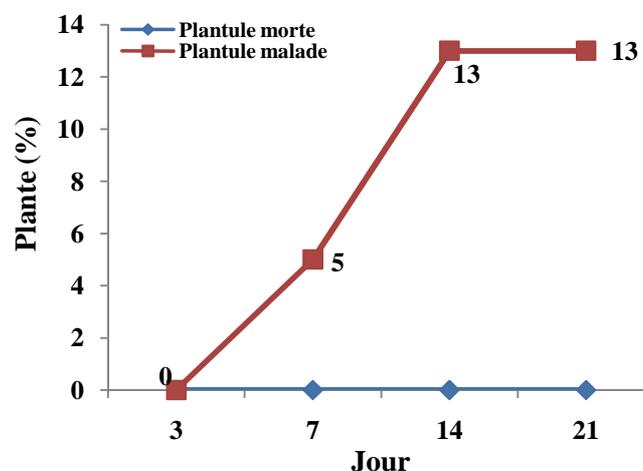
#### III.1. Virulence de l'isolat *Fo-01*

Contaminées au niveau du collet par l'isolat *Fo-01*, les jeunes plantes de concombre, de haricot et de tomates ne présentent pas les symptômes de la maladie fongique et aucune jeune plante n'est morte jusqu'à la fin de l'expérience (21 jours). De même, lorsque la contamination est appliquée au niveau du système racinaire, aucune jeune plante n'est morte

excepté le cas des jeunes plantes de tomate où à la fin de l'expérience, 8% des jeunes plantes sont mortes. Pour cette deuxième méthode de contamination, des jeunes plantes ont montré les symptômes de la maladie fongique présentés par le flétrissement. En effet, le flétrissement des jeunes plantes est apparu au 7<sup>e</sup> jour de l'expérience pour le haricot (Figure 11) et la tomate (Figure 13) et dès le 3<sup>em</sup> jour pour le concombre (Figure 15).

### III.2. Virulence de l'isolat *Fo-02*

L'isolat *Fo-02* s'est montré virulent vis-à-vis du développement des jeunes plantes de tomate, d'haricot et de concombre. La contamination s'est faite au niveau du collet ou au niveau du système racinaire. La contamination au niveau du système racinaire entraîne l'apparition rapide du flétrissement des jeunes plantes par rapport à celle appliquée au niveau du collet. En effet, les jeunes plantes se flétrissent et sont mortes dès le 3<sup>e</sup> jour de l'expérience lorsque la contamination est appliquée au niveau du système racinaire. Par contre, lorsque la contamination est appliquée au niveau du collet, le flétrissement est apparu au 7<sup>e</sup> jour de l'expérience suivi de la mortalité au 14<sup>e</sup> jour de l'expérience. Ainsi, le nombre de jeunes plantes mortes a augmenté pour les deux modes de contamination à la fin de l'expérience. En effet dans le cas du haricot, 85% des jeunes plantes contaminées au niveau des racines contre 63% pour celles contaminées au niveau du collet sont mortes à la fin de l'expérience (Figure 12). Pour la tomate, 96% des jeunes plantes contaminées au niveau des racines sont mortes tandis que 16% pour celles contaminées au niveau du collet après 21 jours d'expérience (Figure 14). Pour le concombre, les pourcentages des jeunes plantes mortes sont respectivement 31% et 11% pour la méthode de contamination au niveau du collet et celle au niveau du système racinaire (Figure 16).



**Figure 11 :** Taux de jeunes plantes d'haricot malades et mortes après la contamination par *Fo-01* au niveau du système racinaire.

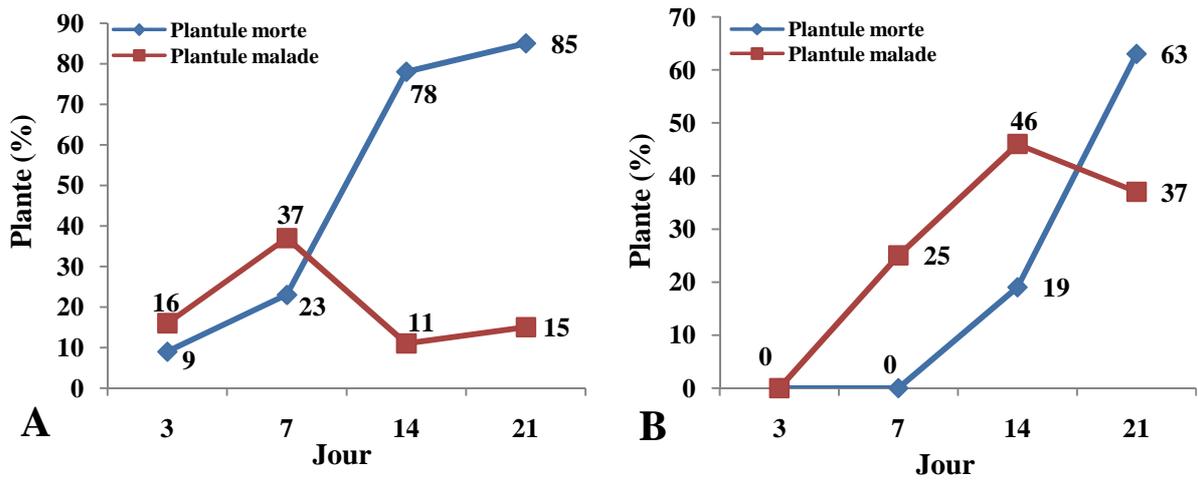


Figure 12 : Taux de jeunes plantes d'haricot malades et mortes après la contamination par *Fo-02* au niveau du système racinaire (A) et du collet (B).

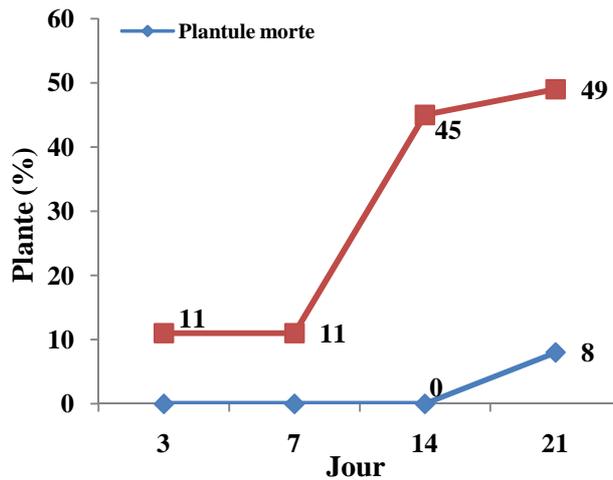
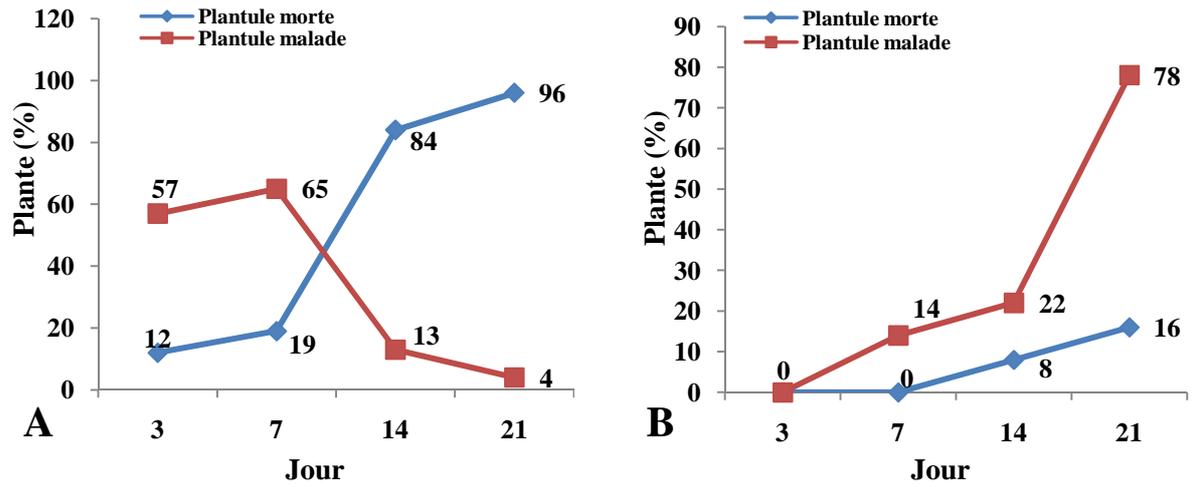
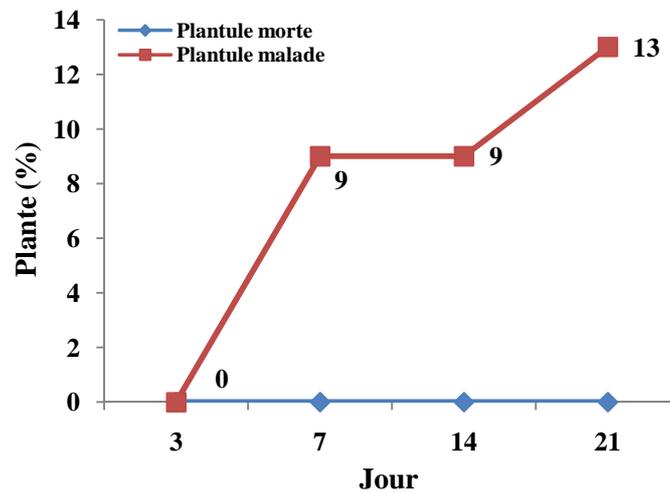


Figure 13 : Taux de jeunes plantes de tomate malades et mortes après la contamination par *Fo-01* au niveau du système racinaire.

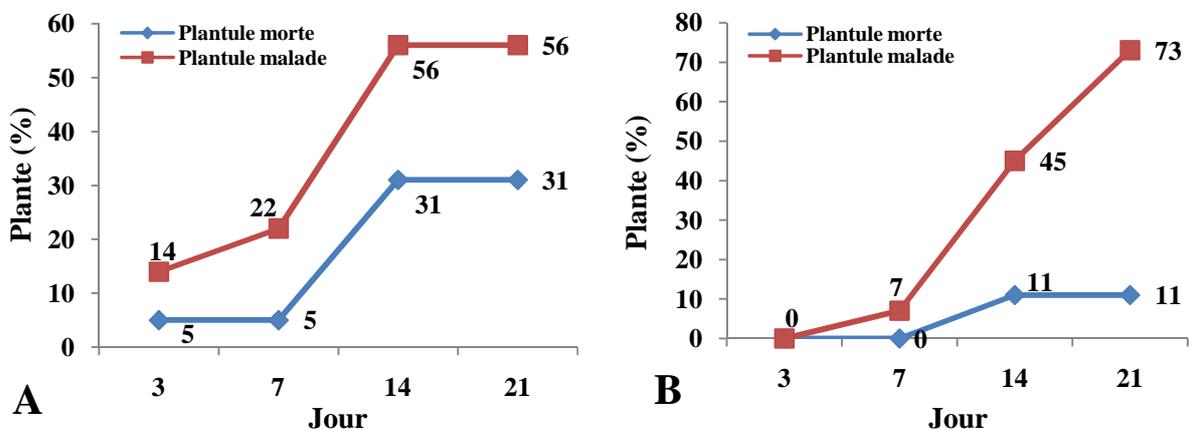
## Résultats et interprétations



**Figure 14 :** Taux de jeunes plantes de tomate malades et mortes après la contamination par *Fo-02* au niveau du système racinaire (A) et du collet (B).



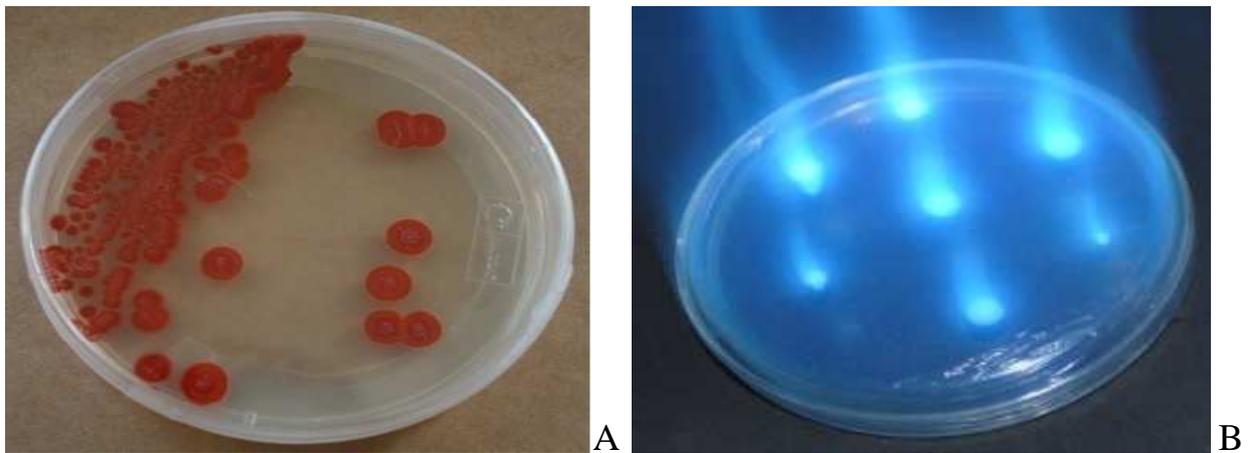
**Figure 15 :** Taux de jeunes plantes de concombre malades après la contamination par *Fo-01* au niveau du système racinaire.



**Figure 16 :** Taux de jeunes plantes de concombre malades et mortes après la contamination par *Fo-02* au niveau du système racinaire (A) et du collet (B).

#### **IV. Isolement des isolats d'Actinomycètes et de *Pseudomonas***

L'isolement des isolats d'Actinomycète et de *Pseudomonas* fluorescent à partir de trois sols rhizosphériques différents, a conduit aux résultats présentés dans le tableau 5. Les isolats sont reconnaissables par leurs aspects macroscopiques (colonies dures incrustées dans la gélose pour les Actinomycètes et le reflet d'un pigment fluorescent sous la lumière ultraviolette de longueur d'onde 254 nm pour les colonies de *Pseudomonas* fluorescent) (Figure 17).



**Figure 17 :** Souches pures. A : Actinomycètes sur milieu Waksman, B : *Pseudomonas* Fluorescents sur le milieu de King B.

Ainsi, 65 isolats de *Pseudomonas* fluorescent codés de Ps1 à Ps65 sont obtenus dont 29 provenant de la rhizosphère de tomate, 21 à partir du sol rhizosphérique de haricot, et 15 à partir du sol rhizosphérique de concombre. Quatre-vingt-sept (87) isolats d'Actinomycète codés d'Ac1 à Ac87 sont obtenus dont 35 à partir du sol rhizosphérique de tomate, 38 à partir du sol rhizosphérique de haricot, et 14 à partir du sol rhizosphérique de concombre (Tableau 5).

**Tableau n°5 :** Isolats d'Actinomycète et de *Pseudomonas* fluorescent isolés à partir des sols rhizosphériques.

Isolats	Origine des sols rhizosphériques			Nombre d'isolats
	Sol tomate	Sol haricot	Sol concombre	
<b>Actinomycètes</b>	35	38	14	87
<b><i>Pseudomonas</i></b>	29	21	15	65
<b>Total</b>	64	59	29	152

Les traitements suivis par une même lettre (a ou b) constituent un groupe statistiquement homogène, au seuil de probabilité 0,05, selon le test de Newman-Keuls.

## **V. Inhibition du développement de l'isolat *Fo-02* par les isolats de *Pseudomonas* et d'Actinomycètes *in vitro***

Parmi les 152 isolats d'Actinomycète et de *Pseudomonas* fluorescent, 39 se sont montrés antagonistes du *Fo-02* dont 15 *Pseudomonas* fluorescents et 24 Actinomycètes (Tableau 6). En effet, après 5 jours en co-culture avec *Fo-02*, chacun de ces 39 isolats inhibent le développement de *Fo-02* (Tableau n°6). Parmi ces 39 isolats, 6 isolats d'Actinomycète et 4 isolats de *Pseudomonas* fluorescent ont un taux d'inhibition supérieur à 30%. (Tableau n°6). Parmi ces isolats qui inhibent de façon élevée le développement de *Fo-02*, 3 isolats de *Pseudomonas* fluorescents et 3 Actinomycètes sont isolés à partir du sol rhizosphérique de tomate ; 01 *Pseudomonas* fluorescent et 03 Actinomycètes sont isolés à partir du sol rhizosphérique de Haricot tandis qu'aucun isolat de *Pseudomonas* fluorescent ni d'Actinomycète présentant le taux d'inhibition de plus de 30% n'est isolé à partir du sol rhizosphérique de concombre.

**Tableau n°6 :** Inhibition du développement de *Fusarium Fo-02* par les isolats de *Pseudomonas* fluorescent et d'Actinomycète isolés du sol rhizosphérique.

Plantes	Isolats	5 jours		
		Mo (mm)	Mi (mm)	% d'inhibition
<b>Tomate</b>	<b><i>Pseudomonas</i></b>			
	<i>Ps2</i>	28	24	14,28
	<i>Ps5</i>	31	20,5	33,87
	<i>Ps6</i>	30	19	36,67
	<i>Ps9</i>	27	23	14,81
	<i>Ps12</i>	30	22	26,67
	<i>Ps16</i>	34	18	47,05
	<i>Ps17</i>	29	23	20,68
	<i>Ps26</i>	32	28	12,5
	<i>Ps28</i>	29	25	13,79
	<b>Actinomycètes</b>			
	<i>Ac1</i>	37	21	43,43
	<i>Ac2</i>	38	20	47,36
	<i>Ac5</i>	36	29	19,44
	<i>Ac7</i>	37	18	51,35
	<i>Ac11</i>	38	28	26,31
	<i>Ac15</i>	38	29	23,68
	<i>Ac18</i>	38	30	21,05
	<i>Ac19</i>	37	31	16,21
	<i>Ac24</i>	37	29	21,62
	<i>Ac28</i>	35	30,5	12,85
	<i>Ac32</i>	38	29,5	22,36

*Résultats et interprétations*

Plantes	Isolats	5 jours		
		Mo (mm)	Mi (mm)	% d'inhibition
<b>Haricot</b>	<b><i>Pseudomonas</i></b>			
	<i>Ps30</i>	29	25	13,79
	<i>Ps35</i>	30,5	21	31,14
	<i>Ps40</i>	29	19,5	32,75
	<i>Ps43</i>	29	24,5	15,51
	<i>Ps45</i>	30	23	23,34
	<i>Ps46</i>	28	22,5	19,64
	<b>Actinomycètes</b>			
	<i>Ac43</i>	39	31,5	19,23
	<i>Ac46</i>	39	28,5	26,92
	<i>Ac51</i>	38	24	36,84
	<i>Ac63</i>	38	30,5	19,73
	<i>Ac64</i>	37	26,5	28,37
	<i>Ac66</i>	3,8	1,5	60,52
	<i>Ac69</i>	35	29	17,14
	<i>Ac72</i>	38	26,5	30,26
	<i>Ac73</i>	38	29,5	22,36
<b>Concombre</b>	<b>Actinomycètes</b>			
	<i>Ac76</i>	35	27	22,85
	<i>Ac80</i>	38	30,5	19,73
	<i>Ac84</i>	38	27,5	27,63

Pour la suite des travaux, deux isolats ont été sélectionnés pour les tests d'antagonisme vis-à-vis du développement de *Fusarium Fo-02 in vivo*. Ces isolats constitués par un isolat de *Pseudomonas* fluorescent (*Ps16*) et un isolat d'Actinomycète (*Ac66*) ont montré les taux d'inhibition les plus élevés vis-à-vis du développement de ce champignon phytopathogène (respectivement de 47,05% et 60,52%).

## **VI. Inhibition de la virulence de *Fusarium Fo-02* par le *Pseudomonas Ps16* ou l'Actinomycète *Ac66 in vivo***

Pour les trois espèces de plante (tomate, concombre, haricot), les jeunes plantes dont les graines n'ont pas été enrobées préalablement avec l'Actinomycète *Ac66* ou avec le *Pseudomonas* fluorescent *Ps16* mais contaminées avec *Fo-02* présentent un taux de mortalité significativement élevé (Tableau n° 7). En effet, 80% de jeunes plantes de tomate, 68% de jeunes plantes de concombre et 72% de jeunes plantes de haricot ont été mortes sans l'utilisation des deux isolats microbiens rhizosphériques.

Comparés à celui des plantes témoins (sans traitement préalable avec les deux isolats rhizosphériques ni contaminées avec l'isolat phytopathogène *Fo-02*), le taux de mortalité des plantes contaminées avec *Fo-02* et préalablement traitées avec le *Pseudomonas Ps16* ou l'Actinomycète *Ac66* ne présente pas de différence significative (tableau n°7). Ce qui suggère l'efficacité des deux isolats rhizosphériques à atténuer l'effet néfaste de l'isolat phytopathogène *Fo-02* sur le développement des plantes en culture maraîchère.

**Tableau n° 7 :** Taux de mortalité des jeunes plantes contaminées par *Fo-02* et traitées ou non avec le *Pseudomonas Ps 16* et l'Actinomycète *Ac 66 in vivo*

Plantules	Taux de mortalité (%)					
	Témoin	<i>Ac66</i>	<i>Ac66+Fo-02</i>	<i>Ps16</i>	<i>Ps16+Fo-02</i>	<i>Fo-02</i>
<b>Tomate</b>	24b	12b	20b	20b	16b	80a
<b>Concombre</b>	16b	8b	20b	12b	12b	68a
<b>Haricot</b>	20b	8b	12b	12b	12b	72a

Les traitements suivis par une même lettre (a ou b) constituent un groupe statistiquement homogène, au seuil de probabilité 0,05, selon le test de Newman-Keuls

Ces résultats sont confirmés par les biomasses aériennes des jeunes plantes issues de différents traitements. En effet, la biomasse aérienne des jeunes plantes inoculées avec le *Fusarium Fo-02* et non traitée par les isolats rhizosphériques est significativement faible par rapport à celle des jeunes plantes témoins et/ou des jeunes plantes traités préalablement avec l'Actinomycète *Ac66* ou avec le *Pseudomonas Ps16* (Tableau n°8).

**Tableau n° 8 :** Biomasse aérienne des jeunes plantes lors du test d'antagonisme de *Pseudomonas Ps16* et d'Actinomycète *Ac66* au *Fusarium Fo-02* *in vivo*.

Plantules	Biomasse aérienne (g)					
	Témoin	<i>Ac66</i>	<i>Ac66+Fo-02</i>	<i>Ps16</i>	<i>Ps16+Fo-02</i>	<i>Fo-02</i>
Tomate	0,80b	0,99b	0,85b	0,91b	0,91b	0,05a
Concombre	0,82b	1,02b	0,93b	0,96b	1,11b	0,10a
Haricot	0,87b	1,14b	1,03b	1,06b	1,07b	0,22a

Les traitements suivis par une même lettre (a ou b) constituent un groupe statistiquement homogène, au seuil de probabilité 0,05, selon le test de Newman-Keuls

# Discussion



L'objectif de cette étude était de décrire la potentialité des microorganismes rhizosphériques (*Pseudomonas* fluorescent et Actinomycètes) à lutter contre les effets néfastes des agents microbiens pathogènes des plantes maraîchères. Outre la description de la virulence des isolats phytopathogènes sur le développement des plantes à différents niveaux, la capacité de 65 isolats de *Pseudomonas* fluorescent et de 87 isolats d'Actinomycètes rhizosphériques à inhiber le développement et la virulence d'un isolat le plus pathogène a été également évaluée. L'expérimentation a été réalisée sur trois plantes maraîchères à savoir la tomate, le haricot et le concombre.

À part les *Fusarium*, d'autres champignons phytopathogènes ont été observés et isolés à partir des organes infestés de plantes maraîchères. En effet, la technique d'isolement de dilution/étalement sur milieu gélosé utilisant comme solution de désinfection que nous avons adopté nous a permis d'isoler 7 isolats fongiques. Selon Davet, et *al.*, (1980), le lavage préalable des organes infestés avec de l'eau distillée permet d'isoler à la fois les champignons de surface et ceux qui s'insinuent et s'installent à l'intérieur de l'organe infesté tandis que la désinfection avec de l'hypochlorite de sodium ne laisse subsister que les champignons qui se trouvent à l'intérieur de l'organe. Cependant, que ce soit à la surface ou à l'intérieur des organes, la fréquence de chaque espèce fongique dépend des conditions d'humidité et de température favorables à son développement (Anahosur 1992). Ce qui pourrait expliquer l'abondance de *Fusarium* dans notre collection d'isolats fongiques. En effet, deux des sept isolats obtenus appartiennent au genre *Fusarium*. Plusieurs représentants de ce champignon sont soit des parasites soit des saprophytes qui sont réputés comme responsables de dommages considérables sur les jeunes plantes des cultures telles que les Cucurbitacées, les asperges et les plantes ornementales (Champion, 1997).

Lors de la description de la virulence des isolats phytopathogènes, nos résultats ont montré que l'arrivée précoce du champignon sur le milieu de culture a beaucoup influencé la germination des graines. En effet, la colonisation préalable du milieu de culture par les deux isolats de *Fusarium* a considérablement réduit le taux de germination des graines. Travaillant sur des isolats de *Pythium* phytopathogènes, Raynal (1980) a constaté que les isolats qui se développent rapidement ont un pouvoir pathogène élevé. Pour le cas de nos deux isolats de *Fusarium*, il s'avère qu'ils ont besoin d'un temps d'adaptation et de multiplication avant de devenir virulents. Cela explique également les résultats des tests au niveau du développement racinaire. Les deux techniques d'application (pré-levée et post-levée) ont inhibé le développement des radicelles après avoir colonisé le substrat.

En comparant les deux isolats de *Fusarium* (*Fo-01* et *Fo-02*) au cours de différentes expérimentations de contamination de trois espèces de plantes maraîchères que ce soit simultanées ou déphasées, l'isolat *Fo-02* montre un pouvoir pathogène significativement élevé par rapport à celui de l'isolat *Fo-01*. Isolé du tubercule de pomme de terre infesté, *Fo-02* a provoqué une inhibition considérable de la germination des graines de tomate. Cela montre le large spectre d'hôte de certains champignons phytopathogènes et la présence de degré de virulence propre à chaque isolat selon la nature des plantes. Ces résultats corroborent ceux de Raynal (1980) qui a pu classer les isolats de *Pythium* en trois groupes selon leur degré de virulence sur la luzerne. Les trois groupes identifiés sont : groupe A ou isolats très pathogènes ; Groupe B ou isolats moyennement pathogènes et Groupe C ou isolats peu ou non pathogènes. Réalisés durant seulement quelques jours de germination des graines, les tests de virulence ont permis de classer les deux isolats selon leur degré de virulence et/ou de pathogénicité. Des auteurs ont déjà signalé que les principaux atouts du test d'agressivité de champignon réalisé sur les graines sont sa rapidité et sa reproductibilité (Dorrance et al., 2004 et Zhang & Yang, 2000).

L'intensité de la virulence de l'isolat *Fo-02* a été également observée lors du test *in vivo*. En effet le taux de mortalité des plantules de trois espèces végétales étudiées s'accroît significativement lorsque l'inoculation fongique est effectuée au niveau des racines. Ces résultats concordent avec ceux trouvés par certains auteurs qui indiquent que les *Fusarium* sont beaucoup plus virulents lorsqu'ils attaquent les graines en émergence et les jeunes plantules (Dorrance et al., 2004 ; Sánchez et al., 2001 ; Zhang & Yang, 2000 ; Forbes & Davet, 1990 ; et Hwang, 1988). De plus, il a été démontré encore une fois par les résultats de nos tests *in vivo* que la virulence des isolats dépend de la plante. En effet, l'isolat *Fo-01* qui s'est révélé peu ou non pathogène pour l'haricot et le concombre, a été hautement virulent chez la tomate. Il est possible que la virulence d'un isolat change également avec le niveau du développement de la plante.

Lors de l'isolement de microorganismes rhizosphériques, les techniques que nous avons adoptées ont permis d'isoler des nombres considérables d'Actinomycètes et de *Pseudomonas* fluorescent. En utilisant le milieu de culture Waksman (1961), un milieu sélectif sans antibiotique, le développement d'un grand nombre de microorganismes à croissance rapide dont les bactéries et les champignons a été inhibé au profit de l'apparition des Actinomycètes (Crawford et al., 1993 ; Williams et al., 1982 ; Williams et Davies, 1965).

Par conséquent, pour isoler les Actinomycètes du sol, certains auteurs ont utilisé des antibiotiques tels que l'acide nalidixique qui inhibe le développement des bactéries gram négatif (Hilali et *al.*, 2002 ; Jung yeop lee, 2002 ; Ouhdouche et *al.*, 2001 ; Hayakawa et Nonomura, 1989 ; Larpent et Sanglier, 1989 ; Porter et *al.*, 1960 ; Dulaney et *al.*, 1955), la triméthoprimine qui inhibe le développement des bactéries à croissance rapide (Labeda et Shearer, 1990) et le cycloheximide inhibiteur du développement des champignons saprophytes (Wang et *al.*, 1990). Tout cela suggère que la quantité d'Actinomycète cultivable dépend non seulement du type du sol mais surtout du type du milieu de culture utilisé pour l'isolement. En effet, Landerkin et *al.*, en 1950 ont suggéré que l'abondance des isolats d'Actinomycète isolées à partir des sols prélevés dans la forêt primaire est en relation avec la quantité élevée de la matière organique. Un peu plus tard, Mayfield et *al.*, (1972) ont définis 5 facteurs influençant positivement le développement des Actinomycètes du sol. Ces facteurs sont l'abondance des matières organiques, la profondeur du sol, le pH, l'aération et l'humidité. Dans notre cas, 87 isolats d'Actinomycètes ont été obtenus à partir de trois types de sol rhizosphérique. Ce nombre est largement suffisant pour effectuer un test d'inhibition sur un seul isolat de champignon phytopathogène.

Pour les *Pseudomonas* fluorescents, 65 isolats ont été obtenus à partir des trois types de sol rhizosphérique en utilisant le milieu de culture King B (King, 1954). Connus pour être abondants dans les sols rhizosphériques (Kragelund et *al.*, 1996), la densité des *Pseudomonas* fluorescents dépend beaucoup de la nature de la plante et de son statut symbiotique (Founoune et *al.*, 2002 ; Ramanankierana, 2005). Ces derniers auteurs ont confirmé que ce groupe de bactérie est particulièrement abondant autour des racines mycorhizées. Dans notre cas, les colonies de *Pseudomonas* et d'Actinomycète isolées du sol rhizosphérique de concombre sont moins nombreuses par rapport à celles isolées des sols rhizosphériques de tomate et d'haricot. En effet, et outre le type de plante, la nature de la matière organique et de l'exsudat racinaire qui sont des sources de carbone pour la population microbienne rhizosphérique est également impliquée dans la répartition de la microflore tellurique (Graystone et *al.*, 1998). D'une manière générale, le nombre d'Actinomycètes et de *Pseudomonas* fluorescents isolés à partir des trois sols rhizosphériques est largement élevé pour effectuer des tests de lutte biologique contre l'attaque des *Fusarium*. Dans ce sens, 24 isolats d'Actinomycète et 15 isolats de *Pseudomonas* fluorescent parmi les 87 isolats d'Actinomycète et 65 isolats de *Pseudomonas* fluorescent isolées, inhibent d'une manière significative le développement mycélien de *Fusarium Fo-02*. Plusieurs études ont avancé que

les Actinomycètes et les *Pseudomonas* fluorescents sont capables de synthétiser des antibiotiques pour inhiber le développement des autres microorganismes (Haas et Keel, 2003 ; Thomashow et Weller, 1988 ; Antoun et *al.*, 1980 ; Howel et Stipatovic, 1979). Il a été également démontré que la production de certains antibiotiques est contrôlée par les conditions nutritionnelles des microorganismes ; tel est le cas de viscosianmide, une substance produite par le *Pseudomonas* fluorescent isolé de la racine de betterave à sucre, et qui est très active contre le développement de certains champignons phytopathogènes (Nielsen et *al.*, 1998). Cette production pourrait être également influencée par certains facteurs physiques (Allaire, 2005). Dans notre cas, les résultats n'ont pas élucidés les mécanismes par lesquels ces isolats ont inhibé le développement du champignon phytopathogène. Par contre, il a été clairement démontré par nos résultats que la cohabitation entre les isolats inhibiteurs et le champignon phytopathogène ne sera pas possible et que cette situation pourrait être exploitée pour des futures luttes contre ces agents phytopathogènes.

Avec nos deux isolats les plus actifs (Actinomycète *Ac66* et *Pseudomonas Ps16*), il a été clairement démontré que l'enrobage préalable des graines par ces isolats constitue un moyen efficace pour lutter contre le *Fusarium Fo-02*. En effet, le taux de mortalité des plantes a été fortement élevé lorsque les graines ne sont pas préalablement enrobées par les isolats de *Pseudomonas* ou d'Actinomycète. Ce qui suggère que le traitement préalable des graines et/ou du sol de culture constitue une étape importante dans la lutte contre les *Fusarium* phytopathogènes. Confirmés à partir des tests *in vivo*, ces résultats méritent d'être exploités en élargissant les études sur d'autres facteurs du milieu. En effet, certains auteurs ont illustré que l'inhibition de l'action des *Fusarium in vivo* se manifeste par la production des antibiotiques par les antagonistes (Haas et Keel, 2003 ; Thomashow et Weller, 1988 ; Antoun et *al.*, 1980 ; Howel et Stipatovic, 1979) ou par la compétition vis-à-vis des éléments nutritifs (Ongena et *al.*, 2002b). *In vivo*, il a été également démontré la présence des *Fusarium* non pathogènes qui pourraient occuper les sites d'infection des *Fusarium* pathogènes empêchant ainsi leur pathogénicité (Weller et *al.*, 2002). Certains auteurs ont avancé que le développement en masse des Actinomycètes et des *Pseudomonas* fluorescents autour des graines constitue un barrage mécanique pour le *Fusarium* (Reyes et *al.*, 2004 ; Piano et *al.*, 1997). Dans notre cas, les tests de pathogénicité *in vivo* sont menés sur sol stérilisé, et les antagonistes se sont développés bien avant l'installation du *Fusarium*. Ce qui confirme l'importance du traitement préalable des graines pour le cas de nos deux isolats les plus actifs.

Au niveau du développement des plantes traitées ou non avec nos deux isolats les plus actifs, les résultats ont montré que le traitement n'a présenté aucun impact négatif. Ce qui nous permettrait de classer ces deux isolats parmi les bactéries rhizosphériques stimulatrices du développement des plantes (Plant Growth Promoting Rhizobacteria ou PGPR) selon la définition de ce groupe de bactérie formulée par Haas et Defago en 2005.

Bref, nos résultats ont démontré l'efficacité d'une technique de lutte contre les *Fusarium* phytopathogènes en valorisant des microorganismes rhizosphériques des plantes maraîchères. Parmi les microorganismes rhizosphériques susceptibles d'être exploités, les Actinomycètes et les *Pseudomonas* fluorescents sont particulièrement proposés par nos résultats.

**Conclusion  
et  
perspectives**





Pour conclure, notre travail qui porte essentiellement sur la recherche des Actinomycètes et des *Pseudomonas* fluorescents rhizosphériques, antagonistes aux champignons phytopathogènes nous a permis de :

- maîtriser les techniques usuelles en microbiologie ;
- nous familiariser avec les méthodes d'identification morphologique des champignons microscopiques ;
- disposer d'une collection d'isolats de *Pseudomonas* fluorescent et d'Actinomycète antagonistes aux champignons phytopathogènes du genre *Fusarium* ainsi que des isolats de champignon phytopathogène ;
- mettre en évidence une partie de l'efficacité de la pathogénicité de *Fusarium*.

Ainsi, par ce travail, 7 isolats de champignon phytopathogènes sont isolés à partir de tubercule de pomme de terre, de gousse d'haricot et de fruit de tomate.

Parmi les 152 isolats d'Actinomycète et de *Pseudomonas* fluorescent obtenus à partir des sols rhizosphériques de tomate, de haricot et de concombre, 39 sont antagonistes du *Fusarium Fo-02* isolé d'un fruit de tomate malade dont 15 *Pseudomonas* fluorescents et 24 actinomycètes. Parmi ces antagonistes, un isolat d'Actinomycète codé *Ac66*, isolé à partir du sol rhizosphérique de haricot et un isolat de *Pseudomonas* fluorescent codé *Ps16*, isolé à partir du sol rhizosphérique de tomate ont montré un antagonisme plus élevé, que ce soit *in vitro* qu'*in situ*. *Fo-02* a montré un pouvoir pathogène élevé lorsqu'il se développe avant l'inoculation avec l'actinomycète ou le *Pseudomonas* fluorescent antagoniste. De même, son pouvoir pathogène augmente lorsqu'il est inoculé au niveau du système racinaire plutôt qu'au niveau du collet de la plante.

Malgré ces résultats promoteurs, cette étude est loin d'être finie et dans l'avenir nous envisagerons d'élargir notre travail de recherche sur :

- l'identification moléculaire en incluant des souches de référence, des isolats fongiques phytopathogènes et des isolats d'Actinomycète et de *Pseudomonas* fluorescent antagonistes à ces champignons ;
- l'étude du mécanisme de la virulence de champignons phytopathogènes ;
- l'étude du mécanisme de l'antagonisme de l'Actinomycète et du *Pseudomonas* fluorescent vis-à-vis des champignons phytopathogènes ;
- l'isolement d'autres groupes de microorganismes antagonistes aux champignons phytopathogènes.

# References bibliograp hiques



**Agrios G.N., (2005).** Plant Pathology. 5th ed. Elsevier Academic Press, USA UK.

**Alabouvette C., Backhouse D., Steinberg C., Donovan N.J., Edel-Hermann V. and Burgess L.W. (2004).** Managing Soil Quality: *Challenges in Modern Agriculture*, **364**: 5-14.

**Allaire Mathieu. (2005).** Diversité fonctionnelle des *Pseudomonas* producteurs d'antibiotiques dans les rhizosphères de conifères en pépinières et en milieu naturel. Maître ès Sciences (M. Sc.) en Microbiologie Agricole. Université Laval ; 80p

**Amzelloug A. (1999)** Des espoirs pour anéantir le bayoud. *Ecologie. LE MATIN*

**Anahosur K.H. (1992).** *Sorghum* diseases in India: knowledge and research needs. *Sorghum* and millets diseases: a second world review, Patancheru, India, international Crops Research Institute for the Semi-Arid Tropics, 45-56.

**Andrianandrasana D.M (2009).** Effets mycorhizosphériques d'*Acacia mangium*: Impacts sur la structure et l'activité de la population microbienne du sol et sur le développement d'une essence ligneuse autochtone, *Intsia bijuga*. (DEA de biochimie). Université d'Antananarivo ; 60p.

**Antoun H., Bordeleau L.M., Prevost D. and Lachance R.A. (1980).** Absence of a correlation between nitrate reductase and symbiotic nitrogen fixation efficiency in *Rhizobium meliloti*. *Canadian Journal of Plant Science*, **60**: 209-212

**Armstrong G.M. and Armstrong J.K. (1981).** Formae speciales and races of *Fusarium oxysporum* causing wilt disease. In *Fusarium: Disease, Biology, and Taxonomy*, P.E. Nelson, T.A. Toussoun, and R.J. Cook, eds (University Park, PA: Pennsylvania State University Press), pp. 391–399.

**Bais H.P., Loyola-Vargas V., Flores H., Vivanco J. (2001).** Root-specific metabolism the biology and biochemistry of underground organs. *In Vitro Plant*, **37**:30-41.

**Bais H.P., Park S.W., Weir T.L., Callaway R.M., Vivanco J.M. (2004a).** How plants communicate using the underground information superhighway. *Trends Plant Sci*, **9**: 26-32.

**Bais H.P., Weir T.L., Perry L.G., Gilroy S., Vivanco J.M (2006).** The role of root exudates in rhizosphere interactions with plants and other organisms. *Annu Rev Plant Biol*, **57**: 233-266.

**Benhamou N., C. Garand. and A. Goulet. (2002).** Ability of nonpathogenic *Fusarium oxysporum* strain Fo47 to induce resistance against *Pythium ultimum* infection in cucumber. *Applied Environ. Microbiol*, **68**: 4044-4060.

**Benhamou N., Chet I. (1997).** Cellular and molecular mechanisms involved in the interaction between *Trichoderma harzianum* and *Pythium ultimum*. *Appl. Environ. Microbiol*, **63**: 2095–2099.

**Benhamou N., Chet I. (1996).** Parasitism of sclerotia of *Sclerotium rolfsii* by *Trichoderma harzianum*: ultrastructural and cytochemical aspects of the interaction. *Phytopathology* **86** : 405–416.

**Berggren I., van Vuurde J.W.L. and Martensson A.M. (2001).** Factors influencing the effect of deleterious *Pseudomonas putida* rhizobacteria on initial infection of pea roots by *Rhizobium leguminosarum* pv. *viceae*. *Appl. Soil Ecol.* **17(2)**:97-106.

**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.

**Bernett, H.L., 1958.** Imperfect Fungi. 217p

**Bertin C., Yang X., Weston L. (2003).** The role of root exudates and allelochemicals in the rhizosphere. *Plant Soil*, **256**:67-83.

**Besnard O. & Davet P. (1993).** Mise en évidence de souches de *Trichoderma* spp à la fois antagonistes de *Pythium ultimum* et stimulatrice de la croissance des plantes. *Agronomie*, **13**: 413-421.

**Bloemberg, G.V. and Lugtenberg, B.J.J. (2001).** Molecular basis of plant growth promotion and biocontrol by rhizobacteria. *Curr. Opin. Plant Biol.* **4(4)**:343-350.

**Bonmatin J.M., Laprevote O. and Peypoux F. (2003).** Diversity among microbial cyclic lipopeptides: iturins and surfactins. Activity-structure relationships to design new bioactive agents. *Comb. Chem. High Throughput Screen*, **6**(6):541-556.

**Bouزيد N. (2002).** Fungal disease development and means of control Main fungal diseases of food legumes in Tunisia. *Collection M, Sciences de l'ingénieur*, 22-30

**BOWERS J.H. & PARKE J.L., (1993).** Epidemiology of *Pythium* damping-off and *Aphanomyces* roots rot of peas after seed treatment with bacterial agents for biological control. *Phytopathology*, **83**: 1466-1473.

**BRAHIM S. (1998)** Isolement à partir de la rhizosphère des conifères de bactéries et d'actinomycètes antagonistes aux champignons phytopathogènes. (maître ès science). Université Laval. 45p

**Cahagnier B. and Richard-Molard D. (1998),** Analyse mycologique in Moisissures des aliments peu hydratés, Ed. Tec & Doc, p 140-158

**Campbell C.A., B.G. McConkey., R.P. Zentner., F. Selles. and D. Curtin. (1996).** Long-term effects of tillage and crop rotations on soil organic matter and total N in a clay soil in southwestern Saskatchewan. *Can. J. Soil Sci*, **76**: 395-401.

**Chaillou S. (2008).** Développement racinaire, fonctionnement de la rhizosphère et nutrition minérale. p 61

**Champion R. (1997).** Identifier les champignons transmis par les semences. INRA, Paris, 398 p.

**CHET I. (1990).** Biological control of soil-borne plant pathogens with fungal antagonists in combination with soil treatments. *In Biological Control of Soil-borne Plant Pathogens*, eds. D. Hornby, pp.15-25. CAB International, Oxon, England.

**Collins D.P. and Jacobsen B.J. (2003).** Optimizing a *Bacillus subtilis* isolate for biological control of sugar beet *Cercospora* leaf spot. *Biol. Control*, **26**(2):153-161.

**Conseil canadien du canola. (2005).** Profil de la culture du canola au Canada. Programme de réduction des risques liés aux pesticides Centre pour la lutte antiparasitaire Agriculture et Agroalimentaire Canada. 50p

**Crawford D.L., Lynch J.M. and Ousley M.A. (1993).** Isolation and characterisation of actinomycetes antagonists of a fungal root pathogen. *Appl. Environ. Microbiol*, **59**(11), 3899-3905

**Curl E.A et B. Truelove. (1986).** The rhizosphere. Advanced Series in Agriculture Sciences, 15. Springer-Verlag Berlin Heidelberg. 288 pages.

**Davet P., Ravise A., Baroudy. C. (1980).** La microflore fongique des racines du Haricot au Liban. *Ann. Phytopathol*, **12** (3), 235-252.

**Dommergues Y. et Emangenut. (1970).** Écologie Microbienne du sol. Eds. Masson et C<sup>ie</sup>, Paris, 796 pages.

**Dorrance A.E., Berry S.A., Bowen P.& Lipps P.E. (2004).** Characterization of *Pythium* spp. from three Ohio fields for pathogenicity on corn and soybean and metalaxyl sensitivity. Plant Health Progress. Online: <http://www.plantmanagementnetwork.org/pub/php/research/2004/pythium/>

**Duffy B.K., and Défago G. (1999).** Environmental factors modulating antibiotic and sidérophore biosynthesis by *Pseudomonas fluorescens* biocontrol strains. *Appl. Environ. Microbiol*, **65**(6):2429-2438.

**Dulaney E.L., Larsen H.A. and Stapley E.O. (1955).** A note on the isolation of microorganisms from natural sources. *Mycol*, **47**, 420.

**Farrar J., Hawes M., Jones D., Lindow S. (2003).** How roots control the flux of carbon to the rhizosphere. *Ecology*, **84** (4), 827-837.

**Ferrari J.M., et Pichenot M. (1974).** *Ceratocytis fimbriata* E et *H f platani* W., responsable d'une grave maladie du platane en France, la tâche chancreuse. *C.R.Acad.Sci.*, Paris **278**, 2787-2789

**Forbes G.A., & Davet P. (1990).** Characterization and pathogenicity on seedlings of *Pythium* species isolated from soybean roots in the Toulouse area. *Agronomie*, **10**: 825-830

**Founoune H., R. Duponnois. (2002).** Interactions between ectomycorrhizal symbiosis and fluorescent *Pseudomonads* on *Acacia holosericea*: isolation of mycorrhiza helper bacteria (MHB) from a Soudano-Sahelian soil. *FEMS Microbiology Ecology*, **41**: 37-46.

**Fravel D. R. (2005).** Commercialization and implementation of biocontrol. *Annu. Rev. Phytopathol.* **43**:337-359.

**Fravel D.R., Rhodes D.J. and Larkin R.P. (1999).** Production and commercialization of biocontrol products. In *Integrated Pest and Disease Management in Greenhouse Crops*, edited by R. Albajes, M. L. Gullino, J. C. van Lenteren and Y. e. Elad: Dordrecht: Kluwer.

**Gagne S. 1984.** Bactéries telluriques et rhizosphériques inhibitrices de certains champignons phytopathogènes : perspective de lutte biologique chez la luzerne. Mémoire de Maîtrise. Université laval, 62 pages.

**Gleba D., Borisjuk N., Borisjuk L., Kneer R., Poulev A., Skarzhinskaya M. (1999).** Use of plant roots for phytoremediation and molecular farming: Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America **25**: 5973-5977.

**Grayston S J., Vaughan D., Jones D. (1996)** Rhizosphere carbon flow in trees, in comparison with annual plants: the importance of root exudation and its impact on microbial activity and nutrient availability. *Appl Soil Ecol*, **5**: 29-56.

**Graystone S.S., Wang C.D., Campbell and A.C. Edwards. (1998).** Selective influence of plant species on microbial diversity in the rhizosphere. *Soil Biol. Biochem*, **30**: 369-378

**Grover J.P. (2004).** Predation, competition, and nutrient recycling: a stoichiometric approach with multiple nutrients. *J. Theor. Biol*, **229**(1):31-43.

**Gupta, S.S. (2003).** Chemotactic response of plant-growth-promoting bacteria towards roots of vesicular-arbuscular mycorrhizal tomato plants. *FEMS Microbiol. Ecol.* **45**(3):219-227.

**Haas D. and Defago G. (2005).** Biological control of soil-borne pathogens by fluorescent *Pseudomonads*. *Nat. Rev. Microbiol*, **3**(4):307-319.

## *Références bibliographiques*

- Haas D., and Keel C. (2003).** Regulation of antibiotic production in root-colonizing *Pseudomonas* spp. and relevance for biological control of plant disease. *Annu. Rev. Phytopathol*, **41**:117-153.
- Hatsch D. (2004).** Interaction hôte/pathogène : étude du modèle *Humulus lupulus/Fusarium graminearum*. Identification, génomique et transcriptomique du pathogène. [Thèse de doctorat]. 'Université Louis Pasteur Strasbourg I ; 190p.
- Hayakawa M., & Nonomura H. (1989).** A new method for the intensive isolation of Actinomycetes from soil. *Actinomycetol*, **3**: 95–104.
- Hibar K., Mejda D.R et El Mahjoub M. (2007).** Effets de certains fongicides de synthèse et biologiques sur la croissance mycélienne et l'agressivité de *Fusarium oxysporum* f. sp. *radicis-lycopersici*. *J. Tropicultura*, **25(3)** :146-152
- Hickman C. J., et HO H. H. (1966)** Behaviour of zoospores in plant pathogenic phycomycetes. *Ann. Rev. Phytopathology*, **4**: 195 – 220
- Hilali L., Khattabi A., Nssarlah N., Malki A. and Finance C. (2002).** Isolement des nouvelles souches d'actinomycètes productrices de substances antifongiques à partir du milieu naturel marocain. *Biol. Biotech*. **1(2)**, 49-53.
- Hinsinger P. (1998).** How do plant roots acquire mineral nutrients? Chemical processes involved in the rhizosphere. *Advances in Agronomy* **24** : 225-265.
- Hjeljord L.G., Stensvand A. and Tronsmo A. (2000).** Effect of temperature and nutrient stress on the capacity of commercial *Trichoderma* products to control *Botrytis cinerea* and *Mucor piriformis* in greenhouse strawberries. *Biol. Control*, **19(2)**:149-160.
- Hmouni.A., Hajlaoui M.R., Mlaiki A. (1996).** Résistance de *Botrytis cinerea* aux benzimidazoles et aux dicarboximides dans les cultures abritées de tomate en Tunisie. *OEPP/EPPO Bull*. **26**, p. 697–705.
- Hodgson D.A. (1992).** Differentiation in actinomycetes. In: *Prokaryotic Structure and Function*.

- Höfte H and Chrispeels M.J. (1992).** Protein sorting to the vacuolar membrane. *Plant Cell*, **4**, 995–1004.
- Howell C. R. and R. D. Stipanovic. (1979).** Control of *Rhizoctonia solani* in cotton seedlings with *Pseudomonas fluorescens* and with an antibiotic produced by the bacterium. *Phytopathology*, **69**:480-482.
- Howell C.R. (2002).** Cotton seedling preemergence damping-off incited by *Rhizopus oryzae* and *Pythium* spp. and its biological control with *Trichoderma* spp. *Phytopathology*. **92**:177-180.
- Hwang S.F. (1988).** Effects of VA Mycorrhizae and metalaxyl on growth of alfalfa seedlings in soils from fields with “Alfalfa Sickness” in Alberta. *Plant disease*, **72**: 448-452.
- Hwang S.F., Chakravarty P. & Prevost D. (1993)** Effects of *Rhizobia*, Metalaxyl and VA Mycorrhizal fungi on growth nitrogen fixation and development of *Pythium* root rot of sainfoin. *Plant Disease*, **77**: 1093 – 1098.
- Isik K., Chun J., Hah Y.C. and Goodfellow M. (1999).** *Nocardia Salmocida*: a fish pathogen. *Inter. J. Syst. Bacteriol*, **49**, 833-837.
- Ji P., Campbell H.L., Kloepper J.W., Jones J.B., Suslow T.V. and Wilson M. (2006).** Integrated biological control of bacterial speck and spot of tomato under field conditions using foliar biological control agents and plant growth-promoting rhizobacteria. *Biol. Control*, **36**(3):358-367.
- Joffin JN., Leyral G. (2001)** Microbiologie technique 1, dictionnaire des techniques. 3e edition, *Biologie technique* 58 p
- 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*, **231**(2):267-275.
- Jung Y.L., Byung K.H. (2002).** Diversity of antifungal actinomycetes in various vegetative soils of Korea. *Can. J. Microbiol*, **48**: 407-417.

**King E.O., Ward M.K. and Raney D.E. (1954).** Two simple media for the demonstration of pyocyanin and fluorescin. *J Lab Clin Med*, **44**:301–307.

**Kloepper J.W. (1993).** Plant growth-promoting rhizobacteria as biological control agents. *In: soil microbial ecology* (P. Blaine Metting, Ed.), Marc Dekker, New York, pp. 255-274

**Labeda D.P. & Shearer M.C. (1990).** Isolation of actinomycetes for biotechnological applications. In *Isolation of Biotechnological Organisms from Nature* (Labeda, D. P., ed.), New York: McGraw Hill Publishing Company. Pp. 1–19.

**Lander Kin G.B, Smith J.R.G, and Lochhead A.G. 1950.** A study of antibiotic activity of Actinomycetes from soil of Northern Canada. *Canadian Journal of Research*, **28**: 690-698.

**Larkin R.P. and Fravel D.R. (2002).** Effects of varying environmental conditions on biological control of *Fusarium* wilt of tomato by nonpathogenic *Fusarium* spp. *Phytopathology*, **92**(11):1160–1166.

**Larpent J.P. et Sanglier J.J. (1989).** Biotechnologie des antibiotiques. Ed. Masson. Paris, 481.

**Lechevalier H.A. and Lechevalier M.P. (1967).** Biology of actinomycetes. *Ann. Rev. Microbiol.* **21**: 71-100.

**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*, **37**(3):329-337.

**Leelasuphakul W., Sivanunsakul P. and Phongpaichit, S. 2006.** Purification, characterization and synergistic activity of [beta]-1,3-glucanase and antibiotic extract from an antagonistic *Bacillus subtilis* NSRS 89-24 against rice blast and sheath blight. *Enzyme Microb. Technol.*, **38**(7):990-997.

**Lin T.P., Chen C.L., Fu H.C., Wu C.Y., Lin G.H., Huang S.H., Chang L.K. and Liu S.T. (2005).** Functional analysis of fengycin synthetase FenD. *Biochim. Biophys. Acta (BBA) - Gene Structure and Expression*, **1730**(2):159-164.

**Link H.F. (1809).** Observations in ordines plantarum naturalis, Dissetatio I. Mag. Ges. Naturf. Freunde, Berlin, **3** : 3-42.

**Lou B.G., Harvey P.R., Warren R.O., Zhang B.X. & Ryder M.H. (2000).** Biological control of damping-off caused by ridomil-resistant *Pythium*. Proceedings of 5<sup>th</sup> International Workshop on Plant Growth-Promoting Rhizobacteria. Auburn University, Cordora, Argentina.

**Lourenco J.V., Maffia L.A., Romeiro R.d.S. and Mizubuti E.S.G. (2006).** Biocontrol of tomato late blight with the combination of epiphytic antagonists and rhizobacteria. *Biol. Control*, **38**(3):331-340.

**Mayfield C.I., Williams S.T., Ruddick S.M., Hatfield H.L. (1972).** Studies on the ecology of actinomycetes in soil. IV Observation on the form and growth of *Streptomyces* in soil. *Soil Biol Biochem*, **4**:79-91.

**McGowan S.J., Barnard A.M.L., Bosgelmez G., Sebahia M., Simpson N.J.L., Thomson N.R., Todd D.E., Welch M., Whitehead N.A. and Salmond G.P.C. (2005).** Carbapenem antibiotic biosynthesis in *Erwinia carotovora* is regulated by physiological and genetic factors modulating the quorum sensing-dependent control pathway. *Mol. Microbiol*, **55**(2):526-545.

**Mendoza Garcia R.A., Martijn ten Hoopen G., Kass D.C.J., SanchezGarita V.A. and Krauss U. (2003).** Evaluation of mycoparasites as biocontrol agents of *Rosellinia* root rot in cocoa. *Biol. Control*. **27**(2):210-227.

**Mercado-Blanco J. & Bakker P.A.H.M. (2007).** Interactions between plants and beneficial *Pseudomonas* spp.: exploiting bacterial traits for crop protection. *Antonie Van Leeuwenhoek*, **92**: 367-389.

**Meziane H., van der Sluis I., van Loon L.C., Höfte M. and Bakker P.A.H.M. (2005).** Determinants of *Pseudomonas putida* WCS358 involved in inducing systemic resistance in plants. *Mol. Plant Pathol*, **6**(2):177-185.

**Milaso C.R et Bart M. (2003).** Risques, production agricole et pauvreté à Madagascar. Conférence "agriculture et pauvreté". *Programme ILO*. 10p

**Minuto A., Spadaro D., Garibaldi A. and Gullino, M.L. (2006).** Control of soilborne pathogens of tomato using a commercial formulation of *Streptomyces griseoviridis* and solarization. *Crop Protect*, **25**(5):468-475.

**Nguyen C. (2003).** Rhizodeposition of organic C by plants: mechanisms and controls. *Agronomie*, **23**: 375-396.

**Nielsen M.N., Sorensen J., Fels J. and Pedersen H.C. (1998).** Secondary metabolite and endochitinase dependent antagonism toward plant-pathogenic microfungi of *Pseudomonas fluorescens* isolates from sugar beet rhizosphere. *Applied and Environmental Microbiology*, **64**(10): 3563-3566

**Ongena M., Daayf F., Jacques P., Thonart P., Benhamou N., Paulitz T.C. and Bélanger R.R. (2000).** Systemic induction of phytoalexins in cucumber in response to treatments with fluorescent *Pseudomonads*. *Plant Pathol*, **49**(4):523-530.

**Ongena M., Jacques P., Delfosse P. and Thonart P. (2002b).** Unusual traits of the pyoverdine-mediated iron acquisition system in *Pseudomonas putida* strain BTP1. *Biometals*, **15**(1):1-13.

**Ongena M., Jacques P., Toure Y., Destain J., Jabrane A. and Thonart P. (2005b).** Involvement of fengycin-type lipopeptides in the multifaceted biocontrol potential of *Bacillus subtilis*. *Appl. Microbiol. Biotechnol*, **69**(1):29-38.

**Ouhdouch Y., Barakate M. and Finance C. (2001).** Actinomycetes of maroccan habitats: isolation and screening for antifungal activities. *Eur. J. Biol*, **37**, 69-74.

**Ozbay N. et S.E. Newman. (2004).** The effect of the *Trichoderma harzianum* strains on the growth of tomato seedling. *Acta Hort*, **635** : 131-135.

**Paulitz T.C. and Bélanger R.R. (2001).** Biological control in greenhouse systems. *Annu. Rev. Phytopathol*, **39**:103-133.

**Peypoux F., Bonmatin J.M. and Wallach J. (1999).** Recent trends in the biochemistry of surfactin. *Appl. Environ Microbiol*, **51**(5):553-563.

**Piano S., Neyrotti V., Migheli Q. and Gullino M.L. (1997).** Biocontrol capability of *Metschnikowia pulcherrima* against *Botrytis* postharvest rot of apple. *Postharvest Biol. Technol*, **11**(3):131-140.

**Porter J.N., Wilhem J.J. and Tresner H.D. (1960).** Method for the preferential isolation of actinomycetes from soil. *Appl. Microbiol*, **8**,174.

**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.

**Raaijmakers J.M., Vlami M. and de Souza J.T. (2002).** Antibiotic production by bacterial biocontrol agents. *Antonie van Leeuwenhoek*, **81**(1-4):537-547.

**Rahajaharitompo R.L. (2004).** Gestion de la fertilité et de la fertilisation phosphatée des sols ferrallitiques des hautes terres de Madagascar. [Thèse de doctorat de Biologie et Ecologie végétales]. Université d'Antananarivo ; 198p.

**Rahman M.S., Ano T. and Shoda M. (2007).** Biofilm fermentation of *iturin A* by a recombinant strain of *Bacillus subtilis* 168. *J. Biotechnol*, **127**(3):503-507

**Rakotoarimanga N (2010).** La symbiose mycorhizienne dans la domestication de *Uapaca bojeri* (Euphorbiaceae), plante ligneuse endémique de Madagascar. [Thèse de doctorat de Biochimie]. Université d'Antananarivo ; 138p.

**Ramanankierana H. (2005).** La symbiose mycorhizienne dans la domestication de *Uapaca bojeri* (Euphorbiaceae), plante ligneuse endémique de Madagascar. [Thèse de doctorat de Biochimie]. Université d'Antananarivo ; 138p.

**Raynal G. (1980).** Evaluation en conditions artificielles de la résistance des plantules de Luzerne aux *Pythium*. Possibilités de lutte chimique. *Annals of Phytopathology*, **12** (2):119-130.

**Reid T.C., M.K. Hausbeck and K. Kizilkaya. (2002).** Use of fungicides and biological controls in the suppression of *Fusarium* crown and root rot of asparagus under greenhouse and growth chamber conditions. *Plant Dis*, **86**: 493-498.

- Rengel Z. 1997.** Root exudation and microflora populations in rhizosphere of crop genotypes differing in tolerance to micronutrient deficiency. *Plant Soil*, **196**:255-260.
- Rey P., Benhamou N. and Tirilly Y. (1998)** Ultrastructural and cytochemical investigation of asymptomatic infection by *Pythium* spp. *Phytopathology*, **88**: 234-244.
- Reyes M.E.Q., Rohrbach K.G. and Paull R.E. (2004).** Microbial antagonists control postharvest black rot of pineapple fruit. *Postharvest Biol. Technol.*, **33**(2):193-203.
- Riba G. & Silvy C. (1989).** Combattre les ravageurs des cultures - Enjeux et perspectives. *INRA Editions*, 230 p.
- Rioux S., Denis., Anne V., Barbara. (2011).** Fongicides chez les céréales : résultats d'essais menés au Québec en 2009 et 2010. Journée INPACQ Grandes cultures et conservation des sols, Ottawa Canada.
- Roger, L. 1951.** Phytopathologie des pays chauds. Tome 1. Eds. Paul LECHEVALIER, Paris, 1245 pages
- Sanchez J., Olivares J.S. and Gallego E. (2001).** Occurrence and pathogenicity of *Pythium* spp. in the dust deposited on the greenhouse roofs in the poniente region of Almeria (south-east Spain). *Journal of Plant Pathology*, **83** (1): 13-19.
- Saravanakumar D., Vijayakumar C., Kumar N. and Samiyappan R. (2007).** PGPR-induced defense responses in the tea plant against blister blight disease. *Crop Protect.*, **26**(4):556-565.
- Shishkoff N. and McGrath M.T. (2002).** AQ10 biofungicide combined with chemical fungicides or AddQ spray adjuvant for control of cucurbit powdery mildew in detached leaf culture. *Plant Dis.*, **86**:915-918.
- Tawil M., Pichenot M. et Ambrosio M. (1982).** Son derdruck aus *European Journal of Forest Pathology*. Bd. 12, Helt 2, 5 79-86.
- Thakore Y. (2006).** The biopesticide market for global agricultural use. *Industrial Biotechnology*, **2**(3):294-208.

## *Références bibliographiques*

**Thomashow L.S. and Weller D.M. (1988)** Role of a phénazine antibiotic from *Pseudomonas fluorescens* in biological control of *Gaeumannomyces graminis var. tritici*, *J. Bacteriol*, **170**:3499-3508.

**Thrower L. B. (1966)** Terminology for plant parasites. *Phytopathology*, **2** (56): 258-259.

**Touré Y., Ongena M., Jacques P., Guiro A. and Thonart P. (2004).** Role of lipopeptides produced by *Bacillus subtilis* GA1 in the reduction of grey mould disease caused by *Botrytis cinerea* on apple. *J. Appl. Microbiol*, **96**(5):1151-1160.

**Uren N. (2000).** Types, amounts and possible functions of compounds released into the rhizosphere by soil grown plants. In *The Rhizosphere: Biochemistry and Organic Substances at the Soil Interface*, ed. R Pinton, Z Varanini, P Nannipieri. New York: Marcel Dekker: pp 19-40.

**Valdebenito M., Crumbliss A.L., Winkelmann G. and Hantke K. (2006).** Environmental factors influence the production of enterobactin, salmochelin, aerobactin and yersiniabactin in *Escherichia coli* strain Nissle 1917. *Int. J. Med. Microbiol*, **296**(8):513-520.

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

**Verpoorte R. (2000).** Plant secondary metabolism. In Verpoorte R, Alfermann A W (Eds.), *Metabolic Engineering of Plant Secondary Metabolism. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, The Netherlands*, pp 1-29.

**Vigouroux A. (1985).** Lutter pour la vie des platanes. Ministère de l'Urbanisme et du Logement - Institut National de la Recherche Agronomique, p. 1-10

**Waksman S.A. (1961).** The Actinomycetes: their nature, occurrence, activities, and importance. *Chronic. Botan. Company, Waltham, MA, USA*.

**Walker T.S., Bais H.P., Grotewold E., Vivanco J.M. (2003)** Root exudation and rhizosphere biology. *Plant Physiol*, **132**: 44-51.

## *Références bibliographiques*

**Wang Y., Zhang Z.S., Ruan J.S., Wang Y.M. & Ali S.M. 1999.** Investigation of actinomycete diversity in the tropical rainforests of Singapore. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* **23**: 178-187.

**Webster J.M. (1969).** The host: parasite relationships of plant-parasitic nemathodes. *Advan. Parasitology*, **7**: 1-40.

**Weller D. M., Raaijmakers J. M., McSpadden Gardener B. B., and Thomashow L. S. (2002).** Microbial populations responsible for specific soil suppressiveness to plant pathogens. *Annu. Rev. Phytopathol*, **40**:309-348.

**Weller D.M. (1988).** Biological control of soilborne plant pathogens in rhizosphere with bacteria. *Annual review of phytopathology*, **26**: 379

**Whipps J.M. (2001).** Microbial interactions and biocontrol in the rhizosphere. *J. Exp. Bot.* **52**:487-511.

**Williams S.T. and Davies F.L. (1965).** Use of antibiotics for selective isolation and enumeration of actinomycetes in soil. *J. Gen. Microbiol*, **38**: 251-261.

**Williams S.T. and Wellington E.M.H. (1982).** Principles and problems of selective isolation of microbes. In: *Bioactive microbial products: Search and discovery*. Academic Press, London. 9-26.

**Zhang B.Q. & Yang X.B. (2000).** Pathogenicity of *Pythium* populations from corn-soybean rotation fields. *Plant Dis*, **84**: 94-99.

# Annexes



**Annexe1**

**Milieux de culture**

**PCA** (Potato carrot agar)

Pomme de terre :	20g
Carotte :	20g
Agar :	15g
Eau distillée qsp :	1000 ml
pH :	5,5 ± 0,2

Autoclaver à 120°C pendant 20 minutes.

**Milieu King B**

Polypeptone :	20g
Glycerol :	10g
Phosphate bipotassique anhydre :	1,5g
Sulfate de magnésium7H <sub>2</sub> O :	1,5g
Agar :	15g
Eau distillée qsp :	1000ml
pH :	7,2 ± 0,2

**Milieu King B liquide**

La même composition que le milieu King B, mais sans d'agar.

**Milieu Waksman**

Glucose :	20g
Casitone :	5g
NaCl :	5g
Beef extract :	3g
Agar :	20g
Eau distillée qsp :	1000ml
pH :	7 ± 0,2

**Milieu Waksman liquide**

La même composition que le milieu Waksman, mais sans d'agar.

**Milieu SNA** (synthetic nutrient poor agar)

KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> :	1g
KNO <sub>3</sub> :	1g
MgSO <sub>4</sub> 7H <sub>2</sub> O :	0.5g
KCl :	0,5g
Glucose :	0,2g
Sucrose :	0,2g
Agar :	20g
Eau distillée qsp :	1000 ml
pH :	5,5 ± 0,2

Ajouter dans les boîtes de Pétri, comme source supplémentaire de carbone, des morceaux de papier-filtre passés à l'autoclave.

**Milieu PDA** (Potato Dextrose Agar)

Pomme de terre :	200g
Glucose:	20g
Agar:	15g
Eau distillée:	1000ml
pH :	5,6 ± 0,2

## Annexe2

## Solutions et colorant

**Solution nutritive*****Solution n°1***

Ca(NO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> , 4H <sub>2</sub> O :	129,8 g
NH <sub>4</sub> NO <sub>3</sub> :	16 g
KNO <sub>3</sub> :	87 g
MgSO <sub>4</sub> , 7H <sub>2</sub> O:	49,2 g
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> :	34 g
HNO <sub>3</sub> :	22 g
H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> :	10,4 g
Eau distillée qsp :	1000ml

***Solution n°2***

Fe-EDTA (13%):	6,45 g
MnSO <sub>4</sub> , H <sub>2</sub> O:	1,69 g
ZnSO <sub>4</sub> , 7H <sub>2</sub> O:	1,15 g
Borax:	1,9 g
NaMoO <sub>4</sub> , H <sub>2</sub> O:	0,12 g
CuSO <sub>4</sub> , 5H <sub>2</sub> O:	0,18 g
Eau distillée qsp :	1000ml

La solution nutritive pour les plants de tomates est obtenue en mélangeant 100 ml de la solution n°1 à 20 ml de la solution n°2 dans 20 litres d'eau distillée.

**Bleu coton**

Bleu de méthyle	0,1 g
Eau distillée qsp	20 ml
Acide lactique	20 g
Glycérol	40 g
Phénol	20 g