

الجمهورية الجزائرية الديمقراطية الشعبية

République Algérienne Démocratique et Populaire

وزارة التعليم العالي والبحث العلمي

Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique



Centre Universitaire Abdelhafid Boussouf-Mila

Institut des Sciences et de la Technologie

Département des Sciences de la Nature et de la Vie

Mémoire préparé en vue de l'obtention du Diplôme de

Master

Domaine : Sciences de la Nature et de la Vie

Filière : Biotechnologie

Spécialité : Biotechnologie végétale

Thème :

Etude d'antagoniste *in vitro* et *in vivo* de *Pseudomonas spp* fluorescents vis-à-vis des deux agents phytopathogènes de la tomate (*Fusarium oxysporum lycopersici* et *Botrytis cinerea*)

Présenté par :

- **HERATI Naima.**
- **SEGHIR Sara.**

Devant le jury:

Président : Mr. **MERZOUG Seyf Eddine**

Examinatrice : Mme. **BOUASSABA Karima**

Promotrice : Mme **Zaidi Sara**

MCB- Centre Universitaire-Mila

MAA- Centre Universitaire-Mila

MAA- Centre Universitaire-Mila

Année Universitaire:

2018 / 2019

REMERCIEMENT

On tient d'abord à remercier et en premier lieu Dieu, le tout puissant et miséricordieux qui nous a donné la force, la volonté le courage pour mener à bonne fin ce travail.

En préambule à ce mémoire, nous voudrions exprimer nos sincères remerciements et nos gratitude à toute personne qui nous ont apporté l'aide et l'assistance nécessaire à l'élaboration de ce travail et qui nous ont contribuées de près ou de loin à l'accomplissement de ce travail.

Nous avons eu la chance et le plaisir d'effectuer ce travail de recherche à la faculté des sciences de la nature et de la vie à la centre universitaire de Mila.

Nous tenons à remercier les membres du jury qui ont bien voulu accepter de valoriser ce travail. Le président du jury MERZOUG Seyf Eddine de nous avoir fait l'honneur de présider le jury de ce mémoire.

Nous tenons à remercier les autres membres de jury BENMAKHLOUF Zoubida et qui nous avons fait l'honneur d'accepter d'être les examinateurs dz notre travail et pour le temps qu'ils ont consacré à l'examen de ce mémoire.

*Notre remerciements s'adressent en particulier à madame **ZAIDI Sara** professeur à l'encadreur notre mémoire de master, pour la confiance qu'elle nous avons accordé en proposant ce mémoire, et pour les précieux conseils qui a bien voulu nous fournir afin de réaliser ce travail, qu'est toujours montré à l'écoute et très disponible tout au long de la réalisation de ce mémoire, ainsi pour l'inspiration, l'aide et le temps qu'elle a bien voulu nous consacrer et sans qui ce mémoire n'aurait jamais vu le jour.*



Dedicace



Je dédie ce mémoire aux êtres les chers au monde

A mes chers parents:

A mon père « **Abdelhamid** » pour tout ce qu'il m'a enseigné, pour la valeur du travail bien fait que j'ai tenté de concrétiser dans ce mémoire.

A ma mère « **Naima** » pour m'avoir encouragé et écouté à d'innombrables reprises.

A ma sœur « **Zineb** », et mon frère « **Zineddine** ».

A mes cousine « **Khadidja, Radia, Soumia, Leouiza** »

A mes amies « **Nada, Warda, Bouthayna, Bousayna, Sanaa** »

A mon binôme « **Naima** »

Sarra



Dedicace



Je dédie ce mémoire aux êtres les chers au monde

A mes chers parents:

A mon père « **Mohamed** » pour tout ce qu'il m'a enseigné, pour la valeur du travail bien fait que j'ai tenté de concrétiser dans ce mémoire.

A ma mère « **Zahia** » pour m'avoir encouragé et écouté à d'innombrables reprises.

A mes sœurs « **Ilhem et Sihem** », et mes frères « **Oussama et Adnan** ».

A mon binôme, « **Sarra** »

A tous mes amies et mes camarades et je voudrais mentionner mes chers « **Nada , Hiba , Nassima, Fatima, Manal, Rim, Ayda, Meriem, Amel, Zineb** »

Naima

Liste des figures

Figure	Titre	Page
01	Plantes de tomate à maturité	3
02	Cycle de vie de la tomate	6
03	Flétrissement et jaunissement des feuilles	10
04	Dessèchement et mort des feuilles	10
05	Pourriture du collet	11
06	Nécrose racinaire	12
07	Cycle général de la maladie flétrissement vasculaire causée par <i>F.oxysporum .f.sp. Lycopersici</i> . Chez la tomate	16
08	Observation sous microscope de conidiospores de <i>Botrytis cinerea</i> portant à leurs extrémités des conidies	17
09	Symptômes de maladie de pourriture grise causée par <i>Botrytis cinerea</i> . sur différentes plantes et des organes	20
10	Cycle biologique de <i>B. cinerea</i>	21
11	Interaction <i>Pseudomonas</i> -pathogènes	24
12	Représentation schématique décrivant les interactions plantes-microorganismes dans la rhizosphère	25
13	Aspect macroscopique (A) <i>Fusarium oxysporum f.sp. lycopersici</i> (B) <i>Botrytis cinerea</i> .	26
14	Protocole d'identification de <i>Pseudomonas spp.fluorescents</i> .	28
15	Méthode de confrontation directe en boîte de pétri entre les souches bactériennes et l'agent phytopathogène.	29
16	Protocole expérimental	30
17	La suspension bactérienne	33
18	Inoculum fongiques (A) <i>Fus.lyc.oxy</i>	34
19	Schéma du dispositif, effet <i>Pseudomonas spp fluorescents</i> sur les deux maladies.	35
20	Résultat de l'identification des <i>Pseudomonas spp. fluorescents</i> par GALERIE API 20E	37
21	Aspect macroscopique (A) et microscopique (B) de <i>Pseudomonas spp. fluorescents</i> (G×40).	38
22	Antagonisme in vitro entre <i>Pseudomonas fluorescent</i> et de	39

	<i>Fus.oxyl.</i>	
23	Effet de l'antagoniste <i>Pseudomonas spp.fluorescents</i> sur le développement de l'agent pathogène <i>Fus.oxyl.</i> comparativement au témoin dans trois milieux.	40
24	Antagonisme in vitro entre <i>Pseudomonas fluorescent</i> et de <i>Bot.</i>	41
25	Effet de l'antagoniste <i>Pseudomonas spp.fluorescente</i> sur le développement de l'agent pathogène <i>Bot.</i> comparativement au témoin dans trois milieux.	42
26	Degrés symptomatologique de deux maladies de tomate.	43
27	Incidence et réduction de deux maladies (%) en pots en comparaison entre les plantes inoculées avec <i>Fus.oxyl.</i> et <i>Bot.</i> avec les plantes traitées par <i>Pseudomonas spp. Fluorescents</i> .	44

Liste des tableaux

Tableau	Titre	Page
01	Caractéristiques des deux variétés de tomate utilisées	31
02	Résultat de l'identification des <i>Pseudomonas spp. fluorescents</i>	37
03	Taux d'inhibition (%) de <i>Pseudomonas fluorescents</i> .sur la croissance mycélienne du <i>Fus.oxy.lyc.</i>	39
04	Taux d'inhibition de <i>Pseudomonas fluorescents</i> .sur la croissance mycélienne du <i>Bot.</i>	41

Liste des abréviations :

% : Pourcentage

°C : Degrés Celsius

Bot : *Botrytis cinerea*

Cm : centimètre

DAPG : 2,4 diacetylphoroglucinol

FAO STAT: Food and Agriculture Organization Corporate Statistical Database.

FOL: *Fus.oxyl.*

GN : gélose nutritive

IM : L'incidence de la maladie

INRAA : Institut National de la Recherche Agronomique Algérie

J : jour

N° : numéro

PDA : Potatoes Dextrose Agar

PGPR : Plant Growth Promoting Rhizobacteria

pH : Potentiel d'hydrique

RM : Réduction de L'incidence de la maladie

Sp : espèce

IRS: Induction de la résistance systémique

SOMMAIRE

Sommaire

Remerciements

Dédicaces

Liste des figures

Liste des tableaux

Liste des abréviations

Introduction

Partie 1 : Etude bibliographique

Chapitre I : Généralité de La Tomate

I. Origine et description de la tomate	2
II. Donnée génétique	3
III. Taxonomie.....	3
IV. Les variétés de tomate	4
IV.1. Variétés fixées	4
IV.2. Variétés hybrides	4
V. Cycle biologique de la tomate	4
V.1. Germination	5
V.2. Croissance.....	5
V.3. Floraison	5
V.4. Pollinisation	5
V.5. Fructification et nouaison des fleurs	6
V.6. Maturation du fruit.....	6
VI. Exigences culturelles.....	7
VI.1. Température.....	7
VI.2. Humidité.....	7
VI.3. Lumière	7

VI.4. Sol.....	7
VI.5. PH.....	7
VI.6. Eau.....	8
VI.7. Eléments fertilisants	8
VII. Culture de la tomate et modes de production.....	8
VII.1. Culture de plein champ	8
VII.2 Culture sous abris.....	8

Chapitre II : Les Agents Phytopathogènes

I. <i>Fusarium oxysporum</i> agent du flétrissement vasculaire	9
I.1. Pathologie.....	9
I.1.1 Flétrissure fusarienne (<i>Fusarium wilt</i>).....	9
I.2. Pourriture racinaire (<i>Fusarium crown et Root</i>).....	11
I.3. Généralité sur le genre de <i>Fusarium oxysporum</i>	13
I.3.1. Races de <i>Fusarium oxysporum</i> f. sp. <i>Lycopersici</i>	13
I.3.2 Position taxonomique	14
I.3.3. Position systématique	14
I.4 . Cycle biologique de <i>Fusarium</i>	14
II. <i>Botrytis cinerea</i>	16
II.1. Description de la pourriture grise	17
II.2. Taxonomie	18
II.3. Classification.....	18
II.4. Habitat.....	18
II.5. Symptômes.....	20
II.6. Cycle de développement et dissémination	20

Chapitre III : *Pseudomonas spp.fluorescents*

I. <i>Pseudomonas spp.fluorescents</i>	22
I.1.Classification de <i>Pseudomonas spp. fluorescents</i>	23
I.2. Interaction <i>Pseudomonas</i> -pathogènes	24
I.3.Interaction <i>Pseudomonas</i> -plantes.....	25

Partie 2 : Etude Expérimentale

Chapitre I : Matériel et méthodes

I. Etude in vitro de l'action antagoniste de <i>Pseudomonas spp. fluorescents</i> sur <i>Fus.oxyl. lyc.et Bot.</i>	26
I.1. Matériel biologique	26
A. Agents pathogènes	26
B. L'agent antagoniste	27
I.2. Test d'antagonisme in vitro.....	28
I.2.1. Méthode de confrontation directe en boîte de pétri	28
I.2.2.Protocole expérimental	29
I.2.3. Evaluation du taux d'inhibition	30
II. Efficacité in vivo de <i>Pseudomonas spp fluorescents</i> sur l'évolution de la maladie	31
II.1. Espèce végétal.....	31
II.2. le sol	32
II.3.Condition d'expérimentation	32
II.4. Inoculation	33
II.4.1.Inoculation bactérien	33
II.4.2.Inoculation fongique.....	33
II.5.Dispositif expérimental	34

Chapitre II : Résultats et discussions

I. Identification et purification des souches bactériennes de <i>Pseudomonas spp. fluorescents</i> .	37
.....	
I.1.Purification de <i>Pseudomonas spp. fluorescents</i>	37
I .2.Résultats de l'antagonisme in vitro	38
I.2.1. Inhibition du développement de <i>Fus.oxy.lyc.</i> par <i>Pseudomonas fluorescents</i> . ..	38
I.2.2. Inhibition du développement de <i>Bot.</i> par <i>Pseudomonas fluorescents</i>	40
I. 3. Efficacité <i>in vivo</i> de <i>pseudomonas spp.fluorescent</i> . sur l'évolution de la maladie..	42
II. Discussion.....	44

Conclusion

Référence

Annexe

Résumé

Introduction

La culture de la tomate a connu une importante évolution depuis l'indépendance. En effet, les superficies occupées par cette plante ne dépassaient pas 8370 ha en 1968 (**MARA, 1968**) alors qu'au début des années 2000 une valeur de 20789 ha est enregistrée (SNOUCI, 2010). Néanmoins, cette solanacée se trouve confrontée à plusieurs problèmes notamment d'ordre phytosanitaire.

Parmi les différents bio-agresseurs de cette plante, les champignons phytopathogènes occupent la première place. En fait, la tomate est très sensible à ces microorganismes mais des rendements acceptables peuvent être obtenus si l'on pouvait réduire les pertes dues à ces bio-agresseurs en utilisant des moyens respectueux de l'environnement et de la santé du consommateur.

Les agents antagonistes peuvent constituer l'un des outils de lutte contre les maladies cryptogamiques de la tomate. En réalité, des formulations à base de souches de *pseudomonas spp. fluorescent* ont longtemps été appliquées en lutte biologique contre les maladies des plantes (**RANASINGH et al., 2006**).

De nombreux travaux ont mentionné l'activité inhibitrice de *pseudomonas spp. fluorescent* contre, *Fusarium oxysporum. sp. Lycopersici* (HIBAR et al., 2005), *Botrytis cinerea* (**HAMITOU et DEHIMAT, 2012**).

Le présent travail consiste donc à étudier *in vitro* par potentialité de souche de *pseudomonas spp. fluorescent* d'inhiber la croissance mycélienne de *Botrytis cinerea*. Et *Fusarium oxysporum f. sp. Lycopersici* qui s'attaquent à tomate et d'évaluer l'effet *pseudomonas spp. fluorescent in vivo* sur taux d'infection de la maladie, l'incidence de la maladie et réduction de l'incidence de la maladie.

Cette étude est composée de deux parties essentielles, La première partie consacrée à la description de données bibliographiques relatives aux plante hôte « tomate haine 1350 », les agents pathogènes *Fusarium oxysporum. sp. lycopersici*, *Botrytis cinerea*, et finalement à l'agent antagoniste étudié dans ce travail *pseudomonas spp. fluorescent*.

La seconde partie est consacrée au travail expérimental et est basé sur les différentes techniques utilisées et d'une autre partie exposant, comparant et discutant les résultats obtenus. Enfin, ce travail est clôturé par une conclusion générale et la mise en évidence des perspectives de recherche.

Partie I: Etude bibliographique

Chapitre I: Généralités de la tomate

I. Origine et description de la tomate

La tomate est l'élément incontournable de la gastronomie dans de nombreux pays, tout particulièrement dans ceux du bassin méditerranéen. En Algérie, cette plante est considérée comme culture stratégique car elle occupe la troisième place après la pomme de terre et les oignons secs, avec une production d'environ 975.075 tonnes en 2013 (**FAO STAT, 2016**). Due à sa grande importance économique et gastronomique, elle est l'objet de nombreuses recherches scientifiques internationales et nationales.

Actuellement, cette culture est installée dans toute les régions du pays, tout au long de l'année, et cela grâce aux différents modes de production: culture sous serre, tunnel, multi chapelle, mais également de plein champs de saison et d'arrière-saison (**Dehliz, 2015**). La tomate est une plante herbacée, originaire des régions latines côtières du Nord-ouest de l'Amérique du Sud (**Philouze, 1993**). C'est une plante du climat tempéré chaud, elle exige une hygrométrie moyenne, craint le gel et ne supporte pas les températures inférieures à 10 °C (**Naïka et al., 1989**). Sa croissance est indéterminée, à l'exception de quelques variétés.

Quant à son appareil végétatif, il est caractérisé par:

- Un système racinaire de type pivotant à tendance fasciculé;
- Une tige de consistance herbacée en début de croissance qui tend à devenir un peuligneuse en vieillissant;
- Des feuilles alternées composées imparipennées avec une longueur de 10 à 25 cm et un limbe avec un bord denté;
- Une tige et des feuilles portent des poils avec parfois une odeur caractéristique;
- Des fleurs hermaphrodites ayant une symétrie pentamère;
- Des fruits charnus et bais, de taille de quelques grammes (tomate groseille, tomate cerise) à près de deux kilogrammes selon la variété.



Figure 01: Plantes de tomate à maturité (Chaux et Foury, 1994).

II. Donnée génétique

La tomate est une espèce diploïde avec 12 paires de chromosomes $2n=2x=24$ chromosomes. La taille de son génome est composé de 77% de hétérochromatine et 23% d'euchromatine quicorrespond aux régions riches en gènes (Díezet Nuez, 2008). Cette taille est relativement faible (Arumuganathan et Earle, 1991).

III. Taxonomie

La systématique de la tomate Selon le système de classification d'Artur Cronquist (1981):

Règne	Plantae
Sous-règne	Tracheobionta (Plantes vasculaires)
Division	Magnoliophyta
Classe	Magnoliopsida (Dicotyledones)
Sous-classe	Asteridae
Ordre	Solanales
famille	Solanaceae
Genre	<i>Lycopersicum</i>
Espèce	<i>Lycopersicum esculentum</i> L.

IV. Les variétés de tomate

Selon le mode de fécondation, on distingue deux types de variétés de tomate:

IV.1. Variétés fixées

Elles se caractérisent par l'homozygotie, c'est-à-dire qu'elles conservent les caractères parentaux (**Polese, 2007**). Leurs fruits sont plus ou moins réguliers, sont sensibles aux maladies, mais donnent en général des fruits d'excellente qualité gustative. Les variétés les plus utilisées en Algérie sont la Marmande et la Saint Pierre (**Gould, 1991; Yamagushi, 1983**).

IV.2. Variétés hybrides

Sont plus nombreux, ce type de variétés permet un cumul de gènes favorables, de résistance aux maladies, une meilleure nouaison, particulièrement en conditions défavorables (**Polese, 2007**).

V. Cycle biologique de la tomate

D'après **Gallais et Bannerot (1992)**, le cycle végétatif complet de la graine à la graine de tomate varie selon les variétés, l'époque et les conditions de culture; mais il s'étend généralement en moyenne de 3,5 à 4 mois du semis, jusqu'à la dernière récolte

(7 à 8 semaines de la graine à la fleur et 7 à 9 semaines de la fleur au fruit) (**Fig 02**). Le cycle comprend six phases qui sont les suivantes:

V.1. Germination

La germination est le stade de levée qui mène la graine jusqu'à la jeune plante capable de croître normalement (**Corbineau et Core, 2006**).

La germination chez la tomate est épigée. A ce moment une température ambiante d'environ 20°C et une humidité relative de 70 à 80% sont nécessaires (**Chaux et Foury, 1994**).

V.2. Croissance

La croissance c'est l'augmentation de dimension d'un végétal. Selon **Laumonier (1979)** la croissance de plante de tomate se déroule en 2 phases et en 2 milieux différents. En pépinière: De la levée jusqu'au stade 6 feuilles, on remarque l'apparition des racines non fonctionnelles et des prés feuilles. En plein champ: Après l'apparition des feuilles à photosynthèse intense et des racines fonctionnelles, les plantes continuent leur croissance. La tige s'épaissit et augmente son nombre de feuille.

V.3. Floraison

C'est le développement des ébauches florales par transformation du méristème apical de l'état végétatif, à l'état reproducteur.

A un certain moment de la croissance de la plante qui dure environ 1mois, la tomate entre en parallèle avec la mise à fleur. Ces fleurs étaient auparavant des boutons floraux. La floraison dépend de la photopériode, de la température et des besoins en éléments nutritifs de la plante, car celle-ci ne peut fleurir que si elle reçoit la lumière pendant une durée qui lui est propre, en plus d'un apport équilibré sous serre.

V.4. Pollinisation

La pollinisation nécessite l'intervention des agents extérieurs, le vent ou certains insectes comme le bourdon qui est capable de faire vibrer les anthères et de libérer le pollen (**Chaux et Foury, 1994**).

La libération et la fixation du pollen reste sous la dépendance des facteurs climatiques. Si la température nocturne est inférieure à 13°C, la plupart des grains de

pollen seraient vides, et une faible humidité dessèche les stigmates et de cela résulte la difficulté du dépôt du pollen (**Pesson et Louveaux, 1984**).

V.5. Fructification et nouaison des fleurs

La nouaison est l'ensemble de gamétogenèse, pollinisation, croissance du tube pollinique, la fécondation des ovules et le développement des fruits « fructification ».

La température de nouaison est de 13°C à 15°C. Les nuits chaudes à 22°C sont défavorables à la nouaison. Le zéro de germination est de 12°C, l'optimum de la croissance des racines est de 15°C à 18°C. En phase grossissement du fruit, l'optimum de la température ambiante est de 25°C le jour et 15°C la nuit (**Rey et Costes, 1965**).

V.6. Maturation du fruit

La maturation du fruit se caractérise par grossissement du fruit, changement de couleur, du vert ou rouge.

La lumière intense permet la synthèse active de matière organique qui est transporté rapidement vers les fruits en croissance, pour cela il faut une température de 18°C la nuit et 27°C le jour (**Rey et Costes, 1965**).

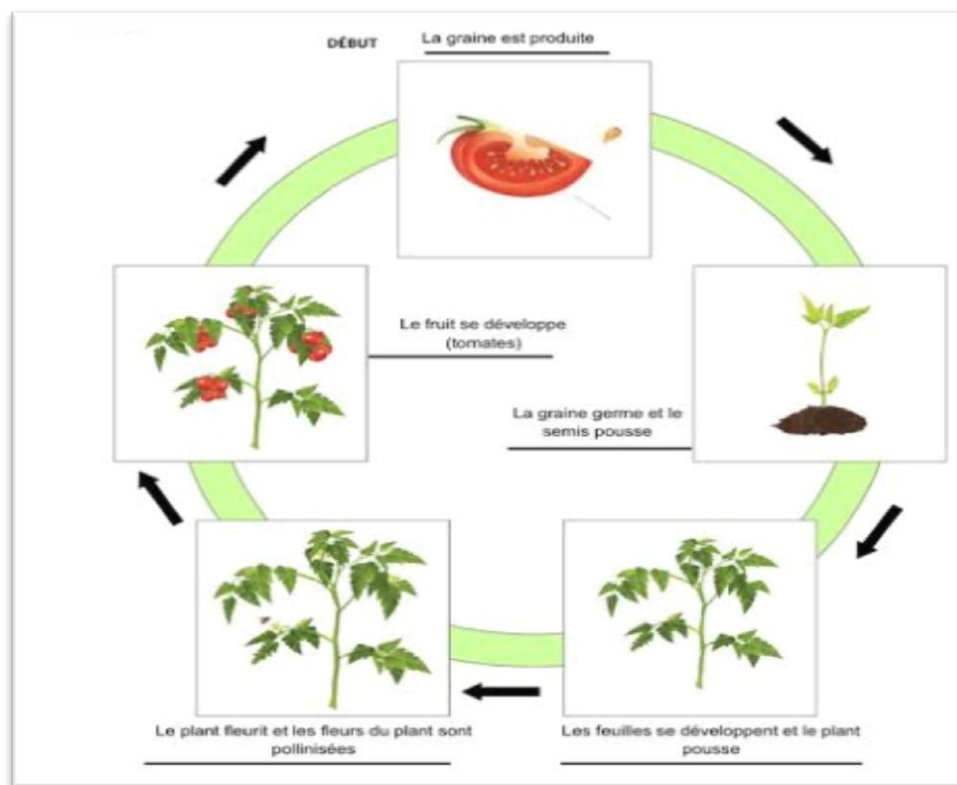


Figure 02: Cycle de vie de la tomate (**Rey et Costes, 1965**).

VI. Exigences culturelles

VI.1. Température

La tomate est une plante des saisons chaudes, elle est exigeante en chaleur. Les températures optimales pour sa croissance sont entre 20 à 25°C. Lorsque les températures nocturnes sont inférieures à 15°C, les fécondations s'arrêtent. En dessous de 10°C et au-dessus de 38°C, les tissus végétaux sont endommagés (**Chaux et Foury, 1994; Naika et al., 2005**).

VI.2. Humidité

Elle joue un rôle important pour la bonne végétation de la tomate, l'humidité optimale de l'air est de 50 à 60% (**Naika et al., 2005**). Un taux d'humidité élevé peut causer des problèmes, parce qu'il favorise l'établissement de nombreux champignons et bactéries pathogènes. Alors qu'un taux d'humidité faible constitue une source de stress pour la plante (**Baptista et al., 2012**).

VI.3. Lumière

La tomate aime les situations bien ensoleillées, mais elle ne présente pas des exigences photopériodiques très marquées. Pendant les quatre à six semaines qui suivent le semi, les fortes intensités lumineuses encouragent le raccourcissement de l'axe et l'induction de premier bouquet, surtout à des températures basses. Pendant la floraison, une forte intensité favorise les 9 pollinisations et régularise la croissance du style. Par contre, l'intensité directe a un effet nocif sur la qualité du fruit (**Chaux et Foury, 1994**).

VI.4. Sol

La tomate préfère des sols riches en matière organiques, pousse bien sur la plupart des sols minéraux qui ont une bonne capacité de rétention de l'eau, une bonne aération et qui sont libres de sels. Elle préfère les terres limoneuses profondes et bien drainées.

VI.5. pH

La tomate tolère modérément un large intervalle de valeurs du PH (niveau d'acidité), mais pousse le mieux dans des sols où la valeur du PH varie entre 5,5 et 6,8 et où l'approvisionnement stimule une bonne croissance (**Shankara, 2005**).

VI.6. Eau

La tomate est très exigeante en eau. Le stress hydrique à n'importe quel stade de croissance réduit le rendement et la qualité du fruit. Une alimentation irrégulière en eau entraîne une irrégularité dans l'alimentation en calcium et par conséquent l'apparition des nécroses apicales (**Chaux et Foury, 1994**).

VI.7. Eléments fertilisants

Les besoins de la tomate en fumure diffèrent selon la nature de sol, le climat et la technique d'irrigation. En général la tomate réagit bien avec les engrais organiques combinés aux engrais minéraux. Trop d'engrais azotés retarde la maturité des fruits. De plus, il favorise le développement de plusieurs agents pathogènes fongiques (**Naika et al., 2005**).

VII. Culture de la tomate et modes de production

Les deux principaux systèmes de culture sont:

VII.1. Culture de plein champ

Ce système de culture est le plus répandu. Si l'irrigation est disponible, les plantations peuvent être faites en saison sèche. Le mécanisme est souvent réduit à la préparation du sol (**Cirad et Gret, 2002**).

VII.2 Culture sous abris

Ce système de culture vise à produire les tomates tous au long de l'année. Il permet de développer des productions hydroponiques, supprimant ainsi certaines contraintes liées au sol (**Cirad et Gret, 2002**). La culture sous abri fournit aujourd'hui une part essentielle du marché de frais pour les légumes-fruits tels que la tomate (**Jeanne Quin et al., 2005**). En ce qui concerne le mode de production, nous avons :

- ❖ la culture sous serre Tunnel (primeur)
- ❖ la culture sous serre multi chapelle (primeur)
- ❖ la culture de plein champ (saison)
- ❖ la culture de plein champ (arrière-saison).

Chapitre II:

Les agents phytopathogènes

I. *Fusarium oxysporum* agent du flétrissement vasculaire

I.1. Pathologie

Le Fusariose, maladie causée par un champignon d'origine tellurique *Fusarium oxysporum f.sp.lycopersici*, est responsable de diverses maladies, la principale étant le flétrissement vasculaire caractérisée par un flétrissement des plantes dû à l'envahissement des vaisseaux du xylème par le pathogène (**Prandini et al.,2009**). Les champignons du genre *Fusarium* sont capables de produire des métabolites secondaires toxiques, les mycotoxines, dont la présence augmente l'incidence de la maladie sur les productions agricoles (**Xu et Nicholson, 2009**).

La tomate est sujette à deux maladies fusariennes:

- **Flétrissure fusarienne classique (*Fusarium wilt.*)** causée par *Fusarium oxysporum f.sp .lycopersici*. snyder et hansen.
- **Pourriture des racines et du collet (*Fusarium crown and root rot*)** causée par *Fusarium oxysporum f.sp.radicis-lycopersici* (**katan et al., 1997**).

I.1.1 Flétrissure fusarienne (*Fusarium will*)

La flétrissure fusarienne est une maladie dévastatrice pour la culture de tomate partout dans le monde, elle est causée par *Fusarium oxysporum f.sp .lycopersici*. (**Walker, 1971**).

Ce champignon terricole qui pénétré dans la plante par les racines envahit les tissus ligneux et provoque le jaunissement, la flétrissure puis la mort de la plante (**Blancard,1997**) (**fig 03**).

Néanmoins, dans la mesure où il existe aujourd'hui de nombreuses variétés résistantes au *Fusarium oxysporum f.sp.lycopersici*. Ce pathogène ne représente plus un grand danger pour la culture de la tomate .



Figure 03: Flétrissement et jaunissement des feuilles (Agrios,2005).

A. Symptômes externes

La maladie évolue très rapidement. Les parties des limbes touchés flétrissent comme par manque d'eau. C'est le flétrissement rapide.

Les feuilles asséchées gardent leur chlorophylle et apparaissent avec un aspect gris verdâtre (Laterrot *et al.*, 1978). Il s'ensuit un jaunissement puis une nécrose d'une partie ou de la totalité du limbe avec des éclaircissements au niveau des nervures (fig 04).

L'atteinte des feuilles se fait progressivement de bas en haut ce qui fait que les feuilles se trouvant à la base de la plante sont déjà mortes (Messiaen, 1981; Gindrat, 1975) (fig 04).



Figure 04: Des sèchement et mort des feuilles (Agrios, 2005).

Au niveau de la tige de la plante atteinte, apparait une dépression longitudinale qui part de la colle puis remonte unilatéralement. Les tissus au niveau de la dépression sont de couleur brune (**Bouhot, 1972**).

D'autres symptômes peuvent parfois apparaître à savoir: L'inclinaison et la courbure progressive vers le sol des pétioles et des limbes (épinasite), le ralentissement de la croissance et la formation de bourrelets adventives sur la tige (**Laterrot et al., 1978**).

B. Symptômes internes

Une coupe longitudinale au niveau de la tige des plantes atteintes, partie ligneuse et adjacente au cortex vert, une coloration brune sombre des tissus conducteurs. Des coupes transversales laissent apparaître également des tissus bruns foncés contenant souvent des fragments mycéliens.

I.2. Pourriture racinaire (*Fusarium crown et Root*)

La pourriture des racines et du collet une maladie causée par *Fusarium oxysporum f.sp lycopersici* (**fig 05**) (**Javis et Shoemaker, 1978**). Cette maladie a été découverte pour la première fois au Japon en 1969 (**Menzies et Jarvis, 1994**) et s'est propagée à travers le monde à partir de 1970 (**Yamamoto et al., 1974**). Elle a été signalée dans plusieurs pays du bassin méditerranéen où elle est plus ou moins dommageable (**Blancard, 1997**).

Cette maladie terricole causée par *Fusarium oxysporum f.sp lycopersici* s'attaque aux plantules et entraîne leur mort (**Henni, 1998**). Elle peut s'exprimer surtout à maturité lorsque les plantes sont chargées de fruits (**Blancard, 1997**).



Figure 05: Pourriture du collet (**Agrios, 2005**).

A. Symptômes externes

Contrairement aux maladies vasculaires notamment, des flétrissements plus ou moins importants apparaissent sur les folioles du sommet de la tige, dans cette zone, la tige est fortement amincie. En fonction des plantes, ces flétrissements peuvent être dans un premier temps réversible durant la nuit, et leur incidence peut varier en fonctions des conditions climatiques.

Les flétrissements peuvent être soudains, peuvent évoluer très rapidement vers la nécrose et le dessèchement des folioles et des feuilles, et peuvent aussi conduire à la mort des plantes (**fig 06**). Certains auteurs signalent aussi l'apparition de jaunissements foliaires situés à la périphérie du limbe des vieilles feuilles. Ceux-ci sont suivis de la nécrose des pétioles et de la chute des feuilles. Certaines plantes affectées précocement voient leur croissance réduite.

Quelle que soit la gravité des flétrissements. Les symptômes primaires sont à rechercher sur les racines et le collet des plantes. Sur les racines apparaissent de nombreuses lésions brun rougeâtre, humides, évoluant rapidement en pourriture (**Fig 06**). Plus le diamètre des racines est faible, plus celles-ci pourrissent et se décomposent rapidement.



Figure 06: Nécrose racinaire (Blancard, 1997).

B. Symptômes internes

Il convient à noter que le système vasculaire présente aussi quelques symptômes, bien que nous n'ayons pas à faire à une maladie uniquement vasculaire. D'une manière générale, le cylindre central des grosses racines révèle de brunissement assez marqués. Il en est de même pour les tissus vasculaires du pivot et ceux situés de part et d'autre de ces derniers. Le brunissement peut s'étendre jusqu'à la tige sur plusieurs dizaines de centimètre au-dessus du collet. Les racines adventives se développent parfois sur la tige pour faire face à l'attaque du champignon (**Blancard, 1997**).

I.3. Généralité sur le genre de *Fusarium oxysporum*.

Le genre *Fusarium* est bien connu pour son rôle important en phytopathologie, ce dernier regroupe un grand nombre d'espèces (**Messiaen et Cassini, 1968**). Les espèces de *Fusarium oxysporum* se caractérisent par une large gamme de plantes hôtes et la plupart des souches pathogènes de *F.oxysporum* envahissent le système vasculaire de ces plantes et présentent une spécificité parasitaire, c'est-à-dire que l'espèce ne peut attaquer qu'un hôte déterminé (**Ozenda, 1990**).

I.3.1. Races de *Fusarium oxysporum* f. sp. *Lycopersici*.

Trois races de *Fusarium oxysporum* f. sp. *Lycopersici*. ont été rapportées, elles se distinguent entre elle par leur degré de virulence vis-à-vis des cultivars de tomate contenant un seul gène de résistance (**Stall, 1961**)

Race 1: la plus cosmopolite a été initialement décrite en 1886 (**Booth, 1971**).

Race 2: a été d'abord découverte en 1945 à Ohio (**Alexander et Tucker, 1945**).

Race 3: a été observée en Australie en 1978 (**Grattidge et O'Brien, 1982**) et a été successivement rapportée aux Etats Unis: en Californie (**Davis et al., 1988**), Floride (**Volin et Jones, 1982**), Géorgie (**Chellimi et al., 1992**), Arkansas et Nord Carolina (**Marlatt et al., 1996**) et au Tennessee (**Bost, 2001**). Elle a également été retrouvée au Mexique (**Valenzuela-Ureta et al., 1996**). Actuellement, peu de cultivars résistants à la race 3 sont commercialisés (**Jones et al., 1991**).

I.3.2 Position taxonomique

Les nombreuses controverses dans les études taxonomiques du genre *Fusarium*. ont peu concerné l'espèce *F.oxysporum*. En effet, (Snyder et Hansen, 1940) ont montré que les différences morphologique décrits par (Wollenweber et Reinking, 1935) pour distinguer plusieurs espèce dans la section élégants n'étaient que des variations culturelles d'une même espèce, appelée *F.oxysporum*. la plupart des système taxonomiques proposés ultérieurement ont maintenu *F.oxysporum* comme espèce unique dans la section élégants. La seule controverse qui subsiste concerne la position taxonomique de *F. redolens*, considérée comme une espèce (Wollenweber et Reinking, 1935; Gerlach et Nirenberg, 1982) ou comme une variété de *F.oxysporum*. (Booth, 1971; Nirenberg, 1982). Cependant, des données Récentes tendent à définir *F.redolens* comme une espèce à part entière (Waalwijk et al., 1996; Baayen et al., 1999).

I.3.3. Position systématique

Le système Saccardo de classification des champignons imparfaits «fungi imperfecti» (Henni, 1998) classe *Fusarium* comme suit :

Embranchement	thallophyte
Classe	Deutéromycète
Famille	Tuberculariacée
Genre	<i>Fusarium</i>
Espèce	<i>Fusarium oxysporum</i>

I.4 . Cycle biologique de *Fusarium*

Le *Fusarium* responsable d'importants dégâts durant tout le cycle vital de la plante hôte est transmis essentiellement par les semences récoltées de plantes infectées, mais peut aussi provenir du sol. Le *Fusarium* est un parasite tellurique doué d'une vie saprophytique où il croît sur des débris de plantes ou survit en forme de chlamydospores, il est capable de survivre pendant plusieurs années dans les conditions les plus défavorables (Haware et al., 1978; Beckman, 1987). Les *F. oxysporum* peuvent même coloniser des zones profondes du sol; c'est le cas de la forme spéciale *ciceris* (Haware et al., 1986). Selon

(Blancard,1988), le *F. oxysporum* f. sp. *Lycopersici* persiste dans le sol jusqu'à une profondeur de 80 centimètres et peut recoloniser le sol à partir des couches inférieures.

L'infection des plantes se fait au moyen des chlamydospores qui restent dormantes jusqu'à la stimulation de leur germination par des substrats organiques ou des exsudats racinaires. Suite à la germination, il y a formation d'un mycélium. Si les conditions sont favorables, le thalle produit des conidies (Beckman et Roberts, 1995; Agrios, 2005).

En présence d'une plante hôte, le mycélium envahit tout d'abord les racines suite à la pénétration de l'épiderme dans la zone d'élongation ou par des blessures (Agrios, 1988; Beckman et Roberts, 1995). Le tube germinatif qui s'introduit à travers l'épiderme du système racinaire envahit les vaisseaux conducteurs, dans lesquels les micro conidies sont transportées de façon passive par le flux du xylème et peuvent ainsi infecter des parties aériennes.

La plante présente un stress hydrique qui provient soit des vaisseaux qui se bouchent (un blocage du transport d'eau et d'éléments nutritifs) sous l'action combinée du mycélium, des micro conidies et de substances mucilagineuses produites par la plante en réponse à l'attaque du champignon, soit de toxines produites par le champignon, comme l'acide fusarique, soit de ces causes combinées (Toyoda *et al.*, 1988; Klein et Correll, 2001).

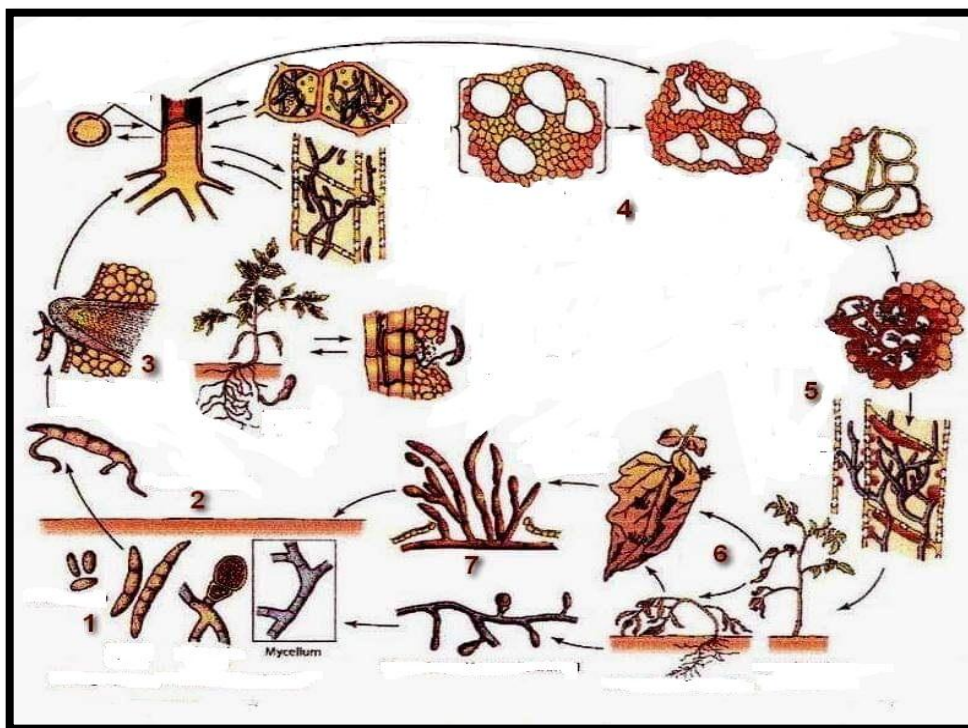


Figure 07: Cycle général de la maladie flétrissement vasculaire causée par *F.oxysporum f.sp. Lycopersici*. chez la tomate (Agrios, 2005).

- 1-Conidies, chlamydospores ou mycélium vivant dans le sol.
- 2-Germination des spores.
- 3-Pénétration du tube germinatif à l'intérieur des racines.
- 4-Invasion des vaisseaux par les conidies et /ou mycélium.
- 5-Production de gamme à l'intérieur des vaisseaux.
- 6-Flétrissement et mort de la plante.
- 7-Sporodochies ou mycélium produisant des conidies.

II. *Botrytis cinerea*

Le champignon phytopathogène utilisé pour infecter la tomate est la souche R16 de *Botrytis cinerea*, agent de la « pourriture grise ». Il possède un large spectre d'action et infecte les feuilles et les fruits de nombreuses plantes. On le conserve à l'obscurité à température ambiante sur boîte de pétri contenant un milieu gélosé à base de farine d'avoine ou sur milieu PDA Sept jours.

Après son repiquage, il est exposé pendant sept jours à une faible irradiation continue par les UV pour favoriser sa sporulation. Pour une conservation à plus long terme, les spores sont mises en suspension dans un mélange eau/glycérol (1:1, V/V) et stockées à – 80°C.

II.1. Description de la pourriture grise

Botrytis cinerea est un champignon causant des maladies sur végétaux, polyphagie et provoque des mortifications des tissus végétaux appelées nécrose affectant les organes aériens et fruits de plantes (**Blancard, 2009**). C'est un champignon à plusieurs plantes hôtes capable d'attaquer plus de 230 espèce (**Pande et al., 2001**) responsable de la pourriture grise; cette maladie se développe plus facilement dans certaines circonstances liées aux conditions climatiques, à la sensibilité de la plante elle-même et aux facteurs culturaux (**Blancard, 2009**). L'agent pathogène, *Botrytis cinerea* produit un mycélium à filaments articulés, brunâtres ou olivâtres, quelque fois cylindrique au niveau de la cloison médiane dont le diamètre varie considérablement suivant les conditions de développement des hyphes. Lorsque le mycélium est au stade fructigène, il produit des touffes de conidiospores grisâtres, ramifiés arrondis contenant des grappes de conidies (**Fig08**) qui sont libéré facilement par temps humide et sont portés par courants d'air Le champignon produit des sclérotés irréguliers qui jouent un rôle important dans la survie du champignon; ils se composent de deux parties différentes le cortex et la médulla (**Holz et al., 2004**) .

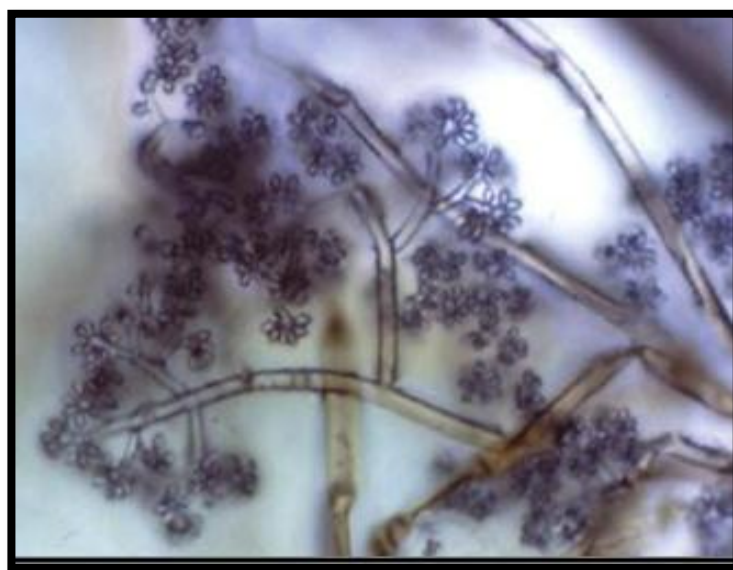


Figure 08: Observation sous microscope de conidiospores de *Botrytis cinerea* portant à leurs extrémités des conidies (**Bryon, 2011**).

II.2. Taxonomie

Botrytis cinerea connaît une double classification selon la forme sous laquelle il se reproduit :

- Forme asexuée : *Botrytis cinerea* (anamorphe), appartenant à la classe des Hyphomycète, ordre des Moniliales, famille des Moniliaceae.
- Forme sexuée : *Botryotinia fuckeliana* (téléomorphe), appartenant à la classe des Discomycète, ordre des léotiales, famille des Sclerotiniaceae. (Chardonn *et al.*, 2000; Staats *et al.*, 2005).

II.3. Classification

Selon Christiaan Hendrik Persoon (1974), *Botrytis cinerea* se classe comme suit:

Règne	Fungi
Division	Ascomycota
Classe	Leotiomycetes
Ordre	Helotiales
Famille	Sclerotiniaceae
Genre	<i>Botrytis</i>
Espèce	<i>Botrytis cinerea</i>

II.4. Habitat

Botrytis cinerea est un champignon nécrotrophe, attaquant des tissus vivants mais également capable de saprophytisme. On lui dénombre environ 270 espèces de plantes dicotylédones sauvages (notamment des Rosaceae sauvages), mais également cultivées (Solanaceae, Cucurbitaceae, Vitaceae, Rosaceae, Fabaceae principalement, pour lesquelles il cause une macération, accompagnée d'une sporulation gris-cendré sur tiges, feuilles, fleurs et/ou fruits, pouvant aller jusqu'à la perte totale de la récolte. En vigne, il représente la 3ème maladie pour son importance économique, après le mildiou *Plasmo paraviticola* et l'oïdium *Erysiphe necator*. Outre les pertes quantitatives à la récolte, *B. cinerea* perturbe la qualité de la vinification par la « casse oxydative », conduisant à une modification de la

couleur, une dégradation des arômes (goûts moisi-terreux), une diminution du degré alcoolique et une accumulation de glycérol, de glucanes et d'acide glucuronique (**Dubos, 2002**). Sous certaines conditions climatiques et de physiologie de la vigne, *B.cinerea* délaisse le faciès «gris» pour le faciès dit «noble» (pourriture noble), permettant la dessiccation progressive des baies et la concentration des arômes typiques des vins liquoreux comme le Sauternes ou le Tokaj. Des travaux récents n'ont pas montré de différenciation génétique entre les deux types de souches, confirmant ainsi le déterminisme environnemental du faciès noble (**Fournier et al., 2013**).

De manière générale, *B. cinerea* est connu au laboratoire pour sa grande diversité morphologique, allant de la couleur du mycélium, la production de spores, l'allure du mycélium aérien jusqu'à la production et l'allure de sclérotés (**Martinez et al., 2003**). Sur vigne, le champignon se conserve sous forme de mycelium haploïde dormant ou condensé et mélanisé (sclérotés) sur les bois d'hivernage.

Sous les conditions favorables du printemps, les sclérotés germent, produisent un mycelium capable de perforer la cuticule végétale grâce à ses appressoria. Ce mycélium primaire différencie des conidies (spores asexuées), responsables des premières contaminations, en particulier sur pièces florales sénescentes (contaminant également la jeune baie), et parfois sur feuilles. Ces premières sporées sont responsables des contaminations secondaires (dissémination par le vent ou la pluie, mais également par certains lépidoptères. La cinétique et la distribution de la dissémination des conidies ne sont pas connues, mais elles sont inversement proportionnelles à l'augmentation de l'humidité relative de l'air (**Dubos, 2002**). Plusieurs cycles de reproduction asexuée peuvent se dérouler dans la saison (environ une semaine dans des conditions optimales: température (15-20°C) et d'humidité supérieure à 90%) (**Dubos, 2002**). L'infection par *B. cinerea* est favorisée par les blessures des baies (grêle, morsures de guêpes, dégâts d'oiseaux) et la grappe est généralement colonisée de proche en proche après la contamination d'une seule baie (**Elmer et al., 2004**). La reproduction sexuée est supposée se produire en hiver, et résulte de la fusion entre les microconidies (spermaties) produites par le mycélium, induit par les conditions hivernales, et les gamètes femelles (ascogones) produits dans les sclérotés.

II.5. Symptômes

Botrytis cinerea est responsable de pourriture grise. Il s'attaque aux fleurs, aux pédoncules et aux fruits à toutes les étapes de leur croissance, entraînant ainsi leur pourriture et la formation d'une couche uniforme de matière soyeuse épaisse et grise qui abrite les spores (**Fig09**) (**Agrios, 2005**).

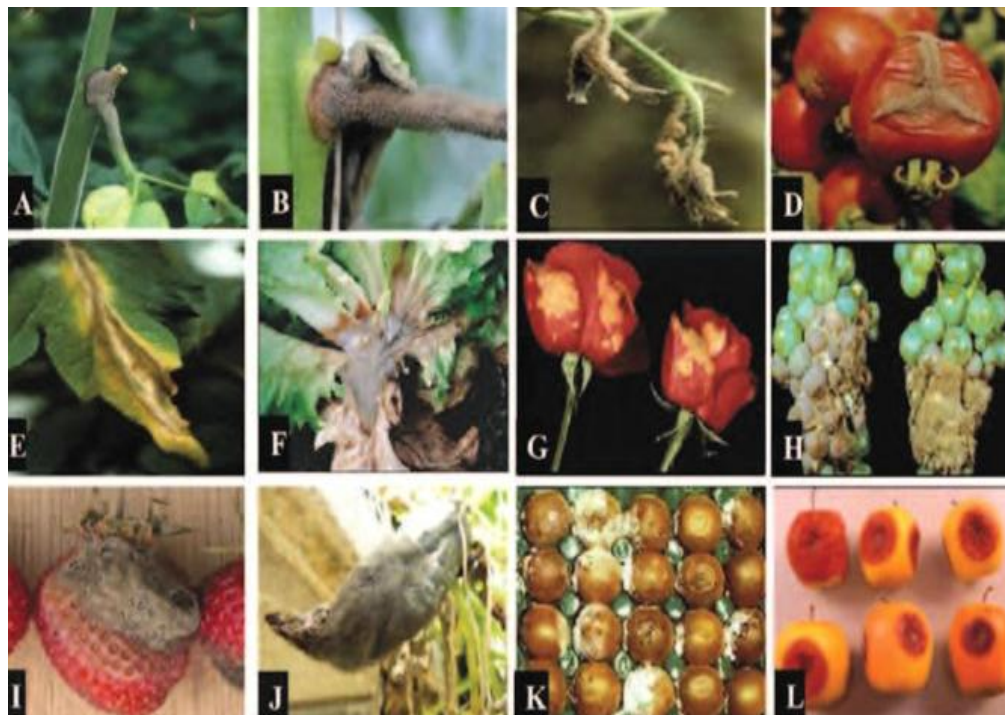


Figure 09: Symptômes de maladie de pourriture grise causée par *Botrytis cinerea*. sur différentes plantes et des organes (**Agrios, 2005**).

(A) Plaie d'ébourgeonnage sur tomate. (B) Tige de tomate. (C) Inflorescence. (D) Fruit de tomate. (E) Feuille de tomate. (F) Laitue. (G) Fleurs du rosier. (H) Grappe du raisin. (I) Fraise. (J) Poivron. (K) Kiwi. (L) Pomme.

II.6. Cycle de développement et dissémination

Au cours de son cycle biologique, *B. cinerea* (**fig 10**) peut produire du mycélium, des spores sexuées, des spores asexuées (conidies), ainsi que des sclérotés (**Agrios, 2005; Ajouz, 2009**). *B. cinerea* se reproduit majoritairement par la voie asexuée (**Nicot et Alain, 1996**). Durant l'hiver, le champignon se conserve principalement sous forme de sclérote dans les débris morts de l'hôte, la plupart du temps les feuilles tombées au sol (**Elad et al., 2007**).

Les sclérotés sont d'abord blancs, puis ils brunissent et enfin noircissent, par la suite leur surface est brillante et marquée de fines ponctuations régulières (**Ibrahim-Ghaleb, 1999**). Lorsque les conditions de température et d'humidité redeviennent favorables à la végétation, les sclérotés germent, leur croissance commence au début du printemps dans les régions tempérées (**Elad et al., 2007**), pour produire du mycélium qui va perforer la cuticule végétale grâce à ses appressoria (**Williamson et al., 2007**). Il y aura par la suite le développement de conidiophores portant des macroconidies (spores asexuées) qui serviront d'inoculum primaire (**Romanazzi et Erica, 2004**).

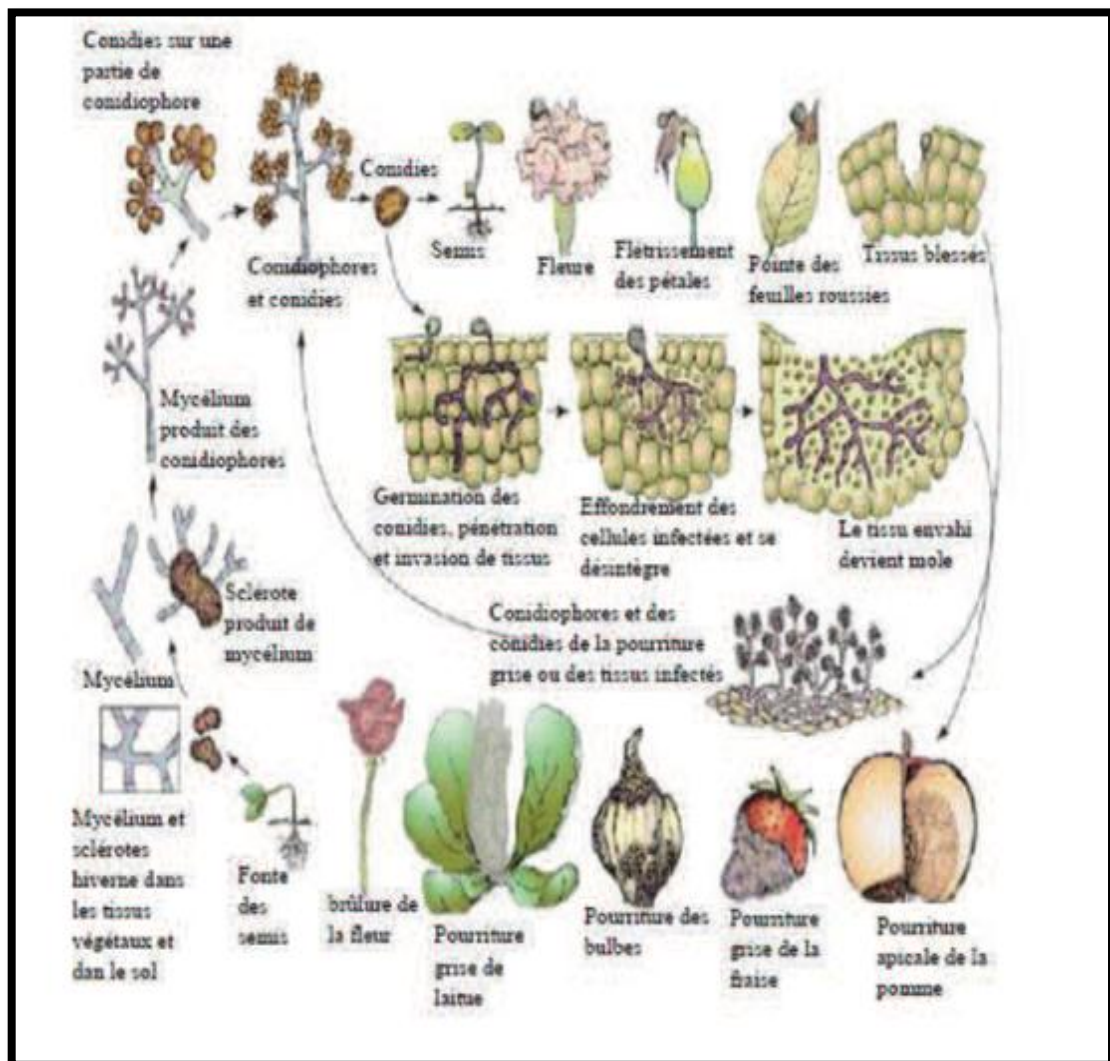


Figure 10: Cycle biologique de *B. cinerea*. (Agrios, 2005).

Chapitre III: *Pseudomonas* spp. fluorescents

I. *Pseudomonas spp. fluorescents*

Les *pseudomonas* sont parmi les bactéries les plus importantes dans la rhizosphère (**Misko et Germida, 2002**), sont des bacilles à Gram négatif de 0,5-1,3 µm de diamètre (**Eyquem et al., 2000**). Le genre *Pseudomonas* a été décrit en 1894 (**Migula, 1894**), englobe des bactéries ubiquitaires possédant une grande diversité, incluant des espèces saprophytes et parasites (**Lefrère et Rouger, 2000; Choudhary et al., 2009**). Ces bactéries se caractérisent par un métabolisme aérobie strict, certaines souches ont une respiration anaérobie avec le nitrate comme accepteur terminal d'électrons et/ou l'arginine. Les *Pseudomonas* sont mobiles grâce à un ou plusieurs flagelles polaires (**Eyquem et al., 2000; Haas et Défago, 2005**), sont rarement immobiles et sont non sporulés. La plupart des *Pseudomonas* se cultivent à 30 °C et se caractérisent par une croissance lente à 4 °C (**Eyquem et al., 2000**).

Les *Pseudomonas spp. fluorescents* ont été étudiés depuis des décennies pour leurs effets bénéfiques sur la stimulation de la croissance et la suppression efficace des maladies telluriques des plantes (**Bakker et al., 2007**). Ces rhizobactéries possèdent de nombreuses caractéristiques qui permettent leur utilisation dans la protection des cultures agricoles (**Weller, 2007**); elles montrent de multiples propriétés: l'utilisation efficace des exsudats racinaires, la colonisation et la multiplication dans la rhizosphère, la spermosphère et à l'intérieur des cellules végétales (**Weller et al., 2002**). La diversité métabolique des *Pseudomonas spp. fluorescents* confère à ces bactéries une plasticité importante pour s'adapter à de différents environnements (**Latour et Lemanceau, 1997; Misko et Germida, 2002**), ce qui implique leur utilisation comme biofertilisants, phytostimulateurs et agents de lutte biologique (**Misko et Germida, 2002**). Ces rhizobactéries fluorescentes sont devenues un modèle important pour les études écologiques de la rhizosphère et l'analyse du métabolisme secondaire bactérien (**Couillerot et al., 2009**).

I.1. Classification de *Pseudomonas spp. fluorescents*

La Classification de *Pseudomonas spp. fluorescents* est la suivante :

Embranchement	Bacteria
Classe	Schizomycetes
Sous-ordre	Pseudomonadineae
Ordre	Pseudomonadales
Famille	Pseudomonadaceae
Genre	<i>Pseudomonas</i>
Espèce	<i>Pseudomonas fluorescens</i>

Le genre *Pseudomonas* est l'un des genres bactériens les plus diversifiés, et sa taxonomie a subi de nombreux changements. Des études antérieures ont donné lieu à la division du groupe *Pseudomonas spp. fluorescents* en cinq biovars (de I à V, synonymes des biotypes A, B, C, F et G), en fonction de caractéristiques phénotypiques tels que les essais métaboliques, la composition de l'acide gras et les profils des protéines (**Palleroni, 2005**). *Pseudomonas spp. fluorescents* ATCC 13525 est le type de souche biovar I (**Palleroni, 2005**).

La taxonomie du groupe de *P. fluorescents* est continuellement à l'étude. Même si les caractéristiques phénotypiques et les biovars de I à V sont toujours valides pour identifier les souches de *P. fluorescens*, la caractérisation moléculaire est plus fiable pour démontrer les relations phylogénétiques et les variations entre les souches de *P. fluorescens* et les espèces de *Pseudomonas* étroitement apparentées.

Les *Pseudomonas* appartiennent au groupe de bactéries appelées PGRP (Plant Growth Promoting Rhizobacteria) (**Kloepper et schroth, 1978**): ce sont des bactéries capables de coloniser efficacement les systèmes racinaires et influencent de manière bénéfique la plante en stimulant sa croissance et /ou en la protégeant contre des infections par des agents phytopathogènes (**weller, 1988**).

La plupart des souches bactériennes PGPR, exploitées comme biopesticides, appartiennent aux genres *Agrobacterium*, *Bacillus* et *Pseudomonas* (Haas et Defago, 2005). Beaucoup de recherches se sont concentrées sur ces deux derniers types de bactéries parce qu'ils sont des habitants communs de la rhizosphère et possèdent une grande activité dans le contrôle biologique de maladies liées au sol. Ils ont la capacité de produire de nombreux antibiotiques, et ils sont faciles à cultiver in vitro ou à manipuler en laboratoire. De plus, les bacilles offrent un avantage par rapport aux autres bactéries en raison de leur capacité à former des endospores résistantes au changement des conditions du milieu avantage aussi pour la formulation du produit (Raaijmakers et al., 2002).

I.2. Interaction *Pseudomonas*-pathogènes

L'utilisation des antagonistes microbiens contre les parasites des plantes dans les productions agricoles a été proposée comme solution de rechange ou complémentaire aux pesticides chimiques (Fernando et al., 2005). L'antagonisme a été mis en évidence par (Kloepper et al., 1980), qui ont montré que *P. fluorescens* et exercent un effet inhibiteur vis-à-vis des champignons et des bactéries telluriques. Ces rhizobactéries ont présenté une forte colonisation des racines de plusieurs plantes et une augmentation significative de leur rendement (Kloepper et al., 1980) (fig 11).

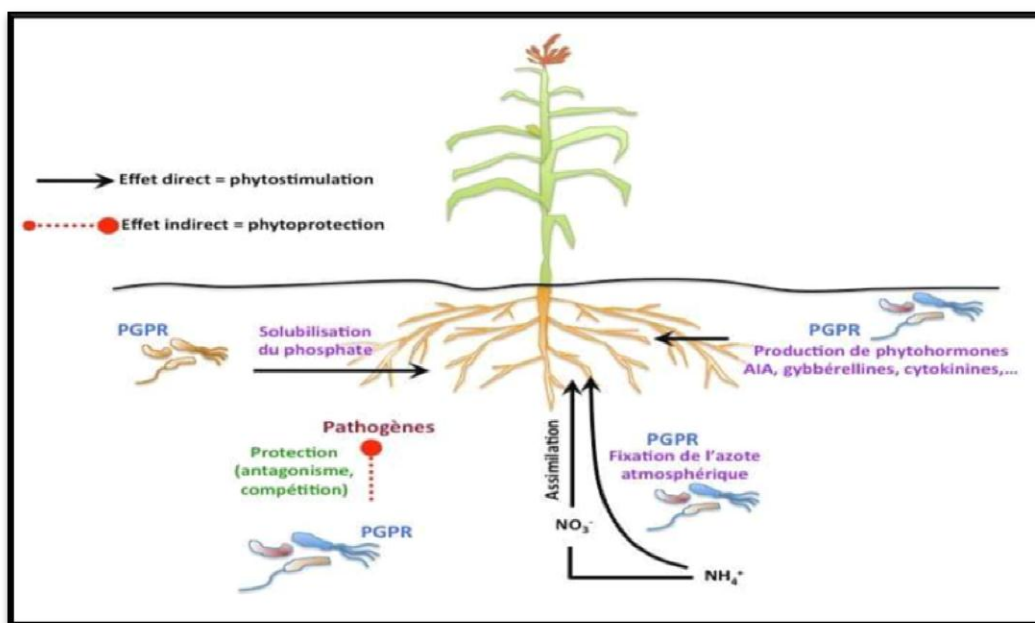


Figure 11: Interaction *Pseudomonas*-pathogènes (Haas et Défago, 2005).

Ces partenaires interagissent entre eux par des signaux biotiques et abiotiques, dont beaucoup sont encore inconnus.

Plusieurs souches de *Pseudomonas* spp. fluorescents ont été signalées par leur effet antagoniste (Lepoivre, 2003; Kwak *et al.*, 2011). L'antagonisme peut résulter d'un ou de plusieurs mécanismes en fonction de l'antagoniste impliqué (Whipps, 2001), en faisant intervenir divers métabolites, qui peuvent affecter les pathogènes par des actions d'antibiose et/ou de parasitisme et/ou de complétion trophique.

I.3.Interaction *Pseudomonas*-plantes

Les *Pseudomonas* peuvent renforcer la résistance des plantes, en induisant leurs capacités défensives naturelles, (Fig12) ce qui conféré à l'hôte une meilleure tolérance vis-à-vis des attaques ultérieures par les agents pathogènes (Bakker *et al.*, 2007). Les *Pseudomonas fluorescents* sont capables de synthétiser différents métabolites secondaires, qui peuvent influencer positivement la croissance des plantes et sont impliqués également dans les relations de reconnaissance entre ces bactéries et les plantes (Sturz et Christie, 2003; Zahir *et al.*, 2004).

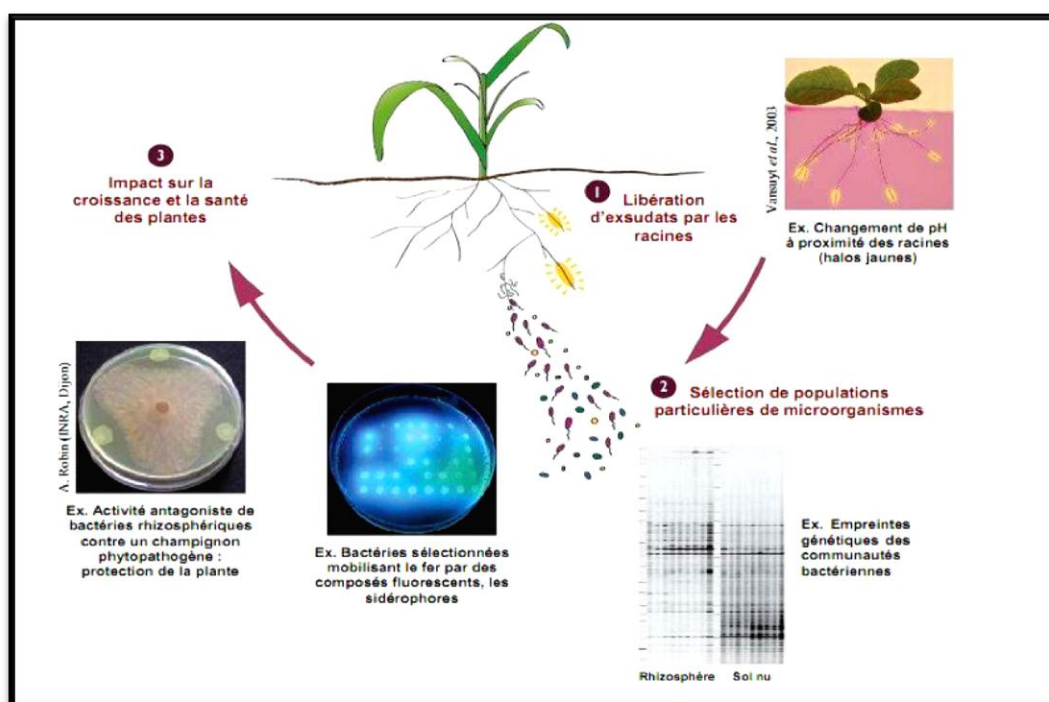


Figure 12: Représentation schématique décrivant les interactions plantes-microorganismes dans la rhizosphère (Lemanceau *et al.*, 2006).

Partie II: Etude expérimentale

Matériel et méthodes

I. Etude *in vitro* de l'action antagoniste de *Pseudomonas spp. fluorescents* sur *Fus. oxy. lyc.* et *Bot.*

Dans les travaux consacrés à l'étude de microorganismes antagonistes aux agents phytopathogènes, les auteurs passent d'abord par une étape préliminaire qui est une étude *in vitro* des potentialités antagonistes de ces microorganismes. Au cours de cette étape ces derniers sont testés pour leur pouvoir antibiotique, parasitaire ou compétitif vis-à-vis de l'agent pathogène.

Nous avons donc essayé de suivre la même voie ; ainsi dans une première étape, nous avons tenté de sélectionner parmi les populations de *Pseudomonas spp.* Isolés du sol, ceux ayant un pouvoir antagoniste vis-à-vis de *Fus. oxy. lyc.* et *Bot.*

La sélection de ces bactéries est basée sur leur capacité à inhiber le développement du parasite.

I.1. Matériel biologique

A. Agents pathogènes

Les isolats des champignons *Fusarium oxysporum f.sp. lycopersici* et *Botrytis cinerea* utilisés dans cette étude ont été obtenus à partir des racines, des tiges, des feuilles et collet de tomate présentant des symptômes d'attaques qui était isolé au niveau de laboratoire de l'INRAA – Constantine (2018).

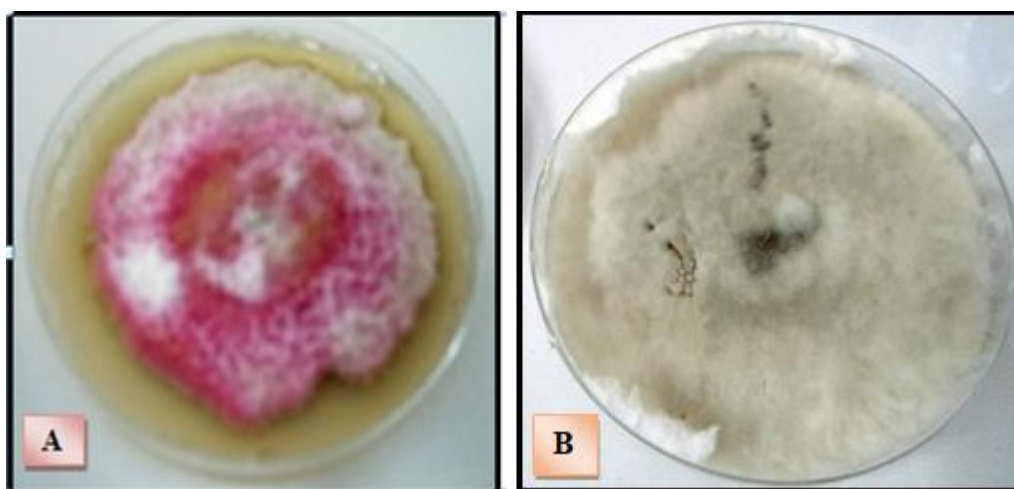


Figure 13: Aspect macroscopique (A) *Fusarium oxysporum f.sp. lycopersici* (B) *Botrytis cinerea*. l'INRAA – Constantine (2018)

B. L'agent antagoniste

Les deux isolats de *Pseudomonas spp.* ont été obtenus du laboratoire INRAA-Constantine qui a été isolé du sol.

Nous avons identifiées les souches de *Pseudomonas spp.fluorescent* procédant les étapes comme suit:

1-Ensemencer l'inoculum: une strie à l'aide d'une anse stérile à la surface du milieu cétrimide (La gélose Cétrimide N) est un milieu sélectif destiné à détection et l'isolement et au dénombrement de *Pseudomonas aeruginosa* dans les produits biologiques).

2 - Production de pigments:

- le pigment bleu ou pyocyanine est caractéristique de l'espèce *Ps. aeruginosa* (mise en évidence sur milieu King A).
- le pigment vert jaune fluorescent ou pyoverdine est caractéristique de quelques espèces regroupées sous le nom de *Pseudomonas fluorescents* (mise en évidence sur le milieu King B) (Pilet *et al.*, 1987, Labres et Mouffok, 2008).

3 - Auxanoqramme du carbone : Chaque espèce est caractérisée par la nature des substrats carbonés qu'elle est capable d'utiliser. L'étude d'une dizaine de substrat suffit à l'identification (Ex. en microméthode: **GALERIE API 20E ®**)

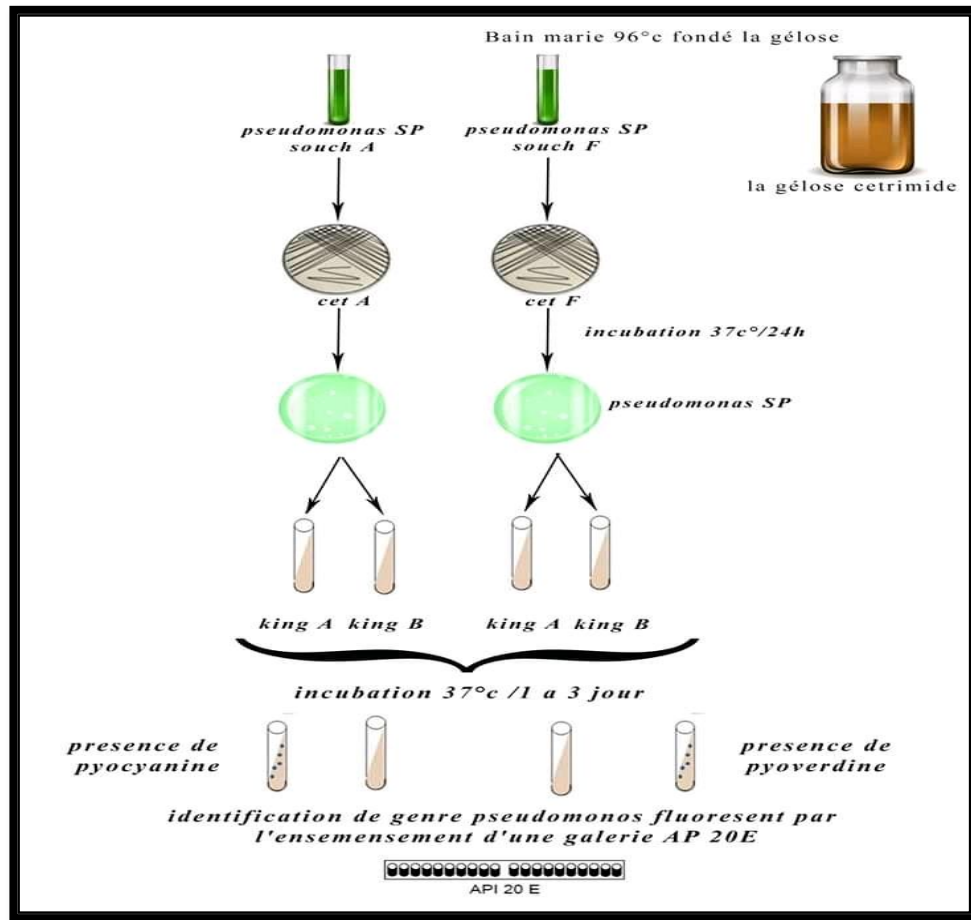


Figure 14: Protocole d'identification de *Pseudomonas spp. fluorescents*.

I.2. Test d'antagonisme *in vitro*

I.2.1. Méthode de confrontation directe en boîte de pétri

Un essai préliminaire d'antagonisme *in vitro* a été réalisé, ce test consiste en la vérification et l'estimation des actions antagonistes des *Pseudomonas spp. fluorescents*. L'activité antagoniste vis-à-vis de deux champignons phytopathogènes *Fus. oxy. lyc.* et *Bot.* ont été étudiées par la méthode de co-culturing sur trois milieux nutritifs : milieu PDA favorable au développement de *Fus. oxy. lyc.*, le milieu King B favorable au développement des *pseudomonas spp. fluorescents*. et le milieu mixte équilibré composé de parts égales des deux premiers milieux (King B + PDA).

Un disque de champignon (*Fus. oxy. lyc.* et *Bot.*) de 5mm de diamètre est prélevé puis déposé à l'aide d'un emporte-pièce stérile sur une boîte de pétri à 2.5cm de la pastille du *Bot.* ou de *Fus. oxy. lyc.*, une souche bactérienne est ensemencée en trait.

Chaque souche bactérienne est confrontée au *Fus.oxyl.* ou au *Bot.* dans le trois milieux à raison de 3 répétitions.

Pour les boîtes des témoins, un disque mycélien du pathogène de 4mm de diamètre a été déposé au centre d'une boîte contenant le PDA.

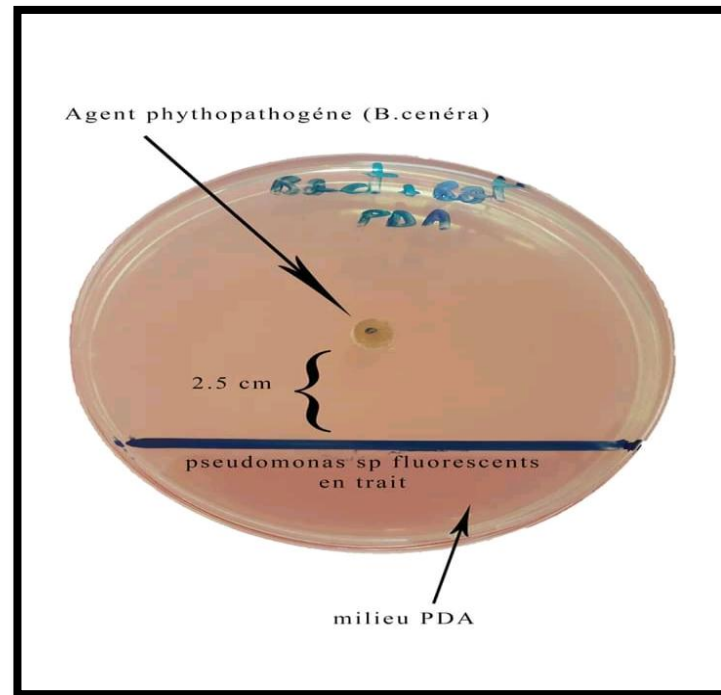


Figure 15: Méthode de confrontation directe en boîte de pétri entre les souches bactériennes et l'agent phytopathogène.

(Photo personnelle,2019).

Le dispositif expérimentale notre travail comprenant selon la(fig 16)

I.2.2.Protocole expérimental

1. Trois répétitions de témoin de *Fus.oxyl.* sur milieux PDA ;
2. Trois répétitionsde témoin de *Botrytis cinerea* sur milieux PDA ;
3. Trois répétitionsde témoin de bactérie (*Pseudomonassp. fluorescents*).
4. Trois répétitions *Pseudomonas spp fluorescents* + deux agents phytopathogènes.
5. Trois répétitionsde confrontation directe entre de *Fus.oxyl.* et *Pseudomonas fluorescents* sur milieux PDA.
6. Trois répétitionsde confrontation directe entre de *Fus.oxyl.* et *Pseudomonas fluorescents* sur milieux King B.

7. Trois répétitions de confrontation directe entre de *Fus.ox. lycet Pseudomonas fluorescents* sur milieux mixte (PDA + King B).
8. Trois répétitions de confrontation directe entre de *Botrytis cinerea* et *Pseudomonas fluorescents* sur milieux PDA.
9. Trois répétitions de confrontation directe entre de *Botrytis cinerea* et *Pseudomonas fluorescents* sur milieux King B.
10. Trois répétitions de confrontation directe entre de *Botrytis cinerea* et *Pseudomonas fluorescents* sur milieux mixte (PDA + King B).

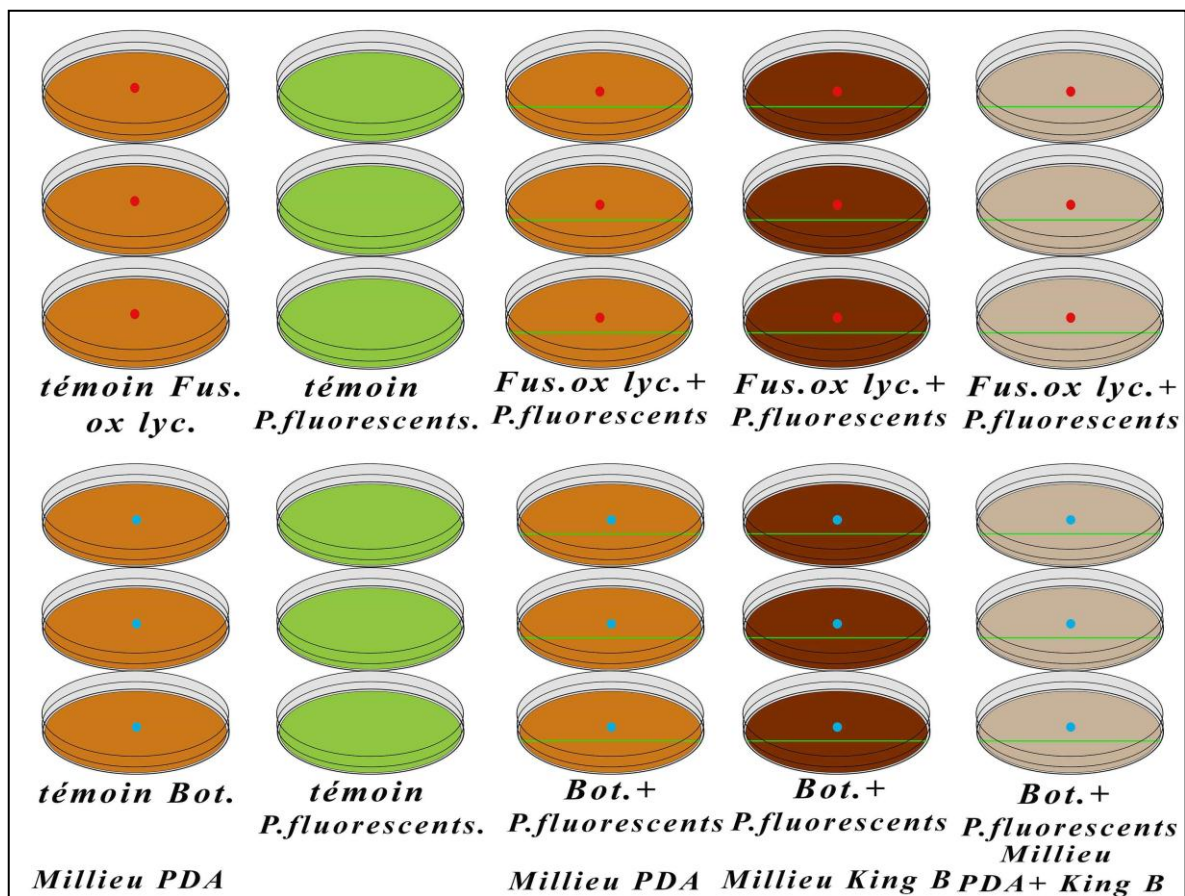


Figure 16: Protocole expérimental

I.2.3. Evaluation du taux d'inhibition

L'évaluation du taux d'inhibition exercé par *Pseudomonas fluorescent* est estimée par le calcul du pourcentage d'inhibition de la croissance mycélienne selon la formule suivante (Hmouni *et al.*, 1996) :

$$I (\%) = (1 - C_n / C_o)$$

Où :

I (%) : le pourcentage d'inhibition de la croissance mycélienne.

Cn : le diamètre moyen des colonies en présence de l'antagoniste

Co : le diamètre moyen des colonies témoins.

II. Efficacité *in vivo* de *Pseudomonas spp fluorescents* sur l'évolution de la maladie

L'étude précédente nous a permis de montrer les capacités antagonistes *in vitro* les bactéries *Pseudomonas spp fluorescents* sélectionnées vis-à-vis le *Fus.oxyl.* et *Bot.*

Cependant, les résultats des expériences réalisées *in vitro* sur milieu gélosé ne représentent pas toujours les réalités naturelles. En effet, plusieurs auteurs ont montré que des microorganismes ayant montré un fort pouvoir antagoniste *in vitro*, ne présentent plus d'intérêt une fois retournés dans le sol. Ce fait, peut s'expliquer par plusieurs raisons dont le manque d'adaptation au milieu dans lequel ils sont introduits, l'inefficacité des antibiotiques sécrétés; ces derniers sont adsorbés par le sol ou métabolisés et par conséquent n'atteignant pas leurs cibles.

Il apparaît donc nécessaire de vérifier l'action antagoniste des microorganismes que nous avons sélectionnés (*Pseudomonas spp fluorescents*) sur le *Fus.oxyl.* et *Bot.* *in vivo*.

II.1. Espèce végétal

Notre étude a été effectuée sur la variété la hainze 1350(hybride F1) de tomate (*Lycopersicon esculentum* Mill.), plante hôte de *Fus.oxyl.* et *Bot.* dont quelques caractéristiques sont énumérées dans le tableau ci-dessus :

Tableau 01 : Caractéristiques des deux variétés de tomate utilisées.

Cultivars	Caractéristiques
hainze 1350	Plante vigoureuse a croissance déterminée, Maturité précoce 70 jours, Très bonne fermeté, Très productive. Résistance : Verticillium, F1 : Fusarium 1, F2 : Fusarium 2, N : nématode.

II.2. le sol

Le sol utilisé dans notre expérimentation a été prélevé au niveau de centre universitaire Mila. Le sol a subi un séchage et tamisage (5mm de diamètre) de façon à obtenir une granulométrie ni trop fine ni trop grosse.

II.3. Condition d'expérimentation

L'expérimentation a été réalisée au niveau de centre université de Mila durant l'année 2018/2019 sous serre.

Une désinfection de la semence a été réalisée selon la technique de **Messiaen et al.,(1991)**, elles sont désinfectées au préalable par un trempage dans l'alcool à 70% pendant 1min puis rincées abondamment à l'eau distillée stérile afin d'éliminer les restes de pesticides utilisés en traitement de semences (**Benhamou et al., 1997**), puis dans une solution de hypochlorite de sodium à 2% pendant 10 min , puis rincées quatre fois à l'eau distillée stérile et séchées par un papier filtre.

Elles sont déposées sur du papier filtre humide dans des boîtes de Pétri à raison de 8-10 graines/boîte.

Ces dernières sont maintenues à l'étuve à la température de 25 °C pendant 7 jours car la germination.

Le semi a été réalisé dans les gobelets contenant de la tourbe désinfectée.

Le repiquage des plantules de chaque cultivar de tomate est réalisé lorsque ces dernières atteignent le stade deux feuilles bien étalées (**Woo et al., 1996**).

La transplantation des plantules est réalisée dans pots en plastique de 15,5cm de hauteur et de 18 cm de diamètre et d'une contenance de 1,4 g, et leur fond a été recouvert d'une couche de gravier de 1cm d'épaisseur, pour assurer un bon drainage. Ensuite les pots ont été remplis par le substrat (2/3 sol +1/3 tourbe) et dans chaque pot on met une plantule avec un arrosage quotidien avec l'eau robinet durant la période d'expérimentation.

II.4. Inoculation

II.4.1. Inoculation bactérien

A partir de culture conservées sur milieu king B, les souches bactériennes ont été purifiées avec plusieurs repiquages à 37°C pendant 24 h. A l'aide d'une anse de platine stérile, la crème bactérienne âgée de 48 h est raclée délicatement et mise en suspension dans 600ml de l'eau physiologique stérile, une bonne homogénéisation est pratiquée.

Pour déterminer la concentration de cette suspension, l'absorbance a été mesurée à une longueur d'onde de $\gamma = 600\text{nm}$ (Vijayan *et al.*, 2006). Cette suspension a été ajustée par l'eau physiologique stérile à une concentration de 0,5 cfu/ml.



Figure 17: La suspension bactérienne
(Photo personnelle, 2019).

II.4.2. Inoculation fongique

Afin de préparer l'inoculum nécessaire à l'infestation artificielle, *Fus. oxy. lyc.* et *Botrytis cinerea* a été cultivé sur le milieu PDA gélosé. Les cultures obtenues sont raclées et mises en agitation dans l'eau physiologique stérile pendant 2 jours (Tello-marquina et Alabouvette, 1984).

L'absorbance a été mesurée à une longueur d'onde de $\gamma = 530\text{ nm}$. Cette suspension a été ajustée par l'eau physiologique stérile à une concentration de 0.15 à 0.17 conidies/ml, une quantité de 20 ml de cette suspension a été appliqué dans chaque pot (Liu *et al.*, 2008).

Après formation deux à six feuille appliquer l'inoculum bactérien. Après 4 jours appliquer l'inoculum fongique.

L'inoculation est faite par pulvérisation simultanée de la suspension sporale des agents phytopathogènes et traitée par l'agent antagoniste sur les surfaces foliaires des plantes de la tomate. Le reste de la solution contaminant sert à contaminer le sol portant les plantes.

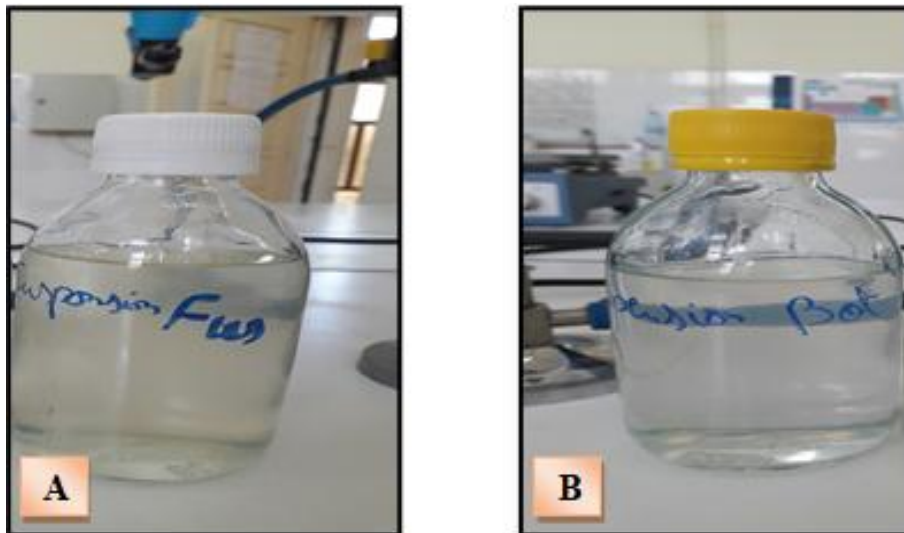


Figure 18: Inoculum fongiques (A) *Fus.lyc.oxy*. (B) *B.cinerea* (C) *Tri*.
(Photo personnelle, 2019).

II.5. Dispositif expérimental

Le dispositif (**Fig19**) de notre travail comprendra 24 plantes de tomate infecté par deux maladies (*Fus.oxy.lyc* et *Bot.*) traité avec *Pseudomonas spp fluorescentis*.

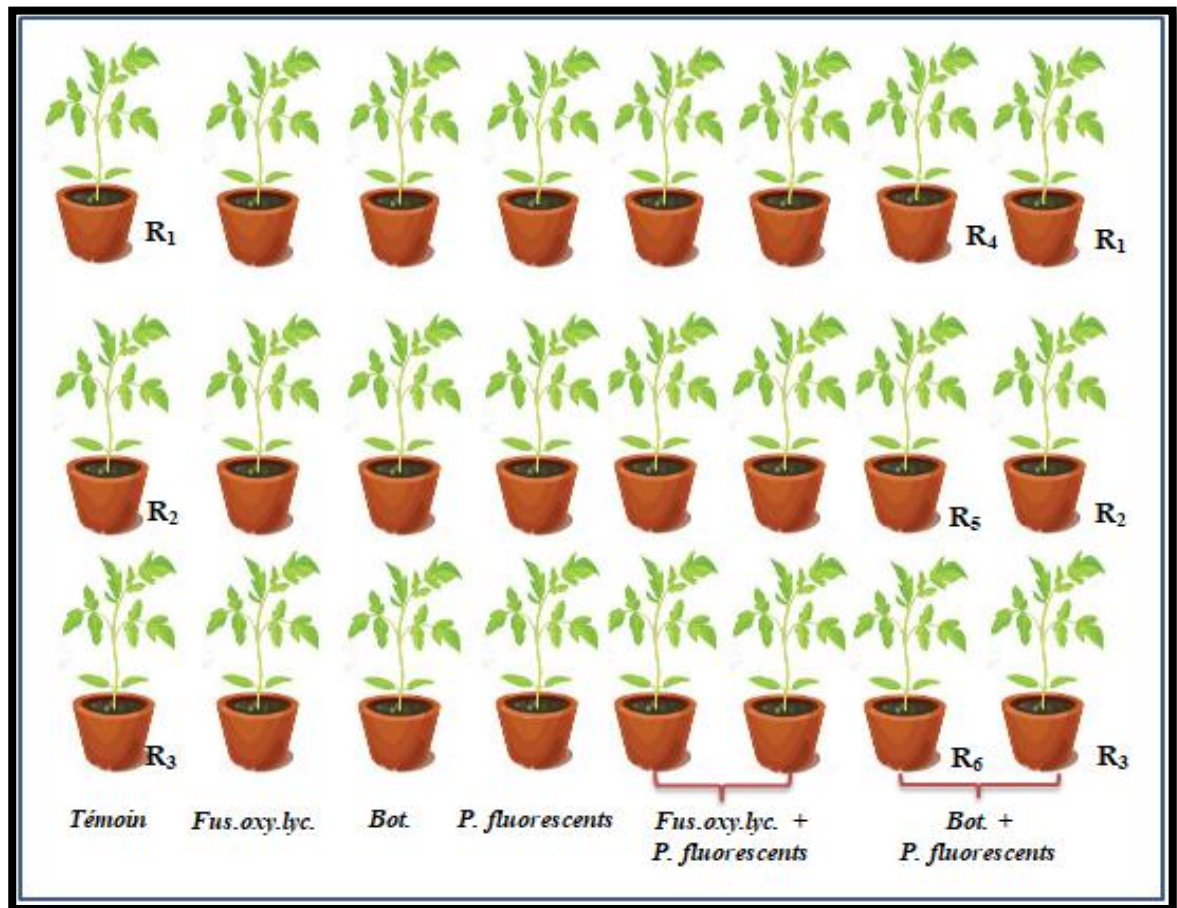


Figure 19: Schéma du dispositif, effet *Pseudomonas* spp. *fluorescent* sur les deux maladies.

R₁: Répétition 1, **R₂:** Répétition 2, **R₃:** Répétition 3.

Le pourcentage de réduction de la maladie (RM) a été calculé en fonction de l'indice de gravité de la maladie (Villajuan-Abgona *et al.*, 1996) :

$$RM (\%) = [(A-B)/A \times 100]$$

Où :

A : est l'indice de gravité de la maladie due uniquement par *Fus. oxy. lyc* et *Bot*.

B : est l'indice de gravité de la maladie après une inoculation par *Fus. oxy. lyc* et *Bot*. et un traitement par *pseudomonas* spp. *fluorescents*.

La maladie a été évaluée en fonction de la gravité des symptômes, en utilisant une échelle de notation proposée par **Landa et al. (1997)** allant de 0 à 4 ; ce classement est basé sur le pourcentage de feuillage avec jaunissement ou nécrose. Cette échelle comprend:

0 = 0% (plantule saine) ;

1 = 1-33% (léger jaunissement) ;

2 = 34-66% (jaunissement important des feuilles) ;

3 = 67-100% (jaunissement avec nécrose) ;

4 = mort de la plantule.

Résultats et discussion

Le présent travail porte sur l'activité antagoniste *in vitro* et *in vivo* du *Pseudomonas spp. fluorescents* vis-à-vis de deux agents pathogènes de *Fusarium oxysporum f. sp. lycopersici* et *Botrytis cinerea*.

I. Identification et purification des souches bactériennes de *Pseudomonas spp. fluorescents*.

Les résultats obtenus pour l'identification et la purification de la souche à utiliser dans cette étude (*Pseudomonas spp. fluorescents*) sont énumérés dans le tableau suivant :

Tableau 02:Résultat de l'identification des *Pseudomonas spp. fluorescents*.

Test prélèvement	King A	King B	Espèce
Souche A	+	-	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> (Confirmer par l'API 20 E).
Souche B	-	+	<i>Pseudomonas fluorescence</i> (Confirmer par l'API 20 E).



Figure 20 : Résultat de l'identification des *Pseudomonas spp. fluorescents* par **GALERIE API 20E (Photo personnelle,2019).**

I.1.Purification de *Pseudomonas spp. fluorescents*

Les colonies développées sur milieu King B montrant des caractéristiques macroscopiques correspondant au genre *Pseudomonas* (fluorescence jaune verdâtre, colonies assez grandes avec des contours dentelés) sont purifiées par des ensemencements successifs jusqu'à l'obtention de cultures pures.

Les observations microscopiques réalisées ont montré des bactéries en forme bâtonnet allongées. Le test de Gram indique des bactéries gram négatives (**fig 21**).

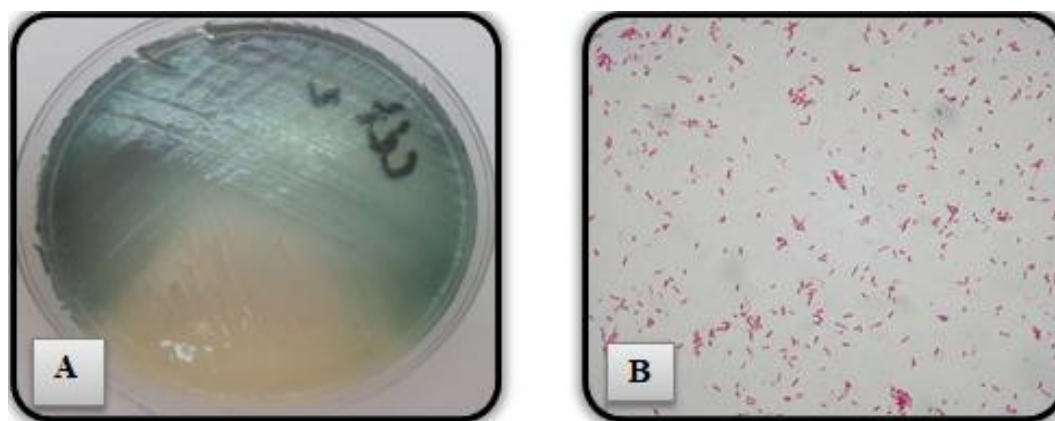


Figure 21: Aspect macroscopique (A) et microscopique (B) de *Pseudomonas* spp. fluorescents (G×40).

I.2. Résultats de l'antagonisme *in vitro*

Le test d'antagonisme *in vitro* a permis d'estimer le potentiel inhibiteur de *Pseudomonas fluorescents* vis-à-vis des souches phytopathogènes *Fusarium oxysporum* f. *sp. lycopersici*. et *Botrytis cinerea*.

Cette évaluation a révélé des intensités inhibitrices variables selon les souches antagonistes et la nature des milieux.

I.2.1. Inhibition du développement de *Fus.oxyl.* par *Pseudomonas fluorescents*.

L'effet antagoniste de *Pseudomonas fluorescents* testés a été évalué à travers la réduction des diamètres de la croissance mycélienne de *Fusarium oxysporum* f. *sp. lycopersici*. Le résultat de cet essai préliminaire a montré une activité inhibitrice appréciable et variable selon les milieux de culture, induisant des taux d'inhibition relativement élevés. Où j'ai réduit fortement la croissance mycélienne de *Fus.oxyl.* sur les milieux mixte (88,38 %) et PDA (86,05%), tandis dans le milieu PDA à 79,85 % (Tableau 03).

Tableau 03: Taux d'inhibition (%) de *Pseudomonas fluorescents*.sur la croissance mycélienne du *Fus.oxyl.*

Milieux jours	1	2	3	4	5	6	7	8	9
PDA	20	84,77	83,01	81,29	82,86	84,62	86,05	86,05	86,05
King B	20	86,66	73,85	71,93	75,24	77,78	79,85	79,85	79,85
PDA+King B	20	90,48	83,01	82,46	85,72	87,18	88,38	88,38	88,38

Les résultats obtenus après sept jours d'incubation à 25°C, ont montré que la croissance mycélienne du témoin pathogène est plus importante que celle obtenue avec celle du pathogène en confrontation. En effet, la croissance du *Fus.oxyl.*cultivé seul est de 33,5 mm, contrairement qu'en présence de *Pseudomonas fluorescents*.où nous avons enregistré des diamètres faibles de la croissance mycélienne, avec un effet plus marquant sur le milieu PDA (5mm) et le milieu mixte (King B+ PDA) (15,6mm).

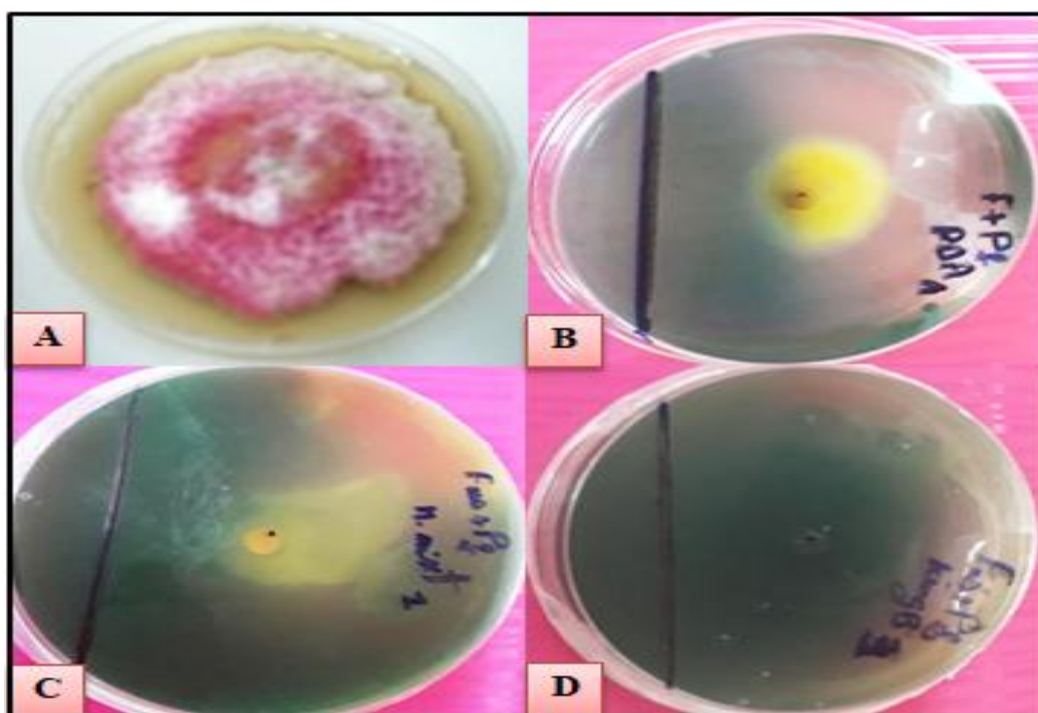


Figure22: Antagonisme in vitro entre *Pseudomonas fluorescents* et de *Fus.oxyl.*

(A): témoin, (B): avec *Pseudomonas fluorescents* dans milieu PDA (C):dans milieu mixte et (D): dans milieu King B (Photo personnelle, 2019).

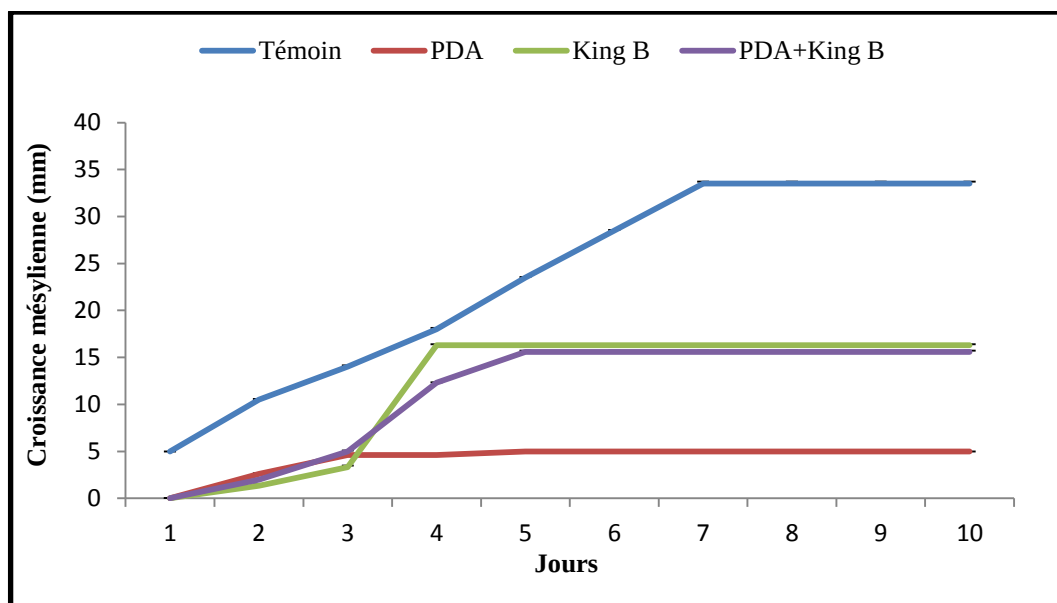


Figure 23: Effet de l'antagoniste *Pseudomonas spp. fluorescents* sur le développement de l'agent pathogène *Fus. oxy. lyc* comparativement au témoin dans trois milieux.

Les résultats obtenus après 10 jours d'incubation à 25 °C, ont montré que la croissance mycélienne du témoin pathogène est plus importante que celle obtenue avec l'antagoniste en confrontation. En effet, la croissance du *Bot.* cultivé seul est de 43 mm, Après le troisième jour d'incubation *Pseudomonas fluorescents* a montré une activité inhibitrice notable et nettement supérieure, où nous avons enregistré des diamètres faibles de la croissance mycélienne de *Bot.* Où il a atteint un diamètre de 5 mm seulement soit un taux d'inhibition de 85,08% dans milieu mixte et 6 mm dans milieu PDA avec un taux d'inhibition de 53,24%. Alors qu'une faible réduction est enregistrée sur le milieu King B (8,66 mm) avec un taux d'inhibition de 51,25%.

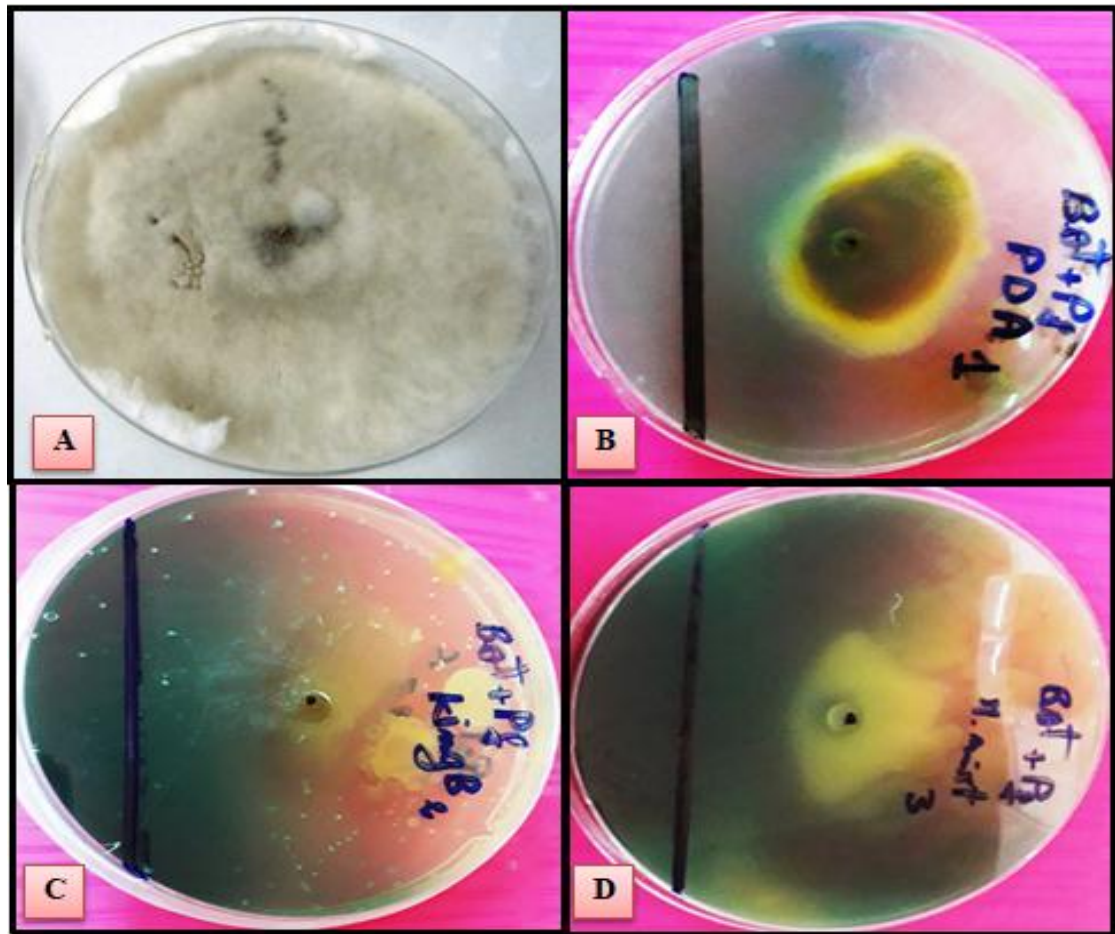


Figure 24:Antagonisme in vitro entre *Pseudomonas fluorescents* et de *Bot*.

(A): témoin, (B): avec *Pseudomonas fluorescents* dans milieu PDA (C):dans milieu mixte et (D): dans milieu King B (Photo personnelle, 2019).

Tableau 04: Taux d'inhibition de *Pseudomonas fluorescents*. sur la croissance mycélienne du *Bot*.

Milieu jours	1	2	3	4	5	6	7	8	9
PDA+King B	20	74 ,61	66,68	74,08	78,73	82,46	85,08	85,08	85,08
King B	20	87 ,31	76,20	92,60	30,50	57,30	51,25	51,25	51,25
PDA	20	89,96	64,24	31,49	33,34	45,04	53,24	53,24	53,24

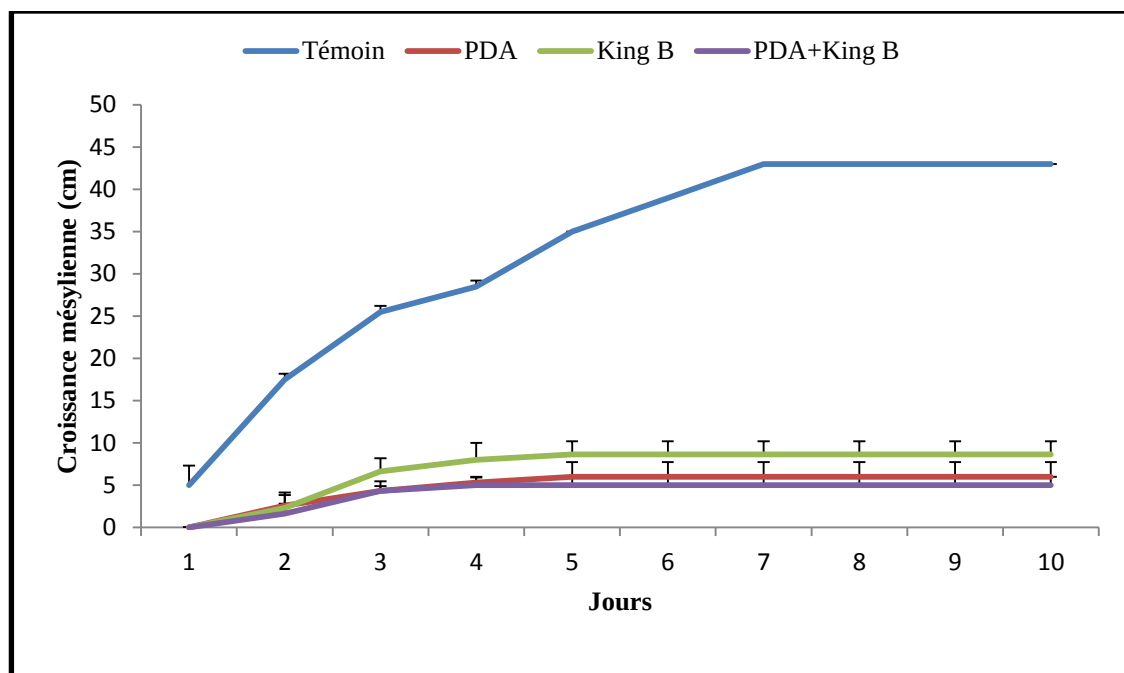


Figure 25: Effet de l'antagoniste *Pseudomonas spp. fluorescente* sur le développement de l'agent pathogène *Bot.* comparativement au témoin dans trois milieux.

I. 3. Efficacité *in vivo* de *pseudomonas spp. fluorescente* sur l'évolution de la maladie

Au cours de cette expérience, l'effet protecteur de *Pseudomonas spp. Fluorescents*. à l'égard de *Fus. oxy. lyc.* responsable du flétrissement vasculaire et *Bot.* responsable du pourriture grise a été testé sur le cultivar de tomate hainze1350. L'efficacité « *in vivo* » *Pseudomonas spp. fluorescente* sur l'incidence de la maladie a été évaluée au bout de 10 jours après l'inoculation.

Les résultats obtenus montrent que les premiers symptômes ont été apparus les 7^{ème} jours après inoculation uniquement avec le *Fus. oxy. lyc.* et *Bot.* en pots où nous avons observé que la maladie s'est installée rapidement. Les observations régulières, notées, ont montré aussi que les symptômes typiques du flétrissement vasculaire se manifestent sous forme d'un jaunissement débutant par les feuilles basales et montant progressivement vers celles du haut, ces symptômes sont représentatifs d'un niveau d'infection important.

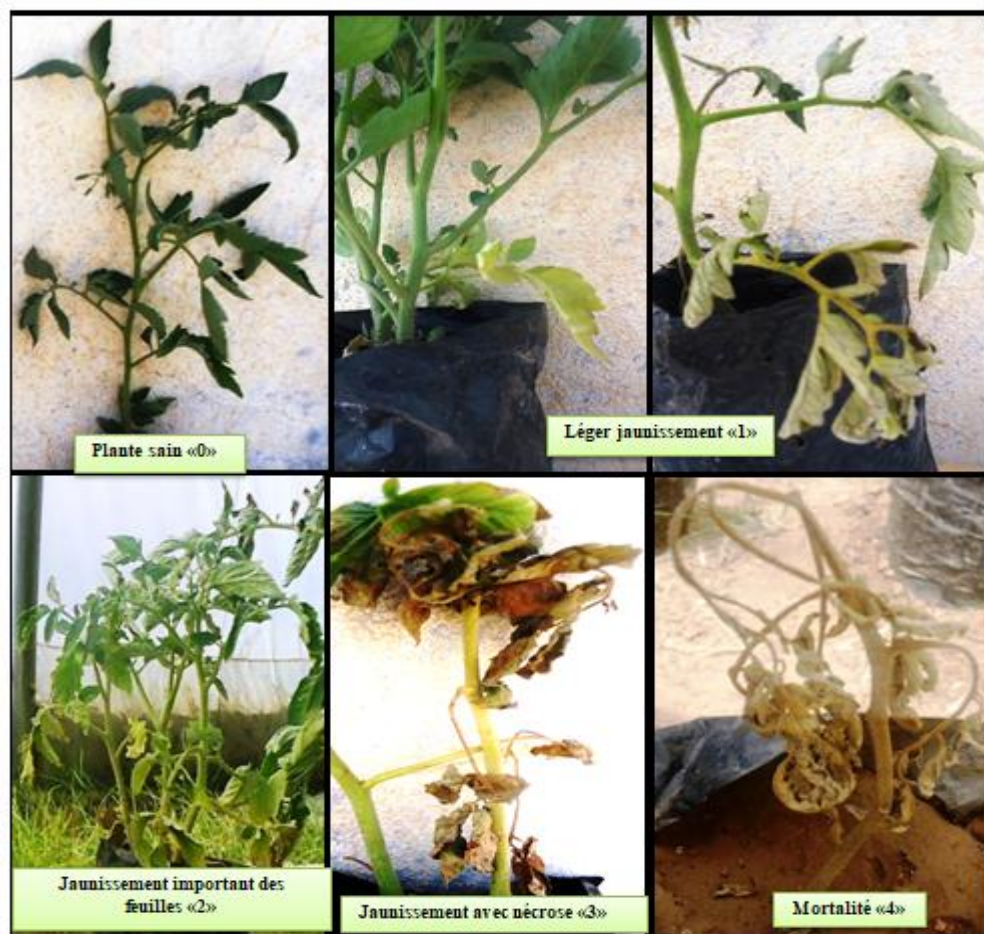


Figure 26 : Degrés symptomatologique de deux maladies de tomate.

Dans ces essais, nous avons noté une variation de la maladie évaluée sous forme de pourcentage des plantes ayant atteintes un indice symptomatologique correspondant au flétrissement généralisé ou à la mort de la plante.

L'incidence de la maladie (IM) a montré que l'isolat testé réduise significativement l'incidence de la maladie (IM) par rapport au témoin. Les résultats obtenus confirment une fois de plus l'efficacité *Pseudomonas spp. fluorescents*. En effet, leur application a réduit l'incidence de la maladie IM chez le Bot à 66,66% donc l'incidence de la maladie 36.25%.

Pour les plantes contaminée par *Fus.oxyl.* l'incidence de la maladie a atteint 33.34% et la réduction de la maladie par *Pseudomonas spp. fluorescents* était de 63.75%.

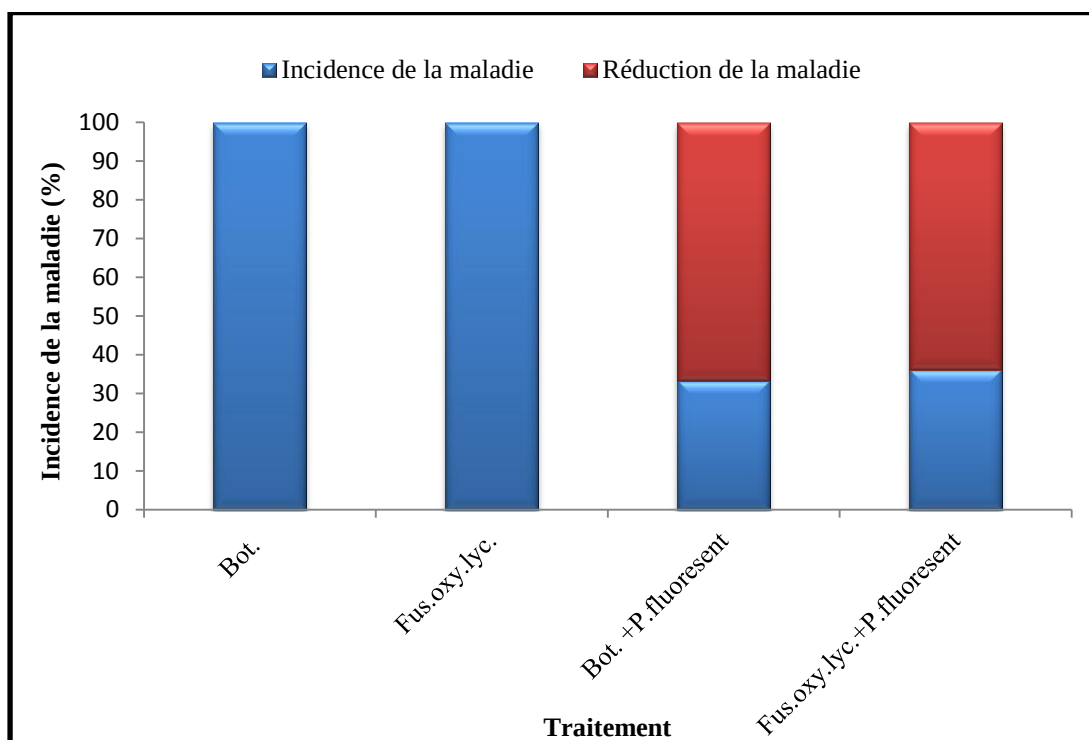


Figure 27: Incidence et réduction de deux maladies (%) en pots en comparaison entre les plantes inoculées avec *Fus.oxyl.* et *Bot.* avec les plantes traitées par *Pseudomonas spp. Fluorescents*.

II. Discussion

Le test d'antagonisme in vitro a permis d'estimer le potentiel inhibiteur de la souche de *Pseudomonasfluorescent* vis-à-vis de les deux souchesphytopathogènes*Fus.oxyl.* et *Bot.* cette évaluation a révélé des intensité inhibitrices variables selon les souches phytopathogène et la nature des milieux.

Plusieurs souches de *Pseudomonas. spp. Fluorescents* ont été signalées par leur effet antagoniste (**Lepoivre 2003 ; Fernando et al., 2005 ; Reddy et Rao, 2009**), notamment vis-à-vis de plusieurs espèces de *Fusarium* où les travaux de **Farhan et al.,(2010)** rapportent un maximum d'inhibition de 94,96%. Également, cette activité bio-inhibitrice a été constatée vis-à-vis de *Dematophoranecatrix* (**Cazorla et al., 2006**) et de *penicillium* (**Etebarian et al., 2005**).

La *Pseudomonas fluorescents* antagonistes agissent sur les agents pathogènes en empêchant leur développement par l'inhibition de leur germination

et/ou leur sporulation et/ou en interférant avec et/ou en interférant avec leurs éléments de pathogénicité (Haas et Défago, 2005; Suty, 2010). Cet antagonisme se révèle particulièrement de compétition pour les éléments nutritifs et l'espace (Nakkeeran et al., 2005; Ligtenberg et Kamilova, 2009), la production d'antibiotiques d'enzymes lytiques (parasitisme) (Denton, 2007; Suty, 2010).

Pseudomonas.spp.fluorescent produisent le DAPG, un antibiotique à large spectre vis-à-vis des virus, des bactéries et des champignons (Kwak et al., 2011). Ce métabolite antimicrobien est efficace contre *phytiumultimum* (Lepoivre, 2003), et *Gaeumannomyces Graminis* var *tritici* (Cool, 2007). *Pseudomonas fluorescent* synthétise diverses enzymes lytiques, β -1,3-glucanases et β -1,4-glucanase et des lipases, qui ont provoqué la lyse de la paroi cellulaire de *phytophthora capsici* (Diby et al., 2005a). *Pseudomonas fluorescents* CHAO sécrète une protéase extracellulaire qui est impliquée dans le bio contrôle d'un nématode (*Meloidogyneincognita*) au cours de l'infection de la tomate et du soja (Siddiqui et al., 2006). *Pseudomonas spp.fluorescents* diffusent le cyanure d'hydrogène qui assure une activité antimicrobienne à large spectre dans le contrôle biologique des maladies telluriques de nombreuses plantes (Ramette et al., 2003).

L'activité antagoniste des *Pseudomonas fluorescentes-putida* implique la production de la pyoverdine (Colin, 1988). Cette production est dépendante de la nature du milieu (King et al., 1954), en cas de carence en ions ferriques, la synthèse de la pyoverdine par les *Pseudomonas fluorescents* afin de chélater les ions ferriques et de les transporter (Eyquem et al., 2003). L'addition des ions ferriques inhibe l'activité antagoniste des *Pseudomonas in vitro*, de même, des mutants déficients en sidérophores ne peuvent plus réduire la croissance des agents pathogènes (Fernando et al., 2005).

Nos résultats suggérant que le principal mécanisme chez la souche *Pseudomonas fluorescentes* est la production de sidérophores sur les trois milieux (milieu mixte, PDA et King B), des actions cumulatives antibiose, parasitisme peuvent être l'origine de l'effet antagoniste chez cette souche, sans omettre l'implication de d'autres mécanismes connus chez cette souche. Cela montre le

rôle principal de l'activité des sidérophores dans le processus d'antagonisme in vitro.

L'application des *Pseudomonas* a assuré une réduction dans l'évolution des degrés des symptômes, notamment la symptomatologie finale. L'initiation de la maladie a été très faible chez les plants bactérisés par rapport aux témoins malades, ce qui montre que la croissance de *Fus.oxyl.* peut être déséquilibrée par la présence des *Pseudomonas*, la stimulation des mécanismes de défense chez les plants de tomate peut ralentir l'envahissement de la plante, ce qui rend l'évolution de la maladie lente.

L'application des *Pseudomonas spp. fluorescents* assure une bio protection significative des plants de tomate vis-à-vis de la fusariose vasculaire et pourriture gris , Malgré l'apparition et l'évolution de l'infection chez tous les traitements étudiés mais toutes les situation de bactérisation ont influencé positivement le développement des plants de tomate en réduisant la maladie avec des degrés appréciables. Les plants bactérisés montrent une tolérance à la fusariose vasculaire et la pourriture gris, se manifestant par un retard des effets de *Pseudomonas spp. Fluorescents* sur le biocontrôle et l'induction de la résistance systémique (IRS) chez la tomate vis-à-vis de la fusariose vasculaire et la pourriture grise.

Notre expérimentation en révèle une réduction significative de l'infection (33,34% à 36,25 %), avec la meilleure bioprotection assurée par la *P. fluorescents*. Relativement, des constats similaires sont enregistrés par plusieurs études. Selon **Verhagen et al., (2010)**, dans le but d'induire l'ISR, l'application individuelle des souches de *Pseudomonas fluorescents* (CHAO, WCS417, Q2-87, WCS358 et 7NSK2) réduit significativement, avec des taux allant de 20% à 43 % l'indice de la pourriture grise causée par *Botrytis cinerea* sur la vigne. D'après **Ongena et al., (2000)**, la stimulation des réactions de défense en système split root par *Pseudomonas putida* BTP1 a réduit la sévérité avec un taux de 43,75 % chez le concombre vis-à-vis *Pythium aphanidermatum*. Selon **Saikia et al., (2003)**, *P. fluorescents* induit la résistance systémique chez le pois chiche et réduit la sévérité de la fusariose vasculaire avec des taux allant de 26 % à 50 %.

L'ISR stimulée avec *Pseudomonas* spp. *Fluorescent* réduit la gravité de plusieurs maladies chez de nombreuses espèces végétales (Van Wees *et al.*, 1999; Kloepper *et al.*, 2004; Van Loon et Bakker, 2006; Bakker *et al.*, 2007; Verhagen *et al.*, 2010). De même, plusieurs souches de *Bacillus* ont montré leur capacité d'induire la résistance chez les plantes (Choudhary et Johria, 2009). *Bacillus pumilus* SE34 et *Pseudomonas fluorescens* 89B61, ont stimulé une protection systémique contre le mildiou de la tomate et une réduction significative de la sévérité est observée. Ce niveau de résistance est similaire de la SAR induite par *Phytophthora infestans* ou l'acide butyrique (Yan *et al.*, 2002). L'activation de la SAR et l'ISR augmente le niveau de contrôle de la maladie (Pieterse *et al.*, 2001).

Conclusion

Certaines bactéries bénéfiques de la rhizosphère (rhizobactéries) contribuent à la gestion des maladies des plantes, avec des pratiques respectueuses de l'environnement, en stimulant les défenses naturelles chez l'hôte et/ou en assurant le biocontrôle direct des bioagresseurs.

L'objectif de ce travail consiste à mettre en évidence l'induction de la résistance systémique et le biocontrôle chez la tomate vis-à-vis de la fusariose vasculaire (*Fusarium oxysporum f. sp. lycopersici*) et pourriture grise (*Botrytis cinerea*), en utilisant une souche rhizobactérienne (*Pseudomonas fluorescens*).

A cet effet, l'essai préliminaire d'antagonisme in vitro a montré des inhibitions appréciables et variables de la croissance mycélienne, selon les agents phytopathogènes et selon les milieux de culture, avec un maximum d'inhibition de 88,38% chez le *Fus. oxy. lyc.* et 85,08 % chez le *Bot.* dans milieu mixte (PDA+ King B).

Les résultats obtenus sont intéressants et ont été confirmés sur in vivo en calculant l'incidence de la maladie et la réduction de l'incidence de la maladie. En effet, leur application a réduit l'incidence de la maladie IM chez le Bot à 66,66% donc l'incidence de la maladie 36.25%. Pour les plantes contaminée par *Fus. oxy. lyc.* l'incidence de la maladie a atteint 33.34% et la réduction de la maladie par *Pseudomonas spp. fluorescents* était de 63.75%.

Globalement, nos résultats montrent que l'application des *Pseudomonas spp. fluorescents* induit une tolérance chez les plants de tomate vis-à-vis de la fusariose vasculaire et pourriture grise, selon les potentialités exprimées, en stimulant les défenses naturelles et/ou en agissant par antagonisme direct sur le parasite.

A partir de nos résultats nous n'avons constaté que l'effet positif de *Pseudomonas spp. fluorescents* en bio protection est nettement supérieur. Il doit mettre en valeur l'effet antagoniste testés et d'élargir l'utilisation des agents antagonistes dans les contrôles biologique surtout de genre *Pseudomonas spp. fluorescents*. Pour diminuer l'utilisation des fongicides chimiques et protéger les cultures maraichères.

Pour cela, il est indispensable de sélectionner des souches de *Pseudomonas spp. fluorescents* douées de potentialités stables, reproductibles et adaptées aux différentes conditions tellurique. Il est fortement souhaitable d'approfondir les investigations relatives à la mise en œuvre des activités antagonistes et stimulatrices des capacité défensive naturelles des plantes

Références bibliographiques

A

Actions, G.N. 2005. Plant pathology. Fifth Edition, Elsevier Academic Press, 525 B Street, Suite 1900, San Diego, California 92101-4495. PP. 524-525, 539.

Agrios, G.N. (2005). Plant pathology. Elsevier Academic Press, Oxford, UK, p 922.

Ajouz S. (2009). Estimation du potentiel de résistance de *Botrytis cinerea* à des biofongicides. Thèse de doctorat, Université d'Avignon et des pays de Vaucluse, France, p 179.

Alexander, L.J. and Tucker, C.M., 1945. Physiologic specialization in the tomato wilts fungus *Fusarium oxysporum* f. *Sp. Lycopersici*. J. Agric. Res. 70:303-313

Anonyme. (2003). Cultures horticoles. Programme National de Transfert et Technologies en Agriculture (PNTTA).p 9.

Arumuganathan K, Earle E (1991) Nuclear DNA content of some important plant species. Plant Molecular Biology Reporter 9:208-218.

Arumuganathan K, Earle E (1991). Nuclear DNA content of some important plant species. Plant Molecular Biology Reporter 9:208-218.

B

Bakker P.A.H.M., Pieterse C.M.J., and Van Loon L.C., (2007). Induced systemic résistance by fluorescent *Pseudomonas* spp. Phytopathology, 97 (2), p 239-243.

Baluska F. and Ninkovic V., (2010). Plant Communication from an Ecological perspective. Springer, Germany, p 252.

Baptista F. J., Bailey B. J., et Meneses J. F. (2012). Effect of nocturnal ventilation on the occurrence of *Botrytis cinerea* in Mediterranean unheated tomato greenhouses. Crop Protection, 32 : 144-149.

Beever, RE and PL Weeds. (2004). Taxonomic and genetic variation of *Botrytis* and *Botryotinia*. In *Botrytis: Biology, pathology and control*, edited by Y. Elad, B. Williamson, P. Tudzynski and N. Delen. Dordrecht, The Netherlands: Kluwer.

Blancard D., (2009). Les maladies de la tomate : identifier, connaître, maîtriser. Versailles: Éditions Quae. p 679.

Blancard, D. 1997. Les maladies de la tomate. Edition INRA, Paris, 212 P.

Blancard, D. Laterrot, H. Marchoux, G. Candresse, T., (2012). A colour Handbook-Tomato Diseases :identification ,biology and control.Manson Publishing Ltd.688 pp.

Booth, C., 1971. The Genus fusarium, p. 237. Commonwealth Mycological Institute , Kew , Surrey , England.

Bost, S.C., 2001. First report of *Fusarium oxysporum* f. *Sp. Lycopersici* race 3 on tomato in Tennessee. Plant Dis. 85:802.

Bouhot, C., 1972. The Genus fusarium, p. 237. Commonwealth Mycological Institute , Kew , Surrey , England

Bryon Florian. (2011).Caractérisation des populations de *Botrytis cinerea* issues de cultures de laitues et de tomates sous abris. P 4.

C

Cazorla F.M., Duckett S.B., Bergstrom E.T., Noreen S., Odijk R., Lugtenberg B.J.J., Thomas-Oates J.E. and Bloemberg Guido V.,(2006). Biocontrol of Avocado Dematophora Root Rot by Antagonistic *Pseudomonas fluorescens* PCL1606.

Chardonnet C. O., Sams C. E., Trigiano R. N. et Conway W. S. (2000). Variability of three isolates of *Botrytis cinerea* affects the inhibitory effects of calcium on this fungus. Phytopathology. 90, 769-774.

Chaux C. et Foury C. (1994). Production légumière. Tome3 : Légumineuses potagère, légumes et fruits. Edition : Technique et documentation – Lavoisier. Paris. P 455.

Chaux C.L. et Foury C.L, (1994). Cultures légumières et maraichères. Tome III : légumineuses potagères, légumes fruit .Tec et Doc Lavoisier, Paris. P 563.

Chellimi, D.O., Dankers, H.A. and Crosier, B., 1992. First report of *Fusarium oxysporum* f. *Sp. Lycopersici*. race 3 on tomato in northwest Florida and Georgia. *Plant Dis.*76:861.

Choudhary D.K. and Johri B.N., (2009). Interaction of *Bacillus* spp.and plants _With spécial référence to induced systemic résistance (ISR). Microbiological Research. 164 (5):493-513.

Choudhary D.K., Prakash A., Wray V., and Johri B.N., (2009). Insights of the fluorescent pseudomonads in plant growth regulation. Current Science, 97, (2), pp 170-179.

Colin J.E., (1988). Antagonisme entre les pseudomonas fluorescents et plusieurs pathovars de pseudomonas syringae . Application comme méthode de lutte contre la moucheture bactérienne de la tomate. EPPO Bulletin, 18, (1), PP 47-54.

Conrad. (2002). Mémento de l'agronome. (ed). Quae. P 1045-1046.

Cook R.J., (2007). Management of resident plant growth-promoting rhizo bacteria with the cropping system : A review of experience in the US pacific Northwest . European journal of plant pathology , 119, (3), pp 255-264.

Corbaz R., (1990). Principes de phytopathologie et de lutte contre les maladies des plantes. Presses polytechniques et universitaire romandes (première édition), Lausanne, Suisse.p 286.

Corbaz R.,(1981) . Vingt ans de lutte contre le mildiou du tabac en Suisse. Annales du tabac, 17, pp 65-72.

D

Davis, R. M., Kimble, K.A., and Farrar, J.J., 1988. A third race of *Fusarium oxysporum* f. *Sp. Lycopersici*. identified in California. *Plant Dis.* 72:453.

DEHLIZ A., (2015) - Etude des potentialités des entomophages autochtones en vue de lutter contre le nouveau ravageur de la tomate *Tuta absoluta* (Meyrick) (Lep. : Gelechiidae) dans la région du sud-est algérien. Thèse Doctorat. Univ. Mostaganem, p 103.

Denton B., (2007) . Advances in Phytoremediation of Heavy Metals using plant Grow the promoting Bacteria and Fungi . Basic Biotechnology, 3, pp 1-5.

Derylo M. and Skorupska A., (1993). Enhancement of symbiotic **nitrogen fixation by vitamin-secreting fluorescent pseudomonas**. Plant and Soil , 154, pp 211-217.

Diby p., Saju K.A ., jisha J.P., Sarma Y.R., Kumar A., Anandaraj M., (2005a) . Mycolytic Enzymes produced by *Trichoderma* and *pseudomonas fluorescens* spp. Against phytophthora capsic , foot rot pathogen of the black pepper (*piper nigrum* L.). Annals of Microbiology, 55, (2), pp 129-133.

Diby P., Saju K.A., Jisha J.P., Sarma Y.R., Kumar A., Anandaraj M., (2005a). Mycolytic Enzymes produced by *Trichoderma* and *pseudomonas fluorescent* spp. Against phytophthora

capsici, foot rot pathogen of the black pepper (*Piper nigrum* L.). *Annals of Microbiology*, 55, (2), pp 129-133.

Díez MJ, Nuez F (2008) Tomato. In: Prohens J, Nuez F (eds) *Vegetables II*. Springer, New York, pp 249-323.

Díez MJ, Nuez F (2008) Tomato. In: Prohens J, Nuez F (eds) *Vegetables II*. Springer, New York, pp 249-323.

Dubos B. (2002), Maladies cryptogamiques de la vigne, champignons parasites des organes herbacés et du bois de la vigne. (Eds) Féret, Bordeaux. P 207.

E

El Guilli M., Achbani E., Fahad K., Jijakli H., (2009). Les biopesticides : Alternatives à la Lutte Chimique ? Symposium international(AGDUME), Agriculture durable en région Méditerranéenne Rabat, Maroc, pp 266-280.

Elad Y., Williamson B., Tudzynski P., Nafiz D. (2007). Botrytis: Biology, pathology and control. (Eds) Springer Science & Business Media. France. P 428.

Elmer P., Michailides TJ. (2004). Epidemiology of Botrytis cinerea in orchard and vine crops. in: Botrytis: biology, pathology and control. Elad Y., Williamson B., Tudzynski P., Delen N. Kluwer Academic Publisher, Dordrecht, The Netherlands, pp 243-272.

Equem A., Alouf J., Montagnier L., (2000). Traité de microbiologie clinique: Deuxièmes mises à jour et compléments. Piccin Nuova Libreria, Italie, p 238.

Etebarian H.R., Sholberg P.L., Eastwell K.C. and Sayler R.J., (2005). Biological control of apple blue mold with *Pseudomonas fluorescens* Can.J. Microbiol. 51, pp 591-598.

Eyquem A., Alouf J., Montagnier L., (2003). Traité de microbiologie clinique : Deuxièmes mises à jour et compléments . Piccin Nuova Libreria, Italie, p 238.

F

Farhan H.N., Abdullah B.H. and . Hameed A.T.,(2010). The biological activity of bacterial vaccine of *Pseudomonas putida* 2 and *Pseudomonas fluorescens* 3 isolates to protect sesame

crop (*Sesamum indicum*) from *Fusarium* fungi under field conditions. *Agriculture And Biology Journal of North America* , 2010, 1 (5), pp 803-811.

Fernando W.G., Dilantha N.S. and Zhang Y., (2005). Biosynthesis of antibiotics by PGPR and its relation in Biocontrol of plant diseases. In Siddiqui Z.A., (ed) PGPR: Biocontrol and biofertilization . Springer, Netherlands, p 313.

Fernando W.G., Dilantha N.S. and Zhang Y., (2005). Biosynthesis of antibiotics by PGPR and its relation in biocontrol of plant diseases. In Siddiqui Z.A., (ed) PGPR and biofertilization . Springer , Netherlands, p 313.

Fournier E., Giraud T., Albertini C. and Brygoo Y. (2005). Partition of the *Botrytis cinerea* complex in France using multiple gene genealogies, *Mycologia Journal*, vol. 97, pp 1251-1267.

G

Grattidge, R., and O'Brien, R. G., 1982. Occurrence of a third race of *Fusarium Wilt.* of tomatoes in Queensland. *Plant Dis.* 66:165-166.

Gould W.A., (1991) . Tomato production processing and technology, 3d CTI Publication, inc, Bltymort. P22-24.

Groves, JW and CA Loveland. (1953) . The connection between *Botryotinia fuckeliana* and *Botrytis cinerea*. *Mycologia* (45):415-425.

Gust A.A., Brunner F. and Nurnberger T.,(2010). Biotechnological concepts for improving plant innate immunity. *Current Opinion in Biotechnology*, 21, pp 204-210.

H

Haas D., Défago G., (2005). Biological control of soil-borne pathogens by fluorescent pseudomonads. *Nature Review of Microbiology* , 3 , pp 307-319.

Haas D., Défago G., (2005). Biological control of soil-borne pathogens by fluorescent pseudomonas. *Nature Review of Microbiology*, 3, pp 307-319.

Hass D., Défago G ., (2005). Biological control of soil-borne pathogens by fluorescent pseudomonads. *Nature Review of microbiology*, 3, pp 307-319.

Hennebert, GL. (1973). Botrytis and Botrytis-like genera. *Persoonia* (7):183-204.

Henni, J.E. 1998. Morphologie, Pouvoir pathogène et diversité génétique chez *Fusarium oxysporum* f.sp. *lycopersici*. Thèse de doctorat d'état. Université d'Oran. 171 P.

Holz, G., Coertze, S., and Williamson, B.,(2004). The ecology of Botrytis on plant surfaces, p.9-27, in: *Botrytis: biology, pathology and control*. Y. Elad, B. Williamson, P. Tudzynski and N. Delen, eds. Kluwer Academic Press, Dordrecht, the Netherlands.

I

Ibrahim Ghaleb A. M. (1990). Le cycle sexué de *Botrytis fuckeliana* (De Bary) forme parfaite de *Botrytis cinerea* (Pers.). Thèse de Doctorat de Biologie et Physiologie Végétale. Université de Lille1 - Sciences et Technologies, France, p 239.

J

Javis, W.R., Shoemaker, R.A. 1978. Taxonomic status of *Fusarium oxysporum* causing foot and root-rot of tomato. *Phytopathology*, 68 :1679-1680.

Jeannequin B., Dosba F., Amiot-Carlin MJ. (2005). Fruits et Légumes.

Johnson J. and Palleroni N.J., (1989). Desoxyribonucleic acid similarities among *Pseudomonas* species . *Int. J. Syst . Bacteriol*, (39) 230-235.

Jones, J.P., Stall, R.E., and Zitter, T.A., 1991. Compendium of tomato diseases. American Phytopathological Society, St Paul.MN.p.15.

K

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

Kloepper J.W., Leong J., Teintze M. and Schroth M.N., (1980). Enhanced plant growth by siderophores produced by plant growth-promoting rhizobacteria . *Nature*, (286) 885-886.

Krishari, M. (2005). Taxonomy of angiosperms . I. K. International Pvt. Ltd , p 908.

Kwak Y.S., Han S ., Thomashow L.S., Rice J.T ., paulitz T.C . Kim D ., Weller D .M., (2011) . saccharomyces cerevisiae Genome-Wide Mutant Screen for sensitivity to 2,4-Diacetylphloroglucinol, an Antibiotic produced by pseudomonas fluorescent..

L

Laterrot, H. ; Rouxel, F. ; Davet, p. ; Mineau, R. ; Nourrisseau, J.G. et Jonan, B.1978. La fusariose vasculaire de la tomate en France. P.H.M.Rev.Horticol 137 : 35-40.

Latour X . et Lemanceau P ., (1997). Métabolisme carboné et énergétique des pseudomonas spp. fluorescents saprophytes à oxydase positive. Agronomie , 17, pp 427-423.

Lefrère J.J. et Rouger P., (2000). Transfusion sanguine: Une approche sécuritaire. John Libbey Eurotex, France . pp 175-177.

Lepoivre P ., (2003). Phytopathologie : Bases moléculaires et biologiques des pathosystèmes et fondements des stratégies de lutte . De Boeck Université , Bruxelles, p 432.

Louvet J., (1979). General aspects of soil disinfection. In : Mulder D (ed) Soil disinfection . Elsevier Scientific, New York , pp 1-8.

Lugtenberg B. and Kamilova F., (2009). Plant-Growth-promoting rhizobacteria . Annual Review of Microbiology, 63, pp 541-556.

M

Martinez F., Blancard D., Lecomte P., Levis C., Dubos B., and Fermaud M. (2003). Phenotypic differences between vacuole and transposon subpopulations of Botrytis cinerea. European Journal of Plant Pathology, vol. 109, pp 479-488.

Menzies, C.M. 1981. Les variétés résistantes. Méthodes de lutte contre les maladies et ennemies des plantes. Edition INRA. Paris. 374 P.

Messiaen, C. M. et R. Cassini., 1968. Recherche sur les fusarioses. 4-La systématique fusarium. Ann. Epiphyt. 19,387- 454.

Messiaen, C.M. 1981. Les variétés résistantes. Méthodes de lutte contre les maladies et ennemies des plantes. Edition INRA. Paris. 374 P.

Migula W., (1894) . Ober ein neues System der Bakterien . Arbeiten aus dem bakteriologischen Institut der technischen Hochschule zu Karlsruhe , 1, pp 1-18.

Misko A.L., Germida-James J., (2002) . Taxonomic and functional diversity of pseudomonads isolated from the roots of field-grown canola . FEMS Microbiology Ecology, (42) 399-407.

Misko A.L., GermidaJames J., (2002). Taxonomic and functional diversity of pseudomonas isolated from the roots of field -grown canola . FEMS Microbiology Ecology. (42) 399-407.

N

NAIKA S., DE JEUDE J.V.L., DE GOFFAU M., HILMI M., VAN DAM B.,(2005) . La culture de la tomate production, transformation et commercialisation. 5ème édition, Fondation Agromisa et CTA, Wageningen, p 105.

NakkeeranS., Fernando W.G.D. And Siddiqui Z.A.,(2005). Plant growth promotin rhizo bacteria formulations and its scope in commercialization for the management of pests and diseases . In Siddiqui Z.A. (ed) PGPR : Biocontrol Bacterium . Verlag der Zeitschrift fur Naturforschung , 59, pp 843-848.

Nakkeran S., Fernando W.G.D. And Siddiqui Z.A., (2005). Plant growth promotion rhizobacteria formulation and its scope in commercialization for the management of pests and diseases . In Siddiqui Z.A. (ed) PGPR : Biocontrol and Biofertilization. Springer, Dordrecht, The Netherlands p 313.

Nicot Pc., Alain B. (1996). Integrated control of Botrytis cinerea on greenhouse tomatoes., In: Morris C.E., Nicot P.C., Nguyen-The C. Aerial Plant Surface Microbiology. (Eds) Springer, Boston, MA, pp 169-189.

O

Ozenda, P., 1990. Les organismes végétaux, tome 1: Végétaux inférieurs. Masson. 220p

P

Palleroni N.J., (1983). Thé taxonomy of bacteria . BioScience ,33, pp 370-377.

Palleroni N.J., (1993).pseudomonas classification. A new case history in the taxonomy of gram-negative bacteria . Antinie van Leeuwenhoek , 64 (3-4): 231-251.

Pande S, Singh G, narayana rao J, Bakr MA, chaurasia PCP, Jashi S, Jonason C, Singh SD, Kumar J, Rahman M et Gowda CLL . (2001). Integrated management of Botrytis cinerea gray mold of chickpea. International crops research. Institute for the semi arid tropics. India. P 34.

Park K.H., Lee C.Y., Son H.J ., (2009). Mechanism of insoluble phosphate solubilization by pseudomonas fluorescent RAF15 isolated from ginseng rhizosphere and its plant growth-promoting activities . Lett Appl Microbiol, 49 (2), pp 222-228.

Pesson, P. et Louveaux, J.,(1984). Pollinisation et production végétales. Ed. INRA. p 663.

PHILOUZE J.,(1993) - Les tomates. INRA, Station d'Amélioration des plantes maraîchères, Montfavet, N° 6-7.

Polese J.M.,(2007). La culture de tomate. Ed Artémis. p 95.

R

Ramette A., Frapolli M., Défago G., Moenne-Loccoz Y., (2003). Phylogeny of HCN synthase-encoding hcnBC genes in biocontrol fluorescent pseudomonads and its relationship with host plant species and HCN synthesis ability . Mol plant Microbe Interact, 16 (6), pp 525-535.

Rey Y et Costes C. (1965). La physiologie de la tomate, étude bibliographique. INRA. P111.

Romanazzi G., and Erica F. (2014). Botrytis cinerea (Gray Mold). In Postharvest Decay.(Eds) Elsevier Inc. Ancona, Italy, pp 131-146.

S

Shankara N., Van lidt de jeude J., de Goffau M., Hilmi M., Van Dam B., Florijin., A. (2005). La culture de la tomate : production, transformation et commercialisation. 5^{ème} (ed).Foundation Agromisa et CAT, Wageningen.

Sharma, OP. (2009). Plant taxonomy. Tata MC Graeu Hill, 2^{ème}édition .39_40.

Siddiqui I.A., Haas D., and Heeb S., (2005). Extracellular protease of pseudomonas fluorescens CHAO, a biocontrol factor with Activity against the Root-Knot Nematode Meloidogyne incognita. Applied And Environmental Microbiology, 71, (9), pp 5646-5649.

Siddiqui I.A., ShahidShaukat S., Imtiazhussain S., Khan A., (2006). Role of cyanide production by pseudomonasfluorescens CHAO in the suppression of root-knotnematode, Meloidogyne javanica in tomato. World journal of microbiology&Biotechnology, 22 (6), pp 641-650.

Singh G. (2004) . Plant systematics : an integrated approach . Science pub Inc ; 2^{ème} édition. P 95.

Snyder W.C and Hans H.N., 1940 *Fusarium oxysporum f. sp. lycopersici*. (Sacc.) Prepared by Mui-Yun Wong.PP728 Soilborne Plant Pathogen Class Project, spring.

Staats M., van Baarlen P. et van Kan J. A.(2005) . Molecular phylogeny of the plant pathogenic genus Botrytis and the evolution of host specificity. Molecular Biology and Evolution. 22, 333-346.

Stall, R.E., 1961. Development of *Fusarium wilt*. on resistant varieties of tomato caused by a strain different from race 1 isolates of *Fusarium oxysporum f.sp.lycopersici*. *Plant Dis. Rep.* 45:12-15.

Sturz A.V., Christie B.R., (2003). Beneficial microbial allelopathies in the root zone: the management of soil quality and plant disease with rhizobacteria. Soil & Tillage Research, 72, pp 107-123.

Suty L., (2010). La lutte biologique : Vers de nouveaux équilibres écologiques Sciences en partage. Editions Quae, paris , p 328.

T

Tello-Marquina J. and Alabouvette C.C., (1984). Observations sur la persistance dans le sol des microconidies de *Fusarium oxysporum*. *Agronomie*, 4, (9), pp 885-890.

V

Valenzuela-Ureta, J.C., Lawn, D.A., Heisey. R. F. and Zamudio-Guzman.V., 1996. First report of *Fusarium Wilt* race 3, caused by *Fusarium oxysporum f.sp.lycopersici* , of tomato in Mexico. *Plant Dis* 80:105.

Van Loin L.C., Bakker P.A.H.M., and . pieterse C.M.J., (1998). Systemic résistance induced by rhizosphère bacteria . *Annu. rev. Phytopathol* , 36, pp 453-483.

Vijayan K.K., Bright Singh I.S., Jayaprakash N.S. Alavandi S.V., Somnath Pai S., Preetha R., Rajan J.J.S., Santiago T.C., (2006). A brackishwater isolate of pseudomonas PS-102, a potential antagonistic bacterium against pathogenic vibrios in penaeid and non-penaeid rearing systems. *Aquaculture* , 251, pp 192-200.

Volin, R.B., and Jones, Jones, J.P., 1982. New races of *Fusarium wilt* of tomato in Florida and sources of resistance. *Proc. Flo. State Hortic. Soc.* 95:268-270.

W

Walker, J.C. 1971 *Fusariumwilt* of tomato. Monogr. 6. American phytopathological Society, St. Paul, MN.

Weller D.M., (2007). The nature and Application of Biocontrol Microbes III: pseudomonas spp. *Pseudomonas Biocontrol Agents of Soilborne pathogène: Looking Back Over 30 Years* . *phytopathology* , 97, (2): 250-256.

Whipps J.M.,(2001). Microbial interactions and Biocontrol in the rhizosphère. *Journal of Experimental Botany* 52, pp 487-511.

Williamson B, Tudzynsk B, Tudzynski P and Van Kan Jal, (2007) . *Botrytis cinerea*: the cause of grey mould disease. *Molecular Plant Pathology*, 8, 561-80.

Y

Yamagushi M ., (1983) .World vegetables, principles production and nutritive values, Ellis horwood limited , westport. P 156.

Yamamoto , I., Komada, H., Kuniyasu, K., Saito, M., and Ezuka, A. 1974. A new race of *Fusarium oxysporum* f.sp. *lycopersici* inducing root rot of tomato. Proc. Kansai. Plant prot. Soc. A6 :17-29.

Z

Zahir Z.A., Arshad M. and Frankenberger W.T., Jr. (2004). Plant growth promoting rhizobacteria: perspectives and application in agriculture. *Advances in Agronomy*, 81, pp 96-168.

Annexes

Annexe

Annexe 1 : Préparation des milieux

1. Milieu PDA

Le milieu PDA a été utilisé pour la purification et la conservation des isolats de *Fusarium oxysporum f.sp. lycopersici* et *Botrytis cinerea*. Il est préparé comme suit :

1. Peser de 250 g de pomme de terre épluchée, lavée et découpée en petits cubes de 12 mm.
2. Faire bouillir la pomme de terre dans l'eau pendant 20 minutes puis l'écraser pour obtenir une purée qui est filtrée à l'aide d'une mousseline.
3. Faire dissoudre 20 g de glucose et autant d'agar-agar, en homogénéisant la solution
4. Ajuster le mélange obtenu en ajoutant de l'eau distillée pour obtenir un volume final d'un litre.
5. Stériliser le mélange dans une auto-clave à 125 °C, pendant 20 minutes, en tenant compte que les récipients ne doivent pas être remplis à ras et
6. les bouchons doivent être dévissés avant la stérilisation.
7. Près de bec Bunsen, couler le milieu obtenu dans des boîtes de Pétri.



Figur 1 : Milieu PDA

2. Milieu King B

La gélose King B est utilisée pour la caractérisation des *pseudomonas* par la mise en évidence de la production de fluorescéine (pyoverdine).

Préparation

1. Dissoudre 38 grammes dans 1 litre d'eau pure.
2. Chauffer sous agitation fréquente et laisser bouillir 1 minute pour dissoudre complètement la suspension.
3. Répartir en tubes.
4. Autoclave 15 minutes à 21 °C. Laisser refroidir avec une perte égale au culot.

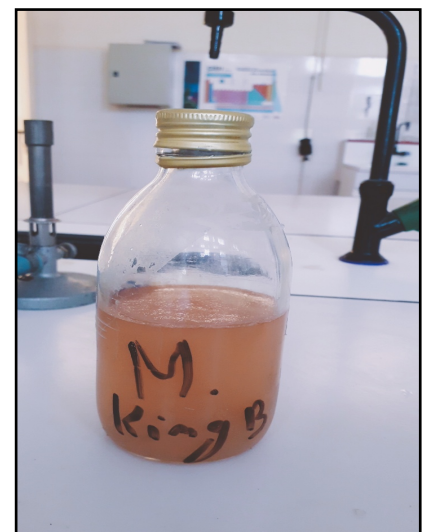


Fig 2 : Milieu King

Annexe

3. Milieu King A

La gélose King A est utilisée pour la caractérisation des *Pseudomonas* par la mise en évidence de la production de pyocyanine.

Préparation

1. Dissoudre 46,4 grammes dans 1 litre d'eau pure.
2. Chauffer sous agitation fréquente et laisser bouillir 1 minute pour dissoudre complètement la suspension.
3. Répartir en tubes.
4. Autoclaver 15 minutes à 121

Annexe 2 : Croissance mycélienne de *Fusarium Oxysporum lycopersici* sur les milieux (PDA), (King B), (PDA et King B)

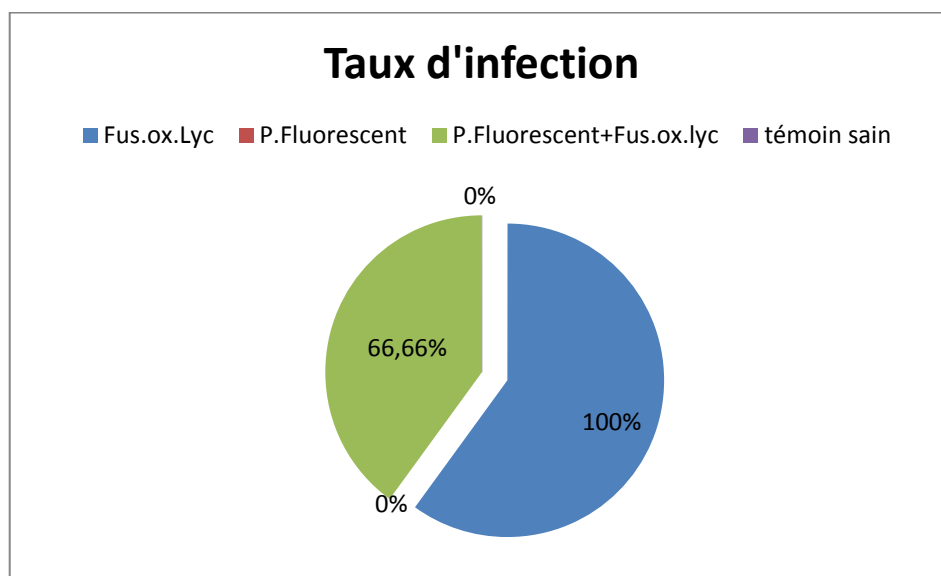
	Témoin	PDA	King B	PDA+King B
1	5	0	0	0
2	10,5	2,66	1,33	2
3	14	4,66	3,33	5
4	18	4,66	16,33	12,33
5	23,5	5	16,33	15,66
6	28,5	5	16,33	15,66
7	33,5	5	16,33	15,66
8	33,5	5	16,33	15,66
9	33,5	5	16,33	15,66
10	33,5	5	16,33	15,66

Annexe

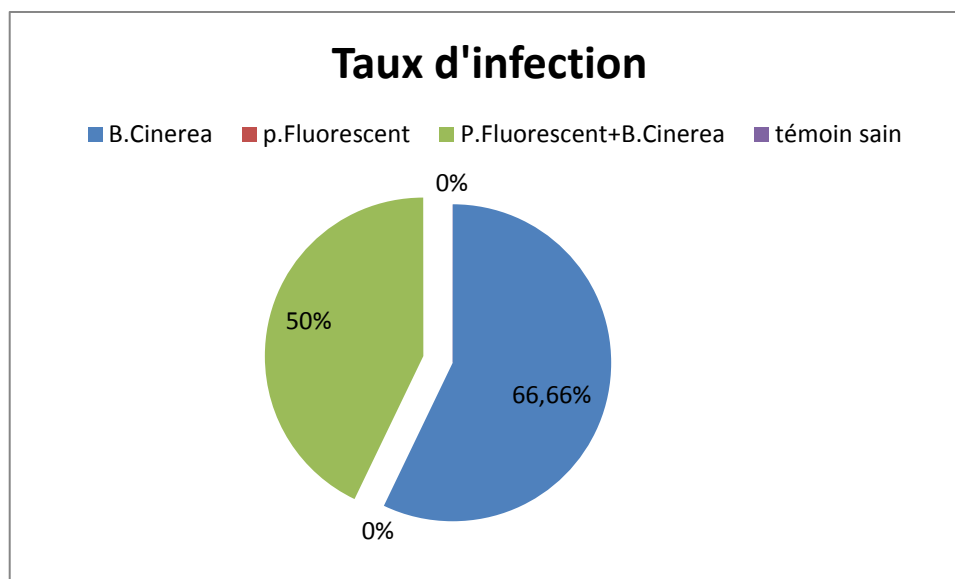
Annexe 3 : Croissance mécyliène de *Botrytis Cinerea* sur les trois milieux (PDA), (King B), (PDA+King B).

	1	2	3	4	5	6	7	8
témoin	9	17,5	25,5	28,5	35	39	43	43
PDA	0	2,66	4,66	5	6	6	6	6
King B	0	2,33	6,66	8	8,66	8,66	8,66	8,66
PDA+King B	0	0,2	4,33	5	5	5	5	5

Annexe 4 : Répartition en pourcentage de Taux d'infection de *Fus.ox. lyc*



Annexe 5 : Répartition en pourcentage de Taux d'infection de *B.Cinerea*



Résumés

ملخص

تعتبر الطماطم من أهم الخضراوات استهلاكاً في العالم بعد البطاطا، حيث تزرع تقريباً في جميع المناخات بمساحة تقدر بحوالي 3 مليون هكتار ، هذه الزراعة تغطي ثلثي مساحة زراعة الخضراوات.

من بين الأمراض الفطرية التي تؤثر على هذا المحصول مرض الذبول الوعائي الذي يسببه فطر *Fusarium oxysporum lycopersici* ومرض التعفن الرمادي الذي يسببه فطر *Botrytis cinerea* . هذه الأمراض تؤدي إلى خسارة ضخمة في المحصول في أحسن شروط تطور المرض.

اختبار عزلة من *pseudomonas fluorescents* مخبرياً في ثلاثة أوساط زراعية (King), (PDA), (PDA et King B)-B، وحلقياً في النبات من خلال المواجهة المباشرة مع *Byotrtiscinerea* و *Fusariumoxysporumlycopersici*

أظهرت النتائج أن عزلة *pseudomonas spp.fluorescent* لها نشاط عدائي في المواجهة المباشرة والتي خفضت بشكل كبير من نمو الفطريات الممرضة مع اختلاف النسبة المئوية لتنشيط نمو الميسيليوم حيث بلغت 90,48% مع *Fus.oxyl.* و 89,96 مع *B.Cinerea*.

أما حلقياً فإن معالجة الشتلات لصنف الطماطم بـ *pseudomonasapp.fluorescent* أدى إلى خفض نسبة المرض 66,66% عند *B.Cinerea* ونسبة 63,75% عند *Fus.oxyl.* كما قللت من نسبة الإصابة مقارنة بالشاهد.

الكلمات المفتاحية : الطماطم، المواجهة المباشرة، *Fusarium oxysporum lycopersici*، *pseudomonasspp. Fluorescent*، *Byotrtiscinerea*، المكافحة الحيوية ، الخصوم الفطرية .

Abstract

Tomato is the most consumed vegetable in the world after the potato. It is grown in almost all latitudes with an area of about 3 million hectares. Its cultivation occupies nearly a third of the world's surface devoted to vegetables. Among fungal diseases that affect this crop, Vascular wilt disease caused by (*Fusarium oxysporum f. lycopersici*.), and gray rot caused by (*Botrytis cinerea*.) These diseases generate yield losses in tomato cultivation in conditions optimal development of the pathogen.

The results show that the *Pseudomonas fluorescents* isolate is an important antagonistic activity by direct confrontation in vitro in three culture media(PDA),(King B), (PDA+King B), where it is significantly inhibited the mycelia growth of all pathogens tested with 90,48% inhibition percentage with *Fusarium oxysporum f. sp. lycopersici* and 89,96% with *Bot.* For this purpose, the preliminary test of antagonism in vitro showed significant inhibitions and variable mycelia growth, according to fungus and in the culture media.

In vivo treatment of seedlings of the tomato variety of *Pseudomonas fluorescents* reduced the percentage incidence of *Botrytis cinerea* 66,66 % and 63,75 % in *Fusarium oxysporum f. sp. lycopersici*, it also reduced the infection rate compared to the control.

Key-words: Tomato; *Pseudomonas fluorescents* ;*Fusarium Oxysporum f. sp. glycopersici*; *Botrytis cinerea*; biological control; Antagonism.

Résumé

La tomate est le légume le plus consommé dans le monde après la pomme de terre. Elle est cultivée sous presque toutes les latitudes avec une superficie d'environ 3 millions d'hectares. Sa culture occupe près du tiers des surfaces mondiales consacrées aux légumes. Parmi les maladies fongiques qui touche cette culture, fusarioses causée par (*Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici*.) , et la pourriture grise causée par (*Botrytis cinerea*.), ces maladies engendrer des pertes de rendements considérables sur la culture de la tomate en condition optimales de développement du pathogène.

Un isolat de *Pseudomonas fluorescents* est confronté *in vitro* dans trois milieux (PDA), (King B) et (mixte entre PDA+King B), et *in vivo* avec *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici*. et *Botrytis cinerea*.

Les résultats montrent que l'isolat de *Pseudomonas fluorescents* est une activité antagoniste importante par confrontation directe où il est inhibé significativement la croissance mycélienne de tous les agents pathogènes testés de pourcentage d'inhibition 90,48 % avec *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* et 89,96 % avec *Bot* dans le milieu mixte. A cet effet, l'essai préliminaire d'antagonisme *in vitro* a montré des inhibitions appréciables et variables de la croissance mycélienne, selon les souches pathogènes et selon les milieux de culture.

in vivo le traitement des plantules de la variété de la tomate de *Pseudomonas fluorescents* a réduit la pourcentage de l'incidence de maladie 66,66% chez le *Botrytis cinerea*. et de 63,75% chez *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici*. Il a également réduit le taux infection par rapport au témoin.

Mots-clés tomate ; *Pseudomonas fluorescents*; *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici*. ; *Botrytis cinerea*. ; lutte biologique ; Antagonisme.