

Université Abdelhamid Ibn
Badis-Mostaganem
Faculté des Sciences de la
Nature et de la Vie



جامعة عبد الحميد بن باديس
مستغانم
كلية علوم الطبيعة و الحياة

DEPARTEMENT D'AGRONOMIE

MÉMOIRE DE FIN D'ÉTUDES

Présenté par

SEKKAL Ibrahim & LABGAA Yacine

Pour l'obtention du diplôme de

MASTER EN AGRONOMIE

Spécialité : PROTECTION DES CULTURES

THÈME

**Contribution à l'étude *in vitro* et *in situ* de
l'action antagoniste de *Pseudomonas* spp.
fluorescents sur *Verticillium dahliae* Kleb.,
agent de la verticilliose de l'olivier
(*Olea europea* L.)**

Président : M^{me}. Saiaih F.

Encadreur : M. Mahiout D.

Examineur : M^{me} Benouarad F.

M.C.B. Univ. Mostaganem

M.A.A. Univ. Mostaganem

M .A.B. Univ. Mostaganem

Remerciements

Nos remerciements vont à Dieu, le tout puissant, le miséricordieux, qui nous a donné la force et la patience pour mener à terme ce travail,

Nous remercions Mme SAIAH, maître de conférences à l'université de Mostaganem, pour avoir accepté de présider ce jury, et de nous avoir prodigué autant de conseils durant toute l'année universitaire,

Nous tenons à remercier Monsieur MAHIOUT Djamel, maître assistant A à l'université de Mostaganem, qui a accepté de nous encadrer et à diriger ce travail de recherche. Nous lui sommes très reconnaissants de nous avoir confié un sujet aussi passionnant. Son enthousiasme, son optimisme et sa bonne humeur nous ont soutenus pendant les périodes de doute.

Nous remercions Mme Benouarad, maître de conférences à l'université de Mostaganem, pour avoir accepté d'examiner ce travail.

Enfin, je remercie tout le personnel du laboratoire de recherche de protection des végétaux, particulièrement, madame Fadila Yakhlaf et monsieur Nabil Berrahal ingénieurs agronomes, pour leur accueil, leur aide et leur accompagnement durant toute la durée de travail de laboratoire.

Dédicaces

Nous dédions ce modeste travail à toutes nos familles et nos amis chacun par son nom, pour leurs aides et leurs soutiens moral.

Nous leurs dédions ce mémoire, en témoignage de notre reconnaissance.

Liste des tableaux :

Tableau 1 : Maladies bactériennes de l'olivier _____ **07**

Tableau 2 : Maladies fongiques de l'olivier _____ **08**

Tableau 3 : Maladies d'origine virale de l'olivier _____ **08**

Tableau 4 : Protection des plantes contre les différentes maladies telluriques, assurée par des souches de *Pseudomonas* spp. fluorescentes (Lemanceau, 1992) _____ **21**

Tableau 1 : Origine des isolats de *Verticillium dahliae* et codification adoptée _____ **26**

Tableau 2 : Origine des souches de *Pseudomonas* fluorescents et codification adoptée _____ **32**

Liste des figures

Figure 1 : Cycle infectieux de <i>Verticillium dahliae</i> sur olivier (originale, 2016).	13
Figure 1 : Séchage des échantillons de sol	26
Figure 2 : Dilutions <i>Pseudomonas</i> spp.	27
Figure 3 : Une colonie de <i>Pseudomonas</i> après purification	27
Figure 4 : Conservation des <i>Pseudomonas</i> sur milieu incliné	29
Figure 5 : Rajeunissements d'une série de souches de <i>Pseudomonas</i> spp. fluorescents (à gauche, témoin contenant le bouillon nutritif sans la bactérie).	29
Figure 4 : dispositif du test de confrontation	30
Figure 7 : Observation microscopique de <i>V. dahliae</i> (originale, 2016).	30
Figure 8 : Test de Gram	31
Figure 9 : Test oxydase	31
Figure 10 : Test catalase	31
Figure 11 : Test Hugh Leifson	32
Figure 12 : Test de mobilité	32
Figure 13 : Colonies de <i>V. dahliae</i> témoins (S1, S2 et S3) après une semaine d'incubation	33
Figure 14 : Colonies de <i>V. dahliae</i> témoins (S1, S2 et S3) après 10 jours d'incubation	33
Figure 15 : Colonies de <i>V. dahliae</i> témoins (S1, S2 et S3) après 15 jours d'incubation	33
Figure 16 : Colonies de <i>V. dahliae</i> (S1) confrontées avec la bactérie R1, R2 et R3, après une semaine d'incubation	34
Figure 17 : Colonies de <i>V. dahliae</i> (S1) confrontées avec la bactérie R1, R2 et R3, après 10 jours d'incubation	34
Figure 18 : Colonies de <i>V. dahliae</i> (S1) confrontées avec la bactérie R1, R2 et R3, après 15 jours d'incubation	34
Figure 19 : Effet antagoniste des <i>Pseudomonas</i> spp. fluorescents sur la croissance mycélienne du <i>Verticillium dahliae</i> (S1)	35
Figure 20 : Colonies de <i>V. dahliae</i> (S2) confrontées avec la bactérie R1, R2 et R3, après une semaine d'incubation	36
Figure 21 : Colonies de <i>V. dahliae</i> (S2) confrontées avec la bactérie R1, R2 et R3,	36

après 10 jours d'incubation

Figure 22 : Colonies de *V. dahliae* (S2) confrontées avec la bactérie R1, R2 et R3, **36**

après 15 jours d'incubation

Figure 23 : Effet antagoniste des *Pseudomonas* spp. fluorescents sur la croissance mycélienne du *Verticillium dahliae* (S2) **37**

Figure 24 : Colonies de *V. dahliae* (S3) confrontées avec la bactérie R1, R2 et R3, **38**
après une semaine d'incubation

Figure 25 : Colonies de *V. dahliae* (S3) confrontées avec la bactérie R1, R2 et R3, **38**
après 10 jours d'incubation

Figure 26 : Colonies de *V. dahliae* (S3) confrontées avec la bactérie R1, R2 et R3, **38**
après 15 jours d'incubation

Figure 27 : Effet antagoniste des *Pseudomonas* spp. fluorescents sur la croissance mycélienne du *Verticillium dahliae* (S3) **39**

Figure 1 : Tomate au stade 5 feuilles **42**

Figure 2 : Dispositif expérimental **43**

Figure 3 : Plantes de tomate après une semaine d'inoculation (T, témoin ; P, **45**
Pseudomonas seul ; P (S1, S2, S3), plantes bactériées et inoculées avec l'un des
isolats de *V. dahliae* ; V (S1, S2, S3), plante inoculée seulement avec l'un des isolats
de *V. dahliae*).

Figure 4 : T : Plante témoin ; P : Plante bactériée avec *Pseudomonas* (une **45**
semaine après le test)

Figure 5 : Plantes bactériées et inoculées avec l'un des isolats de *V. dahliae* (S1, **45**
S2 ou S3), après une semaine d'inoculation.

Figure 6 : Plantes inoculées avec l'un des isolats de *V. dahliae* (S1, S2 ou S3), **45**
après une semaine d'inoculation.

Figure 7 : Plantes de tomate après 15 jours d'inoculation (T, témoin ; P, **46**
Pseudomonas seul ; P (S1, S2, S3), plantes bactériées et inoculées avec l'un des
isolats de *V. dahliae* ; V (S1, S2, S3), plante inoculée seulement avec l'un des isolats
de *V. dahliae*).

Figure 8 : T : Plante témoin ; P : Plante bactériée avec *Pseudomonas* (15 jours **46**
après le test)

Figure 9 : Plantes bactériées et inoculées avec l'un des isolats de *V. dahliae* (S1, S2 ou **46**
S3), après 15 jours d'inoculation

- Figure 10 :** Plantes inoculées avec l'un des isolats de *V. dahliae* (S1, S2 ou S3), après 15 jours d'inoculation. **46**
- Figure 11 :** Plantes de tomate après 21 jours d'inoculation (T, témoin ; P, *Pseudomonas* seul ; P (S1, S2, S3), plantes bactériées et inoculée avec l'un des isolats de *V. dahliae* ; V (S1, S2, S3), plante inoculé seulement avec l'un des isolats de *V. dahliae*). **47**
- Figure 12 :** T : Plante témoin ; P : Plante bactériée avec *Pseudomonas* (21 jours après le test) **47**
- Figure 13 :** Plantes bactériées et inoculée avec l'un des isolats de *V. dahliae* (S1, S2 ou S3) après 21 jours d'inoculation. **47**
- Figure 14 :** Plantes inoculées avec l'un des isolats de *V. dahliae* (S1, S2 ou S3), après 21 jours d'inoculation **47**
- Figure 15 :** Sévérité de la maladie des plantes de tomate due à *Verticillium dahliae*, exprimée en pourcentage d'altération foliaire, en présence de *Pseudomonas* sp. (H1). **48**

Liste des abréviations

BN : Bouillon nutritif

Cm : Centimètre

D : Defoliant

f. sp. : Formae speciale

KB : King B

ml : Millilitre

mm : Millimètre

N.D : Non défoliant

P (S1, S2, S3) : Plantes bactérisées et inoculées avec l'un des isolats de *V. dahliae*

P : *Pseudomonas* seul

PDA : Pomme de terre agar-agar

P.F : *Pseudomonas* fluorescent

PGPR : Plant growth promoting Rhizobacteria

Rpm : Round par minute

T : Témoin

UFC : Unité formant colonie

UV : Ultra violet

V (S1, S2, S3) : Plantes inoculées seulement avec l'un des isolats de *V. dahliae*

V. dahliae : *Verticillium dahliae*

Var. : Variété

µm : Micromètre

Résumé

La verticilliose, causée par *Verticillium dahliae* Kleb., est l'une des maladies vasculaires qui occasionne le plus de dégâts sur l'oléiculture mondiale.

L'inefficacité de la lutte chimique contre le champignon responsable de la maladie a suscité l'intérêt pour d'autres méthodes alternatives de lutte (Blok *et al.*, 2000).

Parmi celles-ci, les bactéries dites (PGPR) représentent une voie très prometteuse, plus particulièrement les bactéries du genre *Pseudomonas*, capables de stimuler la croissance des plantes et de s'opposer à l'activité d'agents pathogènes.

Nous avons isolé 18 souches de *Pseudomonas* fluorescentes de différents sols rhizosphériques à partir de trois régions du nord algérien : M'chedallah (W. Bouira), Tazmalet (W. Bejaia) et Oued rhiou (W. Relizane).

Une étude *in vitro* est réalisée, en vue d'évaluer le pouvoir antagoniste des souches bactériennes sélectionnées sur *Verticillium dahliae*.

Les souches de *Pseudomonas* spp. sélectionnées, plus particulièrement les souches H1, H4, M1, M5 ont montré un effet antagoniste considérable sur la croissance mycélienne des colonies de trois isolats du pathogène.

L'une des bactéries, en l'occurrence (H1), est de nouveau sélectionnée en vue de vérifier ses performances antagonistes à empêcher l'installation de la maladie via un test *in vivo* sur des plants de tomate.

Les plantes de tomate bactérisées puis inoculées avec l'un ou l'autre des isolats de *V. dahliae* se sont montrées plus résistantes à la maladie ; un retard a été constaté dans l'apparition des symptômes. La progression de ces derniers a été plus lente, et moins intense chez les plantes bactérisées avec H1 par rapport aux plantes inoculées seulement avec le pathogène.

Mots clés : Oliver, *Verticillium dahliae*, *Pseudomonas* fluorescents, antagonisme, Lutte biologique.

Sommaire

Introduction générale	01
Chapitre I – Partie bibliographique	
I. L’olivier	03
1. Classification et caractères botaniques	03
2. Origine et historique de la culture	03
3. Ecologie et répartition géographique	04
4. Exigences agro-écologiques	04
5. Importance socio-économique	05
6. L’oléiculture algérienne	06
7. Variétés cultivés en Algérie	07
8. Les principales Maladies de l’olivier	09
9. Les maladies vasculaires de nature fongique	09
II. La verticilliose de l’olivier	10
1. Classification	10
2. Morphologie et caractéristiques	10
3. Hôtes et cycle épidémique de la verticilliose	11
4. Mécanismes de transmission et dispersion	13
5. Importance économique et écologique	14
6. Types de symptômes sur l’olivier	14
7. Méthodes de lutte contre la maladie	15
7.1 Choix des sols sains	15
7.2 Désinfection des sols et autres interventions pour réduire l'inoculum fongique	16
7.3 Lutte variétale et génétique	17
7.4 Sol suppressif et la lutte microbiologique	18
III. Les bactéries Pseudomonas	19
1. Caractères descriptifs	19
2. Classification	19
3. Effets bénéfiques de Pseudomonas	20
3.1 Stimulation de croissance des plantes	21
3.2 Contre les maladies d’origine tellurique	21

3.3 Autres effets bénéfiques	22
4. Mécanismes responsables des effets bénéfiques	23
4.1 L'antagonisme par antibiose	23
4.2 La compétition	23
4.3 Amélioration de l'alimentation minérale de la plante	24
4.4 Production microbienne de substances de croissance	24
4.5 Induction de résistance de la plante	24

Chapitre II - Etude *in vitro* de l'action antagoniste des *Pseudomonas* spp. fluorescents sur *Verticillium dahliae* 26

Introduction	26
I. Matériel et méthodes	26
I.1 Matériel fongique	26
I.2 Matériel bactérien	26
I.2.1 échantillonnage des <i>Pseudomonas</i> spp. fluorescents	26
I.2.2 Isolement des <i>Pseudomonas</i> spp.	27
I.2.3 Purification des <i>Pseudomonas</i> spp. fluorescents	27
I.2.4 Identification biochimique des <i>Pseudomonas</i>	27
I.2.5 Préparation des cultures de PF	29
II. Tests de confrontation directe	30
III. Résultats	30
IV. Discussion et conclusion	39

Chapitre III - Etude *in situ* de l'action antagoniste d'une bactérie *Pseudomonas* sur *Verticillium dahliae* 42

Introduction	42
I. Matériel et méthodes	42
I.1 Matériel	42
I.1.1- Matériel fongique	42
I.1.2- Matériel bactérien	42
I.1.3- Matériel végétal	42
I.2 Méthodes	43
I.2.1 Evaluation de l'indice de la maladie des plantules de tomate cultivées en	43

présence de la bactérie antagoniste H1	
I.2.1.1 Bactérisation du sol et semis des graines	43
I.2.1.2 Protocole expérimental	43
I.2.1.3 Notation de la maladie	44
II. Résultats	44
III. Discussion et conclusion	48
Conclusion générale	51
Références bibliographiques	53
Annexe	68

Introduction générale

Le sol n'est pas simplement le support dans lequel les plantes s'enracinent et puisent les éléments nutritifs indispensables à leur développement. C'est aussi un fantastique réservoir de microorganismes. Il a été estimé qu'un gramme de sol contenait de 10^{10} à 10^{11} bactéries (Horner-Devine *et al.*, 2003), de 6000 à 50000 espèces bactériennes (Curtis *et al.*, 2002) et jusqu'à 200 mètres d'hyphes fongiques (Leake *et al.*, 2004). De plus, les microorganismes jouent un rôle clé et influencent un grand nombre des processus des différents écosystèmes incluant l'acquisition des éléments nutritifs pour les plantes (Smith et Read, 2008 ; Sprent, 2001), les cycles géochimiques comme celui de l'azote (Kowalchuk et Stephen, 2001) ou du carbone (Högberg *et al.*, 2001) et la structure du sol (Rillig et Mummey, 2006). Cependant, alors qu'il est largement reconnu que les microorganismes jouent un rôle indispensable dans les cycles géochimiques, leur impact sur la croissance et la santé des plantes est encore mal compris.

Depuis plus d'un siècle, la compréhension des interactions plantes-microorganismes dans la rhizosphère a suscité l'intérêt de nombreux chercheurs.

La rhizosphère est le siège de nombreuses interactions entre les plantes et les divers microorganismes associés. En effet, la plante, via les exsudats racinaires, met à disposition de la microflore des substrats, sucres et acides aminés, qui favorisent le développement des microorganismes, qu'ils soient pathogènes ou bénéfiques. Les interactions complexes entre ces populations microbiennes et le sol déterminent la santé de ce dernier.

La densité des populations de la microflore associée aux racines est significativement plus élevée dans la rhizosphère que dans le sol nu (Curl et Truelove, 1986 ; Lemanceau et Heulin, 1998 ; Morgan *et al.*, 2005 ; van Loon, 2007). Ces modifications quantitatives de la microflore, ou 'effet rhizosphère', s'accompagnent également de modifications qualitatives. En effet, la diversité et la structure des communautés microbiennes dans la rhizosphère (Cardon et Gage, 2006 ; Garbeva *et al.*, 2008 ; Kowalchuk *et al.*, 2010 ; Latouret *et al.*, 2009 ; Lemanceau *et al.*, 1995) et leur activité métabolique (Bending, 2003 ; Nannipieri *et al.*, 2008 ; Pinton *et al.*, 2001) diffèrent de celles du sol nu. Les populations aptes à percevoir les variations de l'environnement rhizosphérique et à adapter leur physiologie, tirent profit de la perturbation et sont favorisées. Les composés organiques exsudés par les plantes dans la

rhizosphère activent différents groupes de microorganismes et augmentent leur prolifération (Bais *et al.*, 2006).

La microflore rhizosphérique est naturellement constituée d'un assemblage complexe de microorganismes procaryotes et eucaryotes (Cardon et Gage, 2006 ; Kent et Triplett, 2002). Parmi ces microorganismes, certains sont présents dans la rhizosphère sans que leur influence sur le développement des végétaux ne soit connue (microorganismes commensaux), certains sont favorables aux plantes (mutualistes) alors que d'autres ont des effets délétères sur les plantes (parasites et phytopathogènes). La croissance, la santé des plantes et leur diversité sont donc influencées par la diversité des populations microbiennes présentes dans la rhizosphère (Bloemberg et Lugtenberg, 2001 ; Lemanceau, 1992 ; van der Heijden *et al.*, 2008 ; Weller *et al.*, 2002 ; Whipps, 2001). Les

Parmi les microorganismes bénéfiques, on trouve les champignons mycorhiziens, qui entretiennent des relations très intimes avec la plante. Ils apportent à la plante des éléments nutritifs, essentiellement le phosphore, utiles à sa croissance, et d'autre part ils renforcent ses défenses naturelles vis-à-vis de stress d'origine biotique ou abiotique. D'autres microorganismes, en particulier les bactéries du genre *Bacillus* ou *Pseudomonas* qualifiées de PGPR (Plant Growth-Promoting Rhizobacteria) (Kloepper et schroth, 1978), sont également capables de stimuler la croissance des plantes et de s'opposer à l'activité d'agents pathogènes. De nombreuses bactéries sont capables d'améliorer la santé des plantes en limitant la croissance saprophyte des microorganismes phytopathogènes. Certaines sont utilisées en agriculture comme agents de lutte biologique (Bloemberg et Lugtenberg, 2001 ; Whipps, 2001).

Les microorganismes pathogènes sont connus pour pouvoir induire chez les plantes des mécanismes de défense, par l'intermédiaire de la résistance systémique acquise (SAR pour systemic acquired resistance) qui protège les plantes contre les attaques ultérieures d'autres pathogènes. Certaines bactéries sont capables d'avoir un effet protecteur en induisant elles aussi, des mécanismes de défense des plantes *via* la résistance systémique induite (ISR pour induced systemic résistance ; van Loon, 2007) permettant aux plantes de mieux se protéger contre l'attaque éventuelle de pathogènes. D'autres bactéries peuvent contrôler la croissance des pathogènes par la compétition pour les éléments nutritifs, comme par exemple, la compétition pour le carbone (Lemanceau *et al.*, 1988) et la compétition pour le fer dont la

biodisponibilité dans le sol est très faible (Lemanceau *et al.*, 2009). L'antagonisme microbien, lié à la production de métabolites ayant des propriétés antibiotiques, est également un mécanisme par lequel les bactéries rhizosphériques protègent les plantes contre les microorganismes phytopathogènes (Mazurier *et al.*, 2009 ; van Loon, 2007)

La lutte contre les agents pathogènes d'origine tellurique a toujours été difficile, elle a pendant longtemps fait appel à des produits biocides de désinfection des sols tels que la chloropicrine et le bromure de méthyle qui étaient extrêmement dangereux pour l'homme et qui détruisaient indistinctement tous les organismes qu'ils soient nuisibles ou utiles aux cultures. Fort heureusement ces produits ont été interdits, mais cela ne règle pas le problème de la lutte contre les maladies d'origine tellurique.

Aujourd'hui, de nouvelles perspectives s'ouvrent en phytopathologie dans le domaine de la lutte microbiologique contre les maladies vasculaires, une lutte qui représente une alternative très prometteuse pour assurer une protection phytosanitaire performante et durable.

Notre travail consiste à rechercher des bactéries *Pseudomonas* spp. au niveau de la rhizosphère de l'olivier et à tester leur action antagoniste sur *Verticillium dahliae*.

I. L'olivier

L'olivier (*Olea europaea* L.) appartient à la famille des oléacées. Il en existe deux sous espèces :

O.europaea var. *europaea* (olivier commun),

O.subsp. europaea var. *sylvestris* (Mill.) Lehr (oléastre, ou olivier sauvage).

I.1. Classification et caractères botaniques

L'olivier est classé par (Maillard, 1975) comme suit :

- Embranchement : Phanérogames
- Sous Embranchement : Angiospermes
- Classe : Dicotylédones
- Famille : Oléacées
- Genre : *Olea*
- Espèce : *Olea europea* L.

Il s'agit d'une espèce pérenne, à feuilles persistantes, caractérisée par une longue longévité (jusqu'à 2000 ans ; Lewington et Parker, 1999) et à pollinisation anémophile. La forme des feuilles est souvent elliptique. Les fleurs sont petites, regroupées en inflorescences et sont hermaphrodites. Comme c'est le cas de nombreux arbres forestiers, l'olivier est une espèce allogame.

L'olivier méditerranéen est diploïde ($2n=2x=46$; Falistocco et Tosti, 1996;Minelli et al. 2000; Besnard et al., 2003), mais des mutants triploïdes et tétraploïdes ont été observés chez deux variétés (Rugini et al., 1996). La taille du génome est estimée à 1,8 Gpb/1C (Loureiro et al. 2007) correspondant à une quantité d'ADN nucléaire entre 1,5 et 2,3 pg/1C noyau selon les variétés (Rugini et al. 1996;Bitonti et al., 1999; Loureiro et al.,2007).

I.2. Origine et historique de la culture

De tout temps, l'olivier et l'oléastre ont coexisté et c'est encore vrai aujourd'hui. L'observation des marqueurs génétiques nous ont appris beaucoup de choses : l'olivier est issu de la domestication de l'oléastre. Selon Shall (2012), l'expansion de l'aire de culture de l'olivier s'est faite d'une part à l'est du Bassin méditerranéen, dans une vaste région qui englobe les pays actuels que sont le Liban, la Syrie et Israël, et d'autre part à l'ouest, en

Espagne. On peut envisager une domestication secondaire dans toute l'Afrique du Nord, en Espagne et en Corse.

L'oléastre, serait originaire d'Asie mineure. Il semble avoir transité de la Syrie vers l'Anatolie pour s'implanter en Grèce. Mais on le trouve aussi en abondance en Basse Egypte, en Nubie, en Ethiopie et dans les monts de l'Atlas.

L'olivier fut apporté par les Phéniciens en Espagne du temps de leur domination maritime sur la Méditerranée, vers 1050 av. J.C.

Après de nombreuses migrations, l'olivier est présent aujourd'hui en Australie, en Afrique du Sud, en Chine et au Japon.

I.3. Ecologie et répartition géographique

L'olivier est une espèce thermophile très adaptée au climat méditerranéen. *Olea* aurait persisté dans des zones refuges thermophiles situées dans les régions sud du nord du bassin méditerranéen, au sud du Levant et le nord de l'Afrique (Carrión et al., 2010).

Olea europaea L. var. *sylvestris* (l'oléastre, l'olivier sauvage) est une caractéristique importante de l'actuelle végétation méditerranéenne. L'espèce est considérée comme un bioindicateur thermosensible pour la définition du niveau de thermo-méditerranéen bioclimatique et sa répartition naturelle a été confinée aux zones côtières du bassin méditerranéen. Au nord, il est limité par le froid et le gel alors qu'au sud, la culture est limitée par les conditions arides et sahariennes (Amouretti et Comet, 1998). Malgré cela, sa culture a dépassé le bassin méditerranéen et a été exportée dans plusieurs pays du monde tels l'Afrique du Sud et l'Argentine, l'Australie, les Etats unis, (Rugini et Fedeli, 1990). L'émergence de l'olivier est due principalement à sa plasticité écologique et la valeur nutritionnelle de son fruit dont on obtient principalement de l'huile après extraction dans des moulins ou des olives de tables qui nécessitent des procédés complexes de désamérisation.

I.4. Exigences agro-écologiques

Compte tenu des conditions définies sur la base d'une trame agronomique, l'olivier résiste jusqu'à -8 à -10°C, mais les dégâts peuvent être très importants pour des basses températures (0 à -1°C) pendant la floraison. A des températures élevées (35-38°C), la croissance végétative s'arrête et à 40°C et plus, l'appareil foliacé peut être brûlé et les fruits peuvent chuter, surtout si l'irrigation est insuffisante (Walid *et al.*, 2003). La production de l'olivier est normale avec 600 mm de pluie bien répartis dans l'année. Entre 450 et 600 mm, la production

est possible pour un sol profond et argilo-limoneux (les capacités de rétention en eau du sol sont suffisantes). Avec une pluviométrie inférieure à 200 mm, l'oléiculture est économiquement non rentable. Les facteurs défavorables de la production des oliviers sont : les vents chauds au cours de la floraison, et les gelées au printemps (Walid *et al.*, 2003).

I.5. Importance socio-économique

Durant les 30 dernières années, la culture de l'olivier dans le monde est passée de 5,2 à 9,5 millions d'hectares (FAO Stat, 2011). Cette émergence est due principalement à la valeur nutritionnelle reconnue de son huile et à sa plasticité écologique. Avec une superficie actuelle d'environ 9.5 millions d'hectares, soit 865 millions d'arbres, l'olivier occupe le 24^{ème} rang des 35 espèces les plus cultivées (Ellstrand, 2003). Entre 1990/91 et 2010/11, la production en olives de table est passée de 0.95 à 2.56 millions de tonnes, et pour l'huile d'olive, elle est passée de 1,5 à plus 3 millions de tonnes dont 90% de la production est localisée au niveau méditerranéen assurant, par conséquent, 3 % de la production totale d'huile végétale comestible. Selon le Conseil Oléicole International (COI), les principaux pays producteurs sont : l'Espagne, l'Italie, la Grèce et la Turquie avec plus de 80% de la production moyenne, 80% de la production en huile est consommée dans le bassin méditerranéen, soit 2,4 millions tonnes en 2010/11 (COI, 2011).

Cependant, la demande ne cesse d'augmenter et de se diffuser au-delà de l'aire d'origine de l'olivier. A titre d'exemple, la consommation de l'huile d'olive au Etats-Unis est passée de 88,000 en 1990 à 277,000 tonnes en 2011, au Japon de 4000 à 35,000 tonnes et en Australie de 13,500 à 44,000 tonnes (COI, 2011).

I.6. L'oléiculture algérienne

La filière oléicole algérienne est l'une des moins compétitives en Méditerranée, même si le pays est classé 7^{ème} producteur mondial par le Conseil Oléicole international (IOC), l'oléiculture reste encore rudimentaire, bénéficiant de peu d'initiatives de modernisation. L'irrigation, la mécanisation et la fertilisation y sont faiblement répandues.

L'oléiculture couvre 12,61% de la superficie arboricole nationale (1,74 % du SAU), on dénombre 129 089 exploitations (Recensement général de l'agriculture, ministère de l'agriculture et du développement rural- juin 2003)

Le nombre des exploitations oléicoles Irrigué a été estimé en 2003 à 13256 exploitation, couvrant 3,2% la de surface oléicole globale.

On peut distinguer 2 types de système de production : moderne et traditionnel, avec une forte prédominance de ce dernier (Hadjou et al., 2013).

a- Oléiculture moderne : elle englobe 10% du verger Algérien, s'étend principalement le long des anciens domaines coloniaux (38% des olivettes de M'chedallah, Mitidja, et Chélif, 60 à 70% des olivettes de constantinois, Guelma, et Annaba, 90% à Mostaganem, 80% à (Mascara-Sig-Relizane) et 98% à Sidi Bel-Abbès.

Cette oléiculture s'est surtout spécialisée dans la production et le conditionnement de l'olive de table, elle est implantée essentiellement à l'ouest. Les variétés dominantes dans ce type d'exploitations sont la Sigoise et la Gordal.

b- Oléiculture traditionnelle : elle constitue environ 80% du verger national, s'étend principalement sur les régions montagneuses du centre et l'est de l'Algérie.

La majeure partie des exploitations (70%) du secteur traditionnel sont petites (inférieur à 5 hectares) et de type familial. L'irrigation et la fertilisation (chimique) sont quasi absentes. La structure variétale montre la prédominance des trois variétés suivantes Achemlal, Azaradj et Avar Kane.

I.7. Variétés cultivés en Algérie

La description des variétés d'olives cultivés en Algérie ayant déjà fait l'objet de nombreuses études durant la période coloniale (Larsen, 1949), nous ne ferons que rappeler les noms de variétés de base des principales régions oléicoles.

a- Variétés de Kabylie

Chemlal de Kabylie : c'est l'une des plus estimées pour la fabrication de l'huile. Le fruit est moyen (2,5 grammes).

Azaradj : olive à deux fins, pèse environ 5 g. Elle est très estimée pour la conserve en vert, mais moins recommandable pour l'huilerie.

Avar Kane : olive de conserve qui s'emploie à pleine maturité dans la région de Seddouk (Bejaia), mais peut procurer des résultats satisfaisants en huilerie.

Limli : donne un fruit de 2 gramme, pour la fabrication de l'huile.

Ces diverses variétés ont une répartition géographique assez tranchée. Il a été constaté que chacune de ces variétés citées à sa propre zone de prédilection ou elle donne un rendement optimal (Larsen, 1949).

b- Variétés du constantinois

Rougette : variété à l'huile répandue et appréciée pour sa rusticité et sa précocité, déborde jusqu'à la Mitidja, où elle est la plus estimée.

Blanquette Tardive : moins attaquée que les autres par les oiseaux. Elle est destinée à la production de l'huile.

c- Variétés d'Oranie

Sigoise : utilisée principalement pour la production d'olives de table en vert ou en noir et également appréciée pour la production d'huile.

Variété Sévillane ou Gordal : cette variété présente de très gros fruits. Elle est utilisée uniquement pour la production d'olives de table en vert.

I.8. Les principales Maladies de l'olivier

Malgré sa rusticité, et sa grande adaptation, l'olivier est confronté à plusieurs contraintes phytosanitaires. Les tableaux (1, 2, 3) rassemblent la liste les principales maladies affectant l'olivier :

Tableau 1 : Maladies bactériennes de l'olivier

Maladie	Agent pathogène
Le complexe du dessèchement rapide de l'olivier	<i>Xylella fastidiosa</i> (Wells et al., 1987)
la tuberculose de l'olivier	<i>Pseudomonas syringae</i> ssp. <i>Savastanoi</i> pv. <i>oleae</i> (Janse 1981)
Chancre bactérien	<i>Pseudomonas syringae</i> (Van Hall, 1904)

	<i>Xanthomonas campestris</i> (Pammel, 1895) <i>Ralstoniasolana cearum</i> (Yabuuchi et al., 1996)
--	---

Tableau 2 : Maladies fongiques de l'olivier (Symptoms and management of Olive diseases and disorders, 2014)

Maladie	Agent pathogène
Œil de paon	<i>Spilocaea oleaginea</i> (Hughes, 1953)
Verticilliose	<i>Verticillium dahliae</i> (Kleb, 1973)
Pourridié	<i>Phytophthora</i> spp. (Bary, 1876)
Anthracnose	<i>Colletotrichum acutatum</i> (Simmonds, 1968)
Rhizoctone	<i>Rhizoctonia</i> spp.
Chancre de la tige	<i>Botryosphaeria</i> sp.
Pourriture du fruit	<i>Botryosphaeria</i> spp. <i>Coleophoma oleae</i>

Tableau 3 : Maladies d'origine virale de l'olivier (Palestine Technical University Research Journal, 2013)

Maladie	Agent pathogène
Mosaïque de l'arabis	ArMV, Arabis Mosaic Virus
Enroulement foliaire du cerisier	CLRV, cherry leaf roll virus
Jaunissement foliaire de l'olivier	OLYaV, Olive Leaf Yellowing associated Virus
Taches annulaires de l'olivier	OLRSV, Olive Latent Ring Spot Virus

I.9. Les maladies vasculaires de nature fongique

Les champignons pathogènes vasculaires sont répartis dans les quatre genres *Verticillium*, *Fusarium*, *Ceratocystis* et *Ophiostoma* (Yadeta and Thomma, 2013)

Les genres *Fusarium* et *Verticillium* ont de très larges spectres d'hôtes et infectent des plantes herbacées et ligneuses. La majorité des *Fusarium* responsables de flétrissements vasculaires appartient à une seule espèce, *Fusarium oxysporum*, qui provoque le flétrissement vasculaire ou la pourriture racinaire chez plus de 100 hôtes différents (Lievens et al., 2008). Il est à noter que très souvent, une souche n'est capable d'infecter qu'un seul ou quelques hôtes. Ainsi, sur la base de la spécificité d'hôte, elles sont classifiées en forma specialis (Armstrong et al., 1975). A ce jour, plus de 120 formae speciales sont décrites (Michielse, 2009). Cette spécialisation n'est pas observée chez les espèces du genre *Verticillium*.

II. La verticilliose de l'olivier

La verticilliose est causée *Verticillium dahliae* Kleb, un champignon vasculaire d'origine tellurique, capable d'infecter plus de 160 espèces de plantes (Schnathorst, 1981). Cette maladie a été décrite pour la première fois en Italie (Ruggieri, 1946). Elle s'est ensuite répandue dans tous les pays oléicoles du bassin méditerranéen (Montes *et al.*, 1997).

L'agent pathogène : *Verticillium dahliae* Kleb.

II.1. Classification

La classification établie par Agrios (1988) puis (Botton *et al.*, 1990).

Division : Amastigomycota,

Groupe : Deutéromycètes,

Classe : Hyphomycètes,

Ordre : Hyphales ou Moniliales

Famille : Hypocreomycetidae,

Genre : *Verticillum*,

Espèce : *dahliae*.

II.2. Morphologie et caractéristiques

Il existe deux phénotypes connus de *V. dahliae* sur milieu de culture PDA : la forme noire et la forme blanche. La forme noire est constituée de jeune mycélium blanc se transformant avec le temps en mycélium compact et très mélanisé composé de cellules gonflées aux parois épaisses. Le mycélium a un aspect rugueux et vallonné et possède une certaine résistance au froid hivernal. La forme blanche se présente comme un fin mycélium aérien, d'aspect mousseux et complètement blanc.

La forme blanche présente une pathogénicité atténuée par rapport à la forme noire (Pegg et Brady, 2000).

Du point de vue morphologique, le champignon porte des conidiospores disposés en verticilles autour de l'axe principal de l'hyphe. Une phialide se trouve à l'extrémité de

chacune de ces branches et les conidies sont formées une par une à l'extrémité des phialides. Par ailleurs *V. dahliae* produit sous certaines conditions des microsclérotos. Cette particularité permet de le distinguer de *V. albatrum*, un autre pathogène causant des symptômes similaires sur les plantes (Pegg et Brady, 2002).

Les microsclérotos sont des structures de survie formées par l'agglomération d'hyphes contigus dont les parois sont épaisses et mélanisées, les agglomérats formés ont l'aspect de petites boules noires (entre 20 et 200 µm de diamètre) pouvant être séparées des hyphes. Leur germination peut être induite artificiellement sur certains milieux sélectifs. Leur persistance dans le sol varie de 4 à 15 ans (Hawke et Lazarovits, 1994 ; Pegg et Brady, 2002).

II.3. Hôtes et cycle épidémique de la verticilliose

La verticilliose est une trachéomyose provoquée par les espèces du genre *Verticillium* dont *Verticillium dahliae* et *Verticillium albo-atrum* affectant des plantes annuelles et vivaces, des arbres fruitiers et ornementaux ainsi que des arbustes dans les régions tempérées, subtropicales voire tropicales (Pegg and Brady, 2002 ; Fradin and Thomma, 2006 ; Klosterman et al., 2009).

Parmi les plantes à intérêt agronomique les plus touchées, on compte le coton (*Gossypium spp.*), la tomate (*Lycopersicon esculentum* Mill.), la pomme de terre (*Solanum tuberosum* L.), la luzerne (*Medicago sativa* L.), les Cucurbitaceae, le fraisier (*Fragaria grandiflora* Ehrh.), la menthe (*Mentha piperita* L.), le tournesol (*Helianthus annuus* L.), l'aubergine (*Solanum melongena* L.), le colza (*Brassica napus*) et l'olivier (*Olea europaea* L.). Son large spectre d'hôtes et la difficulté de contrôler la maladie par une lutte chimique ou des pratiques culturales font de *Verticillium* l'un des pathogènes les plus dévastateurs dans le monde, provoquant plusieurs milliards de pertes annuelles. De ce fait, la sélection de variétés résistantes est le seul moyen efficace pour le contrôle de la maladie (Fradin and Thomma, 2006).

Les différentes souches de *V. dahliae* ne sont pas toutes spécifiques à leurs hôtes et la susceptibilité des plantes aux différentes souches est variable (Mol et van Riessen, 1995). Par exemple, certaines souches pathogènes qui attaquent la pomme de terre et la tomate ne sont pas pathogènes pour la laitue mais peuvent l'être pour la fraise (Maas, 1998). L'agressivité des différentes souches pour un même hôte est variable (El-Bebany et al., 2010).

L'infection par *V. dahliae* peut avoir lieu même lorsque le pathogène est présent en très faibles quantités dans le sol. Des niveaux aussi bas qu'un microsclérote par gramme de sol suffit pour causer des symptômes d'infection chez une plante (Pegg et Brady, 2002). Les microsclérotes germent dans la rhizosphère en réponse à la présence d'exsudats racinaires de la plante hôte (Mol, 1995). Le tube germinatif peut alors s'infiltrer par une blessure mécanique ou causée par un autre organisme (comme certains nématodes) ou encore profiter de l'élongation cellulaire lors de la rhizogénèse pour s'infiltrer dans la plante. En réaction à la formation de conidies et à leur transport dans le système vasculaire, la plante produit certains composés de défense (ex. : callose), bloquant le transport de l'eau dans le xylème. Ce blocage des vaisseaux du xylème par les composés de défense de la plante et le matériel fongique est responsable du flétrissement du plant (Hiemstra et Hariss, 1998). Le cycle épidémique généralisé de la maladie est présenté à la figure 1.

La sévérité et la progression de l'infection sont dépendantes de plusieurs conditions. La température, le type de sol, les taux d'irrigation, l'espèce et la densité des plants sont autant de facteurs pouvant influencer la croissance et le développement du pathogène (Berg et coll., 2005; Pegg et Brady, 2002).

Les symptômes se développent de façon acropète (du bas vers le haut). En règle générale, le premier symptôme observé est l'épinastie, suivie d'une flaccidité, de chloroses, de brunissements vasculaires et de nécroses à l'extrémité des folioles (Agrios, 2004). La mort de la plante peut se produire en quelques jours voire en quelques semaines ou, dans le cas des plantes vivaces, en quelques mois voire en plusieurs années (Fradin and Thomma, 2006 ; Niño-Liu et al., 2006 ; Juzwik et al., 2008).

Deux types de symptomatologie majeurs sont observés : le flétrissement partiel ou complet des parties aériennes, ou un rabougrissement de la plante. Il est naturel de faire un lien direct entre la colonisation du xylème et les symptômes de flétrissement. En effet, la colonisation des vaisseaux entraîne une perturbation de la circulation d'eau à cause de la biomasse du pathogène et des polysaccharides qu'il peut sécréter. Mais les mécanismes de défenses de la plante peuvent aussi contribuer à diminuer la circulation au niveau du xylème. En effet, pour se défendre, l'hôte va induire la production de tyloses et la sécrétion de gomme et de gel qui favorisent la formation d'embolies (Fradin and Thomma, 2006).

Le deuxième type de symptômes, le rabougrissement de la plante, est observé notamment chez les plantes de la famille des *Brassicaceae* suite à l'infection par *Verticillium longisporum*

(Kamble et al., 2013). En effet, il a été montré que le colza (*Brassic napus*) et *Arabidopsis thaliana* arrivent à maintenir leurs statuts hydriques en développant de nouveaux vaisseaux du xylème, au niveau racinaire et foliaire ainsi qu'au niveau de l'hypocotyle. Ce phénomène appelé la transdifférenciation (Reusche et al., 2012 ; Reusche et al., 2013) permettrait de compenser la perte fonctionnelle des vaisseaux colonisés. Il est intéressant de noter qu'une plante infectée par *V. longisporum* résiste mieux au stress hydrique qu'une plante non infectée (Reusche et al., 2012).

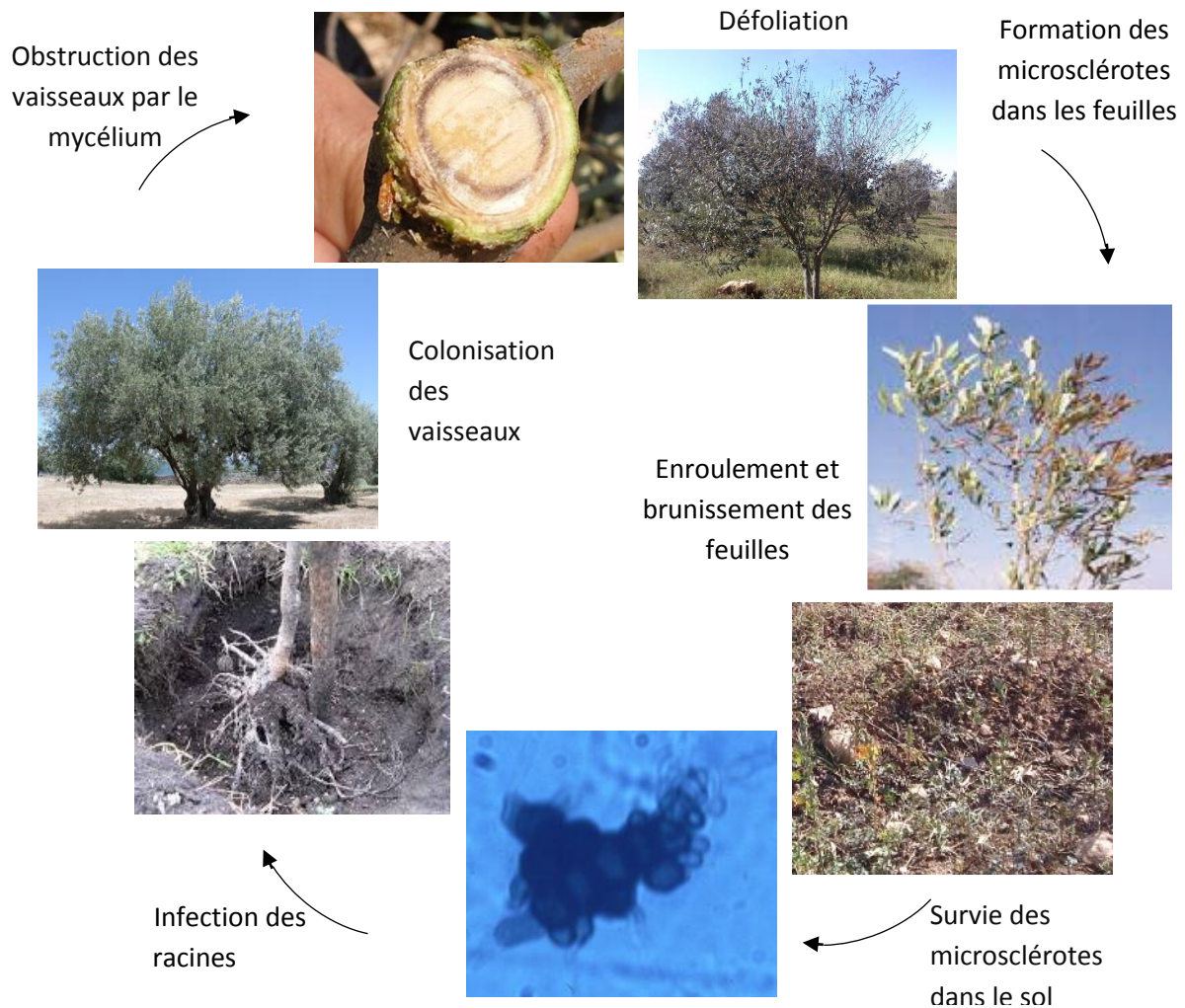


Figure 1 : Cycle infectieux de *Verticillium dahliae* sur olivier (originale, 2016).

II.4. Mécanismes de transmission et dispersion

Les pathogènes du sol ne se disséminent pas facilement sur de longues distances. L'introduction dans un champ dépend donc beaucoup des pratiques culturales. En effet, le transport de terre, de plantes avec un sol d'accompagnement (bulbes et tubercules), de graines, de débris végétaux, de greffons, de plantes de pépinières ou de toute autre matériel végétal

contaminé est le mode de dissémination le plus courant vers de nouvelles zones de cultures. La dissémination peut aussi se faire par le vent et l'eau d'irrigation (Pegg and Brady, 2002).

Les outils contaminés jouent aussi un rôle important dans la contamination de plantes saines comme dans le cas de la luzerne qui est fauchée plusieurs fois lors d'un cycle de culture (Acharya et Huang, 2003).

II.5. Importance économique et écologique

De toutes les espèces du genre *Verticillium*, *V. dahliae* est la plus néfaste à cause de son large spectre d'hôtes et de la persistance de ces microsclerotia, la verticilliose compte parmi les maladies les plus destructrices en ce qui concerne les cultures de tomate et la deuxième en ce qui concerne la pomme de terre. Les cultures les plus touchées en termes de pertes annuelles sont de loin la tomate et la pomme de terre avec une perte annuelle mondiale estimée à plus de 700 millions d'euros, l'oléiculture se situe en 6^{ème} position en termes de pertes annuelles avec une perte économique estimée à 210 ,46 millions de dollars. (FAO ,2013)

II.6. Types de symptômes sur l'olivier

La maladie produit deux types de symptômes : un dépérissement lent et un dépérissement aigu ou apoplexie (Jiménez-Díaz et al. 1998), ou encore des cas asymptomatiques (Zachos, 1963 ; Blanco-Lopez *et al.*,1984).

Dépérissement aigu : Ce type de dépérissement se caractérise par le flétrissement des charpentières et des branches secondaires, suivi par un jaunissement des feuilles. Ces dernières deviennent chlorotiques, prennent progressivement une couleur brune-claire (dessèchement) pour subir ensuite un enroulement progressif vers l'intérieur. Les feuilles restent cependant attachées aux branches, Enfin un dépérissement rapide des branches et des rameaux est constaté sur les arbres infectés.

Ce type de symptômes survient principalement à la fin de l'hiver au début de printemps sous climat méditerranéen typique.

Dépérissement lent : la couleur des feuilles se ternit et les bourgeons terminaux se nécrosent, mais les branches ne dessèchent pas complètement. Seules les grappes florales sont affectées et se dessèchent.

Ces symptômes apparaissent habituellement du début de printemps à la fin de l'été. La défoliation affecte quelque pousses, des feuilles encore vertes dans ce cas peuvent couronner les extrémités des pousses tandis que le reste de la branche est dénudé.

De même, les branches et même le tronc de l'arbre peuvent montrer un teint violacé, ou des lésions longues un peu enfoncées correspondant à la distribution longitudinale des vaisseaux de xylème infectés. Il faut noter qu'un nombre de symptômes appartenant aux 2 formes peuvent se monter d'une façon simultanée sur le même arbre. Cela dépend des conditions favorables à la croissance de champignon.

Cas asymptomatiques : certains arbres peuvent être contaminés sans exprimer les symptômes habituels. Ils manquent de vigueur et ne fleurissent pas sans pour autant montrer les dépérissements classiques.

II.7. Moyens de lutte contre la verticilliose

La verticilliose est une maladie très difficile à contrôler ; plusieurs facteurs contribuent à ce fait, sa capacité à produire et disséminer les microsclérotés dont la longévité est extrêmement longue (plus de 10ans), une grande gamme de plantes hôtes qui peuvent être colonisées par ce champignon sans montrer aucun symptôme (cas asymptomatique), ainsi, augmentant la capacité de survie de pathogène dans le sol. L'inefficacité des fongicides vis-à-vis le pathogène, vu la localisation de ce dernier à l'intérieur des vaisseaux de xylème durant la phase parasite. La variabilité génétique existant parmi les populations de *V. dahliae* dans le sol, ce qui explique l'existence de 2 pathotypes le D et le ND (López et Blanco, 2010).

Pour la lutte contre ce champignon, une stratégie combinant plusieurs modes de contrôle doit être établie, elle doit être basée sur le développement et l'application des deux mesures : préventives et palliatives (Blanco-López et Jiménez-Díaz 1995).

II.7.1 Choix des sols sains

L'utilisation des sols infestés de propagules *V. dahliae* doit évidemment être évitée, surtout si le pathotype D est présent. Il convient de souligner que la santé des sols est la première condition pour parvenir à une culture saine (Cook, 1993). Par conséquent, la décision de

plantation doit être fondée sur une bonne connaissance de l'état phytosanitaire du sol (évaluation de la présence de l'agent pathogène, histoire de problèmes phytosanitaires) en plus de sa fertilité et ces caractéristiques agronomiques (Jiménez-Díaz, 1998).

Il est fortement recommandé pour évaluer la présence des propagules de l'agents pathogène dans les le sol, que ce soit par l'isolement microbiologique traditionnel (Harris et al., 1993;López-Escudero etBlanco López, 2001), ou par des tests de détection moléculaire (Pérez-Artés et al., 2005)

II.7.2 Désinfection des sols et autres interventions pour réduire l'inoculum fongique

Outre les procédures d'isolement et de quantification des propagules de *V.dahliae* dans le sol, qui fournissent des informations utiles pour l'évaluation des risques de la maladie, les sols choisis pour établir de nouvelles oliveries pourraient être préalablement désinfectés par des approches différentes. Avant la plantation, les stratégies pour la désinfection des sols sont basées sur l'application des pratiques physique, culturale, biologique ou chimique pour réduire l'inoculum dans le sol. Il est important de remarquer que l'éradication complète de l'agent pathogène est très difficile, la ré-infestation peut survenir du sol par des propagules préexistantes non éliminées après traitement de désinfection.

Le coût élevé de certains ces mesures de contrôle qui les rend souhaitable uniquement à faible échelle (par exemple pour une zone bien défini où l'agent pathogène a été détecté en particulier)

La désinfestation du sol avant l'implantation du verger peut être accompagnée de pratiques biologiques et des interventions culturales telles que les semailles et l'enfouissement ultérieur des engrais verts tels que l'herbe du Soudan (*Sorgho halepense var. sudanense*) (Devay et Pullman, 1984), la rotation des cultures non/peu sensibles à la verticilliose est également encouragée afin de réduire le potentiel fongique dans le sol.

La solarisation du sol est l'une des méthodes physiques les plus efficaces pour réduire la densité de l'inoculum tellurique des agents pathogènes tels que *V. dahliae* (Katan 1987; Katan2000a; Goicoechea 2009). La couverture de sol avec des films de polyéthylène transparent, combinés avec un arrosage abondant permettra de chauffer le sol par irradiation au soleil, à des températures létales pour de nombreux agents pathogènes transmis par le sol et de même pour les graines de mauvaises herbes. Les températures atteintes par la solarisation

du sol peuvent varier de 35 à 60 ° C (en fonction du type de sol et sa profondeur) et celles-ci sont assez élevées pour tuer les microsclérotés de *V. dahliae* (Katan, 1987).

La technique de la solarisation du sol est effectivement mise en œuvre pour contrôler la Verticilliose des plantes hôtes (herbacées et ligneuses) avant le semis ou la plantation (Pegg et Brady, 2002). Cependant, il est intéressant de souligner que des températures supérieures à 70°C peuvent produire des effets néfastes sur la flore microbienne du sol et peuvent entraîner l'éradication des micro-organismes bénéfiques (par exemple rhizobiums, champignons mycorhiziens, et les antagonistes (Katan 2000 a ; Goicoechea 2009). Un autre obstacle qui peut poser un problème est le fait que l'efficacité de cette méthode dépend des conditions environnementales et édaphiques tels que les caractéristiques physiques du sol et de l'irrigation. En outre, la survie des microsclérotés de *V. dahliae* dans les couches profondes du sol peut constituer une source de propagules infectieux pour plusieurs années après le traitement du sol par solarisation (Katan 1981; Tjamos et al. 1991; López-Escudero et Blanco López-2001).

La solarisation du sol est souvent combiné avec l'application des doses réduites de certains biocides chimiques, les plus couramment utilisés dans cultures intensives (bromure de méthyle, la chloropicrine,...etc) (Tjamos et Paplomatas, 1988).

Les niveaux élevés du rayonnement solaire dans la plupart des régions productrices d'olive rendent la solarisation du sol une action de contrôle adéquate pour réduire la viabilité des microsclérotés, et diminuer les symptômes *V. dahliae* dans les oliveries.

L'irrigation peut jouer un rôle très important dans le développement et la propagation de la verticilliose surtout dans les oliveries intensives (densité de plantation élevée) (Ruggieri 1948; Cirulli 1981; Schnathorst 1981). En effet l'incidence de la maladie a été évaluée dans les oliveries non irriguées à 9% et 21% respectivement au Maroc (Al-Ahmad et Mosli 1993), à 4 et 13% en Syrie (Serrhini et Zeroual 1995), et à 17 et 40% en Espagne (Blanco-López et al., 1984), ces données ont montré qu'une irrigation raisonnée et bien maîtrisée est indispensable dans la lutte contre le champignon. De même, une fertilisation azotée adaptée aux besoins de l'olivier s'est révélée capable de réduire l'incidence de la maladie (Pegg and Brady 2002),

II.7.3 Lutte variétale et génétique

Le développement des programmes d'hybridation visant à produire des cultivars résistants est probablement la mesure de contrôle la plus efficace économiquement et la plus respectueuse

de l'environnement qu'il faut impliquer dans la stratégie de lutte contre la verticilliose. Par conséquent, des efforts sont munis visant à trouver des sources efficaces de résistance contre le *V. dahliae* dans les différents pays où l'oléiculture est pratiquée (Rallo et al., 2005).

De toute évidence, les nouveaux génotypes résistants à la maladie, doivent également afficher des caractères agronomiques attrayant du point de vue commercial. Une fois un génotype résistant vis-à-vis le champignon est identifié, il peut être directement utilisé soit pour remplacer les arbres morts dans les oliveries touchées, ou rhizomes pour greffer des scions de cultivars existants, ou être incorporé comme géniteur dans les programmes de sélection génétiques. Un avantage important dans l'amélioration de la résistance de l'olivier contre *V. dahliae* est l'ample source de variabilité génétique disponible (Angiolillo et al., 1999; Rallo et al., 2005).

II.7.4 Sols suppressifs et lutte microbiologique

L'idée que des rhizobactéries peuvent être utilisées pour lutter contre les agents pathogènes telluriques découle en partie de certaines études faites sur les sols suppressifs (Keel et al., 1996 ; Mazzola et al., 2002 ; Raaijmakers et al., 1997, 1998). Un sol suppressif se caractérise par une très faible incidence d'infection, ou l'absence totale de maladie, malgré la présence d'un organisme capable d'infecter la plante et d'un hôte susceptible (Weller et al., 2002). Bien que certains facteurs physiques comme le pH, la proportion de matière organique et d'argile puissent influencer la capacité de suppression, cette dernière est généralement directement liée à la communauté microbienne. Certains auteurs ont également postulé que plusieurs espèces de plantes ont développé une stratégie de défense contre les pathogènes telluriques qui implique la stimulation sélective et le support de populations de microorganismes antagonistes (Cook et al., 1995).

Parmi les rhizobactéries non symbiotiques, les *Pseudomonas* spp. fluorescents font l'objet d'une attention particulière. Il n'a été attesté que l'inoculation des plantes à l'aide de certaines souches de *Pseudomonas* spp. s'accompagne en effet d'une augmentation significative du rendement de la culture.

Celle-ci résulte de la stimulation de la croissance des plantes et de leur protection contre des microorganismes pathogènes (Lemanceau, 1992)

III. Les bactéries *Pseudomonas*

III.1. Caractères descriptifs

Les bactéries du genre *Pseudomonas* sont des bacilles à coloration Gram négative (Gram-), non sporulés, très généralement mobiles grâce à une ou plusieurs flagelles polaires, aérobies à métabolisme strictement respiratoire et chimioorganotrophes (Palleroni, 2009). Le genre *Pseudomonas* est un grand groupe bactérien particulièrement important qui appartient à la sous-classe γ des protéobactéries et comprend plus d'une centaine d'espèces ubiquitaires (Bossiset *al.*, 2000 ; Palleroni et Moore, 2004). Cependant, depuis la découverte du genre *Pseudomonas* par Migula en 1894, beaucoup de noms d'espèces lui ont été assignés. Le nombre d'espèces a subi de nombreuses variations principalement dues à la description de nouvelles espèces et à divers changements de la définition du genre. La réorganisation a débuté en 1968 et, actuellement, l'édition de 2005 du *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology* rapporte une soixantaine d'espèces au genre *Pseudomonas* (Palleroni, 2005). Néanmoins, 188 espèces sont actuellement répertoriées sur le site internet <http://wwwbacterio.cict.fr/p/pseudomonas.html>.

III.2. Classification

Règne Bacteria

Embranchement Bacteria

Classe Schizomycetes

Ordre Pseudomonadales

Sous-ordre Pseudomonadineae

Famille Pseudomonadaceae

Genre *Pseudomonas*

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. fluorescens* 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.

La taille du génome du groupe *P. fluorescens* varie d'environ 6,4 Mb à 7,07 Mb (Paulsen et al., 2005; Silby et al., 2009). Des études comparatives sur trois bactéries saprophytes de *P. fluorescens* (Pf-5, SBW25 and Pf0-1) entièrement séquencées ont révélé un degré de diversité incroyablement élevé (Silby et al., 2009) chez d'autres espèces de *Pseudomonas* mieux conservées. Ces trois souches de *P. fluorescens* ne partagent que 61,4 % de leur contenu génétique ce pourcentage reflète la grande diversité génétique au sein de ce groupe de bactérie

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; Cavaglieri et al., 2005).

III.3. Effets bénéfiques de *Pseudomonas*

Les principaux effets bénéfiques sont la stimulation de croissance des plantes et la protection des plantes contre les maladies d'origine tellurique. D'autres effets bénéfiques ont également été décrits. Ainsi certaines souches de *Pseudomonas* stimulent la germination des graines. D'autres influencent positivement les interactions entre les microorganismes symbiotiques (*Rhizobium*, *Bradyrhizobium*, champignons mycorhiziens) et la plante hôte.

III.3.1 Stimulation de croissance des plantes

La majorité des *Pseudomonas* fluorescentes produisent des sidérophores peptidiques complexes appelés pyoverdines ou pseudobactines, qui sont des capteurs de fer très efficaces. La bactérie *P. fluorescens* peut améliorer la croissance des plantes grâce à la production de sidérophores qui fixent efficacement le fer de l'environnement et le rendent indisponible pour d'autres composantes de la microflore du sol.

De nombreux travaux font état d'une stimulation de la croissance des plantes et du rendement des cultures après bactérisation. Comme en atteste le tableau I, ces études ont été réalisées avec des plantes hôtes et des conditions expérimentales variées. Il apparaît clairement que l'augmentation de rendement, observée en conditions normales de production, est toujours inférieure à l'augmentation de croissance des plantes cultivées en conditions contrôlées (culture en pots et en serre ou en chambre climatisée).

III.3.2 Contre les maladies d'origine tellurique

L'utilisation de bactéries pour lutter contre les maladies d'origine tellurique a fait l'objet de nombreuses synthèses bibliographiques (Schroth et Hancock, 1982; Leong, 1986; Neilands et Leong, 1986; Fravel, 1988) auxquelles le lecteur pourra se reporter pour plus de détails.

Les modèles biologiques utilisés mettent en jeu différentes souches de *Pseudomonas* et différentes maladies (Tableau 4). Les problèmes pathologiques les plus étudiés sont : les fontes de semis, les fusarioses, le piétin échaudage et les pourritures racinaires.

Tableau 4 : Protection des plantes contre les différentes maladies telluriques, assurée par des souches de *Pseudomonas* spp. fluorescentes (Lemanceau, 1992)

Maladies	Microorganismes pathogènes	Références
Chancre bactérien	<i>Xantomonas citri</i>	Unnamalai et Gnanamanickam (1984)
Fonte de semis	<i>Pythium</i> spp.	Elad et Chet (1987) Howell et Stipanovic (1980)

	<i>Rhizoctonia solani</i>	Weller et cook (1986) Howell et stipanovic (1979)
Fusarioses *de pourriture *vasculaires	<i>F. oxysporum</i> f. sp. <i>radicis lycopersici</i> <i>F. solani</i> <i>F. oxysporum</i>	Lemanceau et Alabouvette (1991) Anderson et Geura (1985) Kloepper et al. (1980b) Leeman et al. (1991) Van peer et al. (1990b)
Jambe noire de la pomme de terre	<i>Erwinia carotovora</i>	Rhodes et Logan (1986)
Pertes et pourritures racinaires	<i>Pythium</i> spp.	Becker et cook (1988) Stuz et al. (1980)
Piétin échaudage du blé	<i>Gaeumannomyces graminis</i> Var. <i>tritici</i>	Keel et al. (1989) Kloepper et al. (1980b)
Tache bactérienne du champignon	<i>Pseudomonas tolaasi</i>	Olivier et Guillaumès (1981)
Verticilliose	<i>Verticillium dahliae</i>	Leben et al. (1987)

III.3.3 Autres effets bénéfiques

a- Stimulation de la germination des semences

Hôte et al (1991) ont enregistré une augmentation significative du taux de germination de semences de maïs soumises au froid après inoculation de 2 souches de *Pseudomonas* fluorescents. L'une d'entre elles a, de plus, permis de maintenir le pourcentage de

germination d'un lot de semences âgé de 2 ans au même niveau que celui uniquement âgé de 1 an. Ces souches sont appelées

«Emergence Promoting Rhizobacteria»(EPR) (Kloepper et al., 1986).

Digat et al (1990) ont montré que certaines souches de *Pseudomonas* peuvent stimuler significativement la germination de graines de tomate même lorsque les conditions d'environnement ne semblent pas défavorables.

b- Stimulation de la nodulation chez les légumineuses

Certaines souches de *Pseudomonas* spp. fluorescents stimulent la nodulation des légumineuses. Ainsi, Grimes et Mount (1987) ont montré qu'une souche de *P.putida* augmente de façon significative la nodulation du haricot.

Ces souches sont appelées «Nodulating Promoting Rhizobacteria» (NPR). Toutes ces souches stimulent la croissance racinaires, produisent de l'acide indole acétique et sont pectinolytiques. Elles provoquent une augmentation de la masse de nodosités plutôt que de leur nombre (Zablotowicz, in Howell et Okon, 1987).

De même, certaines souches de bactéries influencent positivement la colonisation racinaire de la plante hôte par des endomycorhizes (vonAlten et al., 1991) ou par des ectomycorhizes (Garbaye et Bowen, 1987). Mamoun et Olivier (1992) ont montré que certaines souches de *Pseudomonas* spp. fluorescents améliorent la pérennité de l'association symbiotique entre l'ectomycorhize *Tuber melanosporum* et le noisetier. Par ailleurs, l'effet bénéfique, de l'inoculation mycorhizienne sur la plante, pourrait être stimulé par certaines rhizobactéries productrices de substances de croissance (Linderman et Paulitz, 1990) et par les rhizobactéries qui augmentent la solubilité des phosphates dans le sol (Raj et al, 1981).

III.4. Mécanismes responsables des effets bénéfiques

III.4.1 L'antagonisme par antibiose

L'antibiose exercée par certains *Pseudomonas* spp. fluorescents a d'abord été mise en évidence *in vitro*. Ainsi Lindberg (1981) a établi le spectre d'activité d'un antibiotique, la tropolone, synthétisé par une souche de *Pseudomonas*. Cet antibiotique manifeste des propriétés antagonistes à l'encontre de différents champignons : *Alternaria*, *Cladosporium*,

Diplodia, *Fusarium*, *Helminthosporium*, *Pyricularia*, *Pythium*, *Rhizoctonia* (Howell et Stipanovic, 1979, 1980).

Ces auteurs ont ensuite montré que la souche bactérienne protège les plantes de coton contre ces pathogènes de manière analogue à celle des antibiotiques purifiés. Ils en conclurent que la protection des plantes assurée par cette souche de *Pseudomonas* est liée à la synthèse de ces antibiotiques.

III.4.2 La compétition

Le dernier mode d'action direct est la compétition qui s'exprime pour les éléments nutritifs mais aussi pour la colonisation de la surface racinaire Suslow (1982).

Même si le rôle de la compétition pour l'espace ne peut être complètement exclu, l'essentiel des travaux relatifs à la compétition, instaurée par les *Pseudomonas* fluorescents, porte sur la compétition trophique et, en particulier, sur la compétition pour le fer, comme en attestent les différentes synthèses bibliographiques relatives à ce sujet (Heming, 1986; Leong, 1986; Neilands et Leong, 1986; Loper et Buyer, 1991).

III.4.3 Amélioration de l'alimentation minérale de la plante

L'amélioration de l'alimentation minérale de la plante en phosphore a été la première hypothèse proposée pour expliquer l'effet bénéfique enregistré à la suite de la bactérisation de plantes (Gerretsen, 1948). Les espèces, *Bacillus megaterium* var *phosphaticum* et *Pseudomonas* spp. fluorescents, augmenteraient la concentration en phosphore soluble soit par minéralisation des phosphates organiques, grâce à des phosphatases, soit par solubilisation des phosphates inorganiques, sous l'effet d'acides (Krasilnikov, 1961).

III.4.4 Production microbienne de substances de croissance

La production de substances de croissance par les *Pseudomonas* fluorescents a été fréquemment mise en évidence *in vitro* (Brown, 1974; Lynch, 1976). Ces substances peuvent être absorbées par les racines. Ainsi Libbert et al (1969) ont montré que des auxines produites par des microorganismes telluriques pouvaient être assimilées par différentes plantes (maïs, pois, concombre).

Différents auteurs ont mis en relation l'aptitude de souches microbiennes à produire des substances de croissance *in vitro* et leur aptitude à modifier, *in vivo*, la morphologie des plantes de manière analogue aux substances de croissance concernées. Ils en concluent que la

stimulation de croissance des plantes bactérisées est due à la synthèse microbienne de substances de croissance.

III.4.5 Induction de résistance de la plante

Des travaux récents portant sur des modèles d'étude différents ont mis en évidence la plus grande résistance naturelle des plantes bactérisées par certaines souches de *Pseudomonas*. (Brown, 1974). Defago et al. (1990) suggèrent donc que la production de HCN par la souche CHAO provoquerait sur la plante un stress auquel elle réagirait par une augmentation de son système racinaire et de sa résistance naturelle. Pour Anderson et Guerra (1985), l'augmentation de la résistance des plantes de haricot au *Fusarium solani*, grâce à l'inoculation d'une souche de *Pseudomonas putida* serait liée à leur plus grande teneur en lignine.

Etude *in vitro* de l'action antagoniste des *Pseudomonas* spp. fluorescents sur *Verticillium dahliae*

Introduction

Dans les travaux consacrés à l'étude de microorganismes antagonistes aux agents phytopathogènes d'origine tellurique, 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 *Verticillium dahliae*. La sélection de ces bactéries est basée sur leur capacité à inhiber le développement du parasite.

I. Matériel et méthodes

I.1 Matériel fongique

Trois isolats de *V. dahliae* utilisés dans notre étude. Ils sont isolés à partir de rameaux d'oliviers montrant des symptômes typiques de la verticilliose (tableau 1).

Tableau 1 : Origine des isolats de *Verticillium dahliae* et codification adoptée.

Codification des isolats	Région d'origine	Année d'isolement
S1	Sidi Belabes	2015
S2	Sidi Belabes	2015
S3	Mostaganem	2015

I.2 Matériel bactérien

I.2.1 échantillonnage des *Pseudomonas* spp. fluorescents

Des échantillons de sol sont prélevés au niveau de la rhizosphère d'oliviers indemnes de la maladie, à une profondeur de 10 -15 cm, dans les régions suivantes : M'chedallah (wilaya de Bouira), Tazmelt (wilaya de Bejaia), Oued rhiou (Wilaya de Relizane). Cinq arbres sont échantillonnés au hasard, selon deux diagonales, de façon à représenter l'ensemble de la parcelle.

Chaque échantillon est constitué de 100g de sol. L'ensemble des échantillons sont homogénéisés dans des sacs en papier et acheminés en laboratoire. Le sol est disposé en fine couche (2 cm) sur du papier journal et séché dans une étuve réglée à 28°C.



Figure 1 : Séchage des échantillons de sol

I.2.2 Isolement des *Pseudomonas* spp.

Après broyage et tamisage du sol à l'aide d'un tamis à maille de 2 mm, 0,5 g du sol sont placés dans un tube à essai contenant 4,5 ml d'eau physiologique stérile (NaCl 0,85 ‰). La solution est agitée pendant 2 mn à 120 rpm, Après 5 mn de temps de décantation, on a réalisé une série de dilutions décimales allant de 10^{-1} à 10^{-3} .

L'isolement des bactéries est réalisé comme suit : 100 µl représentant une dilution (10^{-1} , 10^{-2} ou 10^{-3}) sont versés dans une

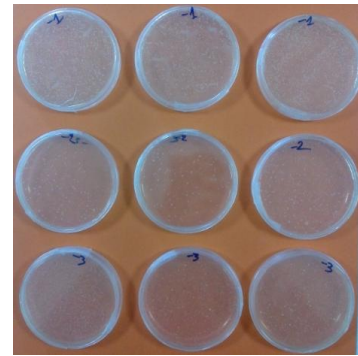


Figure 2 : Dilutions *Pseudomonas* spp

boîte de pétri avant d'y rajouter 20 ml milieu en surfusion. Les boîtes de pétri sont incubées à 28°C.

Un dénombrement des colonies est réalisé après 48 heures. La dilution ayant permis l'obtention d'un nombre 30 à 300 colonies par boîte est retenue pour l'isolement des *Pseudomonas* (Amkraz, 2013) (figure 2).

Les colonies de *Pseudomonas* spp. exposées à une lampe UV, à 365 nm, apparaissent fluorescentes sur milieu KB. Elles montrent une couleur qui varie du bleu vers le jaune verdâtre.

I.2.3 Purification des *Pseudomonas* spp. fluorescents

Les colonies développées sur milieu KB 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

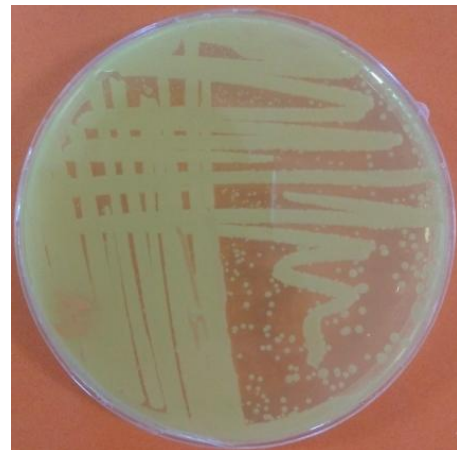


Figure 3 : Une colonie de *Pseudomonas* après purification

cultures pures (figure 3).

I.2.4- Identification biochimique des *Pseudomonas*

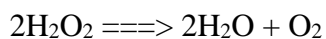
A- Coloration de Gram

Le colorant utilisé est le violet de gentiane qui colore l'intérieur des bactéries. Celles-ci sont ensuite décolorées à l'alcool. En raison de leur paroi, de structure plus épaisse et de composition chimique particulière, les bactéries Gram+ gardent la coloration violette. Les bactéries Gram-, avec une paroi plus fine et plus perméable à la décoloration, perdent la couleur violette. Après recoloration à la Fuschine (rose). Les bactéries Gram+ resteront violettes alors que les Gram- seront teintées en rose. Bien que le résultat de la coloration de Gram puisse dépendre de l'état physiologique des bactéries (âge de la colonie, conditions de croissances...) elle reste cependant

la technique de coloration de base en bactériologie. Elle permet également d'apprécier la forme des cellules bactériennes.

B- Recherche de la catalase

La catalase est une enzyme de haut poids moléculaire existante chez toutes les bactéries aérobies, elle leur permet de vivre en présence de l'oxygène. En plus de la chaîne respiratoire des cytochromes, il existe en effet chez les aérobies une chaîne accessoire courte, fixant l'hydrogène sur l'oxygène aboutissant à la formation de l'eau oxygénée (peroxyde d'hydrogène) selon la réaction suivante :



La recherche de cette enzyme est réalisée par la mise en contact d'une colonie avec quelques gouttes de $2\text{H}_2\text{O}_2$. L'apparition de bulles gazeuses traduit la présence de catalase.

C- Recherche de l'oxydase

Ce test est à la base de l'identification des bactéries négatives. Il permet de mettre en évidence une enzyme : la phénylène diamine oxydase des bactéries à partir de leur culture en milieu gélosé. Cette enzyme est capable d'oxyder un réactif : le N- diméthyl parphénylène diamine.

De la crème bactérienne est mise en contact avec du papier filtre imbibé du réactif à l'aide d'une pipette pasteur.

Une coloration violette traduit un résultat positif (oxydase positive).

D- Test de mobilité bactérienne

Le mannitol est un polyalcool issu de la réduction du D-fructose. Sa dégradation conduit à la formation de fructose qui est attaqué en donnant des acides à chaînes courtes (acide méthanoïque, acide éthanoïque...).

Il permet de lire :

- La fermentation du mannitol : les bactéries mannitol + acidifient le milieu qui vire au jaune (teinte acide du rouge de phénol). L'acidification produite par les bactéries aérobies strictes est en général insuffisante pour permettre le virage du rouge de phénol du fait de l'importance du pouvoir tampon du milieu. Ce milieu convient donc mieux à l'étude des bacilles à Gram négatif fermentatifs.
- La mobilité : du fait de la faible teneur en agar du milieu, les bactéries mobiles peuvent s'y déplacer (les bactéries aérobies strictes ne cultivant pas dans la profondeur, leur mobilité ne pourra pas être lue).

E- Test Hugh Leifson

Il s'agit de l'étude du métabolisme énergétique il découle que un glucide peut être catabolisé par voie respiratoire ou par voie fermentative. Le milieu de Hugh et Leifson permet de distinguer entre les deux processus.

Ce test permet de distinguer trois catégories de bactéries :

- les bactéries fermentatives
- les bactéries oxydatives (qui oxydent le glucide par respiration aérobie)
- les bactéries inactives ou inertes

Après la réalisation de ces tests chaque souche est affectée d'un code de référence puis conservé à 4°C sur milieu KB dans des tubes à essai inclinés (Figure 4).

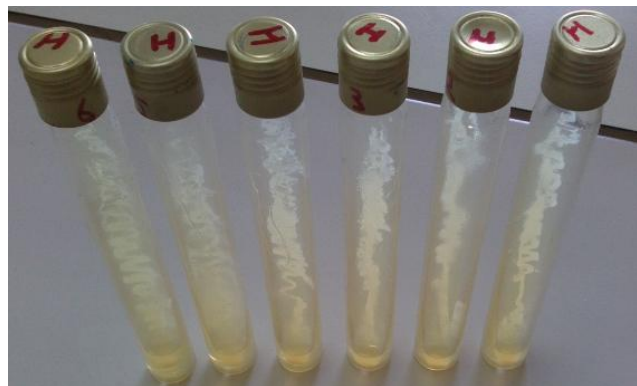


Figure 4 : Conservation des *Pseudomonas* sur milieu incliné

5- Préparation des cultures des PF

Pour le rajeunissement des cultures bactériennes de *Pseudomonas* fluorescents, les suspensions sont préparées dans du bouillon nutritif e tubes à essai. Ces derniers sont maintenus pendant 24h à 26C°. La concentration de chaque souche est ajustée à 10^8 CFU.ml-1 correspondants à un intervalle de DO de 0,08 à 0,1 (Amekraz, 2013).



Figure 5 : Rajeunissements d'une série de souches de *Pseudomonas* spp. fluorescents (à gauche, témoin contenant le bouillon nutritif sans la bactérie).

II. Tests de confrontation directe

Les confrontations des souches bactériennes de PF avec le pathogène sont réalisées sur milieu PDA, selon la technique de Patel et Brown (1969). Un explant mycélien de 4 mm de diamètre, provenant de l'isolat de *Verticillium* à tester, est prélevé en périphérie du thalle en croissance active. Il est déposé au centre d'une boîte de pétri contenant du PDA.

A partir d'une suspension de la bactérie à tester, 3 gouttes de 5 μ l, de concentration 10^8 UFC/ml, sont prélevées et disposées de façon triangulaire autour de l'explant mycélien, à une distance de 3 cm de ce dernier.

Les boîtes sont incubées à l'obscurité, à 25°C, durant 6 jours avant le début des observations.

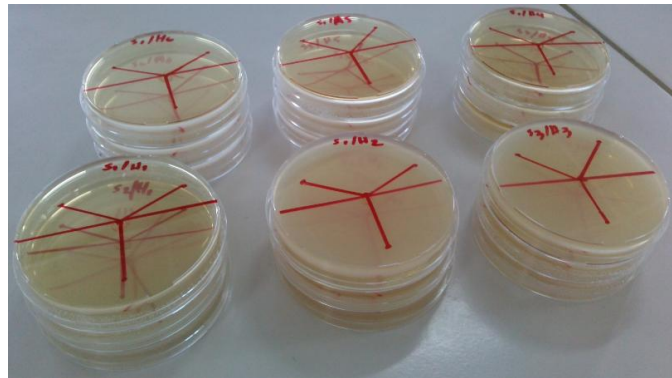


Figure 4 : dispositif du test de confrontation

La croissance diamétrale de chaque fragment fongique été notée au cours du temps, à 7, 10, et 15 jours.

Dans le témoin les gouttes sont remplacées par 3 gouttes de bouillon nutritif stérile.

Chaque traitement est répété 3 fois.

III. Résultats

III.1. Etude macroscopique et microscopique de *Verticillium dahliae*

Les colonies de *V. dahliae*, en culture sur milieu PDA, ont un aspect cotonneux d'une couleur blanchâtre. Des zones noirâtres, correspondant à la mélanisation du mycélium, se forment après 4-5 jours de repiquage, il se forme alors des structures appelées micro-sclérotés.

Il été noté que la production de ces derniers était plus abondante chez la souche S2, moyenne chez la S1, et faible chez la S3.

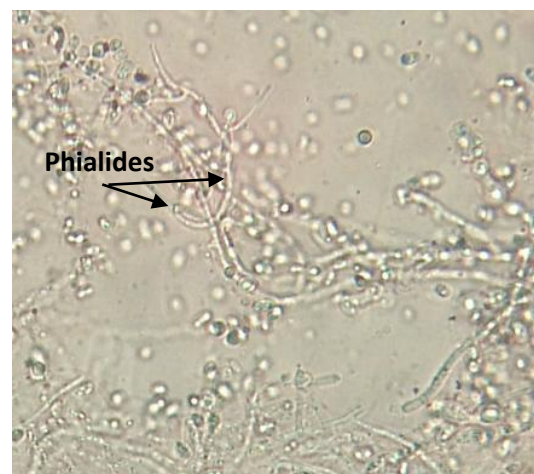


Figure 7 : Observation microscopique de *V. dahliae* (originale, 2016).

L'observation microscopique nous a permis de distinguer des phialides disposées groupes de verticilles sur un conidiophore long. Les conidies se forment sur le bout des phialides. La figure 1 montre un groupe de 3 phialides disposées en verticille (Figure 1)

III.1.1. Purification des isolats de *Verticillium* par culture monospore

La technique utilisée est inspirée de celle de Bouznad (1989). Elle consiste à préparer deux suspensions de spores de 10 et 100 spores par millilitre à partir d'anciennes cultures. 0,5 ml de chaque suspension est étalée sur des boîtes de pétri contenant de l'eau gélosée à 2%. Des boîtes sont incubées à l'étuve réglée à 20°C pendant deux jours. Des petites colonies de 1 mm de diamètre issues chacune d'une spore sont alors prélevées à l'aide d'une aiguille lancéolée et repiquée sur milieu PDA. Les boîtes sont mises à incuber pendant 7 jours à température ambiante, 18-25°C, de laboratoire.

III.2. Identification et purification des souches bactériennes de P.F

Les observations macroscopiques des colonies bactériennes apparues sur milieu King B nous ont permis de noter des colonies de 1 à 2 mm de diamètre, de forme plus ou moins régulière. La fluorescence des colonies a été notée sous lumière Ultra-Violet, à 365 n.m.

Les observations microscopiques réalisées ont montré des bactéries en forme bâtonnet allongées. Le test de Gram indique des bactéries gram négatives (figure 2).

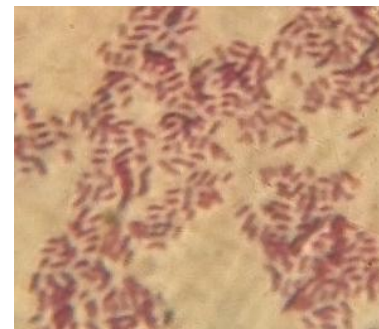


Figure 8 : Test de Gram

Les figures 3 ; 4 ; 5 ; 6 montrent les résultats des tests biochimiques effectués sur les P.F



Figure 10 : Test catalase

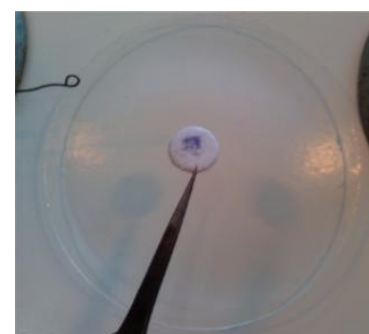


Figure 9 : Test oxydase



Figure 11 : Test Hugh Leifson



Figure 12 : test de mobilité

En tout, 18 souches de *Pseudomonas* sont retenues dans la suite de notre étude. Le tableau 1 montre l'origine de chacune ainsi que la codification adoptée.

Tableau 2 : Origine des souches de *Pseudomonas* fluorescents et codification adoptée.

Codification de la bactérie	Région d'isolement	Date d'isolement
M1, M2, M3, M4, M5, M6	M'chedallah (Bouira)	Janvier 2016
H1, H2, H3, H4, H5, H6	Tazmalet (Bejaia)	Janvier 2016
R1, R2, R3, R4, R5, R6	Oued Rhiou (<u>Relizane</u>)	Janvier 2016

III.3. Résultats de l'antagonisme *in vitro*

Pour les colonies fongiques témoins des 3 souches fongiques S1, S2, S3. Une croissance rapide a été noté chez les deux souches S1, et S3 tandis qu'une croissance moins intense et relativement lente a été constaté chez la souche S2 (figure 7, 8, 9).

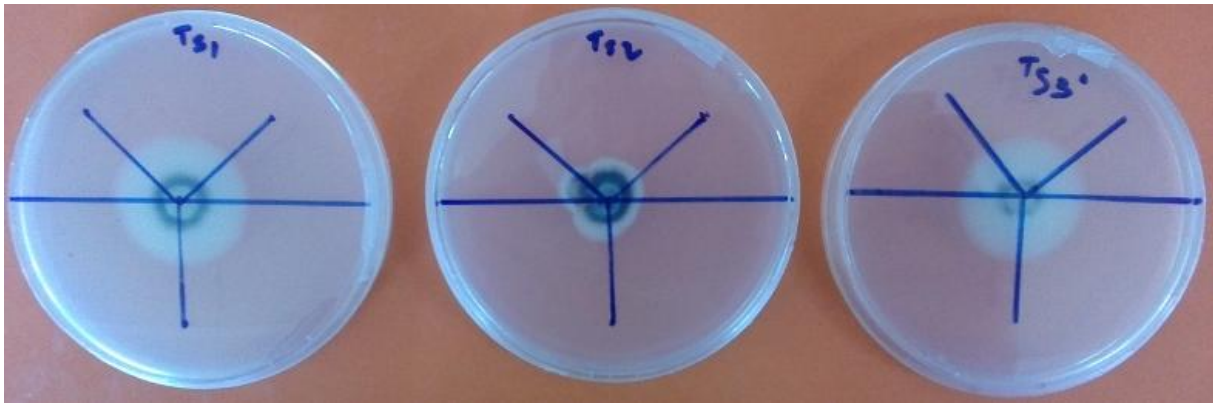


Figure 13 : Colonies de *V. dahliae* témoins (S1, S2 et S3) après une semaine d'incubation

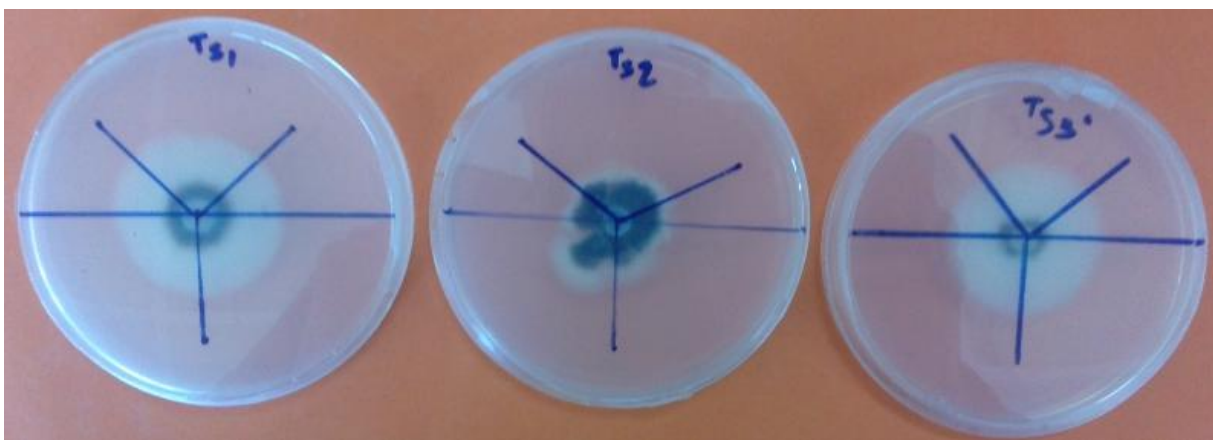


Figure 14 : Colonies de *V. dahliae* témoins (S1, S2 et S3) après 10 jours d'incubation

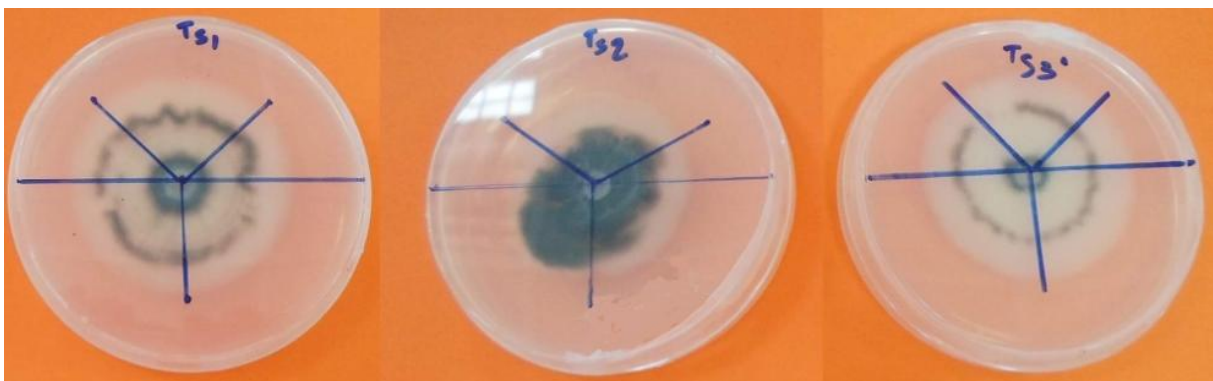


Figure 15 : Colonies de *V. dahliae* témoins (S1, S2 et S3) après 15 jours d'incubation

S1 : Parmi les 18 souches PF utilisées dans notre étude, 3 ont exercé un fort antagonisme vis-à-vis de l'isolat S1, et cela dès le 7^{ème} jour (figure 10), il' agit des souches H4, M1, M5 pour lesquelles le diamètre de la colonie du pathogène n'excède pas les 2.5 cm au terme du 15^{ème} jour de confrontation comparativement au témoin chez lequel nous avons noté un diamètre

moyen de 5,6 cm (figure 12). Un effet antagoniste faible a été noté pour les souches H6, R1, R3, R6 et M2 puisque le diamètre de la colonie du pathogène (S1) dépasse les 4cm. En revanche, un effet antagoniste modéré est exprimé chez les souches restantes de PF, induisant une réduction moyenne du diamètre de la colonie chez le parasite (2,5 à 4 cm) comparativement au témoin (5,6 cm) (Figure 13).

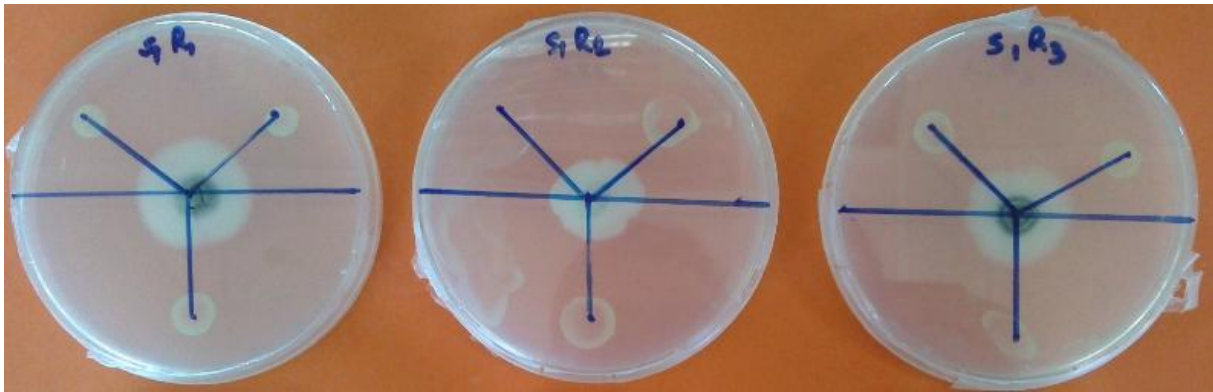


Figure 16 : Colonies de *V. dahliae* (S1) confrontées avec la bactérie R1, R2 et R3, après une semaine d'incubation

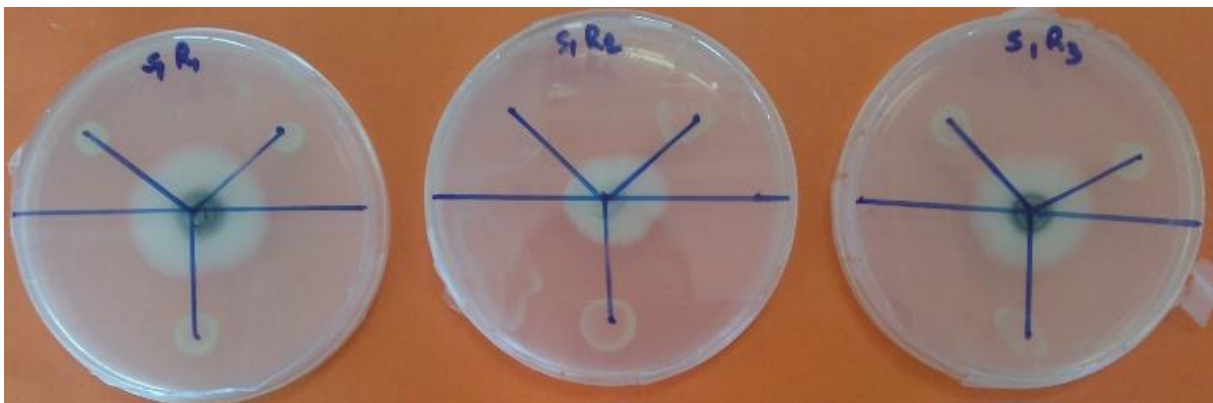


Figure 17 : Colonies de *V. dahliae* (S1) confrontées avec la bactérie R1, R2 et R3, après 10 jours d'incubation



Figure 18 : Colonies de *V. dahliae* (S1) confrontées avec la bactérie R1, R2 et R3, après 15 jours d'incubation

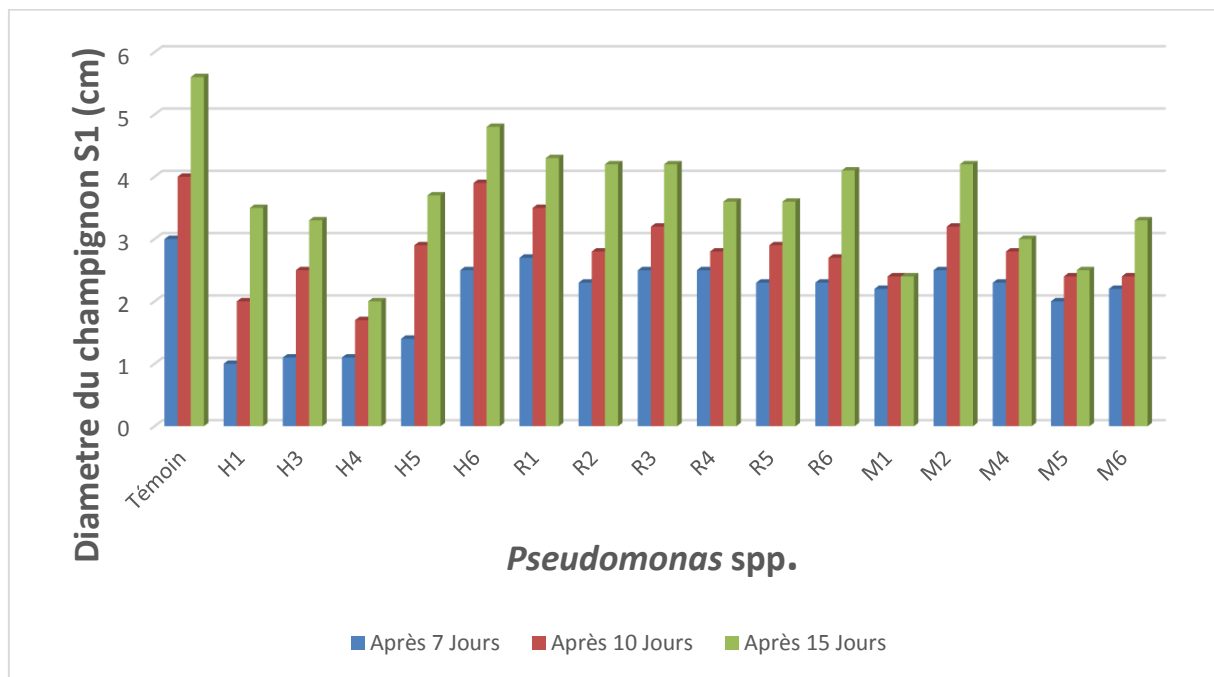


Figure 19 : Effet antagoniste des *Pseudomonas* spp. fluorescents sur la croissance mycélienne du *Verticillium dahliae* (S1)

S2 : La souche fongique S2 a été remarquablement moins sensible à l'effet antagoniste exercée par les bactéries PF. Le diamètre des colonies de l'isolat S2 varie entre 2,5 et 4,8 cm au bout de 15^{ème} jour de confrontation avec les souches H1, H4, H5, H6 H7, H8 R6, M4, M5 et M6. Alors que le diamètre du témoin non confronté est de 4,8 cm (figure 16).

La croissance des colonies de l'isolat S2 au bout de 15 jours de confrontation sont fortement inhibées en présence des bactéries H3, R4, M1, M3 puisqu'un diamètre variant entre 2 et 3 cm seulement est noté comparativement au témoin non confronté (4,8 cm) (figure 17).



Figure 20 : Colonies de *V. dahliae* (S2) confrontées avec la bactérie R1, R2 et R3, après une semaine d'incubation

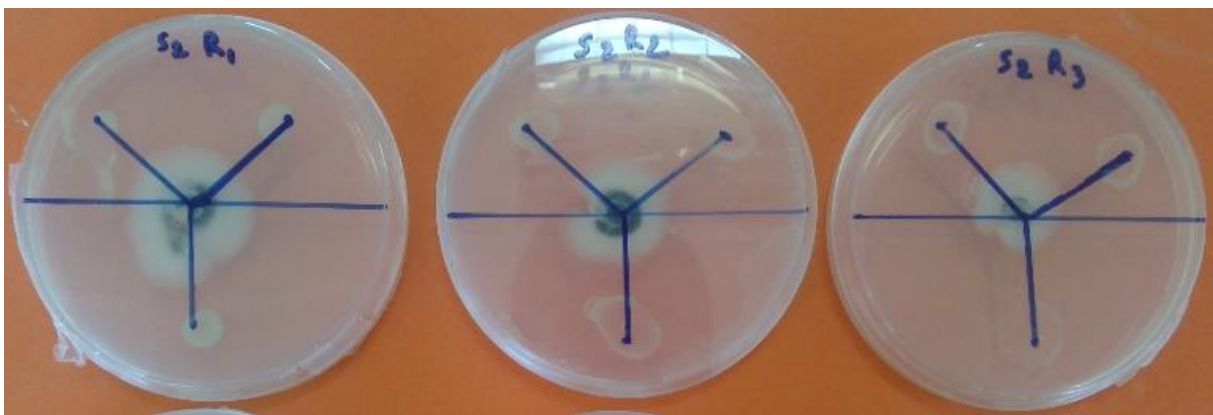


Figure 21 : Colonies de *V. dahliae* (S2) confrontées avec la bactérie R1, R2 et R3, après 10 jours d'incubation



Figure 22 : Colonies de *V. dahliae* (S2) confrontées avec la bactérie R1, R2 et R3, après 15 jours d'incubation

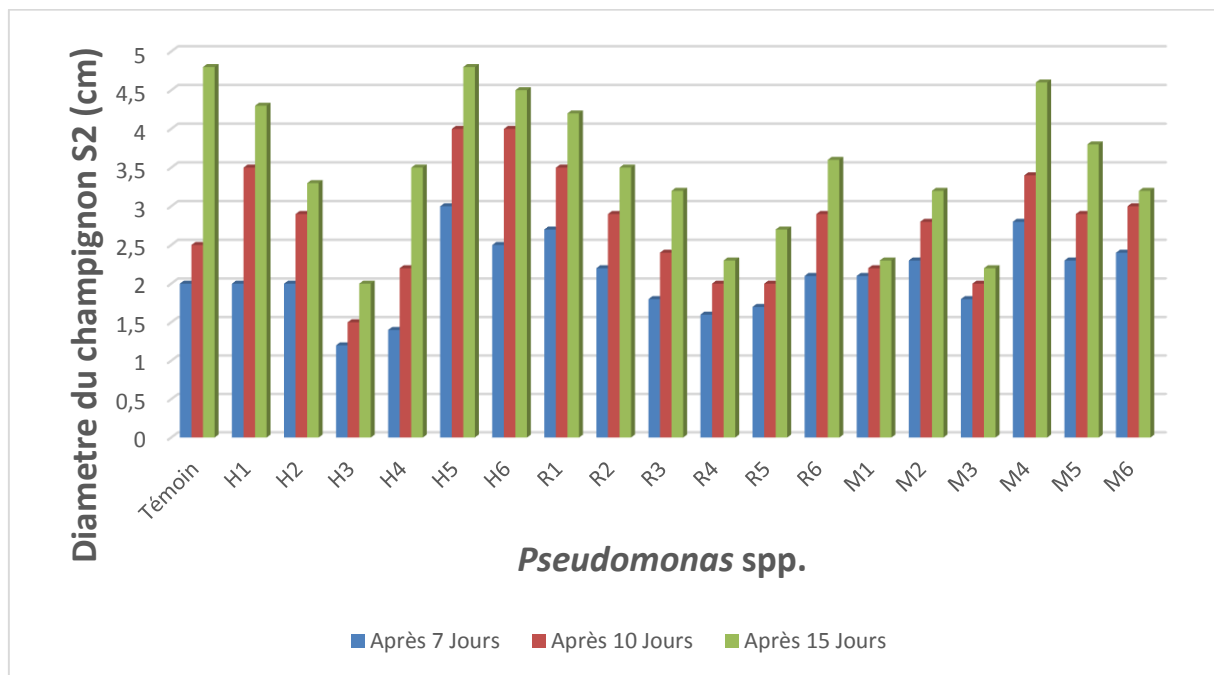


Figure 23 : Effet antagoniste des *Pseudomonas* spp. fluorescents sur la croissance mycélienne du *Verticillium dahliae* (S2)

S3 : la souche S3 a été la souche la plus sensible à l'antagonisme bactérien. La croissance de l'isolat S3 confronté est plus lente relativement au témoin non confronté et cela apparaît déjà au 7^{ème} et 10^{ème} jour de confrontation (figure 18 et 19). Au bout du 15^{ème} jour de confrontation, seul 6 souches de PF ont permis de noter une inhibition importante de la croissance du pathogène, le diamètre des colonies de ce dernier est égal ou inférieur à 2.5 cm (figure 20).

Trois souches (H6 M1 R6) de PF ont un effet antagoniste quasi nul (diamètre de la colonie fongique excédant les 4 cm), comparativement au témoin S3 où nous avons noté un diamètre égal à 5,5 au bout du 15^{ème} jour. Le reste des souches de PF ont montré un effet antagoniste modéré sur l'isolat S3 pour laquelle un diamètre variant entre 2,5 et 4 cm est noté (figure 21).



Figure 24 : Colonies de *V. dahliae* (S3) confrontées avec la bactérie R1, R2 et R3, après une semaine d'incubation



Figure 25 : Colonies de *V. dahliae* (S3) confrontées avec la bactérie R1, R2 et R3, après 10 jours d'incubation

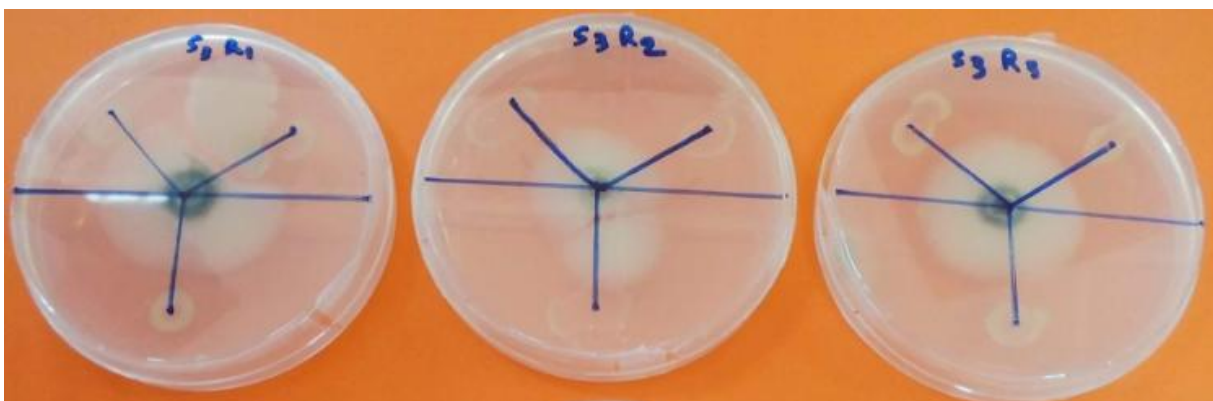


Figure 26 : Colonies de *V. dahliae* (S3) confrontées avec la bactérie R1, R2 et R3, après 15 jours d'incubation

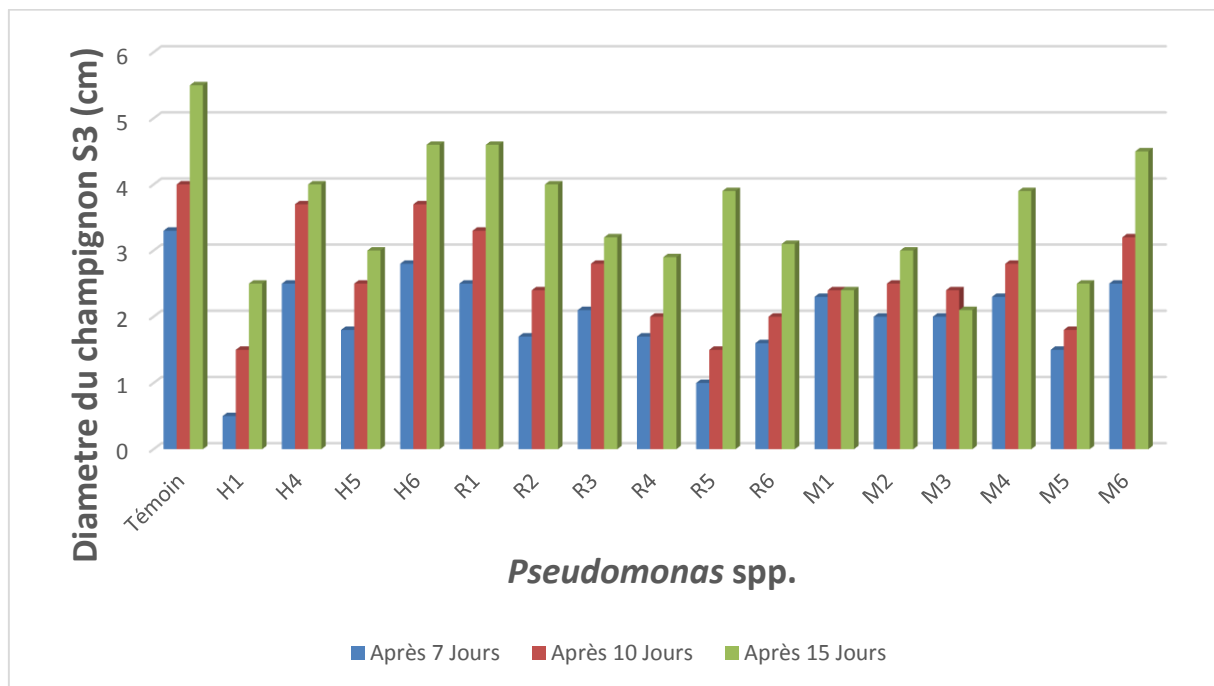


Figure 27 : Effet antagoniste des *Pseudomonas* spp. fluorescents sur la croissance mycélienne du *Verticillium dahliae* (S3)

Les résultats de l'analyse de variance montrent un effet significatif (Annexe1). Le test de Newman-keuls au seuil de 5% montre que les isolats de *Verticillium dahliae* sont répartis dans 2 groupes homogènes (Annexe2). En revanche le même test montre que les bactéries se répartissent dans 11 groupes homogènes indiquant ainsi des différences subtiles au sein des souches étudiées (Annexe3).

IV. Discussion et conclusion

Il a été constaté en analysant les résultats obtenus *in vitro* que certaines souches bactériennes de *Pseudomonas* spp. présentent un effet inhibiteur extrêmement marqué sur la croissance et le développement des colonies du parasite. Plusieurs modes d'action peuvent avoir lieu simultanément ou séparément. Nous pouvons supposer que la bactérie a diffusé des antibiotiques dans le milieu qui ont inhibé la croissance du pathogène. Nous supposons aussi une possible émission, par la bactérie, de substances volatiles. Mais les mécanismes d'antagonisme chez le groupe des PF sont très nombreux. De ce fait, seule une étude plus poussée en vue de connaître les métabolites mis en jeu peut établir avec exactitude la nature de ces composés.

La compétition trophique peut aussi être impliquée dans l'antagonisme bactérien, en particulier, sur la compétition pour le fer, comme en attestent les différentes synthèses bibliographiques relatives à ce sujet (Heming, 1986; Leong, 1986; Neilands et Leong, 1986; Loper et Buyer, 1991).

En effet, les *Pseudomonas* fluorescents produisent des sidérophores appelés pyoverdine (Meyer et Abdallah, 1978) ou pseudobactine (Teintze et al., 1981) qui forment avec le fer (Fe^{+++}) un complexe (ferripyoverdine ou ferripseudobactine) dont la constante de stabilité est beaucoup plus supérieure à celle des champignons phytopatogènes, de ce fait, les *Pseudomonas* fluorescents sont plus aptes à mobiliser le fer que les champignons (Lemanceau, 1988),

La variabilité dans le niveau de performance des différentes souches bactériennes testées (degré de l'antagonisme exercé) à l'encontre des colonies fongiques de *V. dahliae in vitro* peut se justifier par la diversité qui existe au sein des populations de P.F et la multitude de leurs mécanismes d'antagonisme, en effet certaines souches bactériennes présentent une aptitude compétitrice supérieure à d'autres. Les caractéristiques microbiennes responsables de cet avantage sont relativement méconnues (Baker et al., 1986a; 1987; Keel et al., 1989; Thomashow et Weller, 1988).

Kraus et Loper (1990) ont montré en utilisant des mutants de P.F dont les gènes responsables de la synthèse d'antibiotique ont subi une délétion permet d'associer de façon plus directe la protection biologique à l'aptitude à produire l'antibiotique.

De même Howie et Suslow (1986) ont montré qu'un mutant ne produisant pas des antibiotiques s'est révélé significativement moins apte à protéger le coton contre *Pythium ultimum* que la souche sauvage. Le même type de démonstration a été établi par Colyer et Mount (1984) pour expliquer la protection assurée par une souche de *Pseudomonas putida* contre *Erwinia carotovora*.

Cependant, d'autres métabolites secondaires peuvent être impliqués dans le déroulement de ce phénomène tel que (l'acide phénazine-1-carboxylique, acide cyanhydrique), cela a été suggéré par Thomashow et Weller (1988) en démontrant que l'acide phénazine-1-carboxylique, synthétisé par la souche de *Pseudomonas* fluorescent 2-79, est en partie responsable de son activité antagoniste et que la protection contre les maladies assurée par le mutant (non producteur

du composé) est beaucoup moins efficace que celle assurée par la souche sauvage capable de le produire.

Des résultats encourageants sont obtenus lors du test d'antagonisme *in vitro*. En effet 18 souches de *Pseudomonas* se sont avérées antagonistes de *Verticillium dahliae*. Les interactions microbiennes au niveau du sol étant complexes, par conséquent ces résultats ont besoin d'être confirmés par un test des tests *in situ*.

Etude in situ de l'action antagoniste d'une bactérie *Pseudomonas* sur *Verticillium dahliae*

Introduction

L'étude précédente nous a permis de montrer les capacités antagonistes *in vitro* les bactéries *Pseudomonas* sélectionnées vis-à-vis le *Verticillium dahliae*.

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 secrétés ; ces derniers sont adsorbés par le sol ou métabolisés et par conséquent n'atteignant pas leurs cibles.

Il apparait donc nécessaire de vérifier l'action antagoniste des microorganismes que nous avons sélectionnés sur le *Verticillium dahliae* au niveau du sol.

Comme il nous est impossible de vérifier l'action de l'ensemble des bactéries antagonistes, au total 18, nous nous sommes attelés à vérifier l'action de la bactérie la plus performante *in vitro*, à savoir la bactérie H1.

I. Matériel et méthodes

I.1 Matériel

I.1.1- Matériel fongique

Le matériel fongique est constitué des 3 isolats de *Verticillium dahliae* (S1, S2 e S3) décrits dans le chapitre II.

I.1.2- Matériel bactérien

La bactérie *Pseudomonas* H1 ayant montré une importante zone d'inhibition lors du test *in vitro*, a été sélectionnée en vue d'un test *in situ*.

I.1.3- Matériel végétal

On a utilisé la variété de tomate déterminée « Ouezna ». C'est un hybride F1 appartenant à la firme Petoseeds,



Figure 1 : Tomate au stade 5 feuilles

I.2 Méthodes

I.2.1 Evaluation de l'indice de la maladie des plantules de tomate cultivées en présence de la bactérie antagoniste H1

I.2.1.1 Bactérisation du sol et semis des graines

Les graines sont semées en tourbe, dans des plateaux alvéolés préalablement lavées et désinfectées à l'eau de Javel 2%. Les plantes sont élevées sous serre vitrée.

Au stade 5 feuilles, les plantules sont retirées délicatement des alvéoles et transplantées dans des pots en plastique de 6 cm de diamètre et de 7 cm de hauteur. Chaque plante est arrosée avec 20 ml de la suspension fraîchement préparée de la bactérie antagoniste à tester (10^8 CFU.ml⁻¹). Un volume équivalent de l'isolat de *Verticillium dahliae* à 10^6 spores/ml est rajouté immédiatement à chaque plante. Après une semaine, un second apport est réalisé, de la même manière que le premier, avec la bactérie antagoniste. Chaque traitement est répété 3 fois. Deux sortes de témoins sont constitués ; le premier bactérisé avec l'antagoniste (H1) sans apport du pathogène, l'autre a reçu uniquement de l'eau distillée stérile.

I.2.1.2 Protocole expérimental

Les plantes sont disposées selon un dispositif en blocs à trois répétitions (Figure 8)

24 plants de tomate sont utilisés dans cet essai, réparti comme suit :

Témoin 1 : constitué de 3 plantes saines (sans l'isolat de *Verticillium*, ni PF).

Témoin 2 : constitué de 3 plantes bactérisées avec la souche de PF.

Témoin 3 : 03 plantes inoculées avec l'un des isolats de *Verticillium dahliae*, soit 3 isolats x 3 répétitions, donc 9 plantes.

Traitement 1 : 03 plantes bactérisé avec *Pseudomonas* et inoculées avec l'un des isolats de *Verticillium dahliae*, soit 3 isolats x 3 répétitions, donc 9 plantes.



Figure 2 : Dispositif expérimental

I.2.1.3 Notation de la maladie

La maladie est notée selon l'échelle de Beyre et Lafaye (1985) utilisant un indice d'altération foliaire (I.A.F.) qui exprime l'intensité des altérations foliaires.

Nous avons réalisé 3 notations (à 7 dpi, 14 dpi et 21 dpi). Durant chaque notation, une note est attribuée à chaque feuille :

0 : Feuille d'aspect sain,

1 : Épinastie ou feuille flétrie sans chlorose,

2 : une ou plusieurs plages légèrement chlorotiques sur 1 ou plusieurs folioles,

3 : plages chlorotiques sur toute la surface ou plusieurs folioles ou plage chlorotique à centre nécrosé sur 1 ou plusieurs folioles,

4 : nécrose complète de plusieurs folioles ou feuille morte.

Un indice d'altération foliaire est ensuite établi pour chaque plante.

I.A.F. = (somme des notes /maximum possible*) x 100.

*Le maximum possible est égal à 4 fois le nombre de feuilles bien développées portées par la plante.

II. Résultats

Les premiers symptômes de la maladie sont apparus à partir de la première semaine sur les plantes témoins inoculées avec *V. dahliae*. Les folioles situées sur le même côté d'une feuille montrent un symptôme d'épinastie (figure 25). Les flétrissements semblent plus marqués au moment le plus chaud de la journée. Il s'ensuit, après 15 jours d'inoculation, un jaunissement progressif des folioles (figure 23). Au bout de 21^{ème} jours, des nécroses apparaissent au niveau des folioles, une nécrose complète de quelques feuilles a été également notée (figure 33). La progression des symptômes (flétrissement, chlorose et nécrose) se poursuit tout au long de l'essai, dans l'ordre déjà mentionné.

Les plantes bactérisées puis inoculées avec les l'un ou l'autre des isolats de *V. dahliae* se sont montrées plus résistantes à la maladie ; un retard a été constaté dans l'apparition des symptômes. La progression de ces derniers a été plus lente, et moins intense, les feuilles non touchées par la maladie étaient plus nombreuses avec une croissance quasi normale (figure 24, 28 et 32).



Figure 3 : Plantes de tomate après une semaine d'inoculation (T, témoin ; P, *Pseudomonas* seul ; P (S1, S2, S3), plantes bactériées et inoculées avec l'un des isolats de *V. dahliae* ; V (S1, S2, S3), plante inoculé seulement avec l'un des isolats de *V. dahliae*).



Figure 4 : T : Plante témoin ; P : Plante bactériée avec *Pseudomonas* (une semaine après le test)



Figure 5 : Plantes bactériées et inoculée avec l'un des isolats de *V. dahliae* (S1, S2 ou S3), après une semaine d'inoculation.



Figure 6 : Plantes inoculées avec l'un des isolats de *V. dahliae* (S1, S2 ou S3), après une semaine d'inoculation.



Figure 7 : Plantes de tomate après 15 jours d'inoculation (T, témoin ; P, *Pseudomonas* seul ; P (S1, S2, S3), plantes bactériées et inoculée avec l'un des isolats de *V. dahliae* ; V (S1, S2, S3), plante inoculé seulement avec l'un des isolats de *V. dahliae*).



Figure 8 : T : Plante témoin ; P : Plante bactériée avec *Pseudomonas* (15 jours après le test)



Figure 9 : Plantes bactériées et inoculée avec l'un des isolats de *V. dahliae* (S1, S2 ou S3), après 15 jours d'inoculation.



Figure 10 : Plantes inoculées avec l'un des isolats de *V. dahliae* (S1, S2 ou S3), après 15 jours d'inoculation.



Figure 11 : Plantes de tomate après 21 jours d'inoculation (T, témoin ; P, *Pseudomonas* seul ; P (S1, S2, S3), plantes bactériées et inoculée avec l'un des isolats de *V. dahliae* ; V (S1, S2, S3), plante inoculé seulement avec l'un des isolats de *V. dahliae*).



Figure 12 : T : Plante témoin ; P : Plante bactériée avec *Pseudomonas* (21 jours après le test)



Figure 13 : Plantes bactériées et inoculée avec l'un des isolats de *V. dahliae* (S1, S2 ou S3) après 21 jours d'inoculation.



Figure 14 : Plantes inoculées avec l'un des isolats de *V. dahliae* (S1, S2 ou S3), après 21 jours d'inoculation.

L'intensité des altérations foliaires notée sur l'échelle de Beye et Lafaye (1985) a permis de noter des différences nettes dans les symptômes, entre les plantes témoins inoculées avec l'un des isolats de *V. dahliae* et les plantes traitées avec la bactérie H1 (figure 34). Après 21 jours d'inoculation, les plantes témoins inoculées avec V1, V2 ou V3 expriment des indices d'altération de 22, 34 et 22 % respectivement, alors que les plantes inoculées et bactérisées expriment des indices d'altération plus faibles allant de 7, 20 et 17 %.

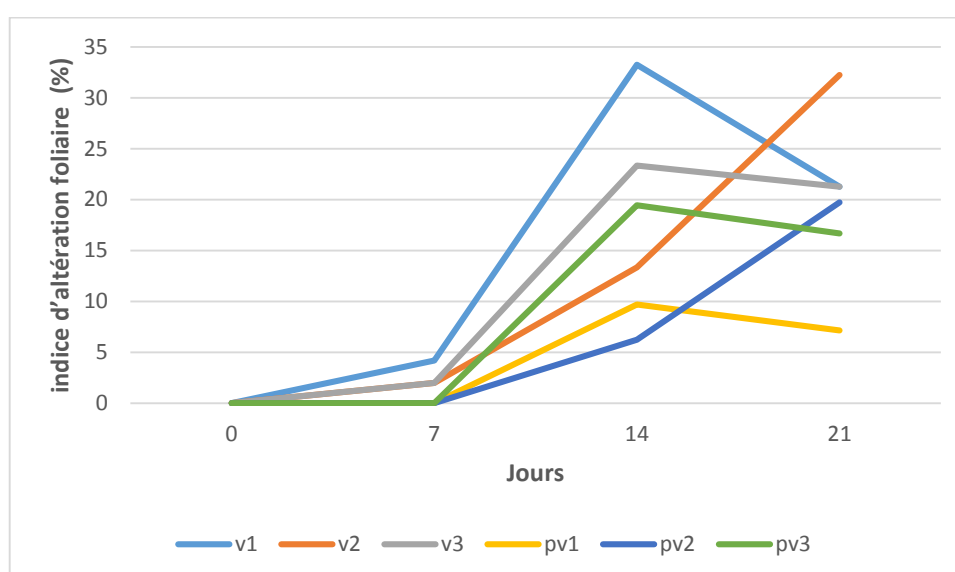


Figure 15 : Sévérité de la maladie des plantes de tomate due à *Verticillium dahliae*, exprimée en pourcentage d'altération foliaire, en présence de *Pseudomonas* sp. (H1).

v1, Plantes témoins inoculées avec l'isolat S1 ; **v2**, Plantes témoins inoculées avec l'isolat S2 ; **v3**, Plantes témoins inoculées avec l'isolat S3 ; **pv1** : Plantes bactérisées et inoculées avec l'isolat S1 ; **pv2** : Plantes bactérisées et inoculées avec l'isolat S2 ; **pv3** : Plantes bactérisées et inoculées avec l'isolat S3.

III. Discussion et conclusion

Comme dans plusieurs travaux précédents traitant l'effet antagoniste des P.F sur les champignons phytopathogènes, la souche bactérienne utilisée dans notre essai in vivo est présélectionnée in vitro (via la technique de la confrontation directe).

Dans le test *in vivo* la souche bactérienne H1 a été confrontée avec le pathogène au niveau d'un substrat à base de terreau. Cette bactérie s'est montrée apte à limiter la sévérité de la maladie. En effet, la souche bactérienne s'est montrée capable de retarder l'apparition des symptômes chez les plantes de tomate bactérisées. À ce propos, Vandenberg et al. (1983) et Rmmoorthy et al. (2002) ont établi que P.F stimulait les mécanismes de défense des plantes en améliorant leur résistance aux différents phytopathogènes. Uppal et al. (2008) ont noté une réduction significative de l'incidence de la verticilliose sur la culture de la pomme de terre par des souches de *Pseudomonas* spp.

Lindberg (1981), Howell et Stipanovic (1979, 1980) concluent que la protection des plantes assurée par les souches de *Pseudomonas* est liée à la synthèse des antibiotiques.

Il faut noter que la corrélation entre le pouvoir antagoniste d'une souche bactérienne *in vitro* et son effet antagoniste *in vivo* vis-à-vis un champignon phytopathogène, n'est pas toujours évidente, les résultats que nous avons obtenus avec la souche H1 sont prometteurs. Defago et Haas (1990) ont étudié de façon approfondie les mécanismes responsables des effets bénéfiques enregistrés. Ainsi, des progrès ont été accomplis dans la compréhension de ces mécanismes grâce à l'utilisation de techniques de biologie moléculaire, reposant en particulier sur l'utilisation de mutants.

Les caractéristiques biologiques du sol sont également déterminantes. En effet, et en absence du pathogène, une souche de *Pseudomonas* dont le mode d'action est l'antagonisme microbien ne modifiera pas la croissance de la plante bactérisée (Bakker et al., 1986a). Cela a été constaté dans notre étude, où la croissance des plants de tomate bactérisées et non inoculées n'était point améliorée en comparaison avec les plants témoins (ni bactérisées, ni inoculées)

D'autres facteurs tel que l'état biologique et physico-chimique du sol, Rosenweig et Stotzky (1979 et 1980), l'état physiologique la plante hôte, et l'aptitude de la souche à coloniser les racines ainsi que sa densité dans la rhizosphère (Howie et al., 1987) peuvent conditionner l'expression antagoniste des souches de P.F et doivent être pris en considération.

Dans cette partie nous avons testé une seule souche de *Pseudomonas*, les résultats ont été encourageants. Les autres souches sélectionnées comme antagonistes *in vitro* doivent également être testé *in situ*. Pour celles qui s'avèreraient performantes, l'identification de

l'espèce est nécessaire. Des études ultérieures sur la nature des métabolites impliqués doivent être réalisées.

Conclusion générale

Le développement des connaissances en écologie microbienne, en particulier sur les relations antagonistes entre les microorganismes du sol, a fait naître l'idée d'utiliser ces microorganismes pour lutter contre les maladies vasculaires d'origine tellurique.

Jusqu'à présent, malgré de nombreux travaux de recherche dans la lutte contre les maladies telluriques, les résultats sont loin d'être satisfaisants car souvent les antagonistes sont incapables de protéger la plante totalement de la pénétration de ces parasites.

Des connaissances récentes sur les bactéries PGPR ont montré que certaines de ces bactéries ne se comportent pas seulement en tant qu'antagonistes des pathogènes mais sont capables d'induire des mécanismes de défense chez les plantes mises en contact avec ces bactéries.

Dans cette optique nous avons d'abord procédé à l'isolement des *Pseudomonas* fluorescents, à partir de sols d'oliveraies indemnes de la verticilliose en vue de lutter contre l'agent pathogène de cette maladie.

En tout, 18 souches de P.F ont été testées *in vitro* par la méthode de la confrontation directe, afin d'évaluer leur pouvoir inhibiteur vis-à-vis *V. dahliae*. Une variabilité dans le niveau de l'antagonisme exercé par les souches bactériennes de P.F sur les colonies fongiques a été notée, tandis que certaines souches ont montré un effet antagoniste extrêmement marquée, d'autres n'avaient montré aucun effet.

En raison de la nature lente des symptômes sur des plants d'oliviers et du temps limité dont nous disposons dans le cadre de la préparation du master, le test *in vivo* est réalisé sur une autre plante hôte du champignon, à savoir la tomate. Le pathogène est connu pour être polyphage et s'attaquant à plusieurs espèces de plantes.

La souche de *Pseudomonas* H1 a été sélectionnée pour le test *in vivo*. Des racines de plants de tomate sont inoculées avec le pathogène et bactérisés au P.F. Les résultats obtenus montrent une certaine résistance à la maladie chez les plantes bactérisées. En effet, des symptômes moins graves sont observés chez ces dernières. Leur apparition est retardée.

L'étude que nous avons réalisée ne constitue qu'une première étape dans la recherche et l'étude des PF antagonistes à *V. dahliae*. Ces travaux doivent se poursuivre en vue de tester *in vivo*, sur des plants d'oliviers et de tomate, l'ensemble des bactéries sélectionnées *in vitro*. On pourrait tester aussi l'effet combiné de plusieurs souches.

D'autres sols restent également à prospecter, afin peut être de trouver d'autres souches plus performantes.

L'étude des effets bénéfiques des *Pseudomonas* spp. fait appel à des domaines de compétence très divers (pédologie, génétique physiologie, biochimie...etc) qui, associés, vont permettre de réaliser des progrès substantiels dans la connaissance des mécanismes et des conditions d'expression des effets bénéfiques et ouvrir des nouvelles perspectives dans le domaine de la lutte biologique contre les maladies vasculaires en général et contre la verticilliose de l'olivier en particulier.

Références bibliographiques

Acharya, S.N. and Huang, H.-C. 2003. Breeding alfalfa for resistance to *verticillium* wilt: A sound strategy. Malcolm, G.M., Kuldau, G.A., Gugino, B.K., and Jiménez-Gasco, M. del M. 2013. Hidden Host Plant Associations of Soilborne Fungal Pathogens: An Ecological Perspective. *Phytopathology* 103: 538–544.

Agrios, G.N. 2004. *Plant pathology* (Elsevier Academic Press: Amsterdam; Boston).

Alabouvette, C. 1995. Effect of two plant species, flax (*Linum usitatissimum*) and tomato.

Al-Ahmad MA, Mosli MN (1993) *Verticillium* wilt of olive in Syria. *Bull OEPP/EPPO Bull* 23:521–529a

Amekraz, N. 2013. Utilisation des *Pseudomonas* spp. fluorescents et des plantes aromatiques et médicinales contre *Clavibacter michiganensis* sub. sp. *michiganensis*, agent du chancre bactérien de la tomate. Thèse de doctorat, université IbnZohr, Agadir, Maroc

Amouretti. MC and Com et G. 1998 *Artisanat et matériaux en agriculture*.

Anderson AJ, Guerra D (1985) Responses of bean to root colonization with *Pseudomonas putida* in hydroponic system. *Phytopathology* 75, 992-995

Angiolillo A, Mencuccini M, Baldoni L (1999) Olive genetic diversity assessed using amplified fragment length polymorphisms. *TheorAppl Genet* 98:411–421

Armstrong, G.M., Armstrong, J.K., and Billington, R.V. 1975. *Fusarium oxysporum* Forma Specialis *Voandzeiae*, a New Form Species Causing Wilt of Bambarra Groundnut. *Mycologia* 67: 709. Michielse, C.B. and Rep, M. 2009. Pathogen profile update: *Fusarium oxysporum*.

Bais, H.P., Weir, T.L., Perry, L.G., Gilroy, S. et Vivanco, J.M. 2006. The role of root exudates in rhizosphere interactions with plants and other organisms. *Annual Review of Plant Biology*, 57: 233-66.

Baker KF, Cook, (1988) Effect of *Bacillus* spp. on increased growth of seedlings in steamed and in non-treated soil. *Phytopathology* 67, 1027-1034

Benhamou, N. and Nicole, M. 1999. Cell biology of plant immunization against microbial infection: The potential of induced resistance in controlling plant diseases. *Plant Physiol. Biochem.* 37: 703–719.

Berlanger, I. and Powelson, M.L. 2000. *Verticillium* wilt.

Besnard G. Rubio de Casas R. Vargas P. 2003 A set of primers for length and nucleotide substitution polymorphism in chloroplastic DNA of *Olea europaea* L. (Oleaceae). *Mol Ecol Notes* 3: 651–653

Biotechnology in Agriculture and Forestry, Legumes and Oil Seed Crops, Vol 10(pp 593–641). Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg

Blanco-López MA, Jiménez-Díaz RM (1995) Una propuesta de lucha integrada contra la Verticilosis de lolivo. *Frutic Prof* 70:52–57 (in Spanish)

Blanco-Lopez, M. A.; Jimenez-Diaz, R. M; Caballero, J. M. 1984. Symptomatology, incidence and distribution of *Verticillium* wilt of olive trees in Andalusia. *Phytopath.* 23 : 1-8.

Blanco-Lopez, M. A.; Jimenez-Diaz, R. M; Caballero, J. M. 1984. Symptomatology, incidence and distribution of *Verticillium* wilt of olive trees in Andalusia. *Phytopath.* 23 : 1-8.

Bloemberg, G.V. et Lugtenberg, B.J. 2001. Molecular basis of plant growth promotion and Boller, T., Wiemken, A. et Sanders, I.R. (1998). Mycorrhizal fungal diversity determines plant biodiversity, ecosystem variability and productivity. *Nature*, 396: 72-75.

Bouznad, Z.; 1989, Contribution à la croissance du genre *Ascochyta*. Cas particulier de l'étude ultra structurale et cytochimique des relations hôte- parasite, *Pisum sativum* L. *Ascochyta pisi* lib, thèse doctorat, Paris VI .217p. *Breed.* 50: 235-238

Cardon, Z.J. et Gage, D.J. 2006. Resource exchange in the rhizosphere: molecular tools and the microbial perspective. *Annual Review of Ecology, Evolution and Systematics*, 37: 459-488.

Carrión Y, Ntinou M, Badal E 2010 *Olea europaea* L. in the North Mediterranean Basin

Cirulli M (1981) Attuallicognizionisulla Verticilliosi del l'olivo. Inf Fitopatol 1–2:10011005

Colyer PD, Mount MS (1984) Bacterization of potato with *Pseudomonas putida* and its influence on post-harvest soft rot diseases. Plant pathology. 68, 703-706

Competition and the fungal community. Dans: The mycota IV. Environmental and Microbiological (Esser, K, Wicklow, D.T., Svderstrvm, B.E.). Springer-Verlag, Berlin, Allemagne. Pp. 135-147.

Cook RJ (1993) Alternative disease management strategies. In: Buxton DR, Shibles R, Forsberg RA, Blad BL, Asay KH, Paulsen GM, Wilson RF (eds) International Crop Science. Crop Science Society of America, Madison, pp 129–134

Curl, E.A. et Truelove, B. (1986). The rhizosphere. Springer-Verlag, New York, Etats-Unis, 288 p.

Curtis, T.P., Sloan, W.T. et Scannell, J.W. (2002). Estimating prokaryotic diversity and its limits. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA*, 99: 10494-10499.

Daugherty, M.P., Lopes, J.R.S., and Almeida, R.P.P. (2010). Strain-specific alfalfa water stress induced by *Xylella fastidiosa*. *Eur. J. Plant Pathol.* 127: 333–340.

Defago G, Haas D (1990) *Pseudomonads* as antagonists of soilborne plant pathogens: mode of action and genetic analysis. In: Soil biochem (JM Bollag, G Stotzky, eds) 6, 249-291

Defago G, Haas D (1990) Pseudomonads as antagonists of soilborne plant pathogens: mode of action and genetic analysis. In: Soil biochem (JM Bollag, G Stotzky, eds) 6, 249-291

DeVay JE, Pullman GS (1984) Epidemiology and ecology of diseases caused by *Verticillium species*, with emphasis on *Verticillium* wilt cotton. *Phytopathol Mediterr* 23:95–108

Digat B, Gaudillat M, Labadie JM (1990) Susceptibility of various tomato and lettuce genotypes to plantgrowth- promoting *Pseudomonas*. *Symbiosis* 9, 295- 303

Duijff BJ, Meijer JW, Bakker PAHM, Schippers B (1991) Suppression of *Fusarium* wilt of carnation of *Pseudomonas* in soil; mode of action. In: Plant growth-promoting rhizobacteria progress and prospects (C Keel, B Koller, G Defago, eds) IOBC/ WPRS, XIV/8, 152-156

During the Pleni glacial and the Early-Middle Holocene. *QuatSci Rev* 29:952–968

E, Blanco-López MA, López-Escudero FJ (2009) Physiological differences expressed by susceptible and resistant olive cultivars inoculated with *Verticillium dahliae*. 10th International *Verticillium Symposium*, Book of Abstracts, Corfu Island, Hellas, p 71

Elad Y, Chet I (1987) possible role of competition for nutrients in biocontrol of *Pythium*damping-off by bacteria. *Phytopathology* 77, 190-195

Ellstrand, N. C. 2003. Dangerous liaisons? When cultivated plants mate with their wild relatives. Johns Hopkins University Press, Baltimore; USA. 244 pp.
Experimental Botany, 52: 487-511.

Falisto E. and N. Tosti. 1996. *Cytogenetic investigation in Olea europaea*L. *J. Genet.*

FAO, Food and Agriculture Organization of the United Nations (2008)
<http://www.fao.org/corp/statistics/en/>

Fradin, E.F. and Thomma, B.P.H.J. 2006. Physiology and molecular aspects of *Verticillium* wilt diseases caused by *V. dahliae* and *V. albo-atrum*. *Mol. Plant Pathol.* 7: 71–86.

Fravel DR (1988) Role of antibiosis in the biocontrol of plant diseases. *Annu Rev Phyto pathol* 26, 75-91

G.H.Larsen, La pépinière fruitière, 1949

Garbaye J, Bowen GD (1987) Effect of different microflora on the success of ectomycorrhizal inoculation of *Pinusradiata*. *Can J For Res* 17, 941-943

Garbeva, P., van Elsas, J.D. et van Veen, J.A. 2008. Rhizosphere microbial community and its response to plant species and soil history. *Plant Soil*, 302: 19-32.

Gerretsen FC (1948) The influence of microorganisms on the phosphate intake by the plant *Plant Soil* 1, 51-81

Giovanni.P. Martelli , *A Brief Outline of Infectious Diseases of Olive* , Dipartimento di Scienze del Suolo, della Pianta e degli Alimenti, Università degli Studi Aldo Moro, Bari, Italy, Published 20 August 2013

Goicoechea N (2009) To what extent are soil amendments useful to control *Verticillium* wilt? *Pest Manag Sci* 65:831–839

Goud JC, Hiemstra JA (1998) Other tree species. In: Hiemstra JA, Harris DC (eds) A compendium of *Verticillium* wilts in tree species. Ponsen and Looijen, Wageningen, pp 37–39

Grimes HD, Mount MS (1987) Influence of *Pseudomonas putida* on nodulation of *Phaseolus vulgaris*. *Soil Biol Biochem* 6, 27-30

Harris DC, Yang YR, Ridout MS (1993) The detection and estimation of *Verticillium dahlia* in naturally infested soil. *Plant Pathol* 42:238–250

Hartman H, Schnathorst WC, Whisler J (1971) Oblonga, clonal olive rootstock resistant to *Verticillium* wilt. *Calif Agric* 25:12–15

Harwood, T.D., Tomlinson, I., Potter, C.A., and Knight, J.D. 2011. Dutch elm disease revisited : past, present and future management in Great Britain. *Plant Pathol.* 60: 545–555.

Heming BC 1986 Microbial-iron interactions in the plant rhizosphere. An overview. *J Plant Nutr* 9, 505-521

Hiltner, L. 1904. Über neuere Erfahrungen und Problem auf dem Gebiet der Bodenbakteriologie und unter besonderer Berücksichtigung der Grundung und Brache. *Arbeits und Deutsche Land wirtschaf Gesell schaft*, 98: 59-78.

Högberg, P., Nordgren, A., Buchmann, N., Taylor, A.F.S., Ekblad, A., Hogberg, M.N.,

Horner-Devine, M.C., Leibold, M.A., Smith, V.H. et Bohannan, B.J.M. (2003). Bacterial diversity patterns along a gradient of primary productivity. *Ecology Letters*, 6: 613-622.

Howell CR, Okon Y (1987) Recent results of greenhouse and field trials on bacterial-induced plant growth promotion with no obvious symptoms of plant disease. In: Proc Int Workshop PGPR. Ontario, Canada, 29-33

Howell CR, Stipanovic RD (1979) Control of *Rhizoctonia solani* on cotton seedlings with *Pseudomonas fluorescens* and with an antibiotic produced

Howell CR, Stipanovic RD 1980 Suppression of *Pythium ultimum* induced damping off of cotton seedlings by *Pseudomonas fluorescens* and its antibiotic, pyoluteorin. *Phytopathology*70, 712-715.

Howie WJ, Cook RJ, Weller DM 1987 Effects of soil matric potential and cell mobility on wheat root colonization by fluorescent pseudomonads suppressive to take-all. *Phytopathology* 77, 286-292

Howie WJ, Suslow TV (1986) Effect of antifungal compound biosynthesis on cotton root colonization and *Pythium* suppression by a strain of *Pseudomonas fluorescens* and its antifungal minus isogenic mutant. *Phytopathology*76, 1069 (abstract)

Interactions among soil components, plants, and microorganisms. Dans "The rhizosphere",

Issa Beye, Jean-FrancoisLafay. Etude de critères de sélection pour une résistance générale la verticilliose chez la tomate. *Agronomie*, EDP Sciences, 1985, 5 (4), pp.305-311. <hal-00884763>.

Jackson RM, Brown ME, Burlingham SK (1964) similar effects on tomato plants of *Azotobacter* inoculation and application of gibberelins. *Nature* 203, 851-852

Janse, J.D. and Obradovic, A. 2010. *Xylella Fastidiosa*: Its Biology, Diagnosis, Control and Risks. *J. Plant Pathol.* 92: S35–S48.

Jiménez-Díaz RM (1998) Control de enfermedades. In: Jiménez- Díaz RM, Lamo de Espinosa J (eds) Agricultura Sostenible. Ediciones Mundi-Prensa, Madrid, Barcelona, México, DF, pp 345–375 (in Spanish)

Juzwik, J., Harrington, T.C., MacDonald, W.L., and Appel, D.N. 2008. The origin of *Ceratocystis fagacearum*, the oak wilt fungus. *Annu. Rev. Phytopathol.* 46: 13–26.

Kamble, A., Koopmann, B., and von Tiedemann, A. 2013. Induced resistance to *Verticillium longisporum* in *Brassica napus* by β -aminobutyric acid. *Plant Pathol.* 62: 552–561.

Katan J (1987) Soil solarization. In: Chet I (ed) Innovative approaches to plant disease management. Wiley, New York, pp 77–105

Katan J (2000a) Physical and cultural methods for the management of soil-borne pathogens. *Crop Prot* 19:725–731

Keel, C, Schnider, U., Maurhofer, M., Voisard, C, Laville, J., Burger, P., Wirthner, P., Haas, D. et Defago G. 1992. Suppression of root diseases by *Pseudomonas fluorescens* CHAO: importance of the secondary metabolite 2, 4-diacetylphloroglucinol. *Molecular Plant-Microbe Interactions* 5:4-13.

Kent, A.D. et Triplett, E.W. 2002. Microbial communities and their interactions in soil land

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

Klosterman, S.J., Atallah, Z.K., Vallad, G.E., and Subbarao, K.V. 2009. Diversity, pathogenicity, and management of *Verticillium species*. *Annu. Rev. Phytopathol.* 47: 39–62.

Kowalchuk, G.A., Yergeau, E., Leveau, J.H.J., Sessitsch, A. et Bailey M. 2010. Plant-associated microbial communities. Dans "Environmental molecular microbiology", Liu, W-T. et Jansson, J.K.(Eds). Caister Academic Press, Norfolk, Royaume-Uni, p 131-148.

Krasilnikov M (1961) On the role of soil bacteria in plant nutrition. J Gen Appl Microbiol 7,128-144

Kraus J, Loper JE (1991) Biocontrol of *Pythium* damping-off of cotton and cucumber by *Pseudomonas fluorescens* Pf-5: mechanistic studies. In: Plant growth-promoting rhizobacteria-progress and prospects(C Keel, B Koller, G Defago, eds) IOBC/WPRS XIV/8, 172-176

Latour, X., Delorme, S., Mirleau, P. et Lemanceau, P. 2009. Identification of traits implicated in the rhizosphere competence of fluorescent pseudomonads: description of a strategy based on population and model strain studies. Dans "Sustainable agriculture", part. 3, Lichtfouse, E., Navarrete,

Leake, J.R., Johnson, D., Donnelly, D.P., Muckle, G.E., Boddy, L. et Read, D.J. 2004. Networks of power and influence: the role of mycorrhizal mycelium in controlling plant communities and agroecosystem functioning. *Canadian Journal of Botany*, 82: 1016-1045.

Leben SD, Wadi JA, Easton GD (1987) Effects of *Pseudomonas fluorescens* on potato plant growth and control of *Verticillium dahliae*. *Phytopathology*77, 1592-1595

Leben SD, Wadi JA, *Pseudomonas fluorescens* on potato plant growth and control of *Verticillium dahliae*. *Phytopathology*77, 1592-1595

Leeman M, Scheffer RJ, Schippers B (1991) Control of fusarium wilt of radish by *Pseudomonas fluorescens* WCS374, in greenhouse trials. In: Plant growth-promoting rhizobacteria-progress and prospects (C Keel, B Koller, G Defago, eds) IOBC/ WPRS, XIV/8, 34-38

Lemanceau, P. 1992. Beneficial effects of rhizobacteria on plants: exemple of fluorescent

Lemanceau, P. et Alabouvette, C. 1991. Biological control of *Fusarium* diseases by fluorescent *Pseudomonas* and non-pathogenic *Fusarium*. *Crop Protection*, 10: 279-286.

Lemanceau, P. et Heulin, T. 1998. La rhizosphère. Dans "Sol : interface fragile", Stengel, P. et Gelin, S. (Eds). INRA, Paris, France, p. 93-106.

Lemanceau, P., Alabouvette, C. et Couteaudier, Y. 1988. Recherches sur la résistance des sols aux maladies, XIV : modification du niveau de réceptivité d'un sol résistant et d'un sol sensible aux fusarioses vasculaires en réponse à des apports de fer ou de glucose. *Agronomie*, 8: 155-162.

Lemanceau, P., Corberand, T., Gardan, L., Latour, X., Laguerre, G., Boeufgras, J-M. et

Lemanceau, P., Expert, D., Gaymard, F., Bakker, P.A.H.M. et Briat, J.F. 2009. Role of iron in plant-microbe interactions. *Advances in Botanical Research*, 51: 491-549.

Lemanceau, P., Offre, P., Mougel, C., Gamalero, E., Dessaux, Y., Moenne-Loccoz, Y. et Berta, G. 2006. Microbial ecology of the rhizosphere. Dans "Microbiological methods for assessing soilquality", Bloem, J., Hopkins, D.W. et Benedetti, A. (Eds). CABI publishing, Massachusetts, Cambridge, MA, Etats-Unis, p. 228-230.

Lemanceau, P., Samson, R. et Alabouvette, C. 1998. Recherche sur la résistance des sols aux maladies, XV : comparaison des populations de *Pseudomonas* fluorescents dans un sol résistant et un sol sensible aux fusarioses vasculaires. *Agronomie*, 8: 243-249.

Leong J (1986) Siderophores: their biochemistry and possible role in the biocontrol of plant pathogens. *Annu Rev Phytopathol* 24, 187-208

Leong J 1986 Siderophores: their biochemistry and possible role in the biocontrol of plant pathogens. *Annu Rev Phytopathol* 24, 187-208

Lewington. A and Parker. E, 1999 *Ancient trees*. Trees that live for a thousand years. (Collins & Brown, London).

Libbert E, Kaiser W, Kunert R (1969) Interactions between plants and epiphytic bacteria regarding their auxin metabolism. VI. The influence of the epiphytic bacteria on the component of extractable auxin in the plant. *Physiol Plant* 22, 432-439

- Lievens, B., Rep, M., and Thomma, B.P.H.J. 2008. Recent developments in the molecular discrimination of formae speciales of *Fusarium oxysporum*. Pest Manag. Sci. 64: 781–788.
- Ligoxigakis, E.K., Vakalounakis, D.J., and Thanassouloupoulos, C.C. 2002. Weed hosts of *Verticillium dahliae* in crete: Susceptibility, symptomatology and significance. Phytoparasitica 30: 511– 518.
- Loper JE, Buyer JS 1991 Siderophores in microbial interactions on plant surfaces. Mol Plant-Microbe Interac 4, 5-13
- Loureiro J, Rodriguez E, Costa A, Santos C 2007 Nuclear DNA content estimations in wild olive (*Olea europaea* L.ssp. *europaea* var. *sylvestris*) and Portuguese cultivars of *O. europaea* using flow cytometry. Genet Resour Crop Evol 54: 21-25.
- Lynch JM (1976) Products of soil microorganisms in relation to plants growth. CRC Crit Rev Microbiol 5, 67-107
- M., Debaeke, D., Souchère, V. et Alberola, C. (Eds). Springer, Pays-Bas, p. 285-296.
- Maillard P., 1975 - L'olivier. Comité technique de l'olivier section spécialisée de l'INVFLEC. Paris,
- Mamoun M, Olivier JM (1992) Effect of soil pseudomonads on colonisation of hazel roots by ectomycorrhizal species *Tuber melanosporum* and its competitors. Plant Soil 139, 265-273
- Linderman RG, Paulitz TC (1990) Mycorrhizal rhizo bacterial interactions. In: Biological control of soil-borne plant pathogens (D Hornby, ed) CAB, Int, 261-283
- Markakis EA, Tjamos SE, Antoniou PP, Roussos PA, Paplomatas EJ, Tjamos EC (2010) Phenolic responses of resistant and susceptible olive cultivars induced by defoliating and non-defoliating *Verticillium dahlia* pathotypes. Plant Dis 94:1156–1162
- Mathre, D. 1986. Occurrence of *Verticillium dahliae* on Barley. Plant Dis. 70: 981–981.

Mathre, D. 1989. Pathogenicity of an Isolate of *Verticillium dahliae* Form Barley. *Plant Dis.* 73: 164–167.

Mazurier S, Lemunier M, Siblot S, Mougél C & Lemanceau P 2004 Distribution and diversity of type III secretion system-like genes in saprophytic and phytopathogenic fluorescent pseudomonads. *FEMS Microbiol Ecol* 49: 455-467.

Meyer JM, Abdallah MA 1978 The fluorescent pigment of *Pseudomonas fluorescens*: biosynthesis, purification and physico-chemical properties. *J Gen Microbiol* 107, 319-328

Michielse, C.B. and Rep, M. 2009. Pathogen profile update: *Fusarium oxysporum*. *Mol. Plant Pathol.* 10: 311–324.

Microbe interactions in the rhizosphere. *Journal of Experimental Botany*, 56: 1729–1739.
Microbial populations responsible for specific soil suppressiveness to plant pathogens. *Annual Review of Phytopathology*, 40: 309-348.

Minelli S., Maggini F., Gelati, M.T., Angiolillo A. and P.G. Cionini. 2000. *The chromosome complement of Olea europaea L.: characterization by differential staining of the chromatin and in situ hybridization of highly repeated DNA sequences.* *ChromRes.* 8:615-619.

Mol, L. and Riessen, H.W. van (1995). Effect of plant roots on the germination of microsclerotia of *Verticillium dahliae*. *Eur. J. Plant Pathol.* 101: 673–678.

Mol. Plant Pathologie. 10 : 311–324.

Mol. Plant Pathology, on the diversity of soilborne populations of fluorescent pseudomonads. *Applied and Environmental Microbiology*, 61: 1004-1012.

Montesinos, E., Bonaterra, A. et Moselio, S. 2009. Pesticides, Microbial. Dans: *Encyclopedia of Microbiology* (Moselio, S.), Academic Press, Oxford, UK. Pp. 110-120.

Morgan, J.A.W., Bending, G. D. et White, P. J. 2005. Biological costs and benefits to plant–rhizosphere ecosystems. *Annual Review of Microbiology*, 56: 211-236.

- Nannipieri, P., Ascher, J., Ceccherini, M.T., Landi, L., Pietramellara, G., Renella, G. et Valori, F. 2008. Effects of root exudates in microbial diversity and activity in rhizosphere soils. Dans "Soilbiology: molecular mechanisms of plant and microbe coexistence", vol. 15, Nautiyal, C.S. et Dion, P.(Eds). Springer, Berlin Heidelberg, Allemagne, p. 339-365.
- Neilands JB, Leong SA 1986 Siderophores in relation to plant growth and disease. *Annu Rev Plant Physiology* 37, 187-208
- Nyberg, G., Ottosson-Löfvenius, M. et Read, D.J. 2001. "Large-scale forest girdling shows that current photosynthesis drives soil respiration". *Nature*, 411: 789-792.
- Olivier JM, Guillaumes J (1981) Essais de lutte biologique contre la tache bactérienne. *Mush Sci XI*, 353-367
- Palleroni, N. J., 2010. The Pseudomonas Story. *Environ. Microbiol.* 12(6): 1377–1383.
- Palleroni, N.J., 2005. Genus I. *Pseudomonas*. In: Brenner, D.J., Krieg, N.R., Staley, J.T. (Eds.), *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology. Part B: The Proteobacteria*. Springer, New York, pp. 323–379.
- Paplomatas EJ, Elena K (2001) Reaction of Greek olive cultivars to the cotton defoliating strain of *Verticillium dahliae*. 8th International *Verticillium* Symposium. Book of Abstracts, Córdoba, Spain, pp 51
- Patel J.J. et Brown M.E., 1969, Interactions of Azotobacter with rhizosphere and root-surface microflora. *Plant and soil*, 31: 273-281.
- Pegg, G.F. and Brady, B.L. 2002. *Verticillium Wilts* (CABI).
- Pérez-Artés E, Mercado-Blanco J, Ruz-Carrillo AR, Rodríguez- Jurado D, Jiménez-Díaz RM (2005) Detection of the defoliating and non-defoliating pathotypes of *Verticillium dahliae* in artificial and natural soils by nested PCR. *Plant Soil* 268:349–356
- Pérez-Donoso, A.G., Sun, Q., Roper, M.C., Greve, L.C., Kirkpatrick, B., and Labavitch, J.M. 2010. Cell Wall-Degrading Enzymes Enlarge the Pore Size of Intervessel Pit Membranes in Healthy and *Xylella fastidiosa*-Infected Grapevines. *Plant Physiol.* 152: 1748–1759.
- Pinton, R., Varanini, Z. et Nannipieri, P. (Eds). Marcel Dekker, Inc., Etats-Unis, p. 1-17.

Pinton, R., Varanini, Z. et Nannipieri, P. 2001. The rhizosphere as a site of biochemical *Pseudomonas* spp..*Agronomie*, 12: 413-437.

Raaijmakers, J.M., Weller D.M. et Thomashow, L.S. 1997. Frequency of antibiotic-producing *Pseudomonas* spp. in natural environments. *Applied and Environmental Microbiology* 63: 881-887.

Raj J, Bagyaraj DJ, Manjunath A (1981) Influence of soil inoculation with vesicular arbuscular mycorrhiza and a phosphate-dissolving bacterium on plant growth and P3-uptake. *Soil Biol Biochem* 13, 105-108

Ralhan, A., Schottle, S., Thurow, C., Iven, T., Feussner, I., Polle, A., and Gatz, C. 2012. The Vascular Pathogen *Verticillium longisporum* requires a Jasmonic Acid-Independent COI1 Function in Roots to Elicit Disease Symptoms in Arabidopsis Shoots. *PLANT Physiol.* 159: 1192–1203.

Rallo L, Barranco D, Caballero JM, Del Rio C, Martín A, TousJ, Trujillo I (eds) (2005) Variedades de Olivoen España. Junta de Andalucía-Consejería de Agricultura y Pesca.Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación. Mundi Prensa.

Reusche, M., Thole, K., Janz, D., Truskina, J., Rindfleisch, S., Drübert, C., Polle, A., Lipka, V., and Teichmann, T. 2012. *Verticillium* infection triggers VASCULAR-RELATED NACDOMAIN7-dependent de novo xylem formation and enhances drought tolerance in Arabidopsis. *Plant Cell* 24: 3823–3837.

Reusche, M., Truskina, J., Thole, K., Nagel, L., Rindfleisch, S., Tran, V.T., Braus-Stromeier, S.A., Braus, G.H., Teichmann, T., and Lipka, V. 2013. Infections with the vascular pathogens *Verticillium longisporum* and *Verticillium dahliae* induce distinct disease symptoms and differentially affect drought stress tolerance of Arabidopsis thaliana. *Environ. Exp. Bot.* rhizosphere bacteria. *Annual Review of Phytopathology*, 36: 453-483.

Rhodes DJ, Logan C (1986) Effects of fluorescent *pseudomonad* on potato blackleg syndrome. *Ann ApplBiol* 108, 511-518

Rillig, M.C. et Mummey, D.L. 2006. Mycorrhizas and soil structure. *New Phytologist*, 171: 41-53.

Rosenweig WD, Stotzky G 1980 Influence of environmental factors on antagonism of fungi by bacteria in soil: nutrient levels. *Appl Environ Microbiol* 39, 354-360

Rugini E & Fedeli E 1990 Olive (*Olea europaea*L.) as an oil seed crop. In: Bajaj YPS (ed)

Rugini E., Pannelli, G., Ceccarelli, M. and M. Muganu. 1996 Isolation of triploid and tetraploid olive (*Olea europaea*L.) plants from mixoploid cv Frantoio and Leccino mutants by *in vivo* and *in vitro* selection. *Plant Breed.* 115:23-27.

Schnathorst, W.C. 1981. Life cycle and epidemiology of *Verticillium*. In *Fungal wilt diseases of plants*, edited by Marshall E (New York, Academic Press, 1981.).

Schroth MN, Hancock JG (1982) Disease suppressive soil and root colonizing bacteria. *Science* 216, 1376-1381

Serrhini MN, Zeroual A (1995) *Verticillium* wilt in Morocco. *Olivae* 58:58–61

Smith, S.E. et Read, D.J. 2008. Mycorrhizal symbiosis. 3ème édition, Academic Press, New-York, Etats-Unis, 787 p.

Sprent, J.I. 2001. Nodulation in Legumes. Royal Botanic Gardens, Kew, Royaume-Uni.

Teintze M, Hossain MB, Barnes CL, Leong J, Van der Helm D 1981 Structure of ferripseudobactin, a siderophore from plant growth promoting *Pseudomonas* B10. *Biochemistry* 20, 6446-6457

Thomas, B., Murphy, D.J. et Murray, B.G , Bending, G.D. (2003). The rhizosphere and its microorganisms. Dans "Encyclopaedia of applied plant sciences",. (Eds). Academic Press, Londres, Royaume-Uni, p. 1123–1129.

Thomashow LS (1991) Molecular basis of antibiosis mediated by rhizosphere *Pseudomonads*. In: Plant growth-promoting rhizobacteria-progress and prospects(C Keel, B Koller, G Defago, eds) IOBC/ WPRS, XIV/8, 109-115

Thomashow LS, Weller DM 1988 Role of a phenazine antibiotic from *Pseudomonas fluorescens* in biological control of *Gaeumannomyces graminis* var. tritici. J Bacteriol 170, 3499-3508

Unnamalai N, Gnanamanickam SS (1984) *Pseudomonas fluorescens* in an antagonist to *Xanthomonas citri* (Hasse) Dye, the incitant of citrus canker. CurrSci (Bangalore) 53, 703704

Van der Heijden, M.G.A., Klironomos, J.N., Ursic, M., Moutoglis, P., Streitwolf-Engel, R.,

Van Loon, L.C., Bakker, P.A.H.M. et Pieterse, C.M.J. 1998. Systemic resistance induced by rhizobacteria.

Van Peer R, Van Kuik AJ, Rattink H, Schippers B (1990b) Control of *Fusarium* wilt in carnation grown on rockwool by *Pseudomonas* sp. strain WCS417r and by Fe-EDDHA. NethJ Plant Pathol 96, 119-132

Weller, D.M., Raaijmakers, J.M., McSpadden Gardener, B.B. et Thomashow, L.S. 2002.

Whipps, J.M. (2001). Microbial interactions and biocontrol in the rhizosphere. *Journal of phytopathology* Widden, P. 1994.

Yadeta, K.A. and Thomma, B.P.H. 2013. The xylem as battleground for plant hosts and vascular wilt pathogens. Front. Plant Sci. 4.

Zachos DG (1963) La verticilliose de l'oliver en Grèce. Ann Inst Phytopathol Benaki (NS) 5:105–107 (in French)

Annexe

Tableau 1 : Analyse de variance pour la croissance mycélienne des isolats de *Verticillium dahliae* confrontés aux *Pseudomonas* spp. fluorescents

	S.C.E	DDL	C.M.	TEST F	PROBA	E.T.	C.V.
VAR.TOTALE	111,194	143	0,778				
VAR.FACTEUR 1	0,572	2	0,286	8,929	0,00034		
VAR.FACTEUR 2	62,968	15	4,198	131,126	0		
VAR.INTER F1*2	44,582	30	1,486	46,419	0		
VAR.RESIDUELLE 1	3,073	96	0,032			0,179	4,96%

Test de Newman – Keuls (5%)

Tableau 2 : Facteur 1 – Isolats de *Verticillium dahliae*

F1	LIBELLES	MOYENNES	GROUPES HOMOGENES	
2.0	Isolat2	3,669	A	
1.0	Isolat1	3,64	A	
3.0	Isolat3	3,523		B

Tableau 3 : Facteur 2 – Souches de *Pseudomonas* spp. fluorescents

F2	LIBELLES	MOYENNES	GROUPES HOMOGENES											
1.0	témoin	5,3	A											
5.0	H6	4,6		B										
6.0	R1	4,356			C									
14.0	M4	3,933				D								
7.0	R2	3,667					E							
16.0	M6	3,644					E	F						
4.0	H5	3,633					E	F						
11.0	R6	3,589					E	F						
8.0	R3	3,478					E	F	G					
2.0	H1	3,411						F	G	H				
10.0	R5	3,367							G	H				
13.0	M2	3,222								H	I			
3.0	H4	3,122									I	J		
15.0	M5	2,956										J		
9.0	R4	2,922										J		
12.0	M1	2,567												K