

Bio-suppression de la fusariose du Maïs et réduction des mycotoxines DON par des bactéries antagonistes du genre *Bacillus*



IABC 2015
International
TUNISIA

L. GARGOURI-KAMMOUN^{1,2}, H. JMII³, B. ESSGAIR³, R. HAJLAOUI MOHAMED², N. SADFI-ZOUAOU³

¹ ESA Kef, Université de Jendouba, 7119, Le Kef, Tunisia,

² INRAT, Université de Carthage, Rue Hédi Karray 2049 Ariana, Tunisie.

³ Laboratoire Microorganismes et Biomolécules Actives, Faculté des Sciences de Tunis, Campus Universitaire, 2092 Tunisie.

* Corresponding author: lobnakammoun3@gmail.com

Abstract-In Tunisia, Maïze is mainly used for the food supply of the cattle in greenery and in silage. The intensification of this cultivation was further developed thanks to the use of hybrid seeds as well as the creation of new irrigated parameters. However, the development of certain fungi in Maïze can affect the grains' quality by causing mycotoxins's contamination. The latter are toxic for humans and animals as well, especially in case of a high level of ingestion. Trichothecene is, in fact, a type of mycotoxin produced mainly by *Fusarium culmorum* and *F.pseudograminearum*, one of the main factors that lead to maize ear rot. Given that, to fight this disease is difficult and it should be essentially based on the use of fungicides and the conduct of different cultural practices. Therefore, a search for new alternatives strategies based on the microbial antagonism can be explored. The objective of the present paper is to study the growth of bacterial inhibitor of the fungi's growth, the disease development, as well as the mycotoxins production. A collection of two high-leveled toxine producing strains of *Fusarium culmorum* and *F. pseudograminearum* were grown in co-cultivation with *Bacillus* species. In vitro bio-attempts have demonstrated that *Bacillus subtilis* has significantly reduced the radial growth of both strains of Fungus. The different in-vivo-attempts were then realized on maize cobs with parallel analysis of the quantification of the trichothecenes deoxynivalenol (DON) type in grain by the ELISA test. These results show the decrease and the deletion of the levels of DON in the grain under study basically due to the opposing bacteria when compared with the specimen.

Keywords:Maïze, deoxynivalenol, *Fusarium*, *Bacillus* spp.

Résumé - En Tunisie, la culture du Maïs est destinée principalement à l'alimentation du bétail en verdure et en ensilage. L'intensification de cette culture a été ensuite développée suite à l'utilisation de semences hybrides et à la création de nouveaux paramètres irrigués. Cependant, le développement de certains champignons peut altérer la qualité sanitaire des grains de Maïs par leur contamination par les mycotoxines. Ces dernières peuvent étre toxiques pour l'homme et les animaux lorsqu'elles atteignent un certain seuil d'ingestion. Parmi ces mycotoxines, figurent les trichothécènes produites principalement par *Fusarium culmorum* et *F. pseudograminearum* agents causales de la fusariose de l'épi. Etant donné que la lutte contre cette maladie est difficile et se base essentiellement sur l'emploi des fongicides et des pratiques culturales, la recherche d'autres alternatives de lutte basée sur l'antagonisme microbien peut étre explorée. L'objectif du présent travail, est la recherche de bactéries antagonistes capables d'inhiber la croissance du pathogène, le développement de la maladie et la production de mycotoxines. Pour se faire, une collection de *F.culmorum* et de *F.pseudograminearum* possédant un pouvoir toxino-gène élevé ont été mis en co-culture avec des bactéries du sol du genre *Bacillus*. A la lumière des bio-essais réalisés *in vitro*, des souches de *Bacillus subtilis* ont inhibé significativement la croissance radiale des deux champignons. Des essais *in vivo* ont été ensuite réalisés sur des épis de Maïs, complétés par une analyse et une quantification des trichothécènes de type déoxynivalénol (DON) dans les grains moyennant le test ELISA. Ces résultats montrent la diminution et la suppression de la production des DON dans grains traités par les bactéries antagonistes comparés au témoin inoculé par l'agent pathogène seul.

Mots clés: Maïs, deoxynivalenol, *Fusarium*, *Bacillus* spp.

1. Introduction

De nombreuses plantes en champs, notamment les céréales et le maïs, sont sujettes à l'attaque par plusieurs moisissures toxigènes, les plus préjudiciales appartiennent au genre *Fusarium*. Les espèces de *Fusarium* peuvent provoquer, le plus souvent, l'attaque de ces cultures par la fusariose. L'importance économique de la fusariose est attribuée aux pertes de rendements considérables (avortement des fleurs, diminution du nombre et du poids des grains) et à l'altération de la qualité des grains par les mycotoxines (Lori *et al.*, 2009). Différentes fusariotoxines peuvent être produites sur les grains issus d'épis contaminés. Il s'agit essentiellement des trichothécènes, zéaralénone et fumonisine. Les trichothécènes sont constitués de deoxynivalenol (DON) et nivalenol (NIV) dont la toxicité n'est pas identique. Les NIV sont considérés comme plus toxiques à l'homme et aux animaux alors que les DON peuvent être en plus phytotoxiques (Bottalico, 1998). Au champ, de nombreux facteurs sont susceptibles d'influencer les niveaux de contamination des grains en fusariotoxines, notamment les facteurs climatiques, les pratiques culturales, le potentiel toxigènes des souches, l'abondance et la dispersion de l'inoculum et la sensibilité variétale. Les trichothécènes suscitent une attention particulière car elles rendent les grains attaqués impropres à la consommation et sont potentiellement responsables de problèmes de santé publique. Ces mycotoxines sont produites principalement par les espèces *Fusarium graminearum*, *Fusarium pseudograminearum* et *Fusarium culmorum* (Desjardin, 2006). Les trichothécènes provoquent chez certains animaux, après leur ingestion, plusieurs affections incluant des troubles digestifs, une leucopénie, une anorexie, des lésions au niveau du rein et du foie (Grosjean, 2002 ; Cahagnier, 1997). De ce fait, parvenir à maîtriser l'accumulation des trichothécènes dans les cultures tel que le maïs et ses produits dérivés relève d'un double enjeu de santé publique économique. De plus, il n'existe pas de méthodes de décontamination appropriées et efficaces contre la production au champ des fusariotoxines en général, et des trichothécènes en particulier. Par conséquent, la prévention de la croissance des agents producteurs demeure l'une des stratégies les plus prometteuses. Les méthodes préventives couramment utilisées incluent l'utilisation des pesticides, des variétés résistantes de maïs (sélection conventionnelle ou plantes génétiquement modifiées) associées à des pratiques culturales adéquates de travail du sol adaptées. Des outils prévisionnels permettant d'évaluer le risque de présence mycotoxines, ont été aussi développés. Cependant, la contamination du maïs par *Fusarium* est fortement modulée par les facteurs abiotiques tels que le climat, et en cas de conditions climatiques favorables à l'installation des espèces de *Fusarium*, l'absence totale des trichothécènes dans le maïs ne peut être garantie. L'utilisation d'antagonistes biologiques pourrait constituer une stratégie de lutte innovante et efficace contre l'accumulation des mycotoxines dans les grains. La lutte biologique, précisément par utilisation de micro-organismes, est une alternative prometteuse aux pesticides de synthèse, par la spécificité et l'efficacité d'action des agents antagonistes, l'ubiquité naturelle de ces agents dans les écosystèmes, leur grande variété, leur dissémination facile et leur persistance dans l'environnement. Des travaux ont rapporté l'existence au sein de certains micro-organismes appartenant aux genres *Azotobacter*, *Bacillus*, *Pseudomonas* et *Trichoderma* (Cavaglieri *et al.*, 2004a ; Cavaglieri *et al.*, 2005 ; Cavaglieri *et al.*, 2004b ; Palumbo *et al.*, 2007) isolés de l'environnement du maïs (racine et rhizosphère), des souches capables de contrôler la croissance de *Fusarium* et de réduire significativement l'accumulation des trichothécènes. Cependant, bien que présentant de fortes activités anti-*Fusarium*, certains de ces micro-organismes, en l'occurrence les *Bacillus* et les *Pseudomonas*, présentent une importante innocuité. Il serait alors judicieux de rechercher des antagonistes microbiens capables d'assurer sagement la bio-protection du maïs au sein des micro-organismes qui sont généralement tolérés par l'homme et les animaux. Les bactéries du genre *Bacillus* sont connues pour leur innocuité mais aussi pour leurs activités antifongiques, pourraient constituer des agents prometteurs. L'objectif de cette étude, est d'explorer la capacité de certaines souches de bactéries du genre *Bacillus* à contrôler le développement de pathogènes potentiellement productrices de mycotoxines sur le maïs.

2. Matériels et méthodes

2.1 Microorganismes

Les deux espèces de *Fusarium*, productrices de trichothécènes de type DON, utilisées dans cette étude sont *Fusarium culmorum* et *F.pseudograminearum*. Ces deux champignons ont été isolés et identifiés au cours d'une étude prospective des espèces de *Fusarium* attaquant le blé en Tunisie (Kammoun *et al.*, 2009). De plus, la collection de bactéries utilisées dans ce travail font partie de la collection des

microorganismes du laboratoire de microbiologie et biomolécules active LMBA de la Faculté des Sciences de Tunis. Les bactéries étudiées appartiennent au genre *Bacillus* à savoir : *Bacillus subtilis* J9, *Bacillus pumilus* M3-16, *Bacillus subtilis* K1-11, *Bacillus subtilis* M1-20, *Bacillus subtilis* SR146, *Bacillus licheniformis* J24 et *Virgibacillus marismortui* K1-19.

2.2 Test d'antagonisme *in vitro*

La sélection des bactéries antagonistes a été réalisée en adoptant la méthode de l'antagonisme direct (co-culture sur milieu solide). Cette méthode consiste à étaler la bactérie sous forme d'une strie sur une boîte de Pétri contenant le milieu PDA (Potato Dextrose Agar) ou TSA (Tryptic Soja Agar) et de placer le champignon sous forme de disque à une distance de 3 cm de la strie. Après 5 jours d'incubation à 25°C, le pourcentage d'inhibition de développement du champignon a été calculé en se basant sur la formule de Whipps (1987). Ensuite, l'inhibition de développement a été évaluée selon une échelle proposée par Korsten (1995).

2.3 Effet de l'antagoniste sur le nombre et la germination des spores

Tout d'abord, pour tester l'effet de l'antagonisme bactérien sur le nombre des spores des deux espèces, un milieu PDB (Potato Dextrose Broth) a été inoculé par les deux espèces de *Fusarium* séparément. Après incubation pendant 5 jours à 25°C, 200 µl du milieu inoculé ont été utilisés pour une deuxième inoculation d'un milieu PDA qui a été à son tour incubé durant 10 jours à 25°C. Par la suite les cultures fongiques ont été raclées et filtrées pour obtenir une suspension sporale dont la concentration a été ajustée à 10⁶ spores/ml Sachant qu'au cours de ce test les colonies des bactéries antagonistes ont été cultivées sur le milieu TSB à 5% NaCl pendant 48h à 30°C. Ce test a été réalisé dans des tubes ependorfs stériles, 200 µl de la culture bactérienne ont été mélangés avec 200 µl de la suspension sporale additionné d'1 µl d'eau stérile à 5% glucose et incubés pendant 24h à 21°C. Le tube témoin n'a pas étéensemencé. Le même mélange décrit précédemment a servi pour déterminer l'effet des bactéries antagonistes sur la germination des spores des deux espèces *F. culmorum* et *F.pseudograminearum*.

2.4 Détection des composés volatils susceptibles d'être sécrétés par les bactéries antagonistes

Pour détecter les composés volatils susceptibles d'être sécrétés par les bactéries antagonistes, le test suivant a été adopté: d'une part une boîte de Pétri contenant un milieu TSA a étéensemencée par la bactérie antagoniste et incubée pendant 24h à 30°C. D'autre part un disque de champignon a été placé au centre d'une boîte de Pétrie contenant un milieu PDA. Les deux boîtes ont été scellées de telle façon à avoir la boîte contenant la bactérie placée en dessous, et incubées pendant 5 jours à 25°C. Un test témoin contenant le champignon seul a été aussi étudié. L'évaluation du degré d'inhibition par les composés volatils est déterminée par la mesure des diamètres du mycélium fongique sur les boîtes traitées et les boîtes témoins.

Au cours de cette étude, l'effet des composés volatils sur la biomasse fongique des deux espèces de *Fusarium* a été déterminé. En effet, du papier cellophane stérile a été placé sur toute la surface de la boîte de Pétrie contenant le milieu PDA, ensuite un disque fongique a été placé au centre de la boîte. L'ensemble décrit précédemment a été scellé à une boîte de milieu TSA sur laquelle la bactérie antagoniste âgée de 24h a été cultivée. Les deux ensembles sont incubés pendant 5 jours à 25°C. Pour le témoin, on incube les boîtes contenant uniquement le pathogène. L'évaluation de la capacité de la bactérie antagoniste à réduire la biomasse du champignon est déterminée de la façon suivante : le papier cellophane occupant la surface de la boîte est pesé seul (m_0). La biomasse fongique est pesée aussi bien pour les boîtes témoins que pour les boîtes traitées. Sachant que : $m_e = m_x - m_0$; avec m_e : biomasse de l'échantillon, et m_x : masse du papier cellophane + biomasse fongique.

2.5 Effet des fractions extra et intracellulaire bactériennes sur la croissance mycélienne des espèces fongiques

Les mycéliums des espèces fongiques ont été récupérés et dispatchés dans des tubes ependorfs. Puis, la concentration des tubes a été ajustée par le tris-HCl afin d'homogénéiser les concentrations. Ensuite, 800 µl de mycélium additionné à 100 µl de fraction intra ou extra cellulaire ont été mis dans un tube ependorf et incubés pendant 14h à 37°C. Enfin, l'effet des bactéries antagonistes sur la croissance

mycélienne a été évalué par la mesure de la densité optique à une longueur d'onde de l'ordre de 540 nm. Sachant que les fractions extra et intracellulaires sont obtenues comme suit :

-Pour l'obtention de la fraction extracellulaire, la culture bactérienne est centrifugée pendant 15 min à 8000 tours par minute. Le surnageant est dispatché sur des tubes coniques et concentré avec 3 volumes d'acétone puis incubé pendant 4h à -20°C. Par la suite la solution est centrifugé pendant 45 min à 12000 rpm, le culot est récupéré et additionné à 200µl de tris-HCl, (0,1M, pH8).

-Pour avoir la fraction intracellulaire, le culot est lavé avec une solution de NaCl (M=1%) puis le culot est mélangé avec 800µl de TEP pH7.5, 25 mM. Par la suite, le culot a subi une sonication, suivie d'une centrifugation pendant 30 min à 12000 rpm, ce qui aboutit à un surnageant qui constitue la fraction intracellulaire.

2.6 Etude de l'antagonisme par la méthode de diffusion par puits

A l'aide d'un embout stérile des puits dans le milieu gélosé ont été créés, ces puits ont été partiellement saturés par la gélose molle à 0.9%. Un disque d'agar de mycélium de champignon a été placé au centre de la boîte et les fractions cellulaires (extra ou intracellulaire) ont été ajoutées aux puits dont un est saturé par le TEP ou le Tris-HCl (témoin). Après 5 jours d'incubation, le diamètre de la croissance radiale du mycélium sur la boîte a été déterminé.

2.7 Test d'antagonisme *in vivo* sur des épis de maïs

Au cours de cet essai, des épis de maïs ont été testés. Tout d'abord les épis ont été décontaminés par l'alcool, puis des sites d'inoculation ont été créés à l'aide d'un emporte pièce stérile. Les sites d'inoculation ont été créés de telle façon qu'ils ont la même surface sachant que le même nombre de site a été créé pour chaque épi. L'inoculation a été réalisée par des morceaux d'agar contenant les mycéliums des espèces de *Fusarium* développés après 10 jours d'incubation. Pour chaque traitement deux épis de maïs ont été essayés et l'expérience a été répétée trois fois. Le taux d'infestation des épis de maïs a été déterminé par le comptage des grains de maïs infectés par rapport à la totalité des grains par épi. De plus, le pourcentage de la réduction de la fusariose des épis de maïs a été calculé en utilisant la formule suivante : $R(\%) = (A-B/A) * 100$; Avec : A est le diamètre de la lésion enregistré dans les épis non traités inoculés uniquement par le pathogène, et B le diamètre de la lésion dans les épis traités par l'antagoniste.

2.8. Dosage des mycotoxines dans des grains infestés

Ce test a porté particulièrement sur le dosage du déoxynivalenol (DON). Il s'agit de la trichothécène la plus fréquemment associée à la fusariose de l'épi en Tunisie. La production du DON par ces espèces dans des échantillons de grains de maïs infestés a été estimée au moyen d'un kit ELISA (enzyme-linked immunoassay). Généralement, cette méthode permet de visualiser une réaction antigène anticorps grâce à une réaction colorée produite sur un substrat, d'une enzyme préalablement fixée à l'anticorps. Avant l'analyse, des échantillons de 200 g de grains ont été broyés et divisés en sous-échantillon de 5 g. Ensuite, 25 mL d'eau distillé stérile ont été ajoutés pour chaque sous-échantillon. Le mélange a été d'abord agité vigoureusement pendant 3 minutes, ensuite filtré sur papier filtre Whatman N°1. Cinq microlitres de chaque filtrat ont été utilisés pour le test ELISA. Les standards et les échantillons ont été analysés suivant les instructions du fournisseur RIDASCREEN® DON Kit (R-Biopharm AG, Darmstadt, Germany). Sachant que ce kit détermine les concentrations de DON, 3-AcDON, et 15-AcDON combinées. Ce test a été réalisé en plusieurs étapes. Au début, 50 µL de chaque solution étalon ou échantillon ont été ajoutés dans les puits correspondants. Puis, 50 µL du conjugué enzymatique et 50 µL de solution d'anticorps anti-deoxynivalenol ont été ajoutés. Le mélange a été ensuite agité doucement, en effectuant un mouvement circulaire de la plaque, et incubé pendant 30 mn à la température ambiante (20-25 °C). Pour retirer tout le liquide des puits, ces derniers ont été vidés en renversant la plaque de microtitration, sur du papier absorbant. Par la suite, les puits ont été remplis avec 250 µL de tampon, puis vidés de nouveau, et l'opération a été répétée deux fois. Les puits ont été remplis de nouveau par l'ajout de 100 µL d'une solution substrat/chromogène. Le mélange a été agité doucement et incubé à l'obscurité et à la température ambiante (20-25 °C) pendant 15 mn. Le test a été terminé par l'ajout de 100 µL de solution stop dans chaque puit, en agitant doucement et en effectuant un mouvement circulaire sur la paillasse. Enfin, dans les 10 mn suivantes,

l'absorbance a été mesurée à l'aide d'un spectrophotomètre Multiskan Ascent® software (Labsystems, Helsinki, Finland) à une densité optique $\lambda=450$ nm.

2.9 Analyse statistique

L'analyse statistique a été réalisée à l'aide du logiciel GraphPad Prism 5 v5.03. (2009) pour l'analyse de la variance en appliquant le test Anova traitement Dunnet (bilatéral). Toutes les analyses statistiques ont été faites pour un intervalle de confiance de 5 %.

3. Résultats et discussion

3.1 Test d'antagonisme *in vitro*

Les résultats du test d'antagonisme *in vitro* ont montré qu'en testant les deux milieux de culture PDA et TSA, une inhibition de la croissance fongique a été révélée. Cette inhibition est variable selon la souche bactérienne et l'isolat de *Fusarium* testé (Figure 1).

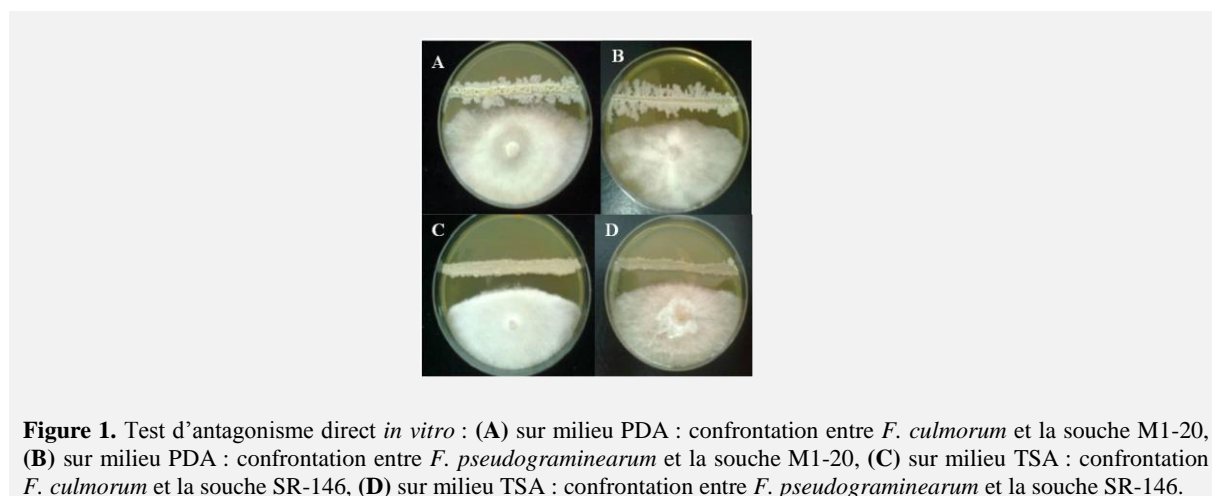


Figure 1. Test d'antagonisme direct *in vitro* : (A) sur milieu PDA : confrontation entre *F. culmorum* et la souche M1-20, (B) sur milieu PDA : confrontation entre *F. pseudograminearum* et la souche M1-20, (C) sur milieu TSA : confrontation *F. culmorum* et la souche SR-146, (D) sur milieu TSA : confrontation entre *F. pseudograminearum* et la souche SR-146.

Les résultats de ce test ont montré globalement que parmi les sept bactéries testées, quatre souches bactériennes ont révélé un pouvoir d'inhibition de croissance à savoir : J9, SR146, M1-20 et K1-11 avec des taux d'inhibition allant de 11.66 % à 58.33 % (Figure 2). Sur le milieu TSA, les meilleurs taux d'inhibition des isolats *F. culmorum* et *F. pseudograminearum* ont été marqués par la souche M1-20 avec des taux de l'ordre de 55% et 58% respectivement. Alors que sur le milieu PDA, les taux d'inhibitions de la croissance fongique les plus élevés ont été marqué par la bactérie J9.

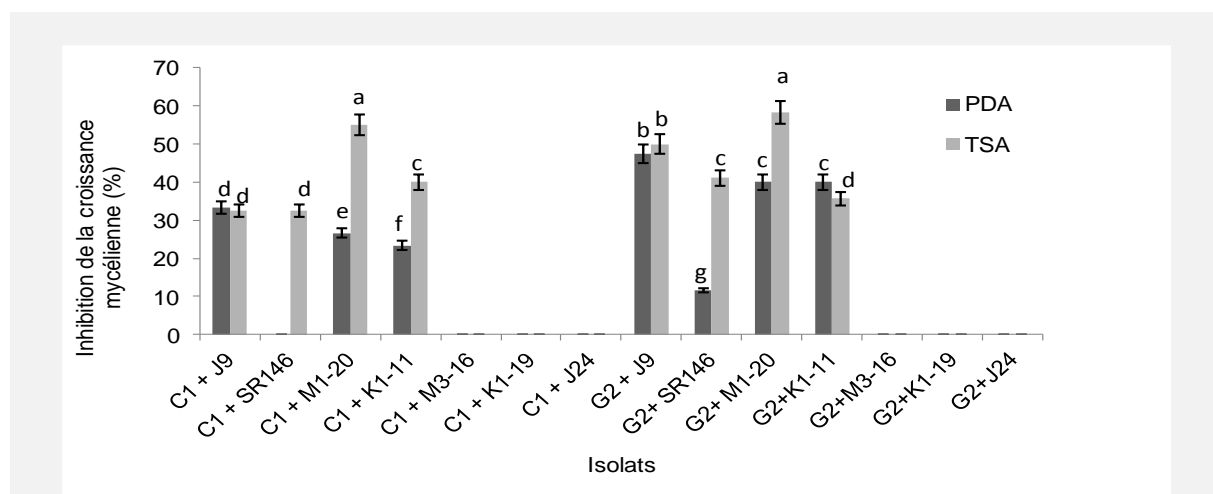


Figure 2 : Effets des bactéries antagonistes sur la croissance mycéliennes des deux espèces de *Fusarium* sur les milieux de culture PDA et TSA. Avec C1 : *F.culmorum*, G2 : *F.pseudograminearum*. les moyennes suivies par différentes lettres sont significativement différentes ($p < 0.05$)

Ce test a montré aussi que le pouvoir d'inhibition ne dépend pas uniquement de la bactérie ou du pathogène mais également du milieu de culture. Sur le milieu de culture PDA la souche bactérienne SR-146 est sans effet sur la croissance mycélienne de *F. culmorum* mais elle a montré une faible inhibition de croissance vis-à-vis de *F. pseudograminearum* (11.66 %). Alors que sur le milieu TSA la souche SR-146 a manifesté un antagonisme envers *F. culmorum* de l'ordre de 35.5% et un pouvoir d'inhibition de croissance de *F. pseudograminearum* (40%) plus élevé que celui enregistré sur le milieu PDA. Ces résultats peuvent être expliqués du fait que les composants nutritionnels du milieu jouent un rôle important dans la production des métabolites antifongiques par les *Bacillus spp* (Hebbar et al, 1992). La différence dans l'effet inhibiteur de croissance du mycélium peut être due au milieu de croissance des deux protagonistes, ainsi le milieu du test peut influencer le degré de l'antibiose manifesté par les antagonistes en question (Cavaglieri et al, 2005)

3. 2 Effet de l'antagoniste sur le nombre et la germination des spores

Les résultats de ce test ont montré que parmi les bactéries testées, les souches J9 et SR146 ont réduit considérablement le nombre de spores. D'ailleurs la souche SR146 a inhibé complètement la sporulation de *F. culmorum* (tableau 1). Les autres souches sont dotées aussi d'une activité antifongique variable à l'exception de la souche J24 qui a réduit légèrement le nombre de spores. La réduction de nombre de spores peut être en relation avec la quantité de substances antifongiques sécrétées par les bactéries antagonistes qui inhibent la division des spores et leur germination.

Tableau 1 : Effet des bactéries antagonistes sur le nombre de spores.

Traitements	Nombre de spores (x 10 ⁶)
Témoin C1	42
C1+J9	14
C1+SR-146	0
C1+M1-20	18
C1+K1-11	32
C1+M3-16	22
C1+K1-19	30
C1+J24	34
Témoin G2	18
G2+J9	4
G2+SR-146	6
G2+M1-20	6
G2+K1-11	10
G2+M3-16	6
G2+K1-19	8
G2+J24	12

Les observations microscopiques ont montré aussi l'efficacité des bactéries antagonistes sur la germination des spores des deux isolats de *Fusarium*. Au bout de 24 h et sans traitement bactérien les spores ont germé pour donner naissance aux hyphes mycéliens qui s'allongent et s'enchevêtrent (Figure 3, A).

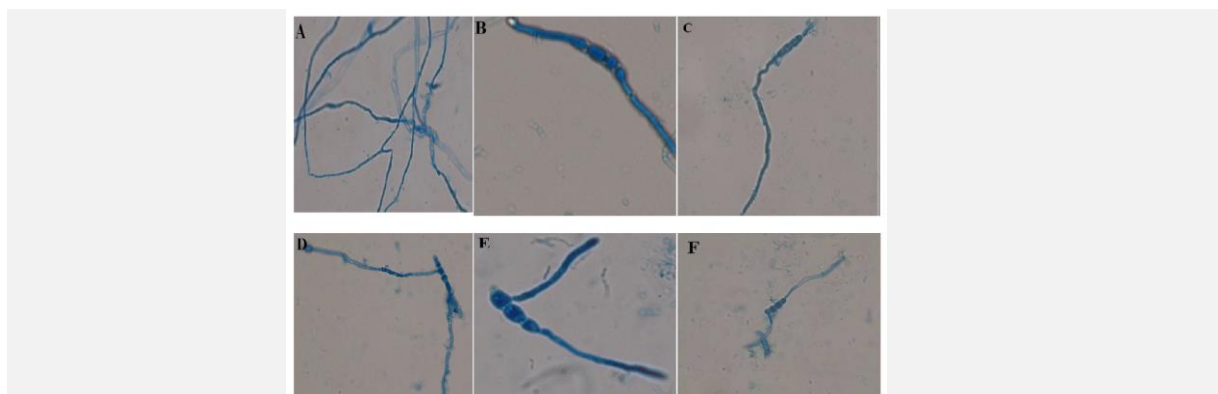


Figure 3 : Observation microscopique montrant l'effet des bactéries antagonistes sur la germination des spores des deux espèces de *Fusarium* après 24h d'incubation à 21°C (X 40); (A) Témoin C1 ; (B) Spores de C1 additionnées d'une suspension bactérienne de J9 ; (C) Spores de C1 additionnées d'une suspension bactérienne de SR-146 ; (D) Témoin G2 ; (E) Spores de G2 additionnées d'une suspension bactérienne de J9 ; (F) Spores de G2 additionnées d'une suspension bactérienne de SR-146.

Cependant, les bactéries antagonistes notamment J9 et SR146 ont notablement entravé la germination des spores de C1 et G2 (Figure 3, B, C, E, F). L'observation microscopique a montré aussi qu'après 24h d'incubation dans l'eau glucosé à 5%, les spores de *F.culmorum* ont fortement germé alors que celles de *F.pseudograminearum* ont moyennement germé (Figure 3, A, D).

Les spores jouent un rôle primordial dans l'incidence et la dissémination de la fusariose de l'épi de maïs (Desjardin et al., 2004). En effet, elles sont transportées jusqu'aux épis par le vent et les insectes, dans des conditions environnementales favorables les spores germent et induisent la maladie. Ainsi réduire le nombre de spores et/ou leurs germinations, c'est réduire la propagation de la maladie.

3.3 Effet des composés volatils secrétés par les bactéries antagonistes

Le test d'antagonisme *in vitro* met en évidence le phénomène de l'antibiose. En effet les bactéries efficaces contre le champignon pathogène synthétisent des substances antifongiques qui diffusent dans le milieu et sont capables d'arrêter la croissance du mycélium. La caractérisation de ces substances antifongiques impose de savoir si ces dernières sont d'origine intracellulaire ou extracellulaire.

L'essai de la culture des espèces de *Fusarium* en présence des fractions cellulaires montre l'aptitude des fractions intracellulaire et extracellulaire à diminuer le développement des champignons.

D'ailleurs, les résultats de ce test ont montré que la fraction intracellulaire de M1-20 a réduit la croissance de *F.culmorum* de l'ordre de 70 % et celle de *F.pseudograminearum* de l'ordre de 42 % (Figure 5). De plus, les résultats ont montré que la fraction interne de K1-11 a réduit la croissance de *F.culmorum* de 45 % et de *F.pseudograminearum* de 41 % ainsi les biomolécules actives synthétisées par K1-11 sont intracellulaires (Figure 4).

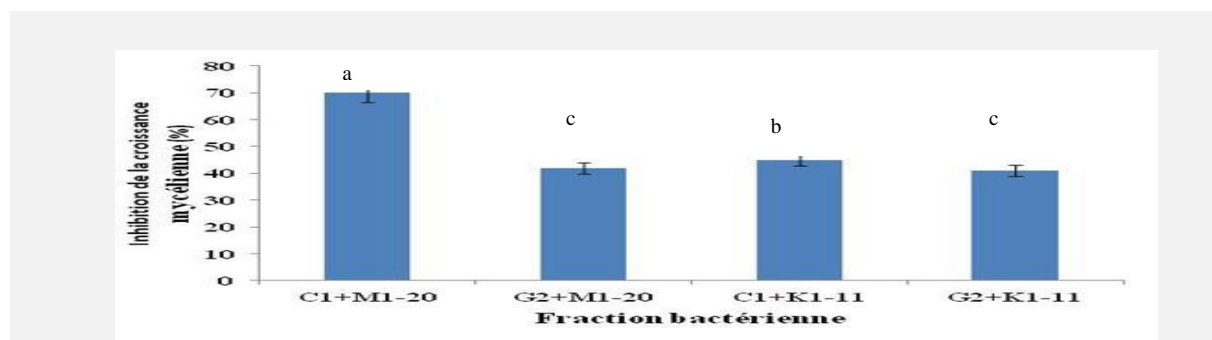


Figure 4 : Effet des fractions bactériennes intracellulaires sur la croissance mycélienne des isolats *F.culmorum* (C1) et *F.pseudograminearum* (G2).
les moyennes suivies par différentes lettres sont significativement différentes ($p < 0.05$)

La fraction extracellulaire de J9 a réduit la croissance de *F.culmorum* de 55 % et *F.pseudograminearum* de 52 % ainsi les biomolécules actives produites par J9 sont extracellulaires. La fraction extracellulaire de SR146 a réduit la croissance de *F.culmorum* de 45 % et *F.pseudograminearum* de 51 % ainsi les biomolécules actives synthétisées par SR146 sont extracellulaires (Figure 5).

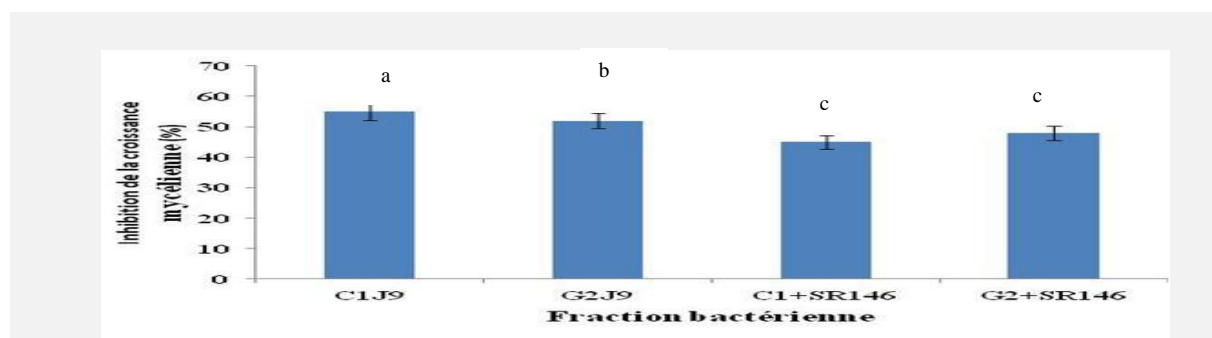
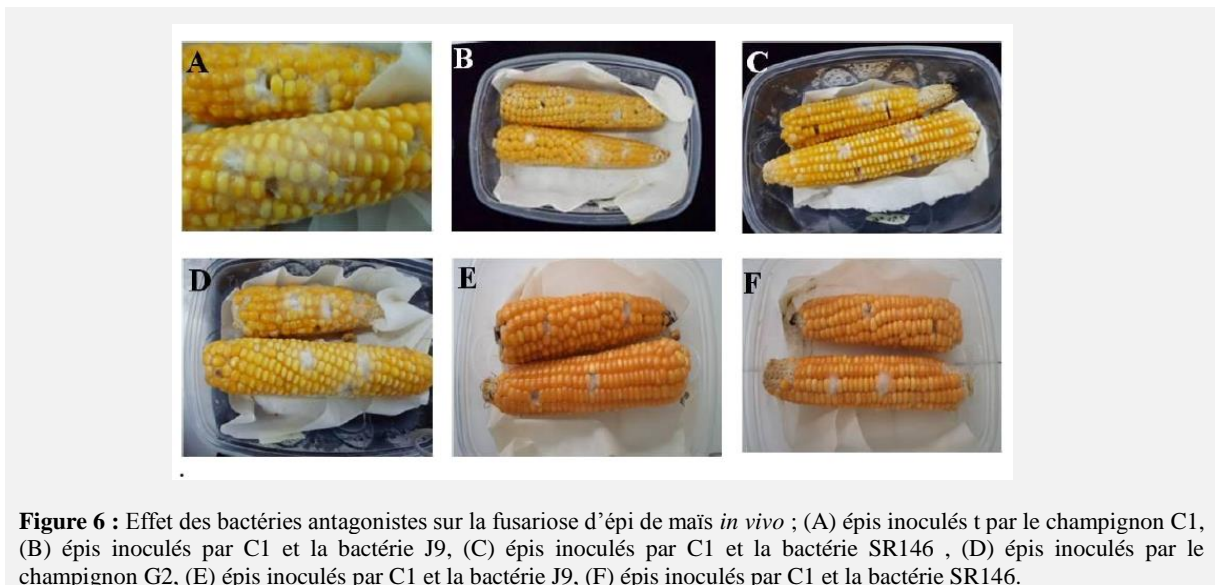


Figure 5 : Effet des fractions bactériennes extracellulaires sur la croissance mycélienne des isolats *F.culmorum* (C1) et *F.pseudograminearum* (G2).
les moyennes suivies par différentes lettres sont significativement différentes ($p < 0.05$)

Les résultats de ce test ont montré qu'à part, les substances antifongiques diffusibles, les *Bacillus spp* produisent également des substances volatiles capables d'inhiber la croissance de *Fusarium*. Ces résultats concordent avec plusieurs travaux montrant la capacité des espèces du genre *Bacillus* à produire des composants volatiles antifongiques. L'étude de Pal et al (2001) a montré que la souche MR-11(2) du genre *Bacillus* produit des antibiotiques, des composants volatils et des siderophores contre *Fusarium*. Les observations microscopiques ont montré que les composants volatils ont causé des aberrations au niveau des structures mycéliennes de *Fusarium* : des lyses au niveau des hyphes, une vacuolisation ainsi qu'une granulation des structures mycéliennes et un gonflement anormal des conidies.

3.4 Test d'antagonisme *in vivo* sur des épis de maïs

Les bactéries qui ont manifesté une activité antifongique *in vitro* ont été utilisées pour des essais *in vivo* sur des épis de maïs. Les résultats de ce dernier test ont montré que les souches bactériennes sélectionnées ont permis la réduction de la propagation du mycélium du pathogène (Figure 6). En effet, la souche J9 a réduit la maladie de l'ordre de 64.22 % pour les épis inoculés par *F. culmorum* (C1) et de l'ordre de 68.57 % pour ceux inoculés par *F. pseudograminearum* (G2).



L'espèce SR146 s'est avérée également efficace contre la maladie qui se trouve atténuée de 60% quand les épis ont été inoculés par C1 et de 50% pour les épis inoculés par G2. Cependant l'espèce M1-20, hautement active *in vitro*, a réduit de 43 % et de 40 % la maladie quand les épis ont été inoculés respectivement par C1 et G2. De même la souche K1-11, a réduit moyennement la maladie (Figure 7). Sachant qu'au cours de cet essai, les résultats ont montré aussi qu'en appliquant le mélange des deux bactéries J9 et SR146 les pourcentages de la réduction de la maladie n'ont pas dépassé 55% et 20% pour les isolats C1 et G2 respectivement.

L'analyse statistique des résultats obtenus confirme l'effet réducteur exercé par les bactéries antagonistes sur l'intensité de la fusariose de l'épi du maïs. La réduction de la maladie a été hautement significative pour toutes les bactéries testées pour le cas de *F. culmorum*. Alors que pour la souche *F. pseudograminearum*, l'effet réducteur exercé par les bactéries antagonistes a été variable allant d'une réduction non significative à une réduction hautement significative.

Il est généralement connu que l'expression d'antagonisme des micro-organismes envers un pathogène dans un milieu de culture ne peut pas être évidemment garantie sous serre ou en plein champ. En effet, il a été démontré que la corrélation entre l'antibiose *in vitro* et le contrôle biologique *in vivo* est fréquemment incohérente (Reddy et al, 1993).

Bevino et al (1998) ont obtenu une faible corrélation entre les résultats obtenus *in vitro* et ceux trouvés sous serre quand ils ont voulu évaluer la capacité des *Bacillus subtilis* à réduire *F. moniliforme* et *F. proliferatum* dans le maïs. Cependant, la présente étude plaide en faveur d'une importante corrélation entre l'antagonisme obtenu *in vitro* et la capacité de *B. subtilis* à inhiber la colonisation des grains de maïs par les espèces de *Fusarium*. L'étude menée par Cavallieri et al, (2005) a montré

l'efficacité de *B. subtilis* CE1 *in vitro* ainsi qu'*in vivo* dans la réduction de *F. verticilloides* et *F. graminearum* dans les grains de maïs.

Les résultats des travaux de Palazzini et al (2007) concordent avec nos résultats, en effet les espèces de *Bacillus* sélectionnées ont réduit la sévérité de la fusariose des épis de maïs de plus de 71% sous serres mais ces bactéries n'ont pas réduit l'incidence de la maladie. Cette remarquable réduction de sévérité de la maladie est similaire a celle rapportée par Da Luz (2000) en utilisant *Bacillus megatherium* et *Bacillus subtilis*.

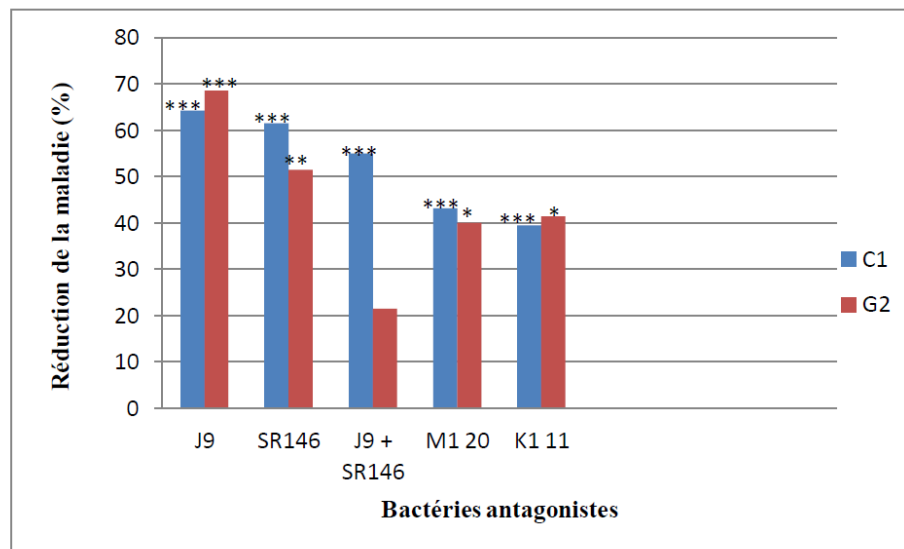


Figure 7 : Effet des bactéries antagonistes sur la fusariose de l'épi du maïs. (***) : Différence très hautement significative, (**) : différence hautement significative, (*) : différence significative, C1 : *Fusarium culmorum*, G2 : *Fusarium pseudograminearum*. ($p \leq 0.05$).

3.5 Dosage du déoxynivalenol (DON) dans des grains infestés

Ce test consiste à faire le dosage du déoxynivalenol (DON) dans les grains de maïs traités par *F. culmorum* et les bactéries antagonistes moyennant du test ELISA. L'objectif de ce test est de vérifier l'effet de ces bactéries sur la réduction de la contamination des grains de maïs par les mycotoxines particulièrement les DON. Les résultats ont montré que les teneurs en trichothécènes de type DON ont varié selon la bactérie antagoniste de 6.2 à 11.5 ppm

Des travaux ultérieurs réalisés par Khan et al (2004) ont montré que le contenu des grains de maïs a été rarement réduit par les traitements biologiques même si la sévérité de la maladie a été significativement réduite par les espèces : *Bacillus subtilis* AS433, *B. subtilis* AS434, *B. subtilis* OH131.1. Ces données s'opposent aux résultats trouvés au cours de cette étude qui ont montré que la bactérie *Bacillus subtilis* J9 a considérablement réduit le taux des DON dans les grains de maïs. De plus, les résultats trouvés sont en concordance avec ceux de Palazzini et al (2007) qui a montré que l'antagonisme exercé par la présence de bactéries spécifiques (*Bacillus spp*) peut influencer la production de mycotoxines. En fait, parmi 22 isolats testés 50% étaient capables de diminuer le taux de DON à des niveaux indétectables dans les grains de maïs irradiés.

Plusieurs études s'orientent vers la nécessité de lutter contre la croissance des champignons pathogènes de genre *Fusarium* afin de réduire la contamination des aliments par les mycotoxines secrétées par ce genre de champignons. Cette idée est contrariée par des études plus récentes qui ont mis en évidence le rôle des mycotoxines comme facteur de virulence qui favorise l'installation et la propagation du champignon pathogène. Maier et al (2006) met en évidence le rôle de DON dans la colonisation des épis de maïs. Les travaux de Mudge et al (2006) ont mis en évidence le rôle de DON dans la propagation de la pourriture de la couronne du blé causée par *Fusarium graminearum* et *Fusarium pseudograminearum* vers la tige et sa colonisation par ces espèces

4. Conclusion

Fusarium est un champignon phytopathogène avec une distribution globale capable d'infecter une large gamme de plantes incluant les céréales comme le maïs, le blé et l'orge. La contamination des céréales par ce champignon pose un problème majeur pour les agriculteurs surtout que le rendement et la qualité du produit agricole peuvent être réduits. L'application des bactéries de genre *Bacillus* a inhibé la croissance des deux espèces de *Fusarium* : *Fusarium pseudograminearum* et *F. culmorum*. Les résultats du test de la double culture *in vitro* suggèrent que les métabolites antifongiques produits par ces bactéries sont à l'origine de l'inhibition de la croissance et la lyse des hyphes de *Fusarium*. Les bactéries antagonistes produisent aussi des composants volatils capables de réduire la croissance de *Fusarium*. Les bactéries antagonistes, des *B. subtilis* ont montré également une capacité à inhiber la germination des spores de *Fusarium* qui jouent un rôle primordial dans l'incidence de la fusariose de l'épi de maïs. Cette aptitude à réduire la croissance de champignon *in vitro* corrèle avec la capacité des bactéries antagonistes à réduire la maladie sur les épis de maïs. Le taux de DON dans les grains de maïs a été également significativement réduit quand les bactéries antagonistes sont appliquées. Ce travail a permis aussi d'explorer la capacité des bactéries du genre *Bacillus* en particulier les souches appartenant à l'espèce *B. subtilis* à prévenir la croissance des *Fusarium* spp producteurs de DON. Ainsi il est intéressant de caractériser les biomolécules qui sont à l'origine de l'inhibition de la croissance fongique. La détermination des conditions optimales de production et la purification de ces métabolites antifongiques semble également très intéressant.

5. Références

- Bevino A, Sarrocco S, Dalmastrì C, Tabacchioni S, Cantale C, Chiarini L. (1998).** Characterization of a free-living maize-rhizosphere population of Burkholderia cepacia : effect of seed treatment on disease suppression and growth promotion of maize. *FEMS Microbiol. Ecol.*, 27 : 225-237.
- Bottalico A. (1998).** *Fusarium* disease of cereals: species complex and related mycotoxin profiles in Europe. *Journal of Plant Pathology* 80: 85-103.
- Cahagnier R. (1997).** Les mycotoxines dans les céréales. Journée d'information « céréales et sécurité alimentaire », dossier participant, IFBM, Nancy p19-25.
- Cavaglieri L, Passone A, Etcheverry M. (2004a).** Screening procedures for selecting rhizobacteria with biocontrol effects upon *Fusarium verticillioides* growth and fumonisin B-1 production. *Research in Microbiology* 15: 747-754. 62
- Cavaglieri L, Passone A, Etcheverry M G. (2004b).** Correlation between screening procedures to select root endophytes for biological control of *Fusarium verticillioides* in *Zea mays* L. *Biological Control* 31: 259-267.
- Cavaglieri L, Orlando J, Rodriguez MI, Chulze S, Etcheverry M. (2005).** Biocontrol of *Bacillus subtilis* against *Fusarium verticillioides* *in vitro* and at the maize root level. *Research in Microbiology* 156: 748-754.
- Desjardins AE. (2006).** *Fusarium* mycotoxins Chemistry, Genetics and Biology. *APS Press, St. Paul, MN.* p 260.
- Desjardins AE, Jarosz AM, Plattner RD, Alexander NJ, Brown DW, Jurgenson JE. (2004).** Patterns of trichothecene production, genetic variability, and virulence to wheat of *Fusarium graminearum* from smallholder farms in Nepal. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 52: 6341-6346.
- da Luz WC. (2000).** Biocontrol of *Fusarium* head blight in Brazil. In: *Proceedings 2000 National Fusarium Head Blight Forum, 10–12 December 2000, Erlanger, KY, USA.* pp. 77–81.
- Grosjean F. (2002).** Toxicité des mycotoxines des céréales. *Perspectives Agricoles* n0278 avril 2002 p28-30.
- Hebbar P, Davey AG, Dart PJ. (1992).** Rhizobacteria of maize antagonistic to *Fusarium moniliforme*, a soil borne fungal pathogen: isolation and identification. *Soil Biol Biochem.* 24: 979–987.
- Hesseltine CW, Rogers RF, Shotwell O. (1978).** Fungi especially *Gibberella zeae*, and zearalenone occurrence in wheat. *Mycologia* 70: 14:18.
- Kammoun GL, Gargouri S, Hajlaoui MR, Marrakchi M. (2009).** Occurrence and distribution of *Microdochium* and *Fusarium* species isolated from durum wheat in northern Tunisia and detection of mycotoxins in naturally infested grain. *Journal of Phytopathology*, 157: 546-551.
- Khan NI, Schisler DA, Boehm MJ, Lipps PE, Slininger PJ. (2004).** Field testing of antagonist of *Fusarium* Head Blight incited by *Gibberella zeae*. *Biol Control* 29: 245–255.
- Lori GA, Sisterna MN, Sarandon SJ, Rizzo, I, Chidichimo H. (2009).** *Fusarium* head blight in wheat : impact of tillage and other agronomic practices under natural infection. *Crop Protection* 28: 495-502.
- Maier FJ, Miedaner T., Hadeeler B., Felk A, Salomon S, Lemmens M, Kassner H, Schafer W. (2006).** Involvement of trichothecenes in fusarioses of wheat, barley and maize evaluated by gene disruption of the

- trichodiene synthase (Tri5) gene in three field isolates of different chemotype and virulence. *Molecular Plant Pathology*, 7, 449-461.
- Mudge AM, Dill-Macky R, Dong, Y, Gardiner DM, White RG, Manners JM. (2006).** A role for the mycotoxin deoxynivalenol in stem colonisation during crown rot disease of wheat caused by *Fusarium graminearum* and *Fusarium pseudograminearum*. *Physiological and Molecular Plant Pathology* 69: 73-85.
- Palumbo JD, O'Keeffe TL, Mahoney NE. (2007).** Inhibition of ochratoxin A production and growth of *Aspergillus* species by phenolic antioxidant compounds. *Mycopathologia* 164: 241-248.
- Pal KK, Tialk KVBR, Saxena AK, Dey R, Singh CS. (2001).** Suppression of mize root diseases by macrophomina phaseolina, *Fusarium moliniforme* and *Fusarium graminearum* by plant growth promoting rhizobacteria. *Microbial. Res.* 156: 209-223.
- Plazzini JM, Ramirez ML, Torres AM, Chulze SN. (2007).** Potential biocontrol agents for *Fusarium* head blight and deoxynivalenol production in wheat. *Crop Prot* 26 : 1702-1710.
- Reddy KR, Delaune RD, Debusk WF, Koch MS. (1993).** Long-term nutrient accumulation rates in the Everglades. *Soil Sci. Soc. Am. J.* 57: 1147-1155.
- Whipps, JM. (1987).** Effect of media on growth and interactions between a range of soil-borne glasshouse pathogens and antagonistic fungi. *New. Phytol.* 107: 127- 142.