RESUME

Mots clé: *Fusarium*, *Bacillus*, thé de compost, identification moléculaire, typologie des réactions envers les stimulants chimiques, bio contrôle, stimulateur, antagonisme in vivo

L'infection à *Fusarium*, phytopathogène souvent rencontré chez les plantes, tend à devenir un problème préoccupant au niveau global, en causant bon nombre de pertes de récolte et économiques graves, les dommages en étant amplifiés par la capacité de ce genre de synthétiser des mycotoxines. Actuellement, sont identifiées presque 19 espèces de *Fusarium*, chaque espèce en ayant le propre profil en mycotoxines et la propre préférence envers la plante hôtesse.

L'identification des flagelles pathogènes de *Fusarium*, présents dans les échantillons de plantes contaminées, est extrêmement importante, en vue du diagnostic des maladies respectives, du combat et de la prévention de la contamination à mycotoxines.

En ce qui concerne le combat contre ces organismes fongiques, on a proposé une série de stratégies, dont la rotation des cultures, l'utilisation de variétés de plantes résistantes ou le traitement antifongique, ce sont les principales approches pratiques. Dans les dernières années, on accorde une attention spéciale aux méthodes de contrôle biologique des infestations fongiques, ce qui pourrait réduire de façon significative l'impact négatif des pesticides chimiques sur l'environnement.

Par ces motifs, le but principal du projet est celui d'identifier de nouveaux agents antifongiques biologiques, ayant pour cible le genre: *F. graminearum* et *F. culmorum*, les principaux responsables pour les infestations aux céréales.

La thèse de doctorat, intitulé « **RECHERCHES CONCERNANT LES METHODES DE BIO CONTRÔLE DES ORGANISMES FONGIQUES DU GENRE FUSARIUM** » comprend 5 chapitres, déroulés sur un nombre de 157 pages, en comprenant 25 tableaux, 67 figures, dont 48 originales, et 190 références bibliographiques.

Au **Chapitre I** sont présentées des informations concernant l'importance du genre *Fusarium*, la taxinomie de celui-ci, le cycle de vie, la portée pathogène, méthodes identificatoires, méthodes préventives et combat. La connaissance de ces aspects contribue à une meilleure compréhension des organismes fongiques du genre *Fusarium*, des méthodes de

différenciation entre les espèces, en constituant un pas important en vue de l'élaboration de certaines expérimentations visant l'identification rapide des espèces mycéliennes toxiques, en vue de la prévention et du combat de ceux-ci.

Au **Chapitre II** sont présentées les méthodes de contrôle biologique, comme alternative aux modèles classiques de combat, au moyen des agents de contrôle biologique. En outre, on a présenté l'effet du compost en tant qu'agent de suppression des organismes fongiques pathogènes, mais aussi comme source d'isolation pour les microorganismes potentiellement antifongiques. Ce chapitre contribue à une meilleure compréhension des stratégies de bio contrôle, les connaissances accumulées en étant utilisées aux expérimentations de bio contrôle, présentées dans le présent ouvrage.

Le but principal de la thèse est celui **d'identifier de nouveaux agents de combat biologique des organismes fongiques du genre: *F. graminearum* et *F. culmorum*, les principaux responsables pour les infestations aux céréales.**

Les objectifs de l'ouvrage ont été:

- l'isolation et la caractérisation de certains flagelles de microorganismes indigènes capables d'inhiber le développement des flagelles de;
- la caractérisation de certains microorganismes fongiques isolés, sous l'aspect de la capacité mycélienne toxique et de l'appartenance aux espèces visées;
- l'identification de certains mécanismes d'action des microorganismes antagonistes aux espèces de.

Au **Chapitre III** on a présenté le matériel biologique pris en étude et la méthodologie utilisée.

Le matériel biologique est représenté par 34 flagelles de *Fusarium*, que nous avons isolés près de la surface des grains de blé de 2013 et 2014. Deux flagelles de référence, en appartenant aux espèces *Fusarium graminearum* (Fg183) et *Fusarium culmorum* (Fc46) ont été obtenues près de différentes collections de microorganismes européennes. En outre, dans l'étude on a également utilisé des différentes espèces de microorganismes fongiques pathogènes envers les végétaux, en appartenant à la collection de microorganismes de la Faculté de Biotechnologies, le Laboratoire de génétique. En tant que microorganismes antagonistes, on a testé 6 flagelles bactériens, nouvellement isolés sur le compost, ainsi que deux bactéries de la collection de microorganismes de la Faculté de Biotechnologies, le Laboratoire de génétique.

Les méthodes de travail utilisées sont en lien à: l'isolation et la culture de microorganismes utilisés aux expérimentations (bactéries et microorganismes fongiques filamenteux); l'isolation de l'ADN génomique près des flagelles bactériens et de ceux des microorganismes fongiques sélectionnés; l'identification, à l'aide du système BIOLOG et des techniques moléculaires, des espèces dont relèvent les microbes isolés utilisés; l'arrêt de la typologie des réactions de réponse aux stimulants chimiques, au cas des microorganismes fongiques du genre; l'analyse de la portée pathogène des organismes fongiques; l'épreuve des propriétés antagonistes des flagelles bactériens sélectionnés et leur caractérisation.

Le chapitre IV comprend les résultats de la recherche propre, groupés principalement autour des objectifs proposés dans le cadre de la thèse. Ainsi, au premier sous-chapitre sont présentés les résultats liés à l'isolation, sur extrait (thé) de compost, de certains flagelles bactériens ayant des propriétés antagonistes envers une large gamme d'organismes fongiques à potentiel pathogène pour les végétales. Ces résultats ont démontré, par la mise à l'épreuve des plusieurs variantes expérimentales, que l'extrait de compost présente des effets d'inhibition sur le développement des organismes fongiques à potentiel pathogène pour les végétaux, l'activité en étant associée, en grande mesure, à la présence de certains microorganismes bénéfiques au niveau de celui-ci.

Le deuxième sous-chapitre comprend les résultats concernant l'identification des espèces dont relèvent les huit flagelles bactériens ayant manifesté, de façon évidente, des effets antifongiques. Aux effets de l'identification des nouveaux flagelles bactériens isolés (six en provenance du compost et deux du terrain), on a utilisé deux variantes des tests: le système BIOLOG et les analyses moléculaires. Le système BIOLOG a été efficace pour l'identification, au niveau de genre, de tous les flagelles isolés, et au niveau d'espèce, de cinq parmi ceux-ci, tandis que par l'utilisation de primers espèce-spécifiques (PCR multiplex), on a réussi l'identification de tous les huit flagelles bactériens utilisés. L'analyse RAPD au cas des flagelles qui appartiennent à la même espèce, ont mis en évidence un léger polymorphisme intra-spécifique, ce qui démontre le fait que, bien qu'ils aient été isolés sur les mêmes sources, les flagelles bactériens respectifs sont différents.

Le sous-chapitre suivant se réfère à l'identification et à la caractérisation des flagelles nouveaux de qui ont été isolés sur les grains de blé. L'identification des flagelles de *Fusarium* a été réalisée par des méthodes classiques, microbiologiques, pour l'encadrement de ceux-ci par niveau de genre. Pour l'identification de l'espèce/des espèces dont ils appartiennent, on a utilisé des méthodes moléculaires. Dans le cadre des expérimentations, on a optimisé une méthode d'isolation de l'ADN génomique fongique, ce qui a permis l'obtention d'échantillons ADN

adéquates de point de vue quantitatif et qualitatif pour les analyses ultérieures. Pour l'identification des espèces de, on a utilisé la réaction PCR multiplex à primeurs espèce-spécifiques, ce qui a mené à l'identification de 34 flagelles de: cinq flagelles ont été identifiés comme en appartenant à l'espèce *Fusarium culmorum* et 29 appartiennent à l'espèce *Fusarium graminearum*, ces résultats en confirmant la domination de cette espèce. En général, l'analyse RAPD des flagelles isolés près de *Fusarium graminearum* et *Fusarium culmorum* a démontré un certain degré de polymorphisme moléculaire entre les flagelles étudiés (intra-spécifique), mais elle n'a pas permis l'association de quelques-uns des rubans polymorphes mis en évidence, à quelque caractère spécifique des organismes fongiques respectifs. Dans le cadre de ce sous-chapitre, on a également présenté les résultats obtenus en ce qui concerne la typologie des réactions de réponse aux stimulants chimiques, concernant les organismes fongiques isolés. L'utilisation de certaines primeurs spécifiques pour le gène *Tri 5* a permis de détecter ce gène à la majorité des flagelles fongiques examinés, en suggérant la capacité de ceux-ci de synthétiser des trichothécènes. L'utilisation de certains jeux de primeurs caractéristiques, y compris pour d'autres gènes impliqués dans la biosynthèse des trichothécènes, a permis l'identification de deux types moléculaires distincts: 15- ADON et 3- ADON. Il est à remarquer le fait que tous les flagelles de *Fusarium culmorum* qui ont été isolés, relèvent du type 3- ADON. Les résultats obtenus à la suite des recherches effectuées, confirment l'utilité des techniques moléculaires pour la caractérisation des flagelles nouveaux de.

Le sous-chapitre 4.4 a pris pour cible l'analyse du caractère pathogène des flagelles de *Fusarium* qui ont été sélectionnés et isolés, en ayant été analysée l'influence des organismes fongiques sur la germination et sur le développement des plantules de blé, aussi bien que la possibilité de l'association de ce caractère à la production de mycotoxines. A la suite des expérimentations, il est résulté, de façon évidente, que le caractère pathogène des flagelles fongiques est nettement associé au niveau de mycotoxines produites, fait démontré par les analyses chromatographiques (TLC), qui ont démontré la présence nette de DON (mais aussi d'autres composants potentiellement toxiques) à quelques-uns des organismes fongiques.

Les derniers trois sous-chapitres sont dédiés aux propriétés antagonistes des bactéries sélectionnées, à leurs mécanismes d'action et à l'évaluation des effets protecteurs/stimulants sur certaines plantes cible. Les résultats obtenus ont démontré que les flagelles bactériens qui ont été sélectionnés et isolés, ont le potentiel d'inhiber de façon significative le développement des espèces *Fusarium graminearum* et *Fusarium culmorum*, et que le rendement de l'inhibition est influé par des interactions spécifiques entre les flagelles bactériens et les organismes fongiques cible, ce qui est démontré par les analyses de microscopie. Les composants antifongiques produits par les

bactéries, sont affectés, tant par la température, que par les enzymes protéolytiques, ce qui signifie que la nature de ces composants est protéique. Les mécanismes spécifiques d'action des bactéries sélectionnées, sont liés à la production de l'enzyme hydrolytique (chitineuses et protéagineuses), aussi bien qu'aux facteurs génétiques naturels (les gènes pour la biosynthèse de la bacillomicine, fengicine, bacillolysine, surfactine, en ayant été décelés à la majorité des bactéries testées). En ce qui concerne les enzymes hydrolytiques testées, les résultats suggèrent que, bien qu'elles soient extracellulaires, les plus nombreuses restent localisées au niveau de la paroi cellulaire, le plus probablement au niveau de certains complexes macromoléculaires associé à celle-ci. Le flagelle *Bacillus amyloliquefaciens* BIR (B8) a présenté les effets les plus puissants antifongiques, en mettant également en évidence les plus élevées activités enzymatiques et en contenant les gènes pour tous les facteurs naturels génétiques analysés. Les épreuves effectuées avec les différents flagelles bactériens analysés, ont démontré que quelques-uns peuvent influencer sur le niveau de DON produit par les organismes fongiques filamenteuses cible, soit en inhibant la synthèse de DON, soit en dégradant la mycotoxine. En outre, on a prouvé que les bactéries d'intérêt ont la capacité de solubiliser le phosphore anorganique, ce qui met en relief leur utilité, non seulement en raison des effets de protection, mais aussi de stimulation du développement des plantes, par l'assurance de certains nutriments importants.

En ce qui concerne l'évaluation des propriétés antagonistes des flagelles bactériens isolés, par le traitement des grains ou des plantes cible, les analyses effectuées ont démontré que la germination des grains de blé, n'a pas été affectée négativement par les traitements bactériens, mais, au contraire, le traitement bactérien a prévenu l'infestation des semences par organismes fongiques, en ayant assuré un taux de germination 2 – 3,5 fois plus grand comparativement aux variantes où le traitement bactérien a manqué. Deux des flagelles bactériens sélectionnés, B3 et B8 (BIR), ont stimulé tant la germination des grains de blé, que le développement des plantules.

La thèse se termine par un chapitre de conclusions, dans lequel sont synthétisés les résultats principaux qui ont été obtenus, suivi par le chapitre de références bibliographiques, qui comprend un nombre de 190 ouvrages scientifiques cités.

Les résultats obtenus sur le parcours des études doctorales, ont été disséminés par la publication in extenso d'un nombre de deux articles, dans des revues indexées BDI; un article publié dans une revue cotée ISI et un article publié dans un volume type ISI Proceedings. En outre, la plupart des résultats ont été présentés aux diverses manifestations scientifiques nationales et internationales.

En conclusion, les expérimentations réalisées dans le cadre de cette thèse, ont mené à la sélection d'au moins deux bâtons bactériens, l'une en compost et l'autre en terrain. Par leur identification et leur caractérisation complexe, ces flagelles pourraient être considérés comme candidats importants à la réalisation de certains composants bio, utilisables tel quel, ou qui pourraient être insérés dans le compost pour le contrôle bio des espèces de *Fusarium*, en prévenant ainsi la contamination des plantes. Les résultats ont un caractère de nouveauté sur le plan national et même international, en raison du matériel biologique sélectionné et caractérisé, des méthodes optimisées sur le parcours des recherches et de la mise en valeur des effets de diminution de la quantité de DON accumulé dans le milieu de culture dans le cas de l'utilisation de certains des flagelles bactériens sélectionnés.