

## **Mémoire**

**Présenté par**

**M<sup>r</sup>. FOUGHALIA Abdelhamid**

**En vue de l'obtention du diplôme de Magister**

**Filière : Biologie**

**Option : Microbiologie**

**Thème**

**Recherche d'agents de lutte biologique  
d'origine microbienne contre  
*Botrytis cinerea* sur tomate**

**Soutenu le : 29/10/2015**

**Devant le jury composé de :**

<b>M<sup>r</sup> ZAIDI Farid</b>	<b>Professeur</b>	<b>UAMB</b>	<b><i>Président</i></b>
<b>M<sup>r</sup> AISSAT Kamel</b>	<b>Professeur</b>	<b>UAMB</b>	<b><i>Rapporteur</i></b>
<b>M<sup>r</sup> KECHA Mouloud</b>	<b>Professeur</b>	<b>UAMB</b>	<b><i>Examineur</i></b>
<b>M<sup>r</sup> TOUATI A. Aziz</b>	<b>Professeur</b>	<b>UAMB</b>	<b><i>Examineur</i></b>

**Année Universitaire : 2015/2016**

# Remerciements

*Je tiens en tout premier lieu à remercier le Bon Dieu **Allah** le tout puissant qui m'a procuré du courage et de la volonté pour réaliser ce modeste travail.*

*Ma reconnaissance et profonde gratitude vont à mon rapporteur le professeur Mr **AISSAT K** qui m'a fait l'honneur d'avoir guidé et assisté tout au long de ce travail ; pour m'avoir accueilli au sein de son laboratoire et pour ses conseils et son aide précieux.*

*Je tiens à remercier profondément:*

*Le professeur : Mr **ZAIDI F** d'avoir accepté de présider le jury de ma soutenance ;*

*Les professeurs : Mr **KECHA M** et Mr **TOUATI A.A** d'avoir manifesté de l'intérêt pour ce travail en me faisant l'honneur de le juger et de l'examiner;*

*Mes remerciements à M<sup>lle</sup> **Yousra B**, M<sup>lle</sup> **Samya L**, Mr **Moussa A** et Mr **Mokhtar K** pour leur aide précieux, A M<sup>lle</sup> **Fatima Zahra A** pour avoir mis à ma disposition tous les moyens nécessaires pour la réalisation de la partie expérimentale, à Mr **Moussa Z** pour m'avoir accueilli dans sa ferme pendant les mois de travail*

*« « DU FOND DU CŒUR » »*

*« « MERCI À TOUS » »*

## DÉDICACES

*A l'aide de Dieu, le tout puissant, ce travail est achevé ; Je le dédie à toutes les personnes qui me sont chères :*

*A la mémoire de mon père, ce travail est le fruit de tes sacrifices que tu as consentis pour mon éducation et ma formation.*

*A ma mère qui m'a donné la vie, le symbole de tendresse, qui s'est sacrifiée pour mon bonheur et ma réussite.*

*A mes frères Abdesslem, Nabil, Hacem et Ilyes et mes soeurs Fouzia, Rafika, Nabila, Nadjet et Fatiha. A leurs filles et enfants.*

*A tous les membres de ma famille, petits et grands*

*A mes meilleurs amis Wahid, Ali, Autmène et Abed*

*A Yousra et Samya*

*A mes collègues de la promotion Magister 2013 : Toufik, Kahina, Zahra, Sylia et Massilia*

*Abdelhamid*

## Liste des figures

<b>Figure.1.</b> Fleur de tomate en coupe.....	6
<b>Figure.2.</b> Les différents morphotypes du fruit de la tomate.....	7
<b>Figure.3.</b> Spore germée de <i>Botrytis cinerea</i> sous microscope optique .....	11
<b>Figure.4.</b> Cycles de vie de <i>Botrytis cinerea</i> .....	12
<b>Figure.5.</b> Chancres sur tiges de tomate causés par <i>B. cinerea</i> .....	14
<b>Figure.6.</b> Taches fantômes sur tomate mature et sur tomate verte.....	15
<b>Figure.7.</b> Lésions sur feuilles de tomate causées par la pourriture grise.....	15
<b>Figure.8.</b> Ensemencement des graines de la tomate.....	28
<b>Figure.9.</b> Tri et prélèvement des folioles.....	28
<b>Figure.10.</b> Méthode de confrontation directe.....	32
<b>Figure.11.</b> Méthode de confrontation indirecte.....	34
<b>Figure.12.</b> Préparation des boîtes et inoculation des folioles.....	37
<b>Figure.13.</b> Répartition des isolats sélectionnés selon leur origine.....	39
<b>Figure.14.</b> Aspect cultural de quelques isolats.....	42
<b>Figure.15.</b> Quelques isolats appartenant au genre <i>Bacillus</i> sous microscope optique (X100) après coloration de Gram.....	43
<b>Figure.16.</b> Effet antagoniste <i>in vitro</i> des isolats sur la croissance mycélienne d'ALG66.....	45
<b>Figure.17.</b> Effet antagoniste <i>in vitro</i> de quelques isolats montrés actifs contre ALG66.....	45
<b>Figure.18.</b> Effet antagoniste <i>in vitro</i> des isolats sur la croissance mycélienne de BC1.....	47
<b>Figure.19.</b> Effet antagoniste <i>in vitro</i> de quelques isolats montrés actifs contre BC1.....	47
<b>Figure.20.</b> L'effet antagoniste <i>in vitro</i> de chaque isolat contre les deux souches fongiques...48	
<b>Figure.21.</b> Effet des substances volatiles sur la croissance mycélienne d'ALG66.....	52
<b>Figure.22.</b> Effet des substances volatiles sur la croissance mycélienne de BC1.....	53
<b>Figure.23.</b> Comparaison entre l'effet des substances volatiles sur les deux souches fongiques.....	54
<b>Figure.24.</b> Effet antagoniste <i>in vitro</i> des isolats sur la germination des spores d'ALG66.....	57

<b>Figure.25.</b> Activité chitinolytique de quelques isolats.....	59
<b>Figure.26.</b> Activité lipolytique de quelques isolats.....	62
<b>Figure.27.</b> Activité protéolytique de quelques isolats.....	63
<b>Figure.28.</b> Effet antagoniste <i>in vivo</i> des isolats sur ALG66.....	65
<b>Figure.29.</b> Effet antagoniste <i>in vivo</i> de quelques isolats sur ALG66.....	65
<b>Figure.30.</b> Comparaison entre l'effet antagoniste <i>in vitro</i> et <i>in vivo</i> des isolats bactériens sur ALG66.....	68

## Liste des tableaux

<b>Tableau.1.</b> Classification botanique de la tomate selon Miller et Linné.....	4
<b>Tableau.2.</b> Les principaux pays producteurs de la tomate en 2013.....	8
<b>Tableau.3.</b> Classification sexuée et asexuée de <i>B. cinerea</i> .....	11
<b>Tableau.4.</b> Principaux fongicides utilisés dans le monde pour contrôler <i>Botrytis cinerea</i> sur tomate.....	19
<b>Tableau.5.</b> Origine des isolats .....	27
<b>Tableau.6.</b> Les caractères morphologiques des 30 isolats bactériens sélectionnés.....	40
<b>Tableau.7.</b> Les caractères biochimiques des 30 isolats bactériens sélectionnés.....	41
<b>Tableau.8.</b> Résultats de l'identification biochimique des 30 isolats sélectionnés.....	44
<b>Tableau.9.</b> Analyse de variance de l'antagonisme <i>in vitro</i> contre ALG66.....	46
<b>Tableau.10.</b> Analyse de variance de l'antagonisme <i>in vitro</i> contre BC1.....	46
<b>Tableau.11.</b> Analyse de variance de la comparaison entre ALG66 et BC1.....	48
<b>Tableau.12.</b> Analyse de variance de l'effet antagoniste des isolats sur la germination des spores d'ALG66.....	56
<b>Tableau.13.</b> Activités enzymatiques des isolats.....	61
<b>Tableau.14.</b> Analyse de variance de l'effet antagoniste <i>in vivo</i> des isolats sur ALG66.....	64

## Liste des annexes

**Annexe I** : Les milieux de culture utilisés

**Annexe II** : Utilisation de la cellule Malassez

**Annexe III** : Chronologie des traitements des plantes

**Annexe IV** : Utilisation du logiciel Assess 2.0

**Annexe V** : Résultats de l'activité antifongique *in vitro* des 132 isolats bactériens envers les deux souches fongiques

**Annexe VI** : Pourcentages d'inhibition *in vivo* des isolats bactériens

## Liste d'abréviations

**ANOVA:** Analysis of Variance

**ATP :** Adénosine triphosphate

**BC :** *Botrytis Cinerea*

**BCA :** Agent de Lutte Biologique

**BOTMAN:** Botrytis Manager

**CD:** milieu Caséine Digest

**FAO :** Organisation des Nations unies pour l'Alimentation et l'Agriculture

**GREENMAN :** Greenhouse Disease Manager

**HR:** Humidité Relative

**PDA :** Potato Dexrose Agar

**PGPR:** Plant Growth Promoting Rhizobacteria

**RM:** Rouge de Méthyle

**SNK:** Student Newman Keuls

**TMTD:** Disulfure de Tétraméthylthiurame Disulfure de Bis (N,N-Diméthylthiocarbamyle)

**ToMV :** Virus de la mosaïque de la tomate

**TSI:** Triple Sugar Iron

**UV:** Ultraviolet

**VP:** Voges-Proskauer



# GLOSSAIRE

# Glossaire

## *A*

**Anamorphe** : Stade de la reproduction asexuée d'un champignon.

**Apothécie** : Organe de reproduction sexuée en forme de coupe.

**Appressorium** : (pluriel appressoria) c'est un système utilisé par les champignons pour pénétrer dans une cellule hôte (plante), il est formé de filaments irrégulièrement branchés.

**Ascomycète** : Classe de champignons dont la reproduction sexuée consiste en la formation d'asques.

**Ascospore** : Spore de reproduction sexuée formée dans un asque.

**Asque** : Une cellule reproductrice, caractéristique des champignons ascomycètes, c'est un élément fertile où les ascospores se forment après caryogamie et méiose.

## *C*

**Callose** : Un glucane constitué de résidus de glucose liées par des liaisons osidiques  $\beta(1\rightarrow3)$  avec des ramifications  $\beta(1\rightarrow6)$ .

**Chlamydospore** : Spores de reproduction végétative à paroi épaisse ; se forme à partir d'une portion de filaments mycéliens,

**Chitine** : Un polysaccharide azoté issu de la polymérisation de plusieurs unités de N-acétylglucosamine liées entre elles par des liaisons osidiques du type  $\beta$ -1,4. C'est l'un des constituants de la paroi fongique et la carapace des insectes.

**Conidie** : Spore de reproduction asexuée.

**Conidiophore** : L'organe portant les conidies.

## *D*

**Deuteromycète** : Groupe artificiel ne constituant pas une vraie "classe" de champignons, la reproduction sexuée est inconnue ou ne peut être obtenue facilement avec les techniques de cultures habituelles (champignons imparfaits).

## *E*

**Epiderme** : "Couche superficielle, le plus souvent unicellulaire.

## *H*

**Hyphe** : Filament tubulaire cloisonné ou non cloisonné (septé ou non septé).

*M*

**Macroconidie** : Grande conidie habituellement pluricellulaire.

**Microconidie** : Petite conidie unicellulaire.

*N*

**Nécrotrophe** : Un organisme qui consomme son hôte une fois mort.

**Mycelium** : Ensemble des hyphes ou des filaments d'un champignon.

**Mycète** : Terme utilisé pour désigner un champignon.

*O*

**Opportuniste** : Espèce fongique qui profite d'une situation de faiblesse pour devenir parasite.

*P*

**Phialide** : Article mycélien fertile en forme de bouteille formant successivement des conidies ou phialospores.

**Phytophage** : Un organisme vivant qui se nourrit à partir de végétaux

**Polyphage** : Un parasite qui se développe sur plusieurs espèces.

*S*

**Saprophage** : Organisme qui se nourrit de matière en décomposition

**Sclérote** : Amas de filaments formant une masse dure de grande taille, c'est un élément de résistance du champignon.

**Septum** : Cloison entre deux cellules fongiques.

*T*

**Téléomorphe** : La forme ou le stade de reproduction sexuée d'un champignon.

# SOMMAIRE

Remerciements

Dédicaces

Liste de figures

Liste de tableaux

Liste des annexes

Liste d'abréviations

Glossaire

Introduction.....1

## Synthèse bibliographique

Chapitre I : La tomate (*Lycopersicon esculentum* Mill).....3

I.1. Généralités et historique.....3

I.2. Classification botanique et étymologie.....3

I.3. Variation génétique de la tomate.....4

I.4. Principales caractéristiques de la tomate.....4

I.5. Morphologie de la tomate.....5

I.6. Culture et production de la tomate.....7

I.7. Les différents pathogènes de la tomate.....9

Chapitre II : *Botrytis cinerea* agent causal de la pourriture grise de la tomate.....10

II.1. Introduction.....10

II. 2. Etymologie et classification.....10

II.3. Morphologie.....11

II.4. Cycle biologique.....12

II.5. Symptômes de la pourriture grise sur tomate.....	14
Chapitre III : La lutte contre la pourriture grise.....	16
III.1. La prophylaxie par des techniques culturales.....	16
III.2. La lutte chimique.....	16
III.2.1. Fongicides affectant la respiration cellulaire.....	17
III.2.2. Fongicides affectant le fonctionnement des microtubules.....	17
III.2.3. Fongicides affectant l'osmorégulation.....	17
III.2.4. Fongicides inhibiteurs de la biosynthèse de la méthionine.....	18
III.2.5. Fongicides inhibiteurs de la biosynthèse des stérols.....	18
III.2.6. Les limites d'utilisation des fongicides chimiques.....	18
III.3. Utilisation des agents de lutte biologique d'origine microbienne .....	19
III.3.1. Les agents de lutte biologique d'origine microbienne .....	20
III.3.1.1. Modes d'action des agents de lutte biologique.....	21
III.3.1.2. Commercialisation des agents de lutte biologique d'origine microbienne.....	25
<b>Partie pratique</b>	
<b>Matériel et méthodes.....</b>	<b>26</b>
I. Matériel.....	26
I.1. Matériel biologique.....	26
I.1.1. Matériel fongique.....	26
I.1.2. Isolats bactériens.....	26
I.1.3. Matériel végétal.....	27
II. Méthodes.....	29
II.1. Identification et caractérisation des isolats bactériens.....	29

II.1.1. Examen macroscopique.....	29
II.1.2. Examen microscopique.....	29
II.1.3. Caractérisation biochimique.....	29
II.1.3.1. La production de catalase.....	29
II.1.3.2. La production d'oxydase.....	30
II.1.3.3. Etude de la voie de fermentation du glucose .....	30
II.1.3.4. Mise en évidence de la mobilité.....	30
II.1.3.5. Fermentation des sucres.....	31
II.1.3.6. Production d'indole.....	31
II.2. Evaluation de l'effet antagoniste <i>in vitro</i> des isolats sur la croissance mycélienne de <i>B. cinerea</i> .....	31
II.2.1. Par confrontation directe.....	31
II.2.1.1. Effet sur la croissance mycélienne du champignon.....	32
II.2.2. Par confrontation indirecte .....	32
II.2.2.1. Evaluation de la croissance mycélienne du champignon.....	33
II.3. Evaluation de l'effet antagoniste <i>in vitro</i> des isolats sur la germination des spores d'ALG66.....	34
II.4. Etude de quelques activités enzymatiques des isolats.....	35
II.4.1. Détermination de l'activité chitinolytique.....	35
II.4.2. Détermination de l'activité lipolytique.....	36
II.4.3. Détermination de l'activité protéolytique.....	36
II.5. Evaluation de l'effet antagoniste <i>in vivo</i> des isolats sur ALG66.....	36
II.5.1. Repiquage de la souche pathogène.....	36
II.5.2. Préparation des suspensions bactériennes.....	37

II.5.3. Préparation des boites et inoculation des folioles.....	37
II.5.4. Evaluation de l'effet antagoniste.....	38
II.6. Analyse statistique.....	38
<b>Résultats er discussions</b> .....	39
I. Identification et caractérisation des isolats sélectionnés.....	39
I.1. Les caractères morphologiques.....	39
I.2. Les caractères biochimiques.....	40
II. Evaluation de l'effet antagoniste <i>in vitro</i> des isolats sur la croissance mycélienne de <i>B. cinerea</i> .....	44
II.1. Par confrontation directe.....	44
II.2. Par confrontation indirecte.....	51
III. Evaluation de l'effet antagoniste <i>in vitro</i> des isolats sur la germination des spores d'ALG66.....	56
IV. Etude des activités enzymatiques des isolats.....	59
V. Evaluation de l'effet antagoniste <i>in vivo</i> des isolats sur ALG66.....	64
V.1. Comparaison entre l'effet antagoniste <i>in vivo</i> et <i>in vitro</i> de chaque isolat contre ALG66.....	68
Conclusion et perspectives.....	71

## Références bibliographiques

## Annexes

# INTRODUCTION



## Introduction

En prenant une place parmi les quatre principaux légumes consommés dans le monde, la tomate est devenue l'un des produits agricoles les plus importants du point de vue économique. Sa production a augmenté de façon constante durant la dernière décennie (125.5 millions tonne sont produits en 2006). Cette augmentation est généralement accompagnée par la superficie cultivée et l'introduction de nouvelles techniques culturales. Son importance dans l'alimentation rend l'amélioration de sa qualité et l'augmentation de sa production indispensables (Peralta et Spooner, 2007).

La production de la tomate rencontre plusieurs problèmes, l'un de ces problèmes limitant sa production, que ce soit en plein champ ou sous serre, sont les maladies. Elles constituent une menace pour les cultures partout où elles se trouvent. En fait plusieurs maladies peuvent affecter les plantes de la tomate. Parmi celles-ci, la pourriture grise est la plus répandue. C'est une maladie cryptogamique aérienne causée par le champignon *Botrytis cinerea* dans des conditions climatiques humides et froides (Blancard, 2009).

Une étude récente de la FAO estime que par rapport au total de fruits et légumes produits à l'échelle mondiale, 15 % à 50 % sont perdus au stade post-récolte, principalement en raison des agents pathogènes dont *B. cinerea*. Les pertes les plus élevées ont été enregistrées dans les pays africains et asiatiques (Romanazzi et Felliziani, 2014).

La lutte contre la pourriture grise compte beaucoup plus sur l'utilisation des fongicides de synthèse chimique. Alors que l'apparition de nouvelles souches de *B. cinerea* résistantes contre la plupart des familles de fongicides a découragé leur utilisation. Cela souligne la nécessité de développer des produits rentables de lutte biologique (Romanazzi et Felliziani, 2014).

La lutte biologique contre la pourriture grise constitue une alternative intéressante ou un complément de la lutte chimique. Les agents microbiens de lutte biologique sont moins exigeants à l'environnement et leur mode d'action généralement complexe réduit le risque de développement de résistances (Elad et Stewart, 2007 ; Romanazzi et Felliziani, 2014).

Plusieurs études et travaux récents durant ces dernières années qui visent à rechercher des nouveaux agents de lutte biologiques efficaces contre *B. cinerea* dont les bactéries, les champignons et les levures sur plusieurs hôtes ont été publiés.

Dans cette étude nous nous sommes intéressés à la recherche des nouveaux agents microbiens antagonistes de *B. cinerea* sur tomate. L'isolement a été réalisé dans différents sites agricoles où la maladie sévit.

Pour étudier l'efficacité des agents isolés nous avons opté pour la démarche suivante :

- Caractérisation et identification des différents isolats
- Etude de l'effet antagoniste *in vitro* des isolats sur la croissance mycélienne des souches fongiques de *Botrytis cinerea*
- Etude de l'effet antagoniste *in vitro* des isolats sur la germination des spores de la souche fongique ALG66
- Etude de quelques activités enzymatiques des isolats
- Etude de l'activité antagoniste *in vivo* des isolats sur la souche fongique ALG66

**SYNTHESE**  
**BIBLIOGRAPHIQUE**

## **Chapitre I : La tomate (*Lycopersicon esculentum* Mill)**

### **I.1. Généralités et historique**

La tomate est originaire d'Amérique du Sud en particulier le Pérou et les îles « Galapagos ». Elle fut domestiquée pour la première fois au 16<sup>ème</sup> siècle au Mexique où elle était cultivée par les Aztèques. Son nom provient du mot « *tomatl* » de la langue « Nahuatl » parlée dans la région de Mexico (Jones, 2007 ; Blancard, 2009).

À la première moitié du 16<sup>ème</sup> siècle, la tomate a été introduite en Espagne et en Italie, puis aux autres pays européens où elle a été cultivée comme plante ornementale mais n'a pas été souvent mangée sauf en Italie et en Espagne car elle était considérée comme fruit toxique (Jones, 2007 ; Blancard, 2009).

Au 18<sup>ème</sup> siècle la tomate a été introduite en Amérique du Nord, bien que son importance en tant qu'un légume n'ait eu lieu qu'à partir du dernier siècle (Jones, 2007). Elle est devenue le légume vedette du 20<sup>ème</sup> siècle et sa consommation sous forme fraîche ou transformée dépasse 20 kg / an / habitant (Da Silva *et al*, 2008 ; Blancard, 2009).

En 2006, la production mondiale de la tomate a atteint 125,5 millions de tonnes. L'augmentation de la production est accompagnée par une augmentation de la surface cultivée (Caicedo et Peralta, 2013).

### **I.2. Classification botanique et étymologie**

La tomate appartient à la famille des *Solanaceae*. Cette famille regroupe d'autres espèces bien connues telles que la pomme de terre, le tabac, le poivron, le piment et l'aubergine (Heuvelink et Costa, 2005 ; Naika *et al*, 2005).

La classification taxonomique est encore en débat. En 1753, le botaniste Suédois Linné a donné à la tomate le nom *Solanum lycopersicon* mais Philip Miller a remplacé ce nom par *Lycopersicon esculentum*. « *Lycopersicon* » est dérivé d'un mot grec signifiant « pêche de loup » et « *esculentum* » signifiant simplement comestible (Jones, 1999 ; Heuvelink et Costa, 2005). La comestibilité ne concerne que les fruits matures, car les jeunes fruits verts contiennent des alcaloïdes toxiques (tomatine, solanine) qui disparaissent au cours du développement (Blancard,

2009). L'utilisation de la biologie moléculaire a permis de confirmer la classification de Linné en incluant le genre *Lycopersicon* dans le genre *Solanum*, les deux sont introduits dans la section *Lycopersicon* (Tableau 1) (Gerszberg *et al*, 2014).

**Tableau.1.** Classification botanique de la tomate selon Miller et Linné (Jones, 1999; Jones, 2007).

	<b>Classification de Miller</b>	<b>Classification de Linné</b>
<b>Famille</b>	<i>Solanaceae</i>	<i>Solaneceae</i>
<b>Genre</b>	<i>Lycopersicon</i>	<i>Solanum</i>
<b>Espèce</b>	<i>Lycopersicon esculentum</i> Mill	<i>Solanum lycopersicum</i> Linn

### **I.3. Variation génétique de la tomate**

La tomate cultivée a atteint son état actuel après une longue période de domestication. Les espèces de tomates cultivées ont une variation génétique extrêmement limitée avec une grande variation morphologique observée entre les différentes variétés. L'amélioration de la récolte a commencé par la sélection des génotypes préférés (Heuvelink et Costa, 2005).

En fait, le genre *Lycopersicon* comprend une petite collection d'espèces: la tomate cultivée *L. esculentum* Mill et plusieurs espèces *Lycopersicon* sauvages à savoir : *L. esculentum* var. *cerasiforme*, *L. pimpinellifolium*, *L. cheesmanii*, *L. parviflorum*, *L. Chmielewski*, *L. hirsutum* Humb, *L. chilense* Dun et *L. peruvianum* (L) Mill (Heuvelink et Costa, 2005).

Le genre a été initialement divisé en deux grands sous genres en se basant sur la couleur des fruits: *Eulycopersicon* (pour les espèces à fruits colorés) et *Eriopersicon* (pour les espèces à fruits verts). Une division plus complète a été proposée par Rick (1976) qui comprend deux grands complexes: (i) Le complexe *esculentum* pour les espèces qui se croisent facilement avec la tomate commerciale et (ii) le complexe de *peruvianum* pour les espèces que ne peuvent pas être facilement croisées avec la tomate commerciale (Heuvelink et Costa, 2005).

### **I.4. Principales caractéristiques de la tomate**

La tomate cultivée est une espèce diploïde avec  $2n = 24$  chromosomes. C'est une plante herbacée vivace généralement cultivée comme plante annuelle dans les régions tempérées (Jones, 2007 ;

Blancard, 2009). Lorsque les conditions climatiques sont favorables, les tomates sauvages peuvent se comporter comme bisannuelles. La durée de vie de la plante est liée aux conditions environnementales de chaque saison et sa capacité à accumuler des réserves dans la racine principale et la couronne (Caicedo et Peralta, 2013). Selon la variété et les conditions du milieu, le cycle de croissance de la tomate de la graine à la graine varie de trois mois et demi à quatre mois, six à huit semaines du semis de la graine à la floraison et sept à huit de la floraison à la maturation du fruit. La première récolte peut avoir lieu 45 à 55 jours après la floraison ou 90 à 120 jours après semis (Naika *et al*, 2005 ; Blancard, 2009).

En termes de croissance, la tomate est divisée en :

- **Tomate à croissance indéterminée** : où la plante produit 7 à 10 feuilles et une inflorescence puis 3 feuilles et une seconde inflorescence et ceci indéfiniment (Blancard, 2009).
- **Tomate à croissance déterminée** : La plante arrête son développement après 2 à 5 inflorescences, les pousses latérales stoppent leur développement après une à 3 inflorescences (Blancard, 2009).

## **I.5. Morphologie de la tomate**

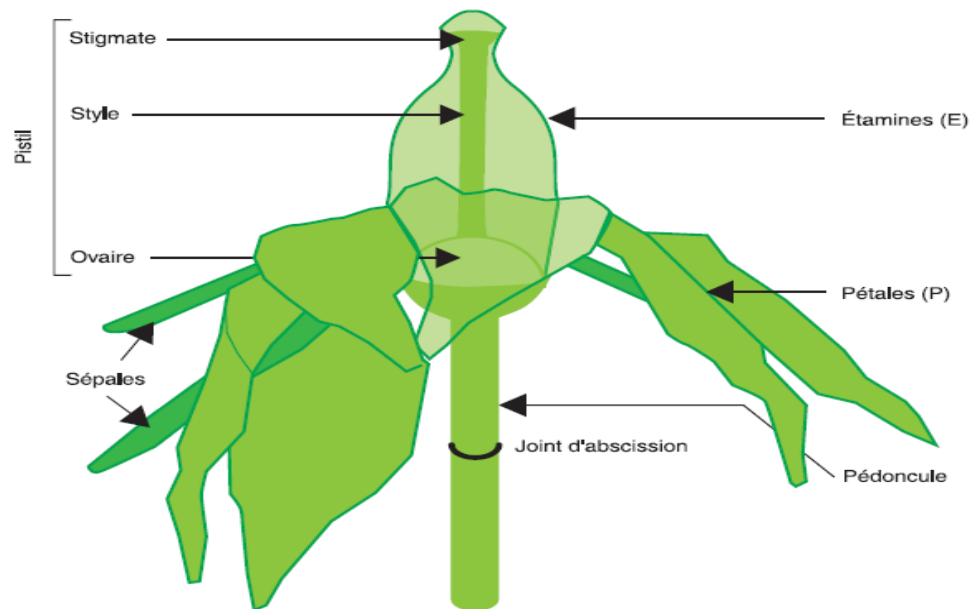
La racine de la tomate est pivotante et forte, elle peut pousser jusqu'à une profondeur de 50 cm ou plus. Une haute densité de racines latérales peut être produite par la racine principale (Naika *et al*, 2005).

La tige est pleine, glandulaire et fortement poilue, elle peut pousser jusqu'à une longueur de 2 à 4 m. Le port de croissance varie entre érigé et prostré (Naika *et al*, 2005).

Les feuilles sont disposées en spirale, 15 à 50 cm de longueur et 10 à 30 cm de largeur, elles sont imparipennées chez la plupart des espèces avec des folioles plus ou moins dentées, de forme ovées à oblongues et couvertes de poils glandulaires (Naika *et al*, 2005 ; Blancard, 2009). Il existe des variétés à feuilles très peu découpées et à bord non denté qui sont désignées comme variétés « à feuilles de pomme de terre ». Les feuilles ont 2 à 6 paires de folioles primaires latérales, opposées, subopposées ou alternatives (Blancard, 2009 ; Caicedo et Peralta, 2013).

Les folioles terminales peuvent être de la même taille ou plus grandes que les folioles primaires latérales. Chez certaines espèces, les folioles latérales primaires et les folioles terminales se divisent pour produire des folioles latérales secondaires et tertiaires. Les feuilles peuvent également développer des petites folioles appelées « folioles interstitielles » (Caicedo et Peralta, 2013).

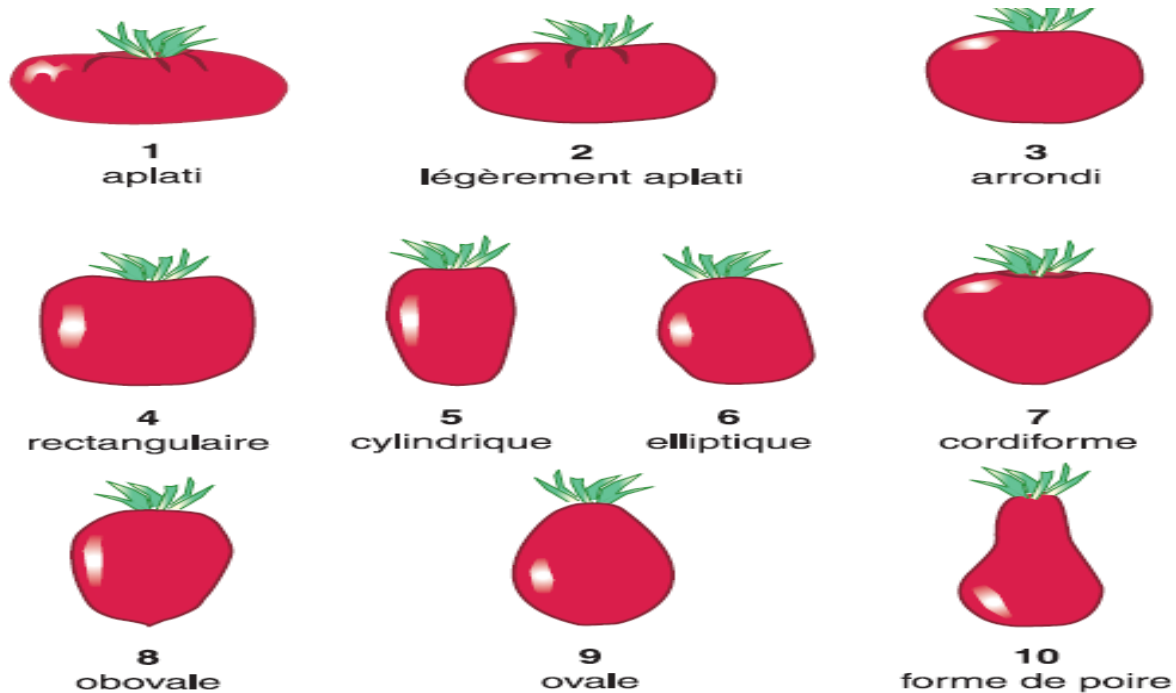
Les fleurs de la tomate (variétés cultivées) sont bisexuées et régulières avec 1,5 à 2 cm de diamètre, elles poussent opposées aux - ou entre les feuilles, elles sont groupées en inflorescences simples ou ramifiées formées de 6 à 12 fleurs. Le nombre de sépales, de pétales et d'étamines varie entre 5 et 8 (généralement 6) avec un ovaire supérieur comprenant 2 à 10 carpelles (Figure 1). Les sépales sont persistants, les pétales ont une couleur jaune avec une longueur pouvant atteindre 1 cm. Les étamines et les anthères ont une couleur jaune vif et soudées en un cône qui entoure le pistil (Naika *et al*, 2005 ; Blancard, 2009).



**Figure.1.** Fleur de tomate en coupe (Blancard, 2009)

Le fruit de la tomate est une baie charnue de forme globulaire ou aplatie avec un diamètre de 2 à 15 cm. Lorsqu'il n'est pas encore mûr, le fruit est vert et poilu. En fonction des cultivars, la couleur verte évolue vers diverses couleurs: crème, jaune, orange, rose, rouge ou brune (Naika *et al*, 2005 ; Blancard, 2009). La plupart des variétés de tomates sont de couleur rouge qui est due à

la présence du caroténoïde rouge « Lycopène ». La couleur rose est due à un seul gène (Y) qui empêche la formation du pigment jaune dans l'épiderme du fruit. La taille, la forme, la consistance et le poids du fruit varient selon les variétés. En général le poids peut varier de quelques dizaines de grammes à plus d'un kilogramme. Plus de 90% du poids frais des fruits de tomate sont constitués par l'eau et sa disponibilité peut influencer la taille des fruits (Jones, 1999 ; Blancard, 2009).



**Figure.2.** Les différents morphotypes du fruit de la tomate (Blancard, 2009).

Les graines sont en forme de poire, poilues, beiges, de 3 à 5 mm de longueur et 2 à 4 mm de largeur, l'embryon est enroulé dans l'albumen. Le poids des 1000 graines est approximativement 2,5 à 3,5 g (Naika *et al*, 2005).

## **I.6. Culture et production de la tomate**

La tomate est l'un des légumes les plus consommés dans le monde, soit fraîche ou transformée (30 % des tomates produites sont transformées) dont les pays méditerranéens sont les premiers consommateurs. Elle est cultivée sous toutes les latitudes dans des conditions très variées. La production de la tomate dans les zones humides est limitée par l'incidence très élevée des maladies (Csizinszky, 2005 ; Blancard, 2009).



Au 20<sup>ème</sup> siècle, la production mondiale de la tomate est toujours en progression régulière et s'est accrue considérablement durant les trois dernières décennies (Blancard, 2009). Les cinq principaux pays producteurs sont la Chine, l'Inde, les Etats- Unis, la Turquie et l'Egypte (Tableau 2) mais les États-Unis est également l'un des plus grands importateurs mondiaux des tomates (Robertson et Labate, 2007 ; Caicedo et Peralta, 2013).

Selon les statistiques de la FAO (FAOSTAT) de l'année 2013, la production mondiale de la tomate a atteint 163963770 Tonnes cultivées sur une surface de 4725416.69 Ha.

Les tunnels en plastique et les serres en verre destinés pour la culture protégée couvrent 1.612.380 Ha dans le monde entier (Peet et Welles, 2005)

**Tableau.2.** Les principaux pays producteurs de la tomate en 2013 (FAOSTAT, 2013)

<b>Position</b>	<b>Pays</b>	<b>Production (Tone)</b>
1	Chine	50,552,200.00
2	Inde	18,227,000.00
3	États-Unis d'Amérique	12,574,550.00
4	Turquie	11,820,000.00
5	Égypte	8,533,803.00
6	Iran	6,174,182.00
7	Italie	4,932,463.00
8	Brésil	4,187,646.00
9	Espagne	3,683,600.00
10	Mexique	3,282,583.00

En Algérie, la tomate prend la troisième place des légumes produits après la pomme de terre et les oignons avec une production de 975075 Ha cultivée sur une surface de 22497 Ha ce qui place l'Algérie dans la 19<sup>ème</sup> place dans le monde avec un rendement de 433424.46 Hg/Ha (FAOSTAT, 2013).

## **I.7. Les différents pathogènes de la tomate**

Plus de 200 maladies peuvent affecter la tomate, elle est sensible aux différentes moisissures, bactéries et virus. Les moisissures et les bactéries provoquent des maladies des feuilles, des fruits ou des racines (Watterson, 1987 ; Naika et al, 2005).

Six genres bactériens peuvent affecter plus ou moins gravement la tomate: *Pseudomonas*, *Ralstonia*, *Xanthomonas*, *Clavibacter*, *Pectobacterium* (ex-Erwinia) et *Agrobacterium* (Blancard, 2009).

L'infection fongique est souvent causée par des spores qui germent puis pénètrent le tissu de la plante par les stomates, les blessures ou la peau de la plante. Les champignons tels que *Thielaviopsis basicola*, *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* et *Fusarium oxysporum* f. sp. *radicislycopersici* et *Pythium* spp produisent des chlamydospores. Les *Pythium* se maintiennent sous la forme d'oospores. Les sclérotés caractérisent la présence de certains champignons tels que: *Sclerotinia sclerotiorum*, *Sclerotinia minor*, *Sclerotium rolfsii*, *Botrytis cinerea* et *Rhizoctonia solani*. Généralement les effets nocifs des champignons se limitent à la zone de contamination mais quelques champignons envahissent les tissus vasculaires des plantes (*Fusarium* et *Verticillium* spp) (Naika et al, 2005 ; Blancard, 2009).

L'infection virale provoque souvent une croissance retardée et une diminution de la production. Parmi les virus affectant gravement la tomate et qui peuvent être transmis par les graines de la plante le ToMV et le PepMV (Naika et al, 2005 ; Blancard, 2009).

Les nématodes saprophages et plus de vingt genres de nématodes phytophages ont été signalés sur tomate mais seules quelques espèces peuvent entraîner des dégâts conséquents sur la plante et elles sont considérées comme des facteurs limitant de la production de la tomate dans le monde (Blancard, 2009).

## **Chapitre II : *Botrytis cinerea* agent causal de la pourriture grise de la tomate**

### **II.1. Introduction**

*Botrytis cinerea* Persoon: Fries (téléomorphe de *Botryotinia fuckeliana* (de Bary) Whetzel), connue sous le nom de champignon de la pourriture grise (Dean *et al*, 2012). C'est un champignon phytopathogène, ubiquiste, nécrotrophe et polyphage qui induit la mort de la cellule hôte ayant pour résultat des sérieux dommages aux tissus végétaux. Il cause des maladies de pré et post-récoltes dans au moins 235 espèces de plantes y compris une large gamme de plantes importantes telles que la vigne, la tomate, la fraise, le concombre et les plantes ornementales. Toutes autres espèces de *Botrytis* n'infectent qu'une ou quelques espèces étroitement liées dans le même genre de la plante. Le nom de l'étape asexuée ou l'anamorphe de *Botrytis cinerea* est préféré au nom du téléomorphe (étape sexuée) qui est rarement détectée dans les champs (Prins *et al*, 2000; Staats *et al*, 2005 ; Blancard, 2009).

### **II. 2. Etymologie et classification**

*Botrytis* est un mot grec signifie « grappe » qui décrit l'aspect des conidies sur les conidiophores et « *cinerea* » signifie « cendres » (Levrault, 1817; Hanson, 2008).

Le nom du genre *Botrytis* a été introduit pour la première fois par Micheli en 1729 et validé en 1801 par Persoon. En 1949 Gregory a considéré *Botrytis cinerea* comme espèce. Après la description de Persoon le genre *Botrytis* a été élargi par l'addition de 280 espèces et soumis aux révisions périodiques donnant naissance à des nouveaux genres séparés (Hawksworth, 1993).

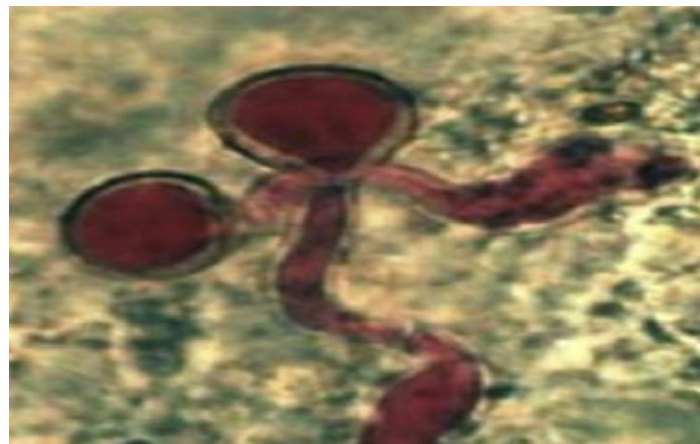
La classification du genre *Botrytis* est en grande partie basée sur les caractères morphologiques. Actuellement une classification du genre a été établie et basée sur les données de séquençage d'ADN des gènes codant pour des protéines nucléiques (Romanazzi et Feliziani, 2014).

**Tableau.3.** Classification sexuée et asexuée de *B. cinerea* (El Oirdi, 2009; Romanazzi et Feliziani, 2014)

	<b>Forme sexuée</b>	<b>Forme asexuée</b>
<b>Classe</b>	Leotiomycete	<i>Hyphomycete</i>
<b>Ordre</b>	<i>Helotiale</i>	<i>Moniliale</i>
<b>Famille</b>	<i>Sclerotiniaceae</i>	<i>Moniliaceae</i>
<b>Genre</b>	<i>Botryotinia</i>	<i>Botrytis</i>
<b>Espèce</b>	<i>Botryotinia fuckeliana</i>	<i>Botrytis cinerea</i>

### II.3. Morphologie

*Botrytis cinerea* produit un long mycélium ramifié et cloisonné de couleur transparente qui tend vers le marron. Les conidiophores se produisent à partir des mycéliums ou à partir des sclérotés, ils sont minces, grands et irrégulièrement ramifiés dans la partie terminale. Les conidies sont transparentes, lisses, grises et ovales avec une longueur de 8-14  $\mu\text{m}$  et une largeur de 6-9  $\mu\text{m}$ . Elles se libèrent facilement dans les conditions humides et peuvent être portées par le vent. Le champignon produit également des sclérotés noirs, durs et irréguliers (Boehm et Leuschner, 1987 ; Ingold et Hudson, 1993).



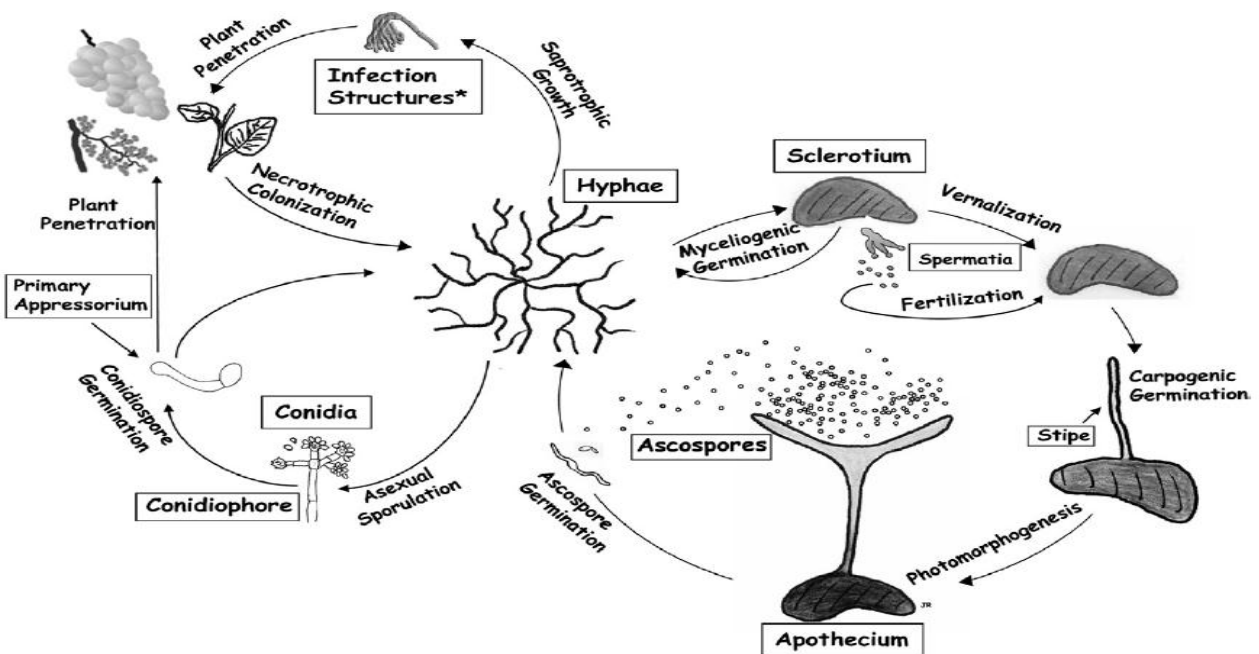
**Figure.3.** Spore germée de *Botrytis cinerea* sous microscope optique (Romanazzi et Feliziani, 2014).

## II.4. Cycle biologique

Le cycle de vie de *Botrytis* comporte deux étapes :

Une étape somatique (asexuée) ou végétative ou anamorphe dans laquelle le mycélium produit les conidies asexuelles (macroconidies) et des sclérotés dans des conditions environnementales difficiles.

Une étape sexuée (téleomorpe) où le champignon forme des microconidies et qui fonctionnent principalement comme spermaties (Figure 4) (Romanazzi et Feliziani, 2014).



**Figure.4.** Cycles de vie de *Botrytis cinerea* (Romanazzi et Feliziani, 2014).

### II.4.1. Le cycle de vie asexuée

Puisque les apothécies du *B. fuckeliana* sont rarement observées, le champignon est mieux connu par son état asexué *Botrytis cinerea* qui est présent sur toutes sortes de matière végétale moribonde (Webster et Weber, 2007).

En nature et durant l'hiver, *Botrytis cinerea* se conserve au moyen de sclérotés (Webster et Weber, 2007) qui sont des structures de survie formées à partir des branches mycéliennes qui se

fusionnent pour former une masse globulaire. Le cortex mélanisé et les  $\beta$ -glucanes emballant le mycélium interne protègent les sclérotés contre la dessiccation, les rayons UV et l'attaque microbienne. Quand les conditions environnementales deviennent favorables, les sclérotés germent par l'émission des conidiophores (Romanazzi et Feliziani, 2014).

Dans les régions tempérées, les sclérotés commencent la croissance au début du printemps pour produire des macroconidies servant de source primaire d'inoculum et peuvent être transportées par le vent sur de longues distances avant d'infecter le prochain hôte. Le transport spécifique par des insectes vers les tissus de l'hôte a été également signalé. *Drosophila meianogaster*, *Thrips obscuratus* aussi bien que les larves de *Lobesia botrana* peuvent transporter les conidies (Prins *et al*, 2000 ; Williamson *et al*, 2007).

Avant de pouvoir pénétrer le tissu de l'hôte, les conidies de *B. cinerea* doivent s'attacher sur la surface de l'hôte. Après l'attachement et dans des conditions favorables la conidie germe et produit un tube germinatif qui pénètre la surface de l'hôte. Une humidité relative supérieure de 93% est exigée pour la germination et la pénétration de l'épiderme de l'hôte. Après la pénétration de la surface, les cellules fondamentales seront éliminées et le champignon établit une lésion primaire. Les barrières de défense seront dépassées et le champignon commence une croissance vigoureuse ayant pour résultat la macération rapide du tissu végétal sur lequel le champignon sporule pour produire l'inoculum pour la prochaine infection. Dans des conditions optimales, un cycle d'infection peut être accompli dans 3-4 jours, selon le type de tissu de l'hôte attaqué (Prins *et al*, 2000).

#### **II.4.2. Le cycle de vie sexuée**

La reproduction sexuée de *Botrytis cinerea* se produit en hiver et dans laquelle on observe un grand nombre de microconidies uninuclées, ces dernières sont formées à partir du mycélium végétatif ou des macroconidies qui peuvent fonctionner comme spermaties. Le cycle sexué implique la spermatisation des sclérotés menant à la production des apothécies et des asques contenant huit ascospores binuclées transparentes de forme ovoïde ou elliptique (Williamson *et al*, 2007 ; Romanazzi et Feliziani, 2014). Les asques constituent les gamètes femelles qui se fusionnent avec les microconidies (spermaties) (Webster et Weber, 2007 ; Melanie, 2014).

## II.5. Symptômes de la pourriture grise sur tomate

*B. cinerea* est responsable de plusieurs symptômes et ceux-ci ne peuvent pas être facilement généralisés à travers des organes et des tissus de l'hôte (Williamson *et al*, 2007).

Sur tomate, tous les organes aériens peuvent être affectés et se couvrent d'une dense moisissure grise constituée des conidiophores et des conidies. *B.cinerea* peut également produire des sclérotés noirs rarement visibles sur les lésions (Blancard, 2009). Les plus grands dommages se produisent sur :

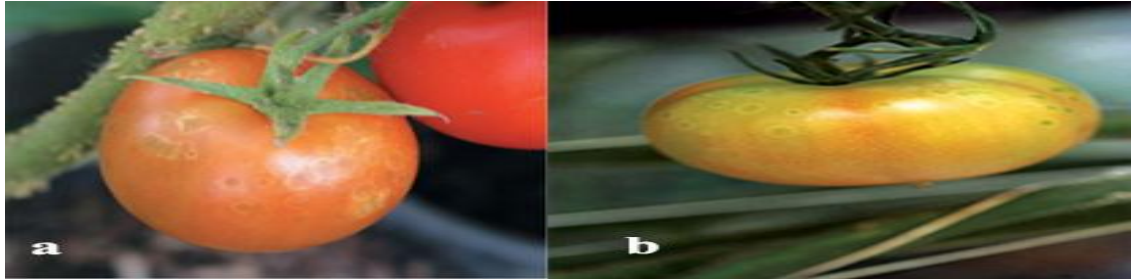
**II.5.1. Les tiges et les pétioles :** Sur les tomates de serres, les infections de tige sont le problème le plus courant. Les symptômes apparaissent en tant que lésions chancreuses humides commençant essentiellement à partir des plaies de taille et d'ébourgeonnage (Watterson, 1987 ; Koike *et al*, 2007) (Figure 5). Les chancres sont plutôt humides et ont tendance à sécher en évoluant. Ils prennent une teinte beigeâtre à brune. Les lésions développées peuvent éventuellement entourer tous le pétiole ou la tige (Koike *et al*, 2007 ; Blancard, 2009).



**Figure.5.** Chancres sur tiges de tomate causés par *B. cinerea* (Koike *et al*, 2007 ; Blancard, 2009).

**II.5.2. Les fruits:** L'infection par *Botrytis cinerea* se produit avant la récolte et quand le fruit entre en contact avec les parties infectées de la plante et la pourriture peut se produire dans le champ ou après la récolte. La maladie apparaît sur le fruit vert (plus rarement les tomates mures) sous forme des anneaux blanchâtres (connues sous le nom de tâches fantômes) entourant un centre vert (Figure 6), et ce sont en fait le résultat des infections avortées de *Borytis cinerea* après que les spores ont germé puis que les tubes germinatifs ont pénétré les tissus. Les tâches fantômes (2 à 10 mm de diamètre) sont plutôt jaunâtres sur les fruits murs (Figure 6 (a)).

Les parties infectées deviennent humides avec le développement des lésions grisâtre-brunes à grisâtre-vertes (Grierson et Kader, 1987 ; Blancard, 2009). Les taches fantômes ne provoquent pas l'affaiblissement des fruits mais les rendent non commercialisables (Koike *et al*, 2007).



**Figure.6.** Taches fantômes sur tomate mature (a) et sur tomate verte (b) (Koike *et al*, 2007 ; Blancard, 2009)

**II.5.3. Les feuilles et les folioles :** L'infection des feuilles commence habituellement à partir des points de blessures et se développe en lésions en forme V situées à l'intérieur du limbe plus fréquemment à sa périphérie et son extrémité. Celles-ci sont de couleur brune et humides au début d'évolution et deviennent rapidement nécrotiques et prennent une coloration beige à brunâtre (Figure 7). L'infection est également à l'origine des taches foliaires qui se développent plutôt sur les feuilles basses et matures des plantes adultes puis sur les apex, ces altérations peuvent donner lieu à une pourriture qui s'étend ensuite et finit par lésion des feuilles entières, flétrissement, dessèchement puis la mort (Watterson, 1987 ; Blancard, 2009).



**Figure.7.** Lésions sur feuilles de tomate causées par la pourriture grise (Blancard, 2009).



## **Chapitre III : La lutte contre la pourriture grise**

En tenant compte les facteurs de développement de la pourriture grise, plusieurs mesures utilisables conjointement peuvent être proposées : des techniques culturales adaptées, une meilleure maîtrise du climat autour des plantes et une lutte chimique raisonnée. Les moyens de lutte biologique en tant que perspectives seront aussi abordés (Caudal, 1998).

### **III.1. La prophylaxie par des techniques culturales**

La prophylaxie consiste à éliminer les sources d'inoculum primaire (Walker, 2013). Les débris végétaux en cours de culture en particulier les plantes moribondes portant un à plusieurs chancres sur tige et les fruits pourris doivent être éliminés très rapidement afin d'éliminer les tissus colonisés par le champignon. Il est important d'éviter les jours pluvieux lors de l'effeuillage qu'il doit être effectué de préférence le matin où les tissus se coupent plus aisément et les plaies ont plus de temps pour sécher au cours de la journée (Caudal, 1998 ; Blancard, 2009).

Une protection chimique préventive des plaies peut être recommandée où les plaies de taille devront être protégées par un fongicide appliqué localement sous la forme d'un badigeon. Un chauffage par thermosiphon localisé permettant de sécher rapidement la plaie (Caudal, 1998 ; Blancard, 2009).

En serres, l'humidité relative et la présence d'eau libre doivent être réduites par ventilation et chauffage et en évitant ou en réduisant l'irrigation par aspiration (Agrios, 2005 ; Koike *et al*, 2007).

### **III.2. La lutte chimique**

Elle demeure la méthode principale pour lutter contre la pourriture grise et les applications les plus courantes se font par pulvérisation des parties aériennes des plantes avec les fongicides et qui sont appliqués préventivement et particulièrement pendant l'automne et le printemps où la plupart des infections se produisent (Leroux, 2007 ; Cumagun, 2012).

Plusieurs familles de fongicides de synthèse capables de contrôler la pourriture grise sont disponibles. Elles peuvent être classées en cinq catégories selon leurs modes d'action biochimiques (Leroux, 2007; Romanazzi et Felliziani, 2014).

### III.2.1. Fongicides affectant la respiration cellulaire

Chez les champignons comme chez les autres eucaryotes, les dernières étapes de la respiration ont lieu dans les mitochondries et conduisent à la synthèse de l'énergie sous forme d'ATP. La répartition des molécules organiques (à savoir les sucres, les graisses, protéines) fournit l'énergie pour la survie des systèmes vivants. Plusieurs groupes de fongicides perturbent l'approvisionnement en énergie chez *B. cinerea* et tous ces composés sont des inhibiteurs puissants de la germination des conidies (Leroux, 2007). Les deux groupes les plus utilisés sont:

- **Les fongicides multisites**

Tels que, le Thirame ou TMTD et Mancozeb ou Maneb et qui peuvent contrôler *B. cinerea* dans plusieurs types de cultures (Leroux, 2007).

- **Les découplants de la phosphorylation oxydative**

Le Fluazinam est un dérivé de Phenylpyridinamine, il présente une bonne activité *in vitro* contre *B. cinerea*, il est hautement toxique contre les conidies et les mycéliums. Le Carboxin et Carboxamides sont des fongicides systémiques inhibant le complexe succinate déshydrogénase (complexe mitochondrial II) (Leroux, 2007).

### III.2.2. Fongicides affectant le fonctionnement des microtubules

Le Benzimidazole, le Thiabendazole, le Carbendazime et le Bénomyl sont les premiers fongicides systémiques qui présentaient un large spectre d'action. Ces fongicides n'empêchent pas la germination des conidies de *B. cinerea*, mais à basses concentrations, ils inhibent la croissance mycélienne et provoquent une distorsion de tubes germinatifs (Leroux, 2007).

### III.2.3. Fongicides affectant l'osmorégulation

Les trois familles les plus utilisées sont:

- **Dicarboximides** : Ils remplacent les Benzimidazoles à la fin 1970 pour le contrôle de la pourriture grise.
- **Phénylpyrrole** : sont des analogues synthétiques de l'antibiotique Pyrrolnitrine produit par *Pseudomonas* spp. Fludioxonil a été introduit dans les années 1990 comme fongicide foliaire en raison de sa stabilité en particulier contre *Botrytis cinerea*.
- **Fongicides hydrocarbures aromatiques** : représentent un ancien groupe hétérogène de fongicides parmi lesquels le plus actifs contre *Botrytis* spp est le Diclorane. Autres

composés comme Quintozène et O-phénylphénol peuvent respectivement contrôler *B. cinerea* dans le sol et durant le stockage des fruits.

#### **III.2.4. Fongicides inhibiteurs de la biosynthèse de la méthionine**

Le mode d'action des Anilinopyrimidines consiste à inhiber la biosynthèse de la méthionine et de la sécrétion d'Enzymes hydrolytiques. Ils sont efficaces contre une large gamme des ascomycètes et basidiomycètes. Des études *in vitro* avec *B. cinerea* ont montré que les Anilinopyrimidines inhibent fortement l'élongation du tube germinatif de *B. cinerea* mais les effets sur la croissance mycélienne varient en fonction de la composition des milieux nutritifs (Leroux, 2007 ; Romanazzi et Felliziani, 2014).

#### **III.2.5. Fongicides inhibiteurs de la biosynthèse des stérols**

Ces fongicides n'empêchent pas la germination des spores de *B. cinerea* mais à des faibles concentrations ils inhibent l'élongation des hyphes et la croissance du mycélium. Cependant, peu d'entre eux peuvent contrôler d'une façon efficace *B. cinerea* dans des conditions de terrain. Les Fenhexamides et Fenpyrazamines inhibent la biosynthèse des stérols en empêchant les tubes germinatifs et le mycélium de se croître (Leroux, 2007 ; Romanazzi et Felliziani, 2014).

#### **III.2.6. Les limites d'utilisation des fongicides chimiques**

L'utilisation des fongicides est une manière efficace pour protéger les cultures contre les espèces de *Botrytis*. Bien que l'application des fongicides synthétiques pour le contrôle des fruits et légumes demeure la méthode la plus courante, leur application a plusieurs inconvénients qui doivent être pris en considération. En général, l'utilisation des fongicide est interdite dans l'agriculture organique. En outre, la préoccupation publique croissante vers les résidus de fongicides a contribué à l'élaboration des méthodes alternatives (Leroux, 2007 ; Romanazzi et Felliziani, 2014).

*B. cinerea* développe une résistance contre plusieurs fongicides (Mengiste *et al*, 2010). Cette résistance peut être due à plusieurs facteurs tels que la variabilité génétique (Webster et Weber, 2007 ; Blancard, 2009). Par exemple, l'utilisation étendue des Dicarboximides et des Benzimidazoles a conduit respectivement à l'apparition des souches résistantes et tolérantes de *B. cinerea* (Blancard, 2009 ; Cumagun, 2012). Des mutants de *B. cinerea* résistant aux Fenexamide, Boscalide, Pyraclostrobine, Carbendazime, Pyrimethanile, Cyprodinile,

Iprodione , Procymidone, Diethofencarb et Fluazinam ont été isolés (Romanazzi et Feliziani, 2014 ; Shao *et al*, 2015).

Pour limiter les risques d'apparition des résistances et améliorer l'efficacité des traitements il est important d'employer une diversité des fongicides avec différents modes d'action et alterner les familles chimiques (Caudal, 1998 ; Koike *et al*, 2007).

**Tableau.4.** Principaux fongicides utilisés dans le monde pour contrôler *Botrytis cinerea* sur tomate (Blancard, 2009).

Mode d'action	Famille chimique	Substance active
Multisite (processus respiratoires et production d'énergie cellulaire)	Dithiocarbamates	Thirame ou TMD
Division cellulaire et microtubules	Phénylcarbamate Benzimidazoles (r)	Diéthofencarbe Carbendazime, Bénomyl
Biosynthèse des stérols	Hydroxyanilides(r)	Fenhexamid
Métabolismes des glucides et des polyols	Dicarboximides(r)	Iprodione Procymidone, Vinchlozoline
Biosynthèse des acides aminés et des protéines	Anilinyrimidines(r)	Pyrimethanil
Multisite (processus respiratoires et production d'énergie cellulaire)	Sulfamides	Tolyfluanid

(r) Famille chimique surtout concernée par les phénomènes de résistance.

### III.3. Utilisation des agents de lutte biologique d'origine microbienne

L'apparition des souches de pathogène de *B. cinerea* résistantes à un ou plusieurs fongicides a découragé leur utilisation répétée. Les recherches récentes ont comme objectif le développement des outils naturels de lutte comme solutions remplaçant les traitements par des fongicides de synthèse. Parmi ces composés naturels, les agents de lutte biologiques d'origine microbienne (Romanazzi et felizziani, 2014).

### III.3.1. Les agents de lutte biologique d'origine microbienne

Le terme “agent de lutte biologique” est utilisé dans différents domaines de biologie y compris l'entomologie et la pathologie végétale. Dans le domaine de pathologie végétale, le terme est appliqué sur l'utilisation des antagonistes microbiens pour l'inhibition des maladies et dont les pathogènes sont leurs hôtes spécifiques (Rettinassababady et Jeyalakshmi, 2014).

L'utilisation des agents de lutte biologique (BCAs) contre *B. cinerea* est l'une des méthodes de lutte alternative. Ces agents sont généralement des bactéries, des levures ou des champignons filamenteux et qui ont un effet antagoniste contre le pathogène (Elad et Shtienberg, 1995 ; Romanazzi et Feliziani, 2014). Plusieurs microorganismes saprophytes sont efficaces contre *B. cinerea*. Et leur effet sur le cycle de vie du champignon et sa sévérité est récemment exploité (Gnanamanickam *et al*, 2002 ; Elad et Stewart, 2007).

Les premières tentatives de lutte biologique contre *B. cinerea* en utilisant des microorganismes antagonistes étaient les travaux de Newhook (1951) et Wood (1951) qui ont testé l'effet de deux champignons *Fusarium* spp et *Penicillium claviforme* contre *B. cinerea* sur des feuilles sénescents de laitue. Ils ont constaté que ces deux champignons ont pu empêcher la croissance de *B. cinerea*. En 1957 et en pulvérisant des tomates sous serres par une suspension sporale de *Cladosporium herbarum* et *Penicillium* sp, Newhook a réussi de contrôler *B. cinerea* (Elad et Stewart, 2007). A partir des années 1970, plusieurs espèces de *Trichoderma* ont été utilisées pour le contrôle de *B. cinerea* sur des fleurs d'haricot, de raisin, de fraise et différentes cultures sous serre (Elad et Stewart, 2007).

Des isolats de *T. harzianum* (T39) ont pu effectivement contrôler les maladies de *Botrytis* sur des cultures sous serres, ces isolats sont commercialisés par Makhteshim Chemical Works sous le nom de Trichodex™ (Butt *et al*, 2001). Ils sont déjà testés dans presque 16 pays différents. Des essais sur tomates, concombre et fraises ont donné un succès considérable (Elad et Shtienberg, 1995).

En 1997, Shtienberg et Elad ont développé une nouvelle stratégie intégrée pour le contrôle de *Botrytis cinerea* qu'elle s'appelle BOTMAN (Botrytis Manager), elle fait appel à l'utilisation d'un agent biologique : *Trichoderma harzianum* qui permet de contrôler *B. cinerea* aussi bien que des applications fongicides hebdomadaires. La stratégie est basée sur des prévisions climatiques pour décider entre la pulvérisation du fongicide chimique ou de l'agent de lutte biologique (Blancard, 2009 ; Gnanamanickam *et al*, 2002). La stratégie BOTMAN a été

étendue vers une autre appelée GREENMAN, son but principal est d'assurer le bon moment pour appliquer l'agent de lutte biologique et le fongicide, de telle façon l'utilisation du fongicide ne sera appliquée sauf s'il est nécessaire et l'agent de lutte biologique sera toujours utilisé durant la période de la maladie sous serre (Elad, 2000).

### **III.3.1.1. Modes d'action des agents de lutte biologique**

Les modes d'action des agents de lutte biologique et leurs interactions avec le pathogène sont nombreux et compliqués. Connaître le mécanisme par lequel l'agent de lutte biologique inhibe le pathogène est très important pour l'amélioration de l'utilisation des méthodes biologiques (Rettinassababady et Jeyalakshmi, 2014).

Les agents de lutte biologique peuvent agir par plusieurs modes d'action:

#### **a. Compétition des nutriments et de l'espace**

Pour assurer la compétition de l'espace avec les pathogènes, les agents de lutte biologique doivent mieux s'adapter aux différentes conditions environnementales et nutritionnelles et être capables de croître très rapide. Généralement, la diminution de la concentration des nutriments conduit à l'inhibition de la croissance de pathogène, la germination des spores et l'élongation de tube germinatif. Les bactéries, les levures et les champignons filamenteux peuvent inhiber le champignon pathogène par compétition de nutriments tels que l'azote, le carbone, les macroéléments et les microéléments. Ce qui conduit également à l'inhibition de la germination des spores et perturbe la croissance d'agents pathogènes cibles. Par exemple *Pseudomonas* sp utilise les acides aminés plus vite que les spores de *B. cinerea*. Plusieurs isolats bactériens et fongiques inhibent la germination des spores de *B. cinerea* par la compétition des nutriments sur feuilles détachées des hôtes ce qui réduit la gravité de la maladie (Elad et Stewart, 2007 ; Nollet et Rathore, 2015).

#### **b. Parasitisme et production d'enzymes dégradant la paroi**

Le parasitisme des champignons par différents microorganismes repose sur la production des enzymes qui dégradent la paroi fongique. Les conidies de *Botrytis* ou les tubes germinatifs sont sensibles aux enzymes lytiques produites par les micro-organismes et qui peuvent empêcher la germination et lyser les tubes germinatifs (Elad et Stewart, 2007 ; Leroux, 2007).

Ces enzymes peuvent hydrolyser les polymères de glucose constituant la grande partie de la paroi. La chitinase et la  $\beta$ -1,3- glucanase sont les enzymes les plus importantes parce qu'ils

attaquent la  $\beta$  -1,3- glucane et la chitine formant la paroi des champignons et qui donnent à cette dernière sa rigidité (Narayanasamy, 2013).

Plusieurs parasites fongiques tels que *Trichoderma virens* peuvent fonctionner comme un mycoparasite agressif des agents pathogènes fongiques. Ils peuvent parasiter non seulement les hyphes de nombreuses espèces de champignons mais ils peuvent également pénétrer et détruire les sclérotés (Narayanasamy, 2013).

### c. Antibiose et production des composés inhibiteurs

L'antibiose est un antagonisme spécifique connu par la sécrétion des métabolites non spécifiques d'origine microbienne, des composés volatiles ou d'autres substances toxiques ayant un effet direct sur d'autres organismes (Rettinassababady et Jeyalakshmi, 2014).

Plusieurs agents de lutte biologique sont connus pour produire des antibiotiques capables d'inhiber la germination des spores et la croissance mycélienne des champignons pathogènes (Narayanasamy, 2013).

La production d'antibiotiques par certaines souches de *Pseudomonas fluorescens* est aujourd'hui connue comme un mécanisme important dans la lutte biologique. Une gamme de composés comme Phénazine, Pyolutéorine, Tropolone, Pyocyanine, Phloroglucinal 2,4 - diacétyl et Pyrrolnitrine est produite avec un large spectre d'action contre de nombreux agents pathogènes des plantes (Rettinassababady et Jeyalakshmi, 2014).

Plusieurs bactéries du genre *Bacillus* produisent des lipopeptides antifongiques, telles que la Fengycine, la Surfactine, l'Iturine et la Bacillomycine dans leur environnement naturel en formant des pores sur les membranes cellulaires fongiques (Nollet et Rathore, 2015). *B. cinerea* a été contrôlé par certaines espèces de *Bacillus* productrices d'antibiotiques sur divers hôtes. Par exemple, *Brevibacillus brevis* sécrète l'antibiotique Gramicidine S qui est connu pour être très efficace contre *B. cinerea* (Elad et Stewart, 2007 ; Jamalizadeh *et al*, 2008).

Les antibiotiques Peptaibole, Trichozianines A1 et B1 de *T. harzianum* et Gliotoxine de *G. virens* inhibent la germination des spores de *B. cinerea* (Elad et Stewart, 2007).

### d. Attachement sur les surfaces du pathogène

L'activité de lutte biologique peut dans certains cas être associée à ou même exige la fixation d'agent de lutte biologique à la surface des cellules hôtes. Les mécanismes de fixation jouent

un rôle dans les interactions cellule-cellule des champignons et d'autres micro-organismes. (Elad et Stewart, 2007).

La fixation des levures *Rhodotorula glutinis* et *Cryptococcus albidus* sur les conidies de *B. cinerea* est associée à la formation d'une substance fibrillaire (Elad *et al.*, 1996).

L'antagoniste *Pichia guilliermondii* agit sur *B. cinerea* en se fixant sur ses hyphes. Lorsque  $\alpha$ -cellulose est appliquée sous forme d'une poudre sèche avec *Candida pulcherrima* sur des colonies sporulées de *B. cinerea* sur des feuilles de kiwis, le mélange se fixe sur les conidiophores et les conidies du champignon et inhibe la libération des conidies par 50 % (Elad et Stewart, 2007).

La microscopie électronique à balayage a montré l'attachement de *Trichoderma* sur les polysaccharides de la matrice extracellulaire des conidies de *B. cinerea* (Elad et Stewart, 2007).

#### **e. Modification des propriétés de surface de la plante**

Ce phénomène a été largement négligé dans la recherche de la lutte biologique et exige une recherche plus approfondie. Les micro-organismes peuvent changer la mouillabilité des surfaces de plantes comme le montre la surface active de *Pseudomonas* spp. L'effet de surface peut interférer avec l'attachement et la croissance de l'agent pathogène sur les surfaces des plantes (Elad et Stewart, 2007).

*Bacillus brevis* peut produire des biosurfactants qui peuvent réduire les périodes de mouillabilité des feuilles (Jamalizadeh *et al.* 2008).

#### **f. Réduction de la pathogénicité de l'agent pathogène**

La synthèse des enzymes hydrolytiques par *B. cinerea* au cours de la première phase des interactions hôte-pathogène est cruciale pour le processus d'infection et toute interférence avec ces enzymes par des enzymes produites par les antagonistes peut réduire l'infection. Les activités polygalacturonase, pectine méthyle estérase, pectate lyase, chitinase,  $\beta$ -1,3-glucanase et cutinase produites par *B. cinerea* ont été réduites en présence *T. harzianum* T39. Il a été montré que *T. harzianum* T39 produit des protéases sur les feuilles des plantes en réduisant la pathogénicité de *B. cinerea* reliée aux enzymes. L'activité pectinolyase de *B. cinerea* est complètement stoppée par *Bacillus circulans* (Paul *et al.*, 1997 ; Elad et Stewart, 2007).



### **g. Stimulation de la résistance de la plante**

La stimulation de la résistance des tissus végétaux est l'un des mécanismes d'action les plus importants. Les réactions de stimulation de la résistance dans les gènes de la plante sont induites par certaines molécules appelées éliciteurs (Elad et Stewart, 2007 ; Rettinassababady et Jeyalakshmi, 2014).

Les réponses de défense de la plante peuvent conduire à l'épaississement physique des parois cellulaires par lignification, dépôt de callose et l'accumulation des substances antimicrobiennes de faible poids moléculaire (phytoalexines) et des enzymes de défense telles que la phénylalanine ammoniac-lyase (PAL) et le chalcone synthase. Les lipopolysaccharides, les sidérophores et l'acide salicylique des PGPR agissent comme éliciteurs de défense chez les plantes cultivées (Rettinassababady et Jeyalakshmi, 2014).

La résistance peut être induite localement ou systémiquement. La résistance systémique est attribuée à une variété de micro-organismes par exemple, les micro-organismes non pathogènes tels que les saprophytes et les PGPR (Elad et Stewart, 2007).

La stimulation de la résistance systémique des plantes a été démontrée au début avec *Pseudomonas* spp et autres bactéries Gram négatif. La capacité de *Trichoderma* spp à stimuler systémiquement le mécanisme de résistance de la plante contre les pathogènes fongiques tels que *Botrytis cinerea* a été démontrée chez plusieurs familles de plantes dont *Graminaceae*, *Solanaceae* et *Cucurbitaceae*. (Choudhary et Johri, 2009 ; Rettinassababady et Jeyalakshmi, 2014).

### **h. Combinaison de mécanismes**

Dans de nombreux cas, on peut supposer que la lutte biologique est le résultat de plusieurs modes d'action combinés de l'antagoniste et la synergie entre les différentes formes d'antagonisme peut se produire (Elad et Stewart, 2007). Par exemple :

*T. pseudokoningii* et *T. viride* contrôlent la pourriture des fruits par parasitisme direct et production d'antibiotiques. *T. harzianum* T39 exerce son effet antagoniste par combinaison de la compétition nutritive, l'interférence avec la production des enzymes pectolytiques de l'agent pathogène et la stimulation de la résistance de l'hôte.

Les modes d'action des levures antagonistes impliquent la compétition pour les éléments nutritifs et de l'espace, le parasitisme direct et la résistance induite (Elad et Stewart, 2007).

### III.3.1.2. Commercialisation des agents de lutte biologique d'origine microbienne

Plusieurs produits à base des microorganismes ont été sélectionnés pour leur pouvoir antagoniste envers *B. cinerea* (Elad et Stewart, 2007). Quelques exemples de ces biofongicides disponibles sont :

- **Binab (Binab Bio-Innovation AB, Suède)** : produit à base de *T. harzianum* et *T. polysporum*. Il a été utilisé la première fois en France en 1976 sur les plaies des arbres, il est destiné à la lutte contre des maladies fongiques dans les serres (tomates, concombres et plantes ornementales) et *Botrytis* sur fraises (Elad et Stewart, 2007).
- **Mycostop (Kemira Gro Oy, Finlande)** : produit à base de *Streptomyces griseoviridis* (K61), utilisé contre les maladies racinaires et la pourriture des tiges de concombres de serre, tomates, poivrons, laitue et plantes ornementales (Elad et Stewart, 2007).
- **Plantshield (Bioworks Inc, USA)** : produit à base *T. harzianum* (T22) pour le contrôle des maladies racinaires des plantes sous serres. Il a également été démontré qu'il est efficace contre *Botrytis* (Elad et Stewart, 2007).
- **Serenade (Agra Quest, USA)** : à base *B. subtilis* (QST 713), vendu pour lutter contre un grand nombre de maladies fongiques du sol et maladies bactériennes des cultures protégées (Elad et Stewart, 2007 ; Romanazzi et Feliziani, 2014).
- **Trichodex (Makhteshim, Israël)** : à base de *T. harzianum* (T39), vendu pour lutter contre *B. cinerea* sur raisins et différentes cultures sous serre (Elad et Stewart, 2007 ; Romanazzi et Feliziani, 2014).
- **BotryZen (Zen-botry Ltd, Nouvelle-Zélande)** : produit à base d'*Ulocladium oudemansii* appliqué contre *Botrytis* sur raisin (Elad et Stewart, 2007).
- **Aspire (Ecogen, USA)** : produit à base de *Candida oleophila* "I-182" utilisé pour le contrôle post-récolte des agents de la pourriture de fruits y compris *B. cinerea* (Elad et Stewart, 2007).
- **Bio-Save (Eco Science Corp, USA)** : à base de *P. syringae*, utilisé pour le contrôle post-récolte de *B. cinerea* sur fruits (Elad et Stewart, 2007; Romanazzi et Feliziani, 2014).
- **YieldPlus (Lallemand, Montreal, Canada)** : biofongicide à base de *Cryptococcus albidus* (Romanazzi et Feliziani, 2014).
- **Amylo-X, Biogard CBC (Grassobbio, Italie)** : biofongicide à base de *Bacillus amyloliquefaciens* (Romanazzi et Feliziani, 2014).

PARTIE  
PRATIQUE

# MATERIEL ET METHODES

## **Matériel et méthodes**

### **I. Matériel**

#### **I.1. Matériel biologique**

Le matériel biologique est constitué des isolats bactériens utilisés comme antagonistes, des souches fongiques de *B. cinerea* et des plantes de tomate cultivées sous serres.

##### **I.1.1. Matériel fongique**

Dans ce présent travail, deux souches fongiques pathogènes de *Botrytis cinerea* agent de la pourriture grise sont utilisées. Une souche d'origine Algérienne isolée en 2007 de la région de Merdj Ouamen (Bejaia) par l'équipe de recherche de laboratoire de Mycologie, département de microbiologie, université Abderrahmane Mira de Bejaia. Une souche de référence d'origine Française isolée en 1989 par l'équipe de recherche de l'unité de phytopathologie d'INRA Avignon.

Le choix des deux souches est motivé par leur agressivité sur tomate selon des travaux de thèses réalisés au sein de laboratoire de Mycologie (Benfedala, 2012).

##### **I.1.2. Isolats bactériens**

L'étude a débuté avec 132 isolats collectés durant une période allant de Mars à Octobre 2014 dans le cadre des travaux de thèses réalisés au sein du laboratoire de Mycologie. Ces isolats proviennent de deux sites agricoles (Merdj-ouamen et Tichy) et isolés à partir du sol et des tiges de tomates comme il est précisé dans le tableau 5.

Après avoir réalisé une étude *in vitro* sur la totalité des isolats collectés, 30 isolats ont été sélectionnés pour la suite du travail. La sélection s'est faite d'une façon aléatoire en tenant compte de l'activité *in vitro* de chaque isolat envers les deux souches fongiques testées (Annexe V). Nous avons choisi des isolats qui se sont montrés très actifs avec d'autres qui se sont montrés moins actifs ou inactifs.

**Tableau.5.** Origine des isolats

Origine	Endroit d'isolement	Isolats
Tichy	Plaies saines non traitées	CS1, CS2, CS3, CS4, CS5, CS6, CS7, CS8, CS9, CS11, CS14, CS15, CS17
	Plaies badigeonnées	CT2, CT3, CT6, CT7, CT8, CT9, CT10, CT11, CT12, CT14, CT15, CT17, CT20, CT21, CT22
	Sol	T1, T2, T5, T8, T11, T14, T16, T18, T17, T19, T20, T21, T23, T25, T26, T28, T29, T30, T31, T33, T34, T35, T36, T37, T40, T44, T48, T50, T53, T54, T57, T58, T60, T62, T63, T64, T66, T68, T73, T74, T75, T76, T77, T80, T81, T82, T83, T85, T88, T89, T90, T92
Merdj-ouamen	Sol	M1, M3, M4, M5, M6, M7, M8, M9, M12, M13, M14, M17, M18, M19, M21, M22, M24, M25, M27, M28, M31, M32, M36, M41, M42, M43, M44, M46, M53, M54, M55, M56, M57, M58, M61, M62, M64, M65, M66, M68, M73

### I.1.3. Matériel végétal

Pour étudier l'effet antagoniste *in vivo* des différents isolats sélectionnés, une variété de tomate cultivée hybride (*Lycopersicon esculentum* var « GF ») a été utilisée. Les graines de la tomate ont été ensemencées sur des alvéoles puis transférées sur le sol et cultivées sous abri dans une ferme située à Tichy (Figure 8).

Les différences étapes de croissance des plantes ont été suivies de l'ensemencement jusqu'à l'étape de fructification.



**Figure.8.** Ensemencement des graines de la tomate

Après l'apparition des feuilles, des folioles ont été détachées à partir des plantes de tomate âgées de 4 à 5 mois. Elles sont de taille moyenne, saines et ne présentent aucun défaut morphologique, ces dernières seront utilisées pour le test d'antagonisme *in vivo* (Figure 9).



**Figure.9.** Tri et prélèvement des folioles

## **II. Méthodes**

### **II.1. Identification et caractérisation des isolats bactériens**

Pour identifier les isolats bactériens sélectionnés, une caractérisation morphologique (microscopique et macroscopique) et biochimique a été effectuée.

#### **II.1.1. Examen macroscopique**

L'aspect macroscopique (forme, taille, couleur, etc...) des colonies des différents isolats a été étudié à partir des cultures jeunes sur gélose nutritive (Tabak et Bensoltane, 2012).

#### **II.1.2. Examen microscopique**

Après la préparation d'un frottis bactérien à partir des cultures pures des différents isolats, une fixation puis coloration ont été effectuées selon la méthode de Gram (Benson, 2002).

Sont considérés Gram positive, les isolats prenant la couleur violette, les autres isolats perdant leur couleur violette en prenant une couleur rose sont des Gram négative.

#### **II.1.3. Caractérisation biochimique**

La caractérisation biochimique des isolats a été effectuée par l'étude des caractères suivants:

##### **II.1.3.1. La production de catalase**

La plupart des microorganismes aérobies et aérobies facultatifs qui utilisent l'oxygène peuvent produire le peroxyde d'hydrogène qui est toxique pour leur propre système enzymatique. La catalase est une enzyme qui dégrade le peroxyde d'hydrogène, elle est produite par les microorganismes pour protéger leur système enzymatique (Benson, 2002).

Pour mettre en évidence la production de la catalase, quelques gouttes de peroxyde d'hydrogène sont placées sur une lame de microscope stérile, une colonie d'isolat issue d'une culture jeune est diluée sur les gouttes de peroxyde d'hydrogène. La production de la catalase se traduit par effervescence immédiate (Tabak et Bensoltane, 2012).



### **II.1.3.2. La production d'oxydase**

La production de l'oxydase est l'un des caractères les plus importants qui sont utilisés pour identifier et différencier certains groupes bactériens. Par exemple, toutes les *Enterobacteriaceae* sont oxydase négative et la plupart des *Pseudomonas* sont oxydase positive (Benson, 2002).

Pour mettre en évidence la production d'oxydase, un disque d'oxydase imbibé d'eau distillée stérile est placé sur une lame de microscope stérile, une colonie de chaque isolat est prélevée par une pipette Pasteur et écrasée sur le disque. L'apparition d'une coloration violette après quelques minutes indique la production de l'oxydase (Tabak et Bensoltane, 2012).

### **II.1.3.3. Etude de la voie de fermentation du glucose**

La fermentation du glucose se fait par deux voies ; soit par voie des acides mixtes ou par la voie de l'acétoïne.

Le milieu Clark et Lubs permet de mettre en évidence la voie de fermentation du glucose utilisée. Un tube contenant le milieu Clark et Lubs est largementensemencé par l'isolat à identifier, l'incubation se fait à 30°C pendant 24 heures. Après l'incubation, le milieu est divisé en deux parties chacune dans un tube. Le premier tube est additionné de quelques gouttes de réactif VP<sub>1</sub> puis de quelques gouttes de réactif VP<sub>2</sub>. L'apparition d'une couleur rouge (VP<sup>+</sup>) indique que la bactérie utilise la voie d'acétoïne (test positif), alors que l'apparition d'une couleur jaune indique que le test est négatif et la bactérie n'utilise pas la voie d'acétoïne. Le deuxième tube est additionné de quelques gouttes de réactif RM. Si la bactérie utilise la voie des acides mixtes cela se traduit par une couleur rouge (RM<sup>+</sup>). L'apparition de la couleur jaune indique que la bactérie n'utilise pas cette voie de fermentation (Kohlerschmidt *et al*, 2015).

### **II.1.3.4. Mise en évidence de la mobilité**

La mise en évidence de la mobilité bactérienne se fait sur gélose mannitol mobilité, ce milieu mou permet à la fois l'étude de la mobilité bactérienne et la dégradation de mannitol.

Le tube contenant le milieu mannitol mobilité estensemencé par une piqure centrale de l'isolat à identifier. L'incubation se fait 24 heures à 30°C. Une diffusion dans la gélose sous forme des

nuages autour de la pique indique la mobilité de l'isolat. La dégradation de mannitol se traduit par un virage de couleur vers le jaune (Kohlerschmidt *et al*, 2015).

#### **II.1.3.5. Fermentation des sucres**

Le milieu TSI est utilisé pour la mise en évidence de la fermentation des trois sucres, le lactose, le glucose et le saccharose avec production ou non de gaz. Ce milieu permet aussi de mettre en évidence la production de H<sub>2</sub>S qui se traduit par l'apparition d'une couleur noire sur le milieu.

Le culot du milieu est ensemencé par une pique centrale et la pente par une strie médiane. L'incubation se fait à 30°C pendant 24 heures. Le virage de la couleur vers le jaune indique une fermentation du sucre (Tabak et Bensoltane, 2012).

#### **II.1.3.6. Production d'indole**

La production d'indole est mise en évidence en utilisant l'eau peptonée exempte d'indole. Le milieu est inoculé par l'isolat bactérien à étudier et l'incubation se fait à 30°C pendant 24 heures. Après l'incubation, le tube est additionné de deux gouttes de réactif de Kovacs. Une production d'indole se traduit par la formation d'un anneau rouge (Kohlerschmidt *et al*, 2015).

### **II.2. Evaluation de l'effet antagoniste *in vitro* des isolats sur la croissance mycélienne de *B. cinerea***

L'évaluation de l'activité antifongique *in vitro* des isolats sélectionnés envers les deux souches fongiques de *B. cinerea* a été effectuée par deux méthodes :

#### **II.2.1. Par confrontation directe**

L'activité antifongique *in vitro* des différents isolats contre les deux souches ALG66 et BC1 de *B. cinerea* a été effectuée par la méthode de Sagahón *et al* (2011). Un disque de 5 mm de diamètre obtenu d'une culture de 4 jours de *B. cinerea* sur milieu PDA est prélevé à l'aide d'un emporte-pièce et placé sur le centre d'une boîte de Pétri contenant le milieu PDA. Sur la même boîte, 3 disques de l'isolat à étudier obtenus d'une culture de 24 heures sur gélose nutritive sont prélevés et chacun est placé à une distance de 2,5 cm du disque de pathogène (Figure 10). L'incubation se fait à 21°C pendant 4 jours. Une boîte contenant le pathogène seul est préparée, elle est utilisée comme témoin et incubée en même temps avec les autres boîtes.

### II.2.1.1. Effet sur la croissance mycélienne du champignon

L'effet antagoniste *in vitro* des isolats bactériens sur la croissance des deux souches de *B. cinerea* a été déterminé en calculant le pourcentage d'inhibition selon la formule de Whipps (1987) :

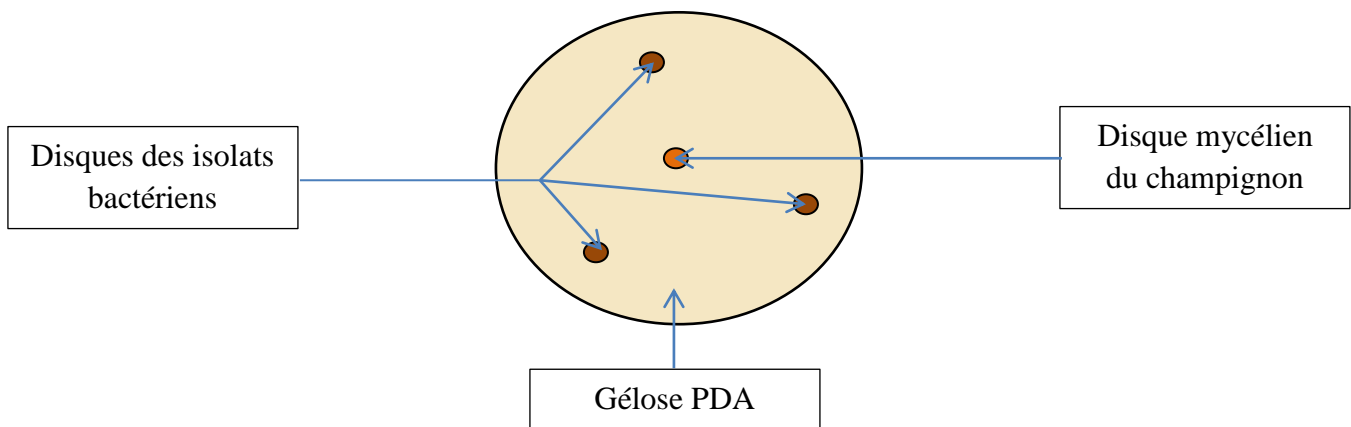
$$\text{PGI (\%)} = \frac{R_1 - R_2}{R_1} \times 100$$

Où :

PGI : Pourcentage d'inhibition.

$R_1$  : Rayon de la croissance mycélienne du pathogène en absence des antagonistes (témoin). La distance est calculée entre le centre du disque de pathogène et le front du mycélium.

$R_2$  : Rayon de la croissance mycélienne du pathogène en présence des antagonistes (distance calculée entre le centre du disque de pathogène et le front du mycélium sur la ligne entre le disque du pathogène et celui de l'antagoniste).



**Figure.10.** méthode de confrontation directe

### II.2.2. Par confrontation indirecte

Cette méthode décrite par Barakat *et al* (2014) est utilisée pour mettre en évidence la production des substances volatiles à effet antagoniste *in vitro* contre les deux souches de *B. cinerea* par les différents isolats.

Les substances volatiles sont des composés organiques de faible poids moléculaire ayant une pression de vapeur appréciable à température ambiante (Made *et al*, 2002).

Un disque de 5 mm de diamètre de chaque souche pathogène a été prélevé à partir d'une culture de 4 jours sur PDA et déposé au centre d'une boîte de Pétri contenant le milieu PDA. Le couvercle de la boîte est enlevé. Dans une autre boîte de Pétri contenant le milieu PDA et à partir d'une culture jeune de 24 heures sur gélose nutritive, l'isolat à tester est ensemencé par stries sur la surface du milieu, le couvercle de la boîte est enlevé et remplacé par le fond de la première boîte contenant le disque du pathogène. Le pathogène doit être placé au-dessus de l'antagoniste. Les deux parties sont collées en utilisant du parafilm (Figure 11). Une boîte contenant du PDA avec le pathogène et sans antagoniste est utilisée comme témoin. L'incubation se fait à 21°C pendant 4 jours.

#### **II.2.2.1. Evaluation de la croissance mycélienne du champignon**

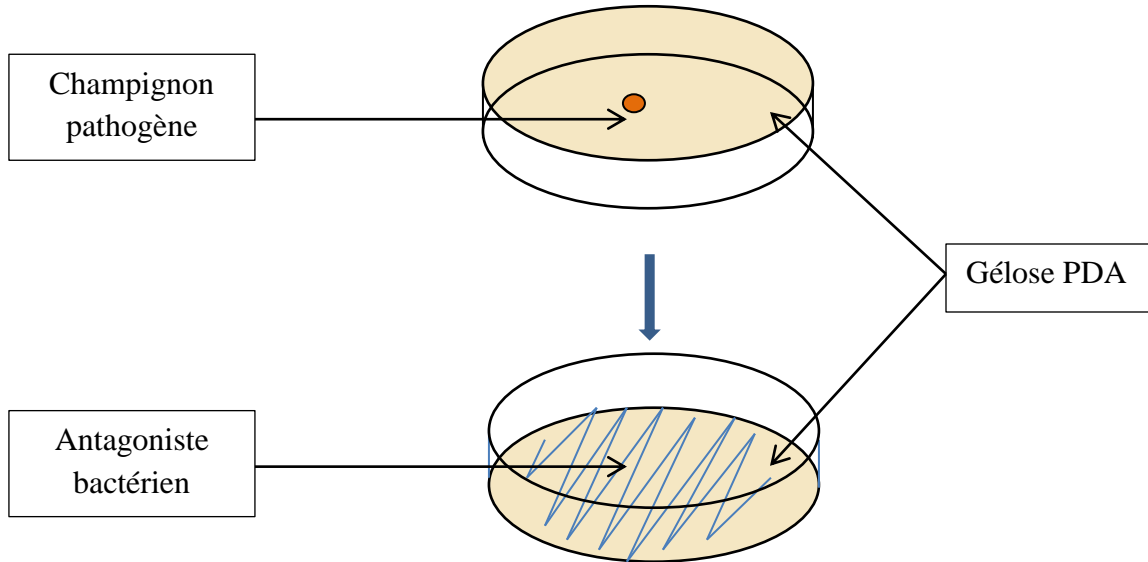
L'effet des substances volatiles sur la croissance mycélienne du pathogène est évalué par le calcul du pourcentage d'inhibition par la formule suivante :  $I (\%) = (C - T / C) \times 100$  (Barakat *et al*, 2014).

Où :

I (%) : Pourcentage d'inhibition

C: diamètre moyen des colonies témoins

T: diamètre moyen des colonies du champignon en présence de l'antagoniste



**Figure.11.** Méthode de confrontation indirecte

### II.3. Evaluation de l'effet antagoniste *in vitro* des isolats sur la germination des spores d'ALG66

Pour évaluer l'effet antagoniste des isolats sur la germination des spores de la souche fongique ALG66 de *B. cinerea* on a procédé à la méthode décrite par Zouaoui *et al* (2008).

1 ml d'eau distillée stérile à 5% du glucose est transmis dans un tube Eppendorf puis additionné de 20µl d'une suspension sporale d'ALG66 à  $10^6$  spore/ml. Autres 20 µl d'une suspension bactérienne de l'antagoniste à  $10^8$  UFC/ml sont additionnés et le mélange est vortexé. Un témoin ne contient que l'eau distillée stérile à 5% de glucose et la suspension sporale du pathogène a été préparé. L'incubation se fait à 21°C pendant 24 heures.

L'évaluation de taux de germination des spores se fait par l'utilisation de la cellule Malassez (Annexe II) en comptant le pourcentage des spores germées après 24 heures d'incubation. La spore est considérée germée lorsque sa taille dépasse le diamètre de la conidie. Le taux de germination est calculé comme suit :

$$\text{Taux de germination (\%)} = \frac{\text{nombre de spores germées}}{\text{nombre total des spores (germées et non germées)}} \times 100$$

## II.4. Etude de quelques activités enzymatiques des isolats

Les enzymes hydrolytiques extracellulaires dont les chitinases, les lipases et les protéases produites par les agents de lutte biologique jouent ont un rôle très important dans l'inhibition de la croissance des champignons phytopathogènes. Ces enzymes peuvent dégrader les constituants de la paroi cellulaire qui est la principale cible des agents de lutte biologique (Islam et Hossain, 2013 ; Tapadar et Jha, 2013). La production des enzymes est l'un des modes d'action les plus courants chez les agents de lutte biologique (Akocak et al, 2015 ; Tommassen et Wösten, 2015). En fait, la capacité d'un agent de lutte biologique à produire des enzymes dégradant la paroi ne garantit pas nécessairement une lutte biologique efficace (Elad et Stewart, 2007).

### II.4.1. Détermination de l'activité chitinolytique

La chitine est un polysaccharide linéaire constitué de plusieurs unités de N-acétylglucosamine liées entre elles par des liaisons osidiques de type  $\beta$ -1,4. C'est la substance azotée la plus abondante dans la nature. Elle confère à la paroi des champignons sa rigidité, ce qui rend sa synthèse la meilleur cible pour contrôler les champignons (Kopečný *et al*, 1996 ; Herrera, 2012).

La dégradation de la chitine est cruciale dans le maintien de la croissance fongique normale (Cohen, 2010; Glick, 2015). Elle joue un rôle très important dans la lutte biologique contre les champignons phytopathogènes (Estrella et Chet, 1999). Les chitinases coupent les liaisons  $\beta$ -1,4-N-acetylglucosamine. La dégradation complète implique une action conjointe de deux enzymes hydrolytiques, une endoenzyme coupant au hasard la chitine en petits oligomères et une exoenzyme hydrolysant des dimères, des oligomères et des polymères terminaux. La double action des enzymes chitinolytiques est synergique (Cohen, 2010).

Pour mettre en évidence l'activité chitinolytique des isolats sélectionnés, un disque de 5 mm de diamètre provenant des cultures jeunes sur gélose nutritive de chaque isolat bactérien a été prélevé et déposé sur des boites de Pétri contenant le milieu à base de chitine (Annexe I). L'incubation se fait à 30°C pendant au moins 7 jours, l'activité chitinolytique se traduit par l'apparition des zones claires autours des disques des colonies des isolats bactériens (Kopečný *et al*, 1996).

#### **II.4.2. Détermination de l'activité lipolytique**

Pour déterminer l'activité lipolytique des isolats on a suivi la méthode de Carrim et *al* (2006).

Un milieu de culture pour déterminer l'activité lipolytique a été préparé (Annexe I) et additionné (après l'autoclavage) d'un volume de 1% (v/v) de Tween 20 préalablement stérilisé.

A l'aide d'un emporte-pièce et à partir des cultures jeunes de chaque isolat, des disques de 5 mm de diamètre sont prélevés et inoculés sur la surface du milieu préparé et préalablement coulé sur des boîtes de Pétri. Les boîtes sont incubées à 30 ° C pendant au moins 96 heures, l'apparition des zones sombres autour des disques indique la présence d'une activité lipolytique.

#### **II.4.3. Détermination de l'activité protéolytique**

L'activité protéolytique des isolats sélectionnés a été déterminée en utilisant la méthode de diffusion sur gélose de CD (Caséine Digest) modifiée (Christen et Marshall, 1984). Le milieu est additionné de 1% (v/p) de l'agar, puis après autoclavage, 5% (v/v) du lait écrémé sont additionnés.

Le milieu est coulé sur des boîtes de Pétri et après solidification, des disques issus des cultures jeunes de chaque isolat ont été prélevés et placés sur la surface de la gélose. L'incubation se fait à 30°C pendant au moins 24 heures. La formation d'un halo autour des disques des isolats indique la présence d'une activité protéolytique.

### **II.5. Evaluation de l'effet antagoniste *in vivo* des isolats sur ALG66**

Dans le but d'évaluer l'effet antagoniste *in vivo* des différents isolats bactériens sur la croissance mycélienne de la souche ALG66 sur folioles de tomate, un protocole fourni par l'unité de phytopathologie d'INRA Avignon a été utilisé :

#### **II.5.1. Repiquage de la souche pathogène**

La souche ALG66 de *B. cinerea* a été repiquée sur milieu PDA et incubées à 21°C pour avoir des cultures jeunes de 3 à 4 jours.

### II.5.2. Préparation des suspensions bactériennes

Des suspensions bactériennes de  $10^8$  UFC/ml des isolats sélectionnés ont été préparées à partir du milieu solide (GN) en ensemencant chaque isolat sur bouillon nutritif. L'incubation se fait à  $30^{\circ}\text{C}$  pendant 24 heures.

### II.5.3. Préparation des boîtes et inoculation des folioles

Des boîtes transparentes en plastique (22 cm x 15 cm) ont été utilisées, le fond de chaque boîte est couvert par un papier absorbant humidifié. Des folioles de tomate (4 folioles par boîte) de taille moyenne issues des plantes saines et âgées de 4 à 5 mois sont prélevées et placées sur le papier absorbant (Figure 12).

Les folioles sont pulvérisées par les suspensions bactériennes préparées à partir des isolats, et après que les folioles soient bien séchées, des disques mycéliens de 5 mm de diamètre sont prélevés à partir des cultures jeunes de la souche ALG66 du champignon et déposés au centre de chaque foliole. Les témoins sont seulement inoculés par le champignon. L'incubation se fait à température ambiante du laboratoire pendant 4 jours (Figure 12).



**Figure.12.** Préparation des boîtes et inoculation des folioles



#### II.5.4. Evaluation de l'effet antagoniste

Pour évaluer l'effet antagoniste *in vivo* des différents isolats sur la souche ALG66 de *B. cinerea*, des photos des boîtes sont quotidiennement prises et les surfaces de lésions causées par le champignon sur les folioles en absence et en présence de l'antagoniste sont mesurées en utilisant le logiciel ASSESS 2.0 (APS Press, St Paul, Minnesota) après calibration (Annexe IV). Les surfaces de lésion sur les folioles en présence des antagonistes sont comparées à celles en absence des antagonistes (témoins).

Le pourcentage d'inhibition exercé par les isolats contre la souche ALG66 sur folioles est calculé par la formule suivante :

$$PGI (\%) = \frac{\text{Surface de lésion du témoin} - \text{surface de lésion en présence de l'antagoniste}}{\text{Surface de lésion du témoin}} \times 100$$

#### II.6. Analyse statistique

Pour effectuer des analyses statistiques, le logiciel XLSTAT 2009 a été utilisé.

Pour analyser les résultats obtenus concernant les tests d'antagonisme *in vitro*, le test ANOVA (Analyse de Variance) à un seul facteur associé du test SNK (Student Newman Keuls) avec un facteur de risque égal à 5% a été utilisé.

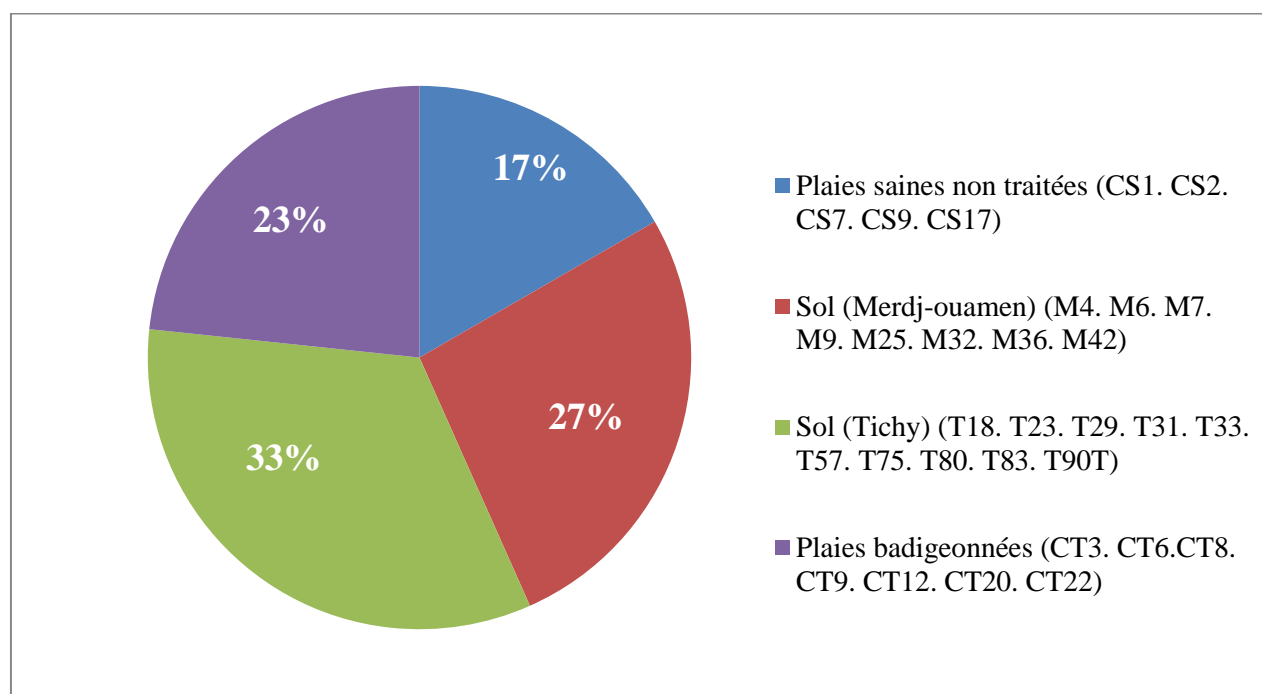
Le test ANOVA associé du test de comparaison de Dunnett a été utilisé pour analyser les résultats de l'antagonisme *in vitro* sur la germination des spores et celui *in vivo* sur le développement de la maladie sur folioles.

# RESULTATS ET DISCUSSIONS

## Résultats et discussions

### I. Identification et caractérisation des isolats sélectionnés

Après avoir étudié leur activité antagoniste contre les deux souches fongiques de *B. cinerea*, 30 isolats parmi les 132 isolats étudiés sont sélectionnés (Annexe V), la répartition des isolats sélectionnés selon leur origine est montrée par la figure 13. Une identification et caractérisation des 30 isolats sélectionnés a été effectuée.



**Figure.13.** Répartition des isolats sélectionnés selon leur origine

#### I.1. Les caractères morphologiques

Les caractères morphologiques microscopiques et macroscopiques des isolats bactériens ont été étudiés après 24 heures de culture sur gélose nutritive. Le tableau 6 regroupe les résultats de la caractérisation morphologique des 30 isolats bactériens sélectionnés :

Nous pouvons constater que la plupart des isolats bactériens sont des Gram positif, des Bacilles de taille variable avec capacité à former des spores.

**Tableau.6.** Les caractères morphologiques des 30 isolats bactériens sélectionnés

Isolat	Gram	Aspect de colonies	Forme	Spores	Isolat	Gram	Aspect de colonies	Forme	Spores
CS1	+	Petite, ronde, jaune et lisse	Cocci	-	M9	+	Blanche, rugueuse et irrégulière	Bacille	+
CS2	+	Blanche, rugueuse et irrégulière	Grands Bacille	+	M25	+	Blanche, rugueuse et irrégulière	Bacille	+
CS7	+	Petite, ronde, orange et lisse	Micro cocci	-	M32	-	Ronde, bombée et opaque	Bacille	-
CS9	+	Blanche, rugueuse et irrégulières	Bacille	+	M36	+	rhizoïde, adhérente, poilue	Bacille	+
CS17	+	Petite, beige, lisse et régulière	Cocci	-	M42	+	Ronde, petite, lisse et plate	Petite Bacille	+
CT3	-	verdâtre, large, bombée avec pigmentation verte sur GN	Petit Bacille	-	T18	+	Blanche, opaque et irrégulière	Grands Bacille	+
CT6	-	Mate, légèrement bombée, irrégulière	Bacille	-	T23	+	Blanche, opaque et irrégulière	Bacille	+
CT8	-	Muqueuse, opaque et régulière	Petit Bacille	-	T29	+	Blanche, opaque et irrégulière	Bacille	+
CT9	+	Ronde, jaune, régulière et lisse	Bacille	+	T31	+	Translucide, brillante et lisse	micrococci	-
CT12	+	Ronde, blanche, plate et opaque	Bacille	+	T33	-	Translucide, brillante et lisse	coccobacille	-
CT20	-	Petite, translucide et lisse	Petit Bacille	-	T57	+	petite, crème, irrégulière	Bacille	+
CT22	+	Blanche, opaque et lisse	micrococci	-	T75	+	beige, lisse, régulière légèrement bombée	Bacille	+
M4	-	Régulière, ronde et lisse	coccobacille	-	T80	-	bombée, jaune et régulière	Petit Bacille	-
M6	-	Ronde, translucide, lisse et régulière	coccobacille	-	T83	-	Jaunes, brillantes et lisse	Bacille	-
M7	-	Brillante et lisse	coccobacille	-	T90	+	Blanche et irrégulières	Bacille	+

## I.2. Les caractères biochimiques

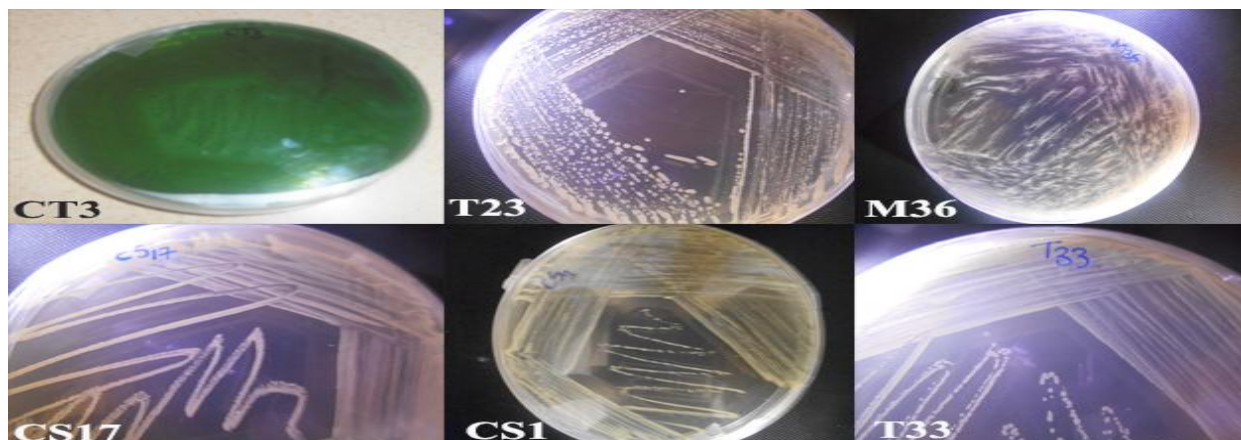
Concernant les caractères biochimiques des 30 isolats bactériens sélectionnés, les résultats obtenus sont représentés dans le tableau 7.

**Tableau.7.** Les caractères biochimiques des 30 isolats bactériens sélectionnés

Isolat	Mob	Cat	Oxy	Ind	VP	RM	Man	Glu	Lac	H <sub>2</sub> S	Sac	Gaz
CS1	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
CS2	+	-	+	-	-	+	-	+	+	-	-	+
CS7	+	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-	+
CS9	+	-	+	-	-	+	-	+	+	-	-	+
CS17	-	+	-	-	-	+	+	+	+	-	-	+
CT3	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-
CT6	+	+	+	-	-	+	-	+	+	-	-	+
CT8	+	+	+	-	-	-	-	+	+	-	-	+
CT9	+	+	+	-	-	-	-	+	-	-	-	-
CT12	+	+	+	-	-	+	+	+	-	-	-	-
CT20	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	+
CT22	-	+	-	-	+	-	+	+	+	-	-	-
M4	-	+	-	-	-	+	+	+	+	-	+	+
M6	+	+	-	-	-	+	+	+	-	-	+	+
M7	-	+	-	-	-	+	+	+	+	-	+	+
M9	-	+	+	-	-	+	+	+	-	-	-	-
M25	-	+	+	-	-	+	-	+	-	-	-	-
M32	+	+	+	-	-	+	-	-	-	-	-	-
M36	+	-	-	-	-	+	-	+	+	-	-	+
M42	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-	-
T18	+	-	-	-	-	-	+	+	+	-	-	-
T23	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
T29	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-
T31	+	+	-	-	+	-	+	+	+	-	+	+
T33	-	+	+	-	+	-	+	+	+	-	-	+
T57	-	-	+	-	-	-	+	-	-	-	-	-
T75	+	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-
T80	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-
T83	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-
T90	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-

Où : **Cat** : Catalase. **Glu**: Glucose. **Ind**: Indole. **Lac**: Lactose. **Man**: Mannitol. **Mob** : Mobilité.

**Ox** : Oxydase. **Sac** : Saccharose.



**Figure.14.** Aspect cultural de quelques isolats

En utilisant *Bergey's manual* (2005 et 2009) et en se basant sur les résultats présentés dans les tableaux 6 et 7 qui résumant les différents caractères biochimiques et culturels des isolats sélectionnés, une identification générale a été effectuée.

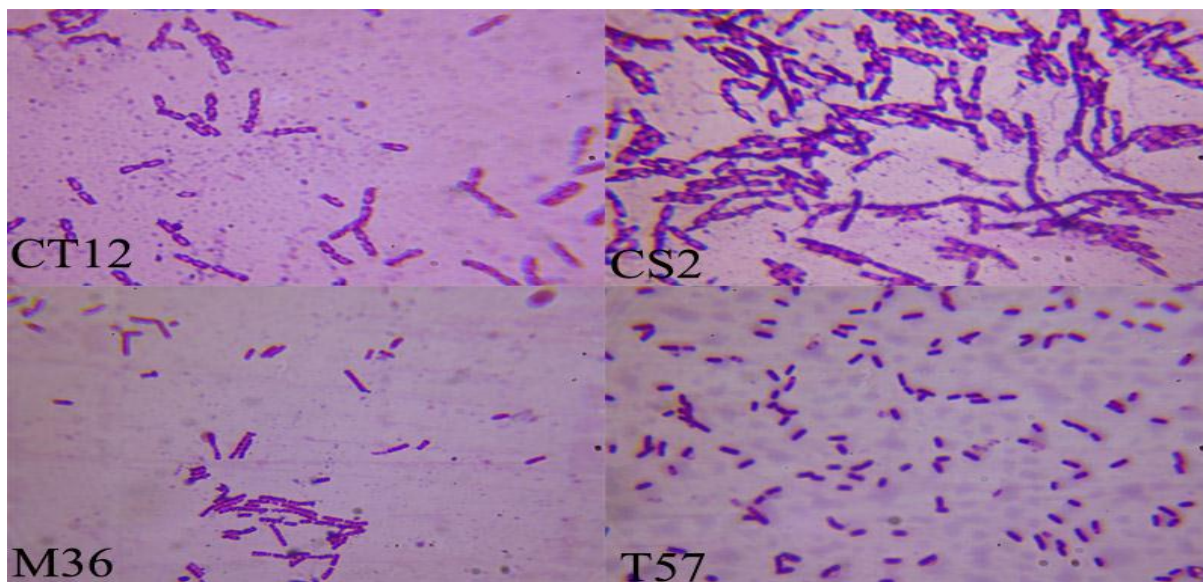
Les isolats CS2, CS9, CT9, CT12, M9, M25, M36, M42, T18, T23, T29, T57, T75 et T90 sont des Bacilles de taille variée à Gram Positive (Figure 15), capables de former des spores, oxydase et catalase produites par la plupart des isolats. Ces isolats appartiennent au genre *Bacillus* (Logan et De Vos, 2009).

Il faut noter que les colonies de l'isolat M36 sont de forme rhizoïde, adhérentes et poilues et peuvent facilement couvrir toute la surface de la gélose (Figure 14), selon Logan et De Vos (2009) cet isolat est un *Bacillus mycoides*.

Les isolats : CS1, CS17, CT22 et T31 sont des Cocci à Gram positive, catalase positive, oxydase négative, immobiles et non sporulés, selon Schleifer et Bell (2009) ces isolats sont des *Staphylococcus*.

Les isolats : CT3, CT6, CT8, CT20, M32, T80 et T83 sont des Bacilles à Gram négative, non sporulés, la plupart sont mobiles, oxydase positive et catalase varié, selon Garrity *et al* (2005) ces isolats sont affiliés au genre *Pseudomonas*.

L'isolat CT3 est capable de produire un pigment vert sur gélose nutritive, c'est l'un des caractères de *Pseudomonas fluorescens* (Garrity *et al*, 2005).



**Figure.15.** Quelques isolats appartenant au genre *Bacillus* sous microscope optique (X100) après coloration de Gram

Les isolats : M4, M6 et M7 sont des coccobacilles à Gram négative, catalase positive et oxydase négative, ils sont affiliés à la famille des *Enterobacteriaceas* (Brenner et Farmer, 2005).

Pour les isolats : CS7, T33, les informations obtenues sont insuffisantes pour pouvoir les identifier.

La plupart des isolats étudiés appartiennent aux genres *Bacillus* et *Pseudomonas* (Tableau 8). Les espèces du genre *Bacillus* sont les plus utilisées pour lutter contre plusieurs maladies fongiques des plantes (Borriss, 2015). Les espèces du genre *Pseudomonas* ont été étudiées pendant des décennies comme microorganismes modèles pour le contrôle biologique des maladies des plantes (Stockwell et Stack, 2007).

Parmi les 14 isolats appartenant au genre *Bacillus* nous pouvons constater que 6 isolats sont issus du sol agricole de Tichey (T18, T23, T29, T57, T75, T90), 4 isolats du sol agricole de Merdjouamen et 2 autres isolats (CT12 et CT9) sont issus des plaies de plantes badigeonnées par le sol (Tichey). Tous les isolats du genre *Pseudomonas* sont issus du sol de site de Tichey ou des plaies traitées par le sol du même site.

En fait, les espèces des genres *Bacillus* et *Pseudomonas* sont très répandues dans le sol dont plusieurs entre elles appartiennent au groupe des PGPR. *Pseudomonades fluorescens* et autres

espèces de *Bacillus* ont été rapportés pour leur capacité à coloniser les racines et la production de métabolites aidant la croissance des plantes (Bhattacharyya et Jha, 2012).

**Tableau.8.** Résultats de l'identification biochimique des 30 isolats sélectionnés

Isolats	Famille ou genre
CS2, CS9, CT9, CT12, M9, M25, M36, M42, T18, T23, T29, T57, T75, T90	<i>Bacillus</i>
CT3, CT6, CT8, CT20, M32, T80, T83	<i>Pseudomonas</i>
CS1, CS17, CT22, T31	<i>Staphylococcus</i>
M4, M6, M7	<i>Enterobacteriaceae</i>
CS7, T33	Non déterminés

Ces résultats doivent être complétés par d'autres tests biochimiques en utilisant des galeries API ou des analyses de biologie moléculaire pour pouvoir identifier les espèces.

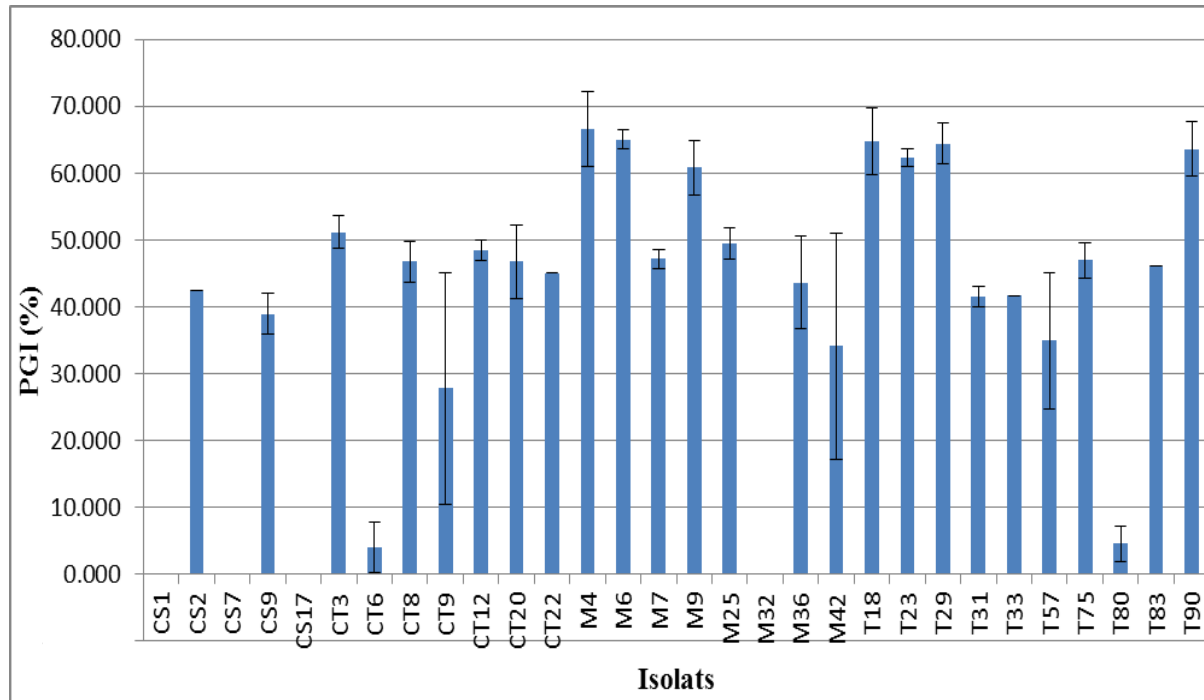
## II. Evaluation de l'effet antagoniste *in vitro* des isolats sur la croissance mycélienne de *B. cinerea*

### II.1. Par confrontation directe

#### II.1.1. Sur ALG 66

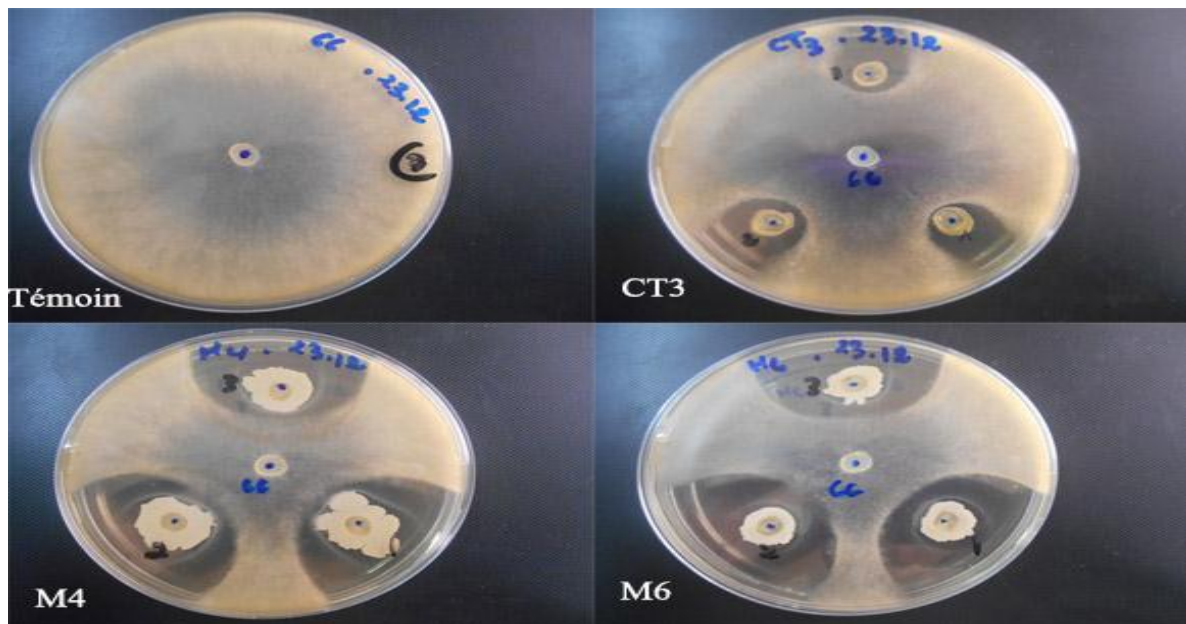
Le test d'antagonisme *in vitro* des différents isolats contre la souche ALG66 de *B. cinerea* a permis d'évaluer le pourcentage d'inhibition de chaque isolat envers la souche pathogène. Les PGI ont été calculés après 4 jours d'incubation sur milieu PDA à une température de 21°C. La figure 16 représente les pourcentages d'inhibition des différents isolats sur la croissance mycélienne d'ALG66.





**Figure.16.** Effet antagoniste *in vitro* des isolats sur la croissance mycélienne d'ALG66

L'analyse statistique des résultats représentés par la figure 16 révèle une différence significative ( $P < 0,0001$ ) entre les PGI de chaque isolat envers la souche ALG66 de *B. cinerea* (Tableau 9).



**Figure.17.** Effet antagoniste *in vitro* de quelques isolats montrés actifs contre ALG66

**Tableau.9.** Analyse de variance de l'antagonisme *in vitro* contre ALG66

Source	DDL	Somme des carrés	Moyenne des carrés	F	Pr > F
Modèle	29	41263,366	1422,875	45,561	< 0,0001
Erreur	60	1873,819	31,230		
Total corrigé	89	43137,185			

Les isolats : M4, M6, T18, T29, T90, T23, M9 et CT3 sont les plus actifs sur ALG66 avec des pourcentages d'inhibition supérieurs à 50% (entre 66,66% et 51,18% ).

Les isolats : CS2, CS9, CT8, CT9, CT12, CT20, CT22, M7, M25, M36, M42, T31, T33, T57, T75 et T83 présentent un effet antagoniste moyen à relativement faible allant de 27,77% à 49,51%.

Les autres isolats (CS1, CS7, CS17, CT6, M32 et T80) ne présentent aucun effet antagoniste contre la souche ALG66 de *B. cinerea* (entre 0% et 4,6%).

### II.1.2. Sur BC1

La figure 18 montre les résultats de l'activité antagoniste *in vitro* des 30 isolats testés sur la souche fongique BC1 de *B. cinerea*.

L'effet antagoniste *in vitro* des différents isolats contre la souche BC1 de *B. cinerea* montre une différence significative ( $P < 0,0001$ ) (Tableau 10).

**Tableau.10.** Analyse de variance de l'antagonisme *in vitro* contre BC1

Source	DDL	Somme des carrés	Moyenne des carrés	F	Pr > F
Modèle	29	34937,830	1204,753	36,349	< 0,0001
Erreur	60	1988,631	33,144		
Total corrigé	89	36926,461			

Les isolats : CT3, CT6, CT9, M4, M6, M9, T18, T23, T29 et T90 sont les plus actifs et représentent un pourcentage d'inhibition élevé et compris entre 50,79% et 68,52%.

Les isolats : CS9, CT8, CT12, CT20, CT22, M7, M25, M36, M42, T31, T33, T57, T83 et T75 exercent un pourcentage d'inhibition moyen à relativement faible entre 20,71% et 49, 23%.

Les isolats : T80, CS7, CS2, CS1, M32 et CS17 exercent un très faible effet inhibiteur (vers négligeable) avec des pourcentages d'inhibition compris entre 0% et 17,88%.

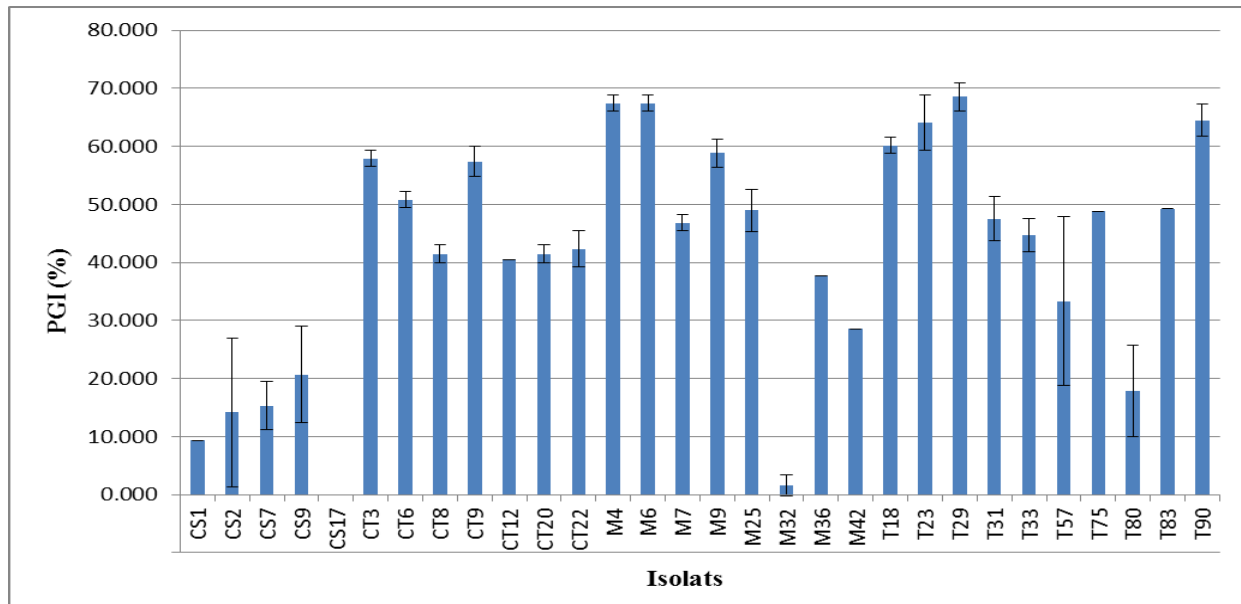


Figure.18. Effet antagoniste *in vitro* des isolats sur la croissance mycélienne de BC1

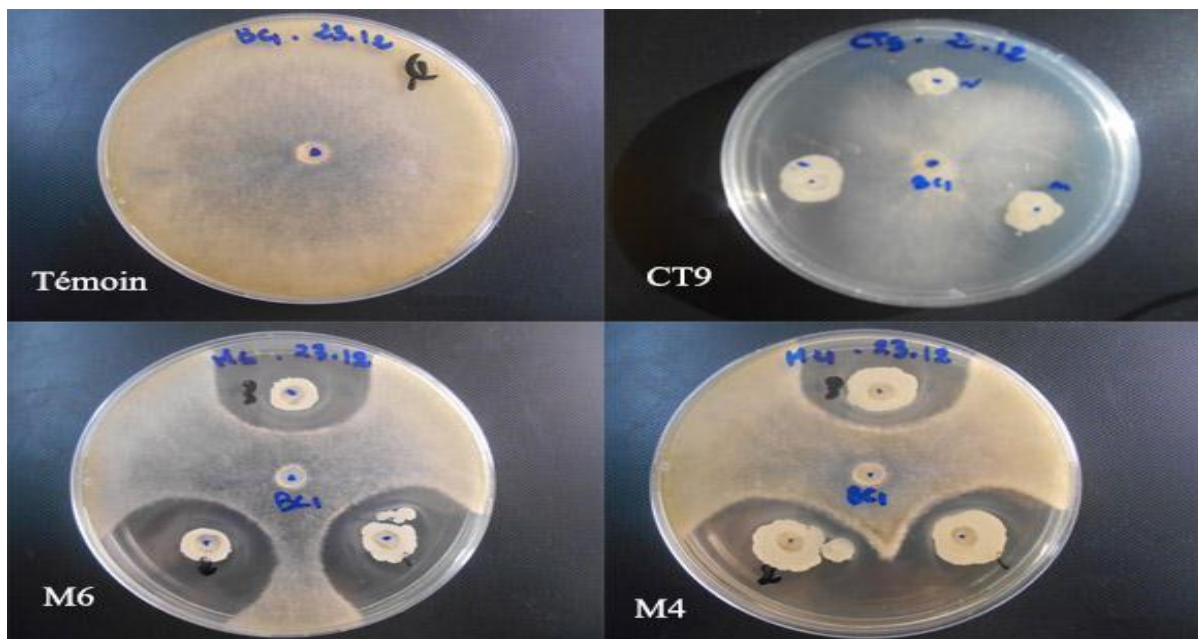
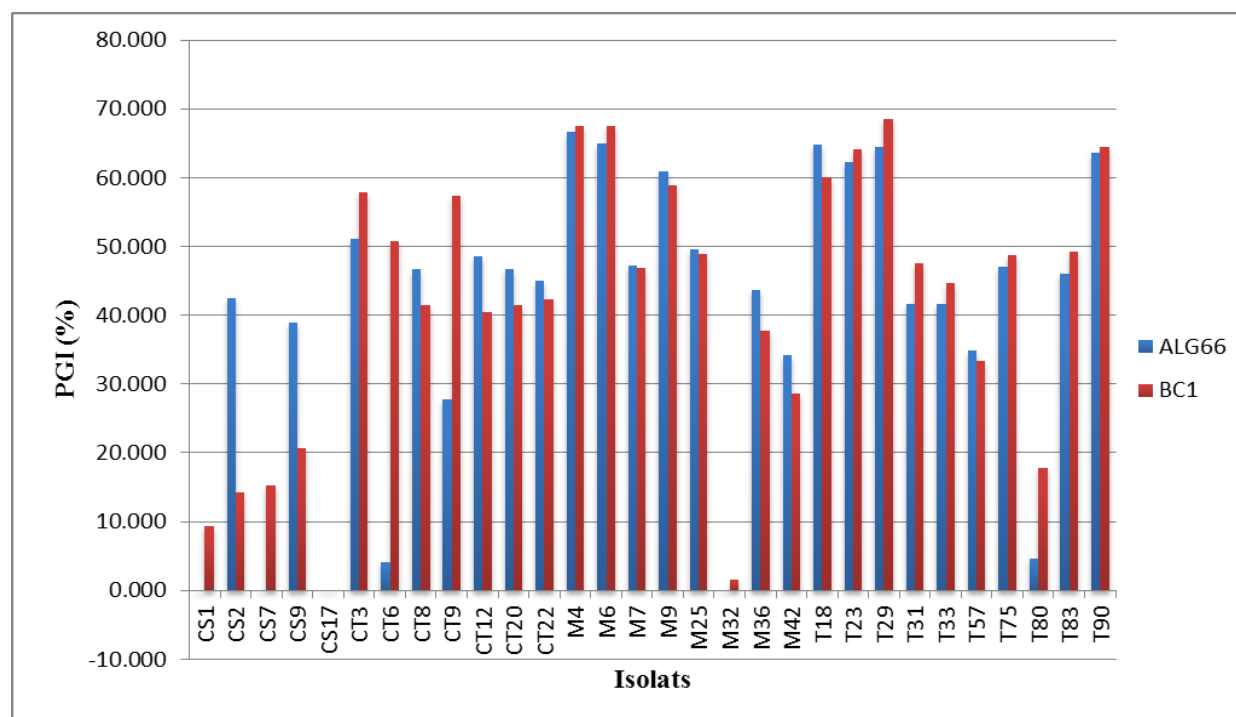


Figure.19. Effet antagoniste *in vitro* de quelques isolats montrés actifs contre BC1

### II.1.3. Comparaison entre ALG66 et BC1

La figure 20 représente l'effet antagoniste *in vitro* de chaque isolat contre les deux souches fongiques ALG66 et BC1 en même temps. Elle permet de comparer entre la sensibilité des deux souches fongiques envers le même isolat.



**Figure.20.** L'effet antagoniste *in vitro* de chaque isolat contre les deux souches fongiques

L'analyse ANOVA à deux facteurs associé au test SNK a révélé une différence non significative ( $P = 0,139$ ) entre l'effet antagoniste *in vitro* de chaque isolat contre les deux souches fongiques (Tableau 11).

**Tableau.11.** Analyse de variance de la comparaison entre ALG66 et BC1

Contraste	Différence	Différence standardisée	Valeur critique	Pr > Diff	Significatif
BC1 vs ALG66	1,929	1,489	1,976	0,139	Non

La figure 20 a permis d'obtenir les informations suivantes :

À l'exception des isolats: CS1, CS2, CS7, CS9, CT6, CT9 et T80 qui ont présenté une grande différence entre leur activité antagoniste contre BC1 et celle contre ALG66, les autres isolats ont

exercé un effet antagoniste du même ordre contre les deux souches fongiques avec une légère différence.

Les isolats : CT3, M4, M6, M9, T18, T23, T29 et T90 sont les plus actifs sur les deux souches fongiques avec des pourcentages d'inhibition très proches et supérieurs à 50%.

Les isolats : CT8, CT12, CT20, CT22, M7, M25, M36, M42, T31, T33, T57, T75 et T83 exercent un faible à moyen effet antagoniste compris entre 28,57% et 49,51%.

Les isolats : CS17 et M32 ne présentent aucun effet antagoniste contre les deux souches fongiques.

Certains isolats ont révélé une différence entre leur effet antagoniste sur ALG66 et celui contre BC1 : CS2 et CS9 sont plus actifs sur la souche ALG66 que sur BC1 avec un pourcentage d'inhibition égal à 42,40% (ALG66) et 14,18% (BC1) pour CS2 et 38,91 % (ALG66) et 20,71% (BC1) pour CS9.

Contrairement aux isolats CS2 et CS9, l'isolat CT6 est plus actif sur BC1 (50,79%  $\pm$  1,37%) que sur ALG66 (4,06 %), c'est la même chose pour l'isolat CT9 qui est très actif sur BC1 (57,42%) et peu actif sur ALG 66 (27,77%).

Les isolats CS1, CS7 et T80 sont actifs sur BC1 et inactifs sur ALG66.

Les isolats les plus actifs sur les deux souches fongiques en même temps (M4, M6, M9, T18, T23, T29, T90 et CT3) sont issus du sol de deux régions différentes (sauf CT3) et à l'exception des isolats M4, M6 et CT3, tous les autres isolats ayant présenté un pourcentage d'inhibition supérieur à 50% à l'égard des deux souches fongiques appartiennent au genre *Bacillus*. En fait la capacité de ces isolats à inhiber la croissance mycélienne de *B. cinerea* sur boîtes peut être due à leur capacité à produire des substances antifongiques.

A l'heure actuelle, les espèces du genre *Bacillus* sont les plus utilisées comme agents de lutte biologique. Cela est principalement dû à leur capacité à former des endospores très résistantes, ce qui permet de produire des préparations très stables pendant des longues durées de conservation (Borriss, 2015).

Selon Sherwani et Khan (2015), les bactéries appartenant au genre *Bacillus* peuvent produire une large gamme de molécules actives qui inhibent la croissance des agents pathogènes des plantes. Dans le cas de *B. subtilis*, 5,4% de son génome est responsable de la synthèse d'antibiotiques et peut produire environ 25 différents types de molécules. Les bactéries telles que *Bacillus subtilis*, *Bacillus licheniformis*, *Bacillus cereus*, *Bacillus mycoides* et *Bacillus amyloliquefaciens* sont connues pour leur capacité à produire des lipopeptides antifongiques dans leur environnement naturel tels que : la Fengycine, la Surfactine, l'Iturine, et la Bacillomycine, ces derniers attaquent la paroi fongique en formant des pores sur les membranes fongiques.

D'autres espèces de *Bacillus* peuvent aussi produire d'autres antibiotiques tels que la Zwittermicine A et la Kanosamine (Hang *et al*, 2005).

Plusieurs travaux sur des espèces de *Bacillus* ont révélé le pouvoir de ces dernières à contrôler le champignon phytopathogène *B. cinerea* sur boites :

Dans leurs études sur l'effet antagoniste *in vitro* d'une souche (W4) de *Brevibacillus brevis* contre *Botrytis cinerea*, Yang *et al* (2011) ont trouvé que cette souche peut inhiber la croissance mycélienne de *B. cinerea* avec un pourcentage d'inhibition égal à 78%.

La souche S1-0210 de *Bacillus subtilis* a exercé un pouvoir inhibiteur contre la croissance mycélienne de *B. cinerea* avec un PGI supérieur à 60% (Hang *et al*, 2005). Alors qu'une autre souche (EB-28) a pu inhiber 71,05% de la croissance mycélienne de *B. cinerea* (Wang *et al*, 2009).

Des souches de *B. amyloliquefaciens* ont significativement inhibé la croissance mycélienne de *B. cinerea* avec un pourcentage d'inhibition supérieur à 70% (Shternshis *et al*, 2015).

*Pseudomonas* est un autre genre montré très actif sur plusieurs champignons phytopathogènes. Ce genre comprenant plus d'une centaine d'espèces est caractérisé par sa grande capacité à produire des métabolites secondaires à pouvoir antifongique (Blanco, 2015 ; Sherwani et Khan, 2015).

L'activité antagoniste des *Pseudomonas* tels que *P. syringae* et *P. fluorescens* contre plusieurs maladies des plantes est généralement due à la production de métabolites antifongiques. Par exemple, plusieurs souches de *P. fluorescens* peuvent produire la Pyrrolnitrine, un métabolite

secondaire dérivé de tryptophane qui a une forte activité antifongique. Elles peuvent aussi produire le 2,4-diacétylphloroglucinol qui joue un rôle majeur dans la lutte biologique contre les maladies fongiques des plantes (Mikani *et al*, 2008).

Mikani *et al* (2008) ont pu inhiber la croissance mycélienne *in vitro* de *Botrytis* par l'utilisation de *P. fluorescens* avec un pourcentage d'inhibition égal à 59,8% et 61,8% pour deux souches de *Botrytis*.

## II.2. Par confrontation indirecte

### II.2.1. Sur ALG66

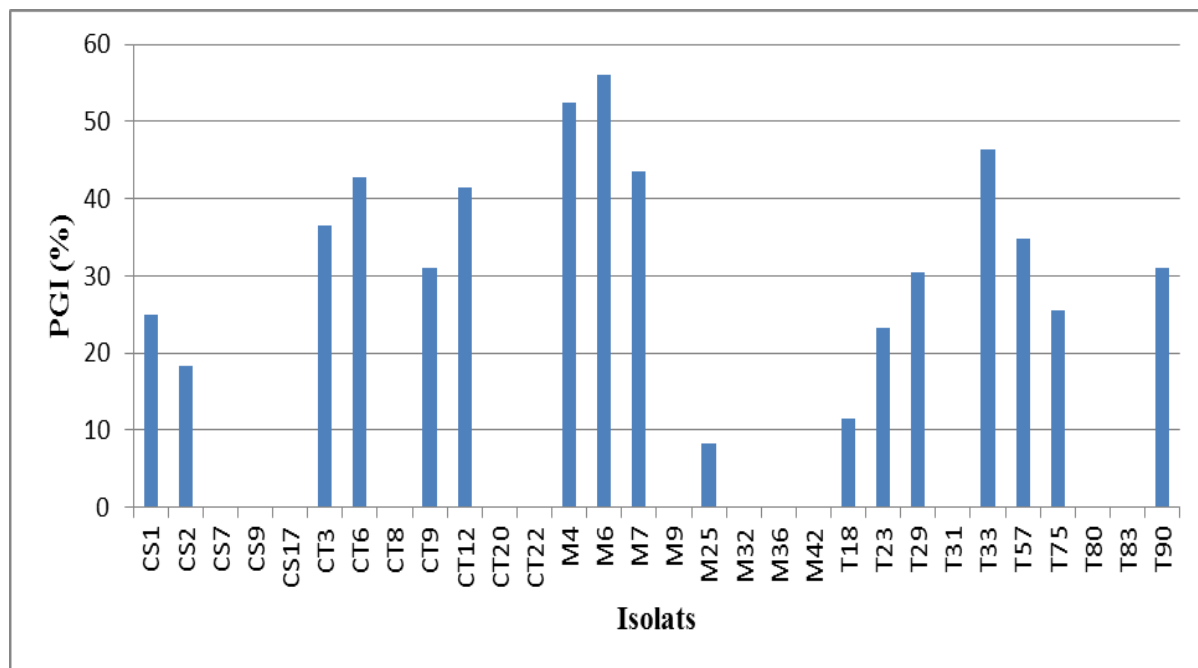
Les résultats obtenus concernant l'effet antagoniste *in vitro* des substances volatiles des différents isolats sur la souche fongique ALG66 ont montré que parmi les 30 isolats testés, seuls 17 isolats ont pu inhiber la croissance mycélienne du pathogène. Cette inhibition diffère d'un isolat à l'autre.

Les isolats : M4, M6, CT6, CT12, M7 et T33 sont les plus actifs avec des pourcentages d'inhibition supérieurs à 40%, cette activité peut être due à la production des substances volatiles antifongiques.

Les isolats : CS1, CS2, CT3, CT9, M25, T18, T23, T29, T57, T75 et T90 produisent des substances volatiles à effet antagoniste moyen (vers faible).

Les isolats : CS7, CS9, CS17, CT8, CT20, CT22, M9, M32, M36, M42, T31, T80 et T83 n'ont aucun effet sur la croissance mycélienne de la souche ALG66, cela indique que ces isolats sont probablement incapables de produire des substances volatiles à pouvoir antifongique.

Les isolats qui se sont montrés très actifs et capables de produire des substances volatiles antifongiques sont issus du sol de deux sites différents (M4, M6, M7 et T33) ou des plaies traitées par le sol (CT6 et CT12) et cela montre que les bactéries du sol sont probablement les plus capables à produire des substances volatiles antifongiques contre ALG66.



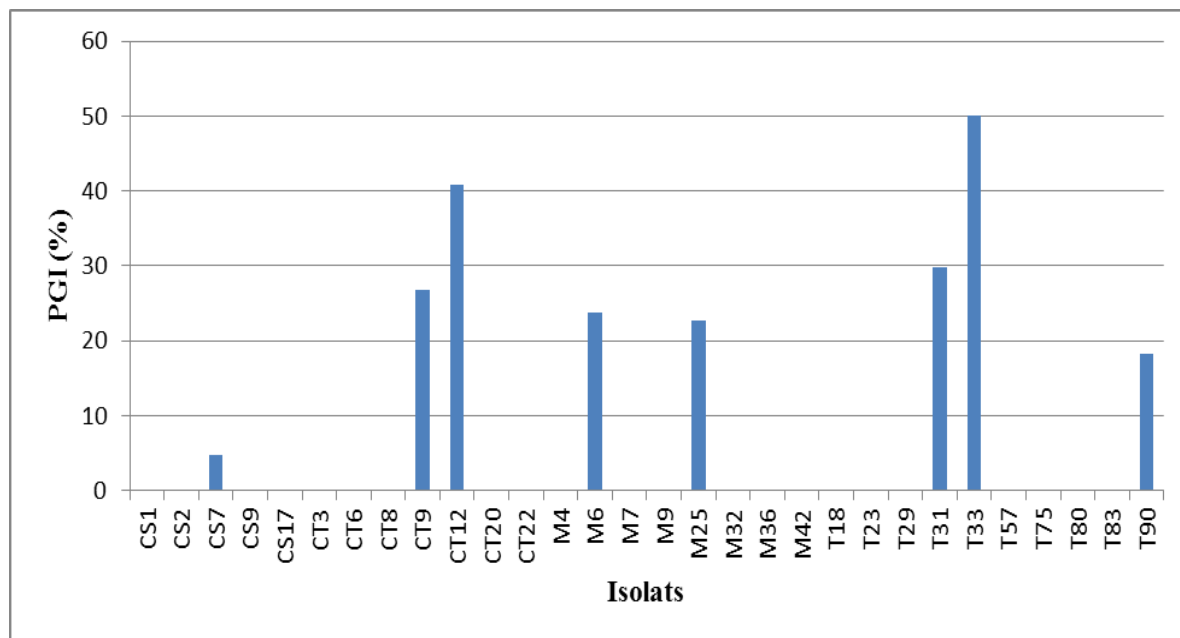
**Figure.21.** Effet des substances volatiles sur la croissance mycélienne d’ALG66

### II.2.2. Sur BC1

Selon la figure 22, seuls 8 isolats (CS7, CT9, CT12, M6, M25, T31, T33 et T90) parmi les 30 isolats testés ont montré un effet antagoniste contre la souche fongique BC1 (CS7 est révélé moins actif). Et parmi ces 8 isolats, T33 et CT12 sont les plus actifs avec un pourcentage d’inhibition égal à 50% et 40,85% respectivement. Tous ces isolats (à l’exception de CS7) sont issus du sol de deux sites différents ou des plaies badigeonnées par le sol ce qui confirme que les bactéries du sol sont les plus capables à produire des substances volatiles antifongiques contre BC1.

Les autres 22 isolats n’ont aucun effet inhibiteur sur la croissance mycélienne de la souche BC1 et cela montre qu’ils sont incapables de produire des substances volatiles à pouvoir antifongique contre BC1.





**Figure.22.** Effet des substances volatiles sur la croissance mycélienne de BC1

### II.2.3. Comparaison entre ALG66 et BC1

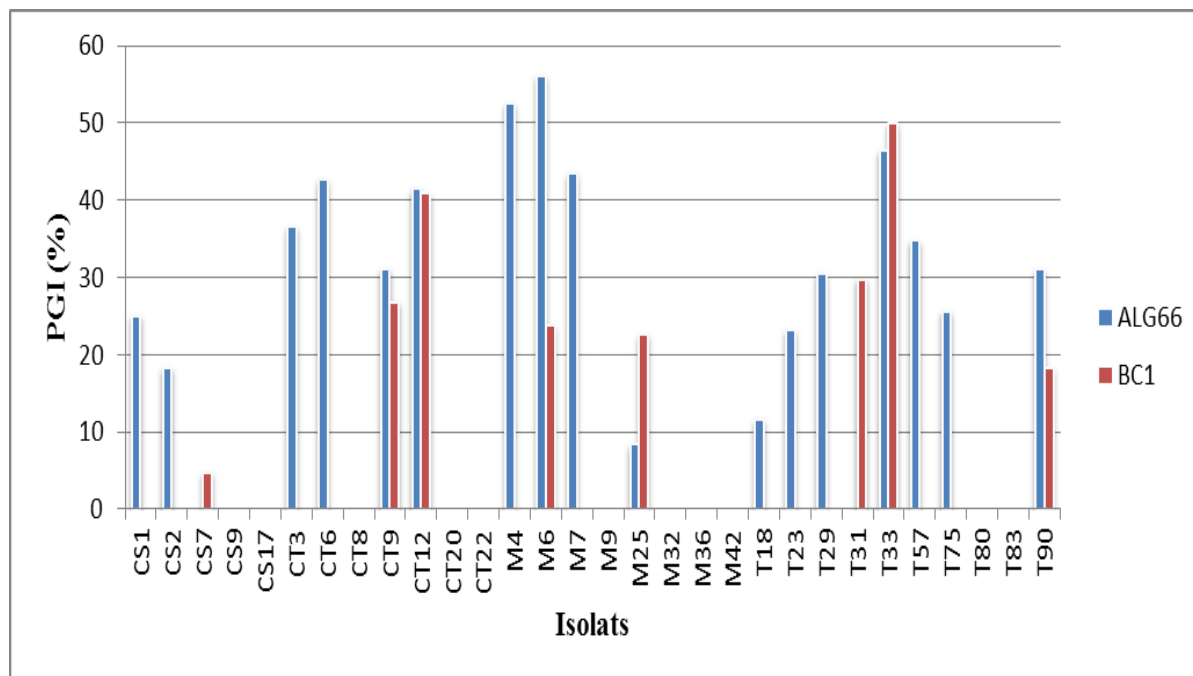
La comparaison entre l'effet antagoniste *in vitro* des substances volatiles de chaque isolat contre les deux souches fongiques est représentée par la figure 23.

La figure 23 montre que :

Les isolats ayant un effet antagoniste sur les deux souches fongiques sont : T90, M25, M6, CT9, CT12 et T33, les pourcentages d'inhibition sont différents et sont pas du même ordre (à l'exception de CT12 et T33).

Les isolats T80, T83, M32, M36, M9, M42, CT20, CT22, CS9, CT8, CS17 ne présentent aucun effet antagoniste sur les deux souches fongiques et la croissance mycélienne des deux souches n'est pas affectée. Ils sont incapables de produire des substances volatiles antifongiques.

Par ailleurs, on peut constater que certains isolats ne sont actifs que sur une seule souche fongique, T18, T23, T29, T57, T75, M7, M4, CT3, CT6, CS2 et CS1 sont les isolats ayant présenté un effet antagoniste sur ALG66 que sur BC1. Par contre, T31 est actif sur BC1 et inactif sur ALG66.



**Figure.23.** Comparaison entre l'effet des substances volatiles sur les deux souches fongiques

La différence entre l'efficacité des isolats contre les deux souches de *B. cinerea* peut être due à la différence entre les deux souches fongiques ou à la nature des substances volatiles produites qui sont généralement différentes et par conséquent à pouvoir antifongique différent.

En comparant ces résultats avec ceux de la confrontation directe on peut constater que les isolats montrés actifs sur les deux souches fongiques par production des substances volatiles (CT9, CT12, M6, M25, T33 et T90) sont également actifs *in vitro* sur les deux souches fongiques en même temps (contact direct), cela nous permet de dire que la production des substances volatiles est l'un des modes d'action par lesquels ces isolats peuvent agir.

Les 6 isolats capables de produire des substances volatiles antifongiques contre les deux souches fongiques sont issus soit du sol agricole de deux sites différents, soit des plaies badigeonnées par le sol et cela soutient l'hypothèse disant que les bactéries du sol sont les plus capables à produire des substances volatiles antifongiques.

A l'exception de T33 et M6, les autres isolats montrés actifs sur les deux souches fongiques sont appartenus au genre *Bacillus*. Plusieurs études ont révélé l'effet des substances volatiles produites par plusieurs espèces du genre *Bacillus* sur le champignon pathogène *B. cinerea* :

Bien que la plupart des recherches sur *B. subtilis* aient montré que cet antagoniste agit par production des antibiotiques comme principal mode d'action (Fiddaman et Rossall, 1993), les travaux de Chen *et al* (2008) sur la souche JA de *Bacillus subtilis* ont montré que cette dernière peut également produire plus de 14 substances volatiles à pouvoir antifongique identifiées. Ces composés sont montrés très actifs sur *B. cinerea* en inhibant sa croissance mycélienne et la germination de ses spores. Une autre souche de *Bacillus subtilis* est montrée très active contre une large gamme des champignons phytopathogènes dont *Botrytis* par production des substances volatiles antifongiques très puissantes (Fiddaman et Rossall, 1994).

Liu *et al* (2008) ont testé l'effet antagoniste des composés volatiles de quatre souches de *Bacillus spp* contre quelques champignons phytopathogènes dont *Botrytis cinerea*. Les quatre souches de *Bacillus* ont inhibé 60% de la croissance mycélienne de *B. cinerea* par production des composés volatiles.

*B. licheniformis* (EN74-1) est un antagoniste de *Botrytis mali* agent de la pourriture grise des pommes. Il a inhibé la croissance mycélienne du champignon pathogène par production des substances volatiles avec un pourcentage d'inhibition égal à 28,4% pour l'isolat 19JR et 33,8% pour l'isolat 20JR (Jamalizadeh *et al*, 2008).

Quelques espèces du genre *Pseudomonas* sont également capables de produire des substances volatiles antifongiques, c'est le cas de *P. fluorescens* qui produit des substances volatiles qui sont très efficaces contre la croissance mycélienne de *B. mali* (81,5% pour Bm1 et 83,5% pour Bm2) (Mikani *et al*, 2008).

Un autre exemple des microorganismes capables de produire des substances volatiles antifongiques est le champignon *Muscodor albus* qui a été découvert la fin des années 1990. *M. albus* est un agent de lutte biologique très efficace contre une large gamme de champignons et bactéries phytopathogènes, il produit des composés volatiles à pouvoir antifongique (Glick, 2015).

### III. Evaluation de l'effet antagoniste *in vitro* des isolats sur la germination des spores d'ALG66

Les résultats obtenus concernant l'effet antagoniste des différents isolats sur la germination de la souche ALG66 de *B. cinerea* sont représentés par la figure 24.

Le test ANOVA associé au test de comparaison de Dunnett avec un intervalle de confiance égal à 95% a été utilisé. Une différence significative a été enregistrée entre l'effet antagoniste des différents isolats par rapport au témoin.

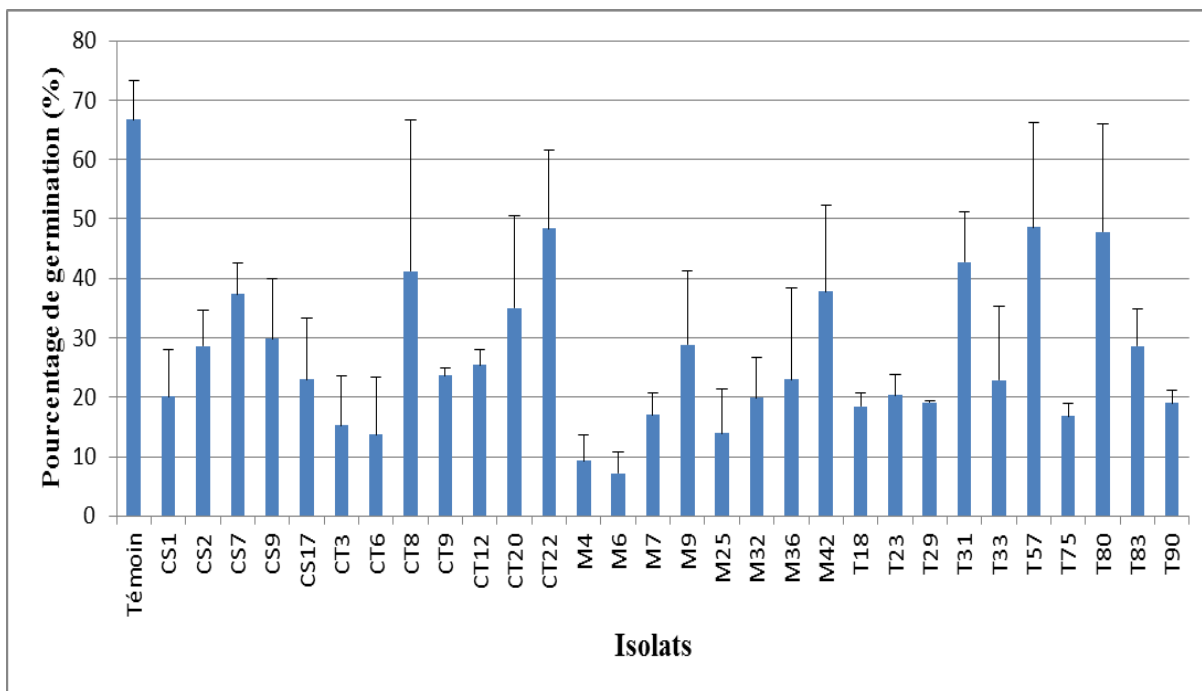
**Tableau.12.** Analyse de variance de l'effet antagoniste des isolats sur la germination d'ALG66

Source	DDL	Somme des carrés	Moyenne des carrés	F	Pr > F
Modèle	30	16469,447	548,982	2,858	0,000
Erreur	62	11908,081	192,066		
Total corrigé	92	28377,527			

La germination des spores est une étape très importante dans le cycle de vie des champignons, généralement elle aboutit à la formation d'un tube germinatif qui apparait quelques heures après que la spore ait été placée en conditions adéquates. La plupart des spores germent en présence d'eau et d'oxygène (Lepoivre, 2003 ; Cotoras *et al*, 2009). Comme les champignons du sol, la germination des spores des champignons de phylloplane peut être dépendante aux nutriments du milieu extérieur (Blakeman, 1975 ; Szandala et Backhouse, 2001).

Comparés au témoin (66,76%), les isolats : CT3, CT6, M4, M6 et M25 sont les plus actifs sur la germination des spores d'ALG66, ils réduisent le taux de germination de plus de 50% (15,30%, 13,73%, 9,23%, 7,21% et 13,94% respectivement).

L'origine des isolats M4, M6 et M25 est le sol du même site (Merdj-ouamen). CT3 et CT6 sont issus des plaies badigeonnées par le sol d'un autre site agricole (Tichey) et cela peut donner une idée sur l'efficacité des microorganismes du sol sur la germination des spores de *B. cinerea*.



**Figure.24.** Effet antagoniste *in vitro* des isolats sur la germination des spores d'ALG66

Les isolats : CS1, CS2, CS7, CS9, CS17, CT8, CT9, CT12, CT20, M7, M9, M32, M36, M42, T18, T23, T29, T33, T75, T83 et T90 ont exercé un moyen effet antagoniste (à légèrement fort) avec un taux de germination compris entre 17,01% et 41,17% par rapport au témoin.

Les isolats CS1, CS2, CS9 et CS17 sont issus des plaies saines et non badigeonnées des plantes de tomate en constituant leur flore épiphyte. Selon Blakeman et Szejnberg (1974), les bactéries épiphytes peuvent jouer un rôle de protection de la plante contre les maladies fongiques.

Les isolats les plus faibles sont : CT22, T31, T57 et T80 avec un taux de germination compris entre 42,79 % et 48,58%.

A l'exception de CT3, les autres isolats montrés actifs sur les spores d'ALG66 (M4, M6 et M25) ont présenté une meilleure activité antagoniste contre la croissance mycélienne de la même souche fongique avec des pourcentages d'inhibition allant de 49,51% à 66,66%. Cela montre que ces isolats ont un effet antagoniste sur la croissance mycélienne et sur la germination des spores de la souche ALG66.

Comparés aux résultats de l'antagonisme *in vitro* sur la croissance mycélienne d'ALG66, quelques isolats ont été montrés actifs sur boîte alors qu'elles ont un faible effet sur la

germination des spores, c'est le cas de CT22. Par contre, CS1 n'a aucun effet sur la croissance mycélienne d'ALG66 alors qu'elles a une bonne capacité à inhiber la germination des spores. Ce manque de concordance entre les résultats obtenus sur boîtes et ceux de la germination des spores peut être dû à la différence de la nature des milieux extérieurs entre solide et liquide et cela est bien confirmé lorsque le mécanisme d'action de l'antagoniste est la compétition des nutriments. Le mode d'action par lequel l'antagoniste peut intervenir peut également être à l'origine de ce manque de concordance.

La capacité des isolats à inhiber la germination des spores de *B. cinerea* peut être due à l'utilisation du glucose dans le milieu, ce dernier peut être utilisé par les isolats actifs et qui entrent en compétition en glucose avec les spores du pathogène.

Selon Blakeman (1975), une faible germination de *B. cinerea* peut être due à une compétition des nutriments et le taux de germination augmente avec la concentration du glucose dans le milieu. La germination des spores de *B. cinerea* est liée à la présence des nutriments dans le milieu notamment les sucres, par exemple *Pseudomonas* sp peut utiliser les acides aminés plus vite que les spores de *B. cinerea*, la germination est aussi stimulée par le contact avec des surfaces hydrophobes (Elad et Stewart, 2007 ; Cotoras *et al*, 2009).

Plusieurs travaux ont étudié la capacité des antagonistes à inhiber la germination des spores de *B. cinerea* :

*Bacillus pumilus* (F17) et *Pseudomonas* sp (C155) ont pu inhiber la germination des spores de *B. cinerea* (22% et 5% successivement, avec 80% de germination du témoin) (Elad *et al*, 1994).

Après 4 heures d'incubation, *B. subtilis* JA a inhibé la germination des spores de *B. cinerea* à  $43\% \pm 4\%$  comparé au témoin ( $90 \pm 4\%$ ) (Chen *et al*, 2008).

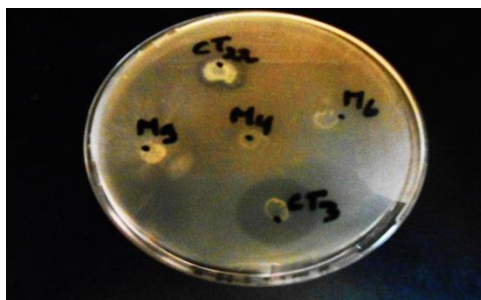
En étudiant l'effet antagoniste de deux souches d'*Erwinia herbicola* (B66 et B90), Bryk *et al* (1998) ont trouvé qu'après 6 heures, la souche B66 a inhibé la germination des spores de *B. cinerea* jusqu'à 22,3% comparé au témoin (49,8%) et 33,3% après 12 heures par rapport au témoin (75,6%). Pour la souche B90, et après 12 heures elle a pu diminuer le taux de germination de *B. cinerea* jusqu'à 27,7% par rapport au témoin (75,6%).

La souche B2 de *Serratia marcescens* est capable de produire deux enzymes chitinolytiques, endochitinase et chitobiase, ces derniers ont un effet inhibiteur sur la germination des spores de *B. cinerea* (Someya *et al*, 2001).

Il faut signaler que l'activité antagoniste des isolats montrés actifs sur la germination des spores d'ALG66 n'est pas due à la production d'antibiotiques ou d'enzymes lytiques mais peut être à la compétition des nutriments est notamment le glucose, car les observations microscopiques ne montrent aucune déformation des spores non germées incubées avec les isolats actifs et qui est généralement due à l'intervention d'une enzyme lytique ou d'un antibiotique.

#### IV. Etude des activités enzymatiques des isolats

L'étude de l'activité chitinolytique des isolas a montré que la plupart des isolats sont « chitinase négative ». Seuls les isolats CT3, CT22 et M32 sont « chitinase positive » (Tableau 13). L'importance de l'activité chitinolytique de ces isolats est différente où CT3 semble être le plus actif avec une activité chitinolytique très importante (Figure 25). Cela peut être dû à la différence de la nature et le nombre des chitinases produites par ces isolats. En fait une souche bactérienne peut produire plus d'une chitinase en même temps et l'effet de ces dernières est synergique (Cohen, 2010).



**Figure.25.** Activité chitinolytique de quelques isolats

L'isolat CT3 est très actif sur la croissance mycélienne *in vitro* des deux souches fongiques de *B. cinerea*, il est aussi capable de produire des substances volatiles antifongiques (seulement contre ALG66) (Figure 23) et même inhibé la germination des spores d'ALG66 (Figure 24), cela peut donner idée sur le mode d'action de cet isolat qui semble une combinaison de plusieurs modes

d'action dont la production des chitinases, la production des substances volatiles antifongiques et la compétition pour les nutriments.

Pour l'isolat CT22, il est très actif *in vitro* sur la croissance mycélienne des deux souches fongiques de *B. cinerea* mais il est incapable de produire des substances volatiles à pouvoir antifongique, alors qu'il faiblement inhibe la germination des spores de la souche ALG66. Ces informations révèlent qu'il agit en produisant des enzymes chitinolytiques et entrant en compétition pour les nutriments avec le pathogène comme deux modes d'action les plus répandus.

M32 n'a aucun effet *in vitro* sur la croissance mycélienne des deux souches fongiques, il ne produit pas des substances volatiles antifongiques mais il est capable d'inhiber la germination des spores d'ALG66 et cela montre qu'il exerce son pouvoir antagoniste en utilisant au moins deux modes d'action, entrer en compétition pour les nutriments avec le pathogène et produire des enzymes chitinolytiques.

Les trois isolats montrés chitinase positive sont issus du sol ou des plaies badigeonnées par le sol. CT3 et CT22 appartiennent au genre *Pseudomonas*. Selon Brzezinska *et al* (2014), le sol est fortement colonisé par des microorganismes chitinolytiques dont *Pseudomonas*.

Ces résultats coïncident avec d'autres résultats obtenus par d'autres auteurs :

Folders *et al* (2001) ont identifié un gène appelé « *chiC* » codant pour une enzyme chitinolytique extracellulaire (CCDH) dans le matériel génétique de *P. aeruginosa*, cette enzyme est capable de dégrader la chitine colloïdale.

A partir de rhizosphère de quelques *Solanaceas*, Ramyasmruthi *et al* (2012) ont pu isoler une souche de *P. fluorescens* nommée R ayant une très importante activité chitinolytique.

De nombreuses souches appartenant aux genres, *Pseudomonas* spp et *Bacillus* spp ont été testé et sont montrées chitinase positive avec une forte activité chitinolytique (Akocak *et al*, 2015).

Les lipases constituent un autre groupe des enzymes hydrolytiques les plus importantes. Aujourd'hui les lipases microbiennes occupent une meilleure place parmi les biocatalyseurs en raison de leur capacité à stimuler une grande partie des réactions dans des milieux aqueux et non



aqueux (Saxena *et al*, 2003). Une activité lipolytique peut jouer un rôle dans la lutte biologique contre les champignons phytopathogènes. Elle peut inhiber la synthèse ou même dégrader les stérols et les glycérophospholipides des membranes fongiques (Poritsanos *et al*, 2006).

**Tableau.13.** Activités enzymatiques des isolats

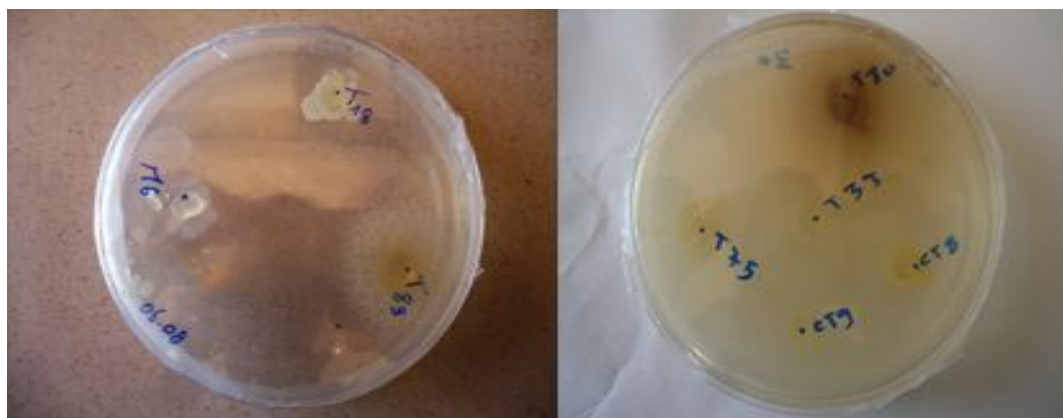
Isolat	Chitinase	Lipase	Protéase
CS1	-	-	-
CS2	-	+	+
CS7	-	-	+
CS9	-	+	+
CS17	-	-	+
CT3	+	ND	ND
CT6	-	+	+
CT8	-	-	-
CT9	-	+	+
CT12	-	ND	ND
CT20	-	-	-
CT22	+	+	+
M4	-	-	-
M6	-	-	-
M7	-	+	+
M9	-	+	+
M25	-	+	+
M32	+	-	+
M36	-	+	+
M42	-	+	+
T18	-	+	+
T23	-	+	+
T29	-	+	+
T31	-	-	-
T33	-	+	+
T57	-	+	+
T75	-	+	+
T80	-	+	+
T83	-	+	+
T90	-	+	+

Le tableau 13 montre que 19 isolats parmi les 30 isolats sont lipase positive alors que 9 isolats sont lipase négative. Pour les isolats CT3 et CT12 l'activité lipolytique est non déterminée.

14 isolats parmi les 19 isolats ayant une activité lipolytique sont issus du sol des deux sites différents et 3 isolats sont issus des plaies badigeonnées par le sol. En fait, les bactéries du sol sont connues par leur capacité à produire des enzymes lipolytiques qui les permettent de dégrader les substances grasses. 20% de l'humus de la plupart des sols est sous la forme de substances grasses d'origine végétale, microbienne ou animale (Breuil et Gounot, 1972).

16 isolats parmi les 19 isolats montrés lipase positive appartiennent aux deux genres *Bacillus* et *Pseudomonas*, ces deux genres sont connus par leurs espèces productrices des lipases (El-Shafei et Rezkallah, 1997).

Par exemple, la souche PA23 de *Pseudomonas chlororaphis* peut produire des composés hydrolytiques y compris des lipases qui peuvent contribuer à ses propriétés de contrôle biologique. Lorsque le gène GacS responsable de la production de la plupart de ces composés est enlevé du matériel génétique de la souche PA23, le pouvoir de cette souche à contrôler le champignon phytopathogène *Sclerotinia sclerotiorum* est significativement diminué (Poritsanos *et al*, 2006).

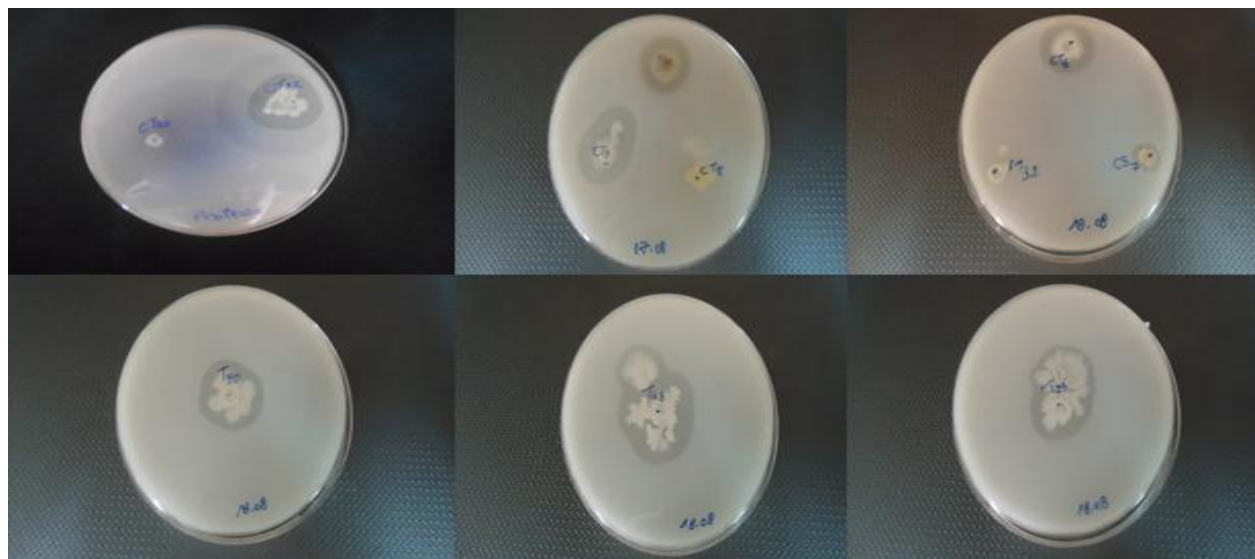


**Figure.26.** Activité lipolytique de quelques isolats

Le troisième groupe des enzymes hydrolytiques les plus répandues sont les protéases. L'activité protéolytique joue un rôle primordial dans la lutte biologique. La sécrétion de protéases par les agents de lutte biologique les confère une capacité à diminuer la pathogénicité de l'agent pathogène par dénaturation de ses enzymes hydrolytiques qui sont à l'origine des premières

étapes de l'infection de l'hôte. Les protéases stimulent la synthèse des auxines qui ont un rôle dans la l'induction de la résistance de la plante (Mansour *et al*, 1994 ; Elad et Kapat, 1999).

L'étude de l'activité protéolytique des 30 isolats montre que la plupart des isolats (22 isolats) ont une activité protéolytique et seules 8 isolats sont protéase négative. Pour les isolats CT3 et CT12, l'activité protéolytique n'est pas déterminée (Tableau 13).



**Figure.27.** Activité protéolytique de quelques isolats

Parmi les 22 isolats ayant une activité protéolytique, 15 sont issus du sol de deux sites différents et 3 isolats sont issus des plaies badigeonnées par le sol. 17 isolats parmi les 22 isolats montrés protéase positive appartiennent aux deux genres *Bacillus* et *Pseudomonas*.

Il est montré que les espèces du genre *Bacillus* sont capables de produire une large gamme de protéases :

La souche N7 de *Bacillus subtilis* est capable de produire une protéase antifongique appelée P6, cette dernière a exercé une forte inhibition sur la croissance mycélienne de *Fusarium oxysporum* f. sp. *cucumerium* à des concentrations supérieure à 25 µg / ml (Luo *et al*, 2013).

*Trichoderma harzianum* est un champignon très connu par sa capacité à produire des protéases qui jouent un rôle dans la lutte biologique. L'étude de l'effet des protéases des deux souches de *T. harzianum* (T39 et NCIM1185) sur 3 enzymes hydrolytiques de *B. cinerea* ;

Carboxyméthylcellulase, endo-polygalacturonase et exo-polygalacturonase a montré que les protéases de *T. harzianum* ont dénaturé les enzymes de *B. cinerea* ce qui diminue la maladie sur les feuilles d'haricots (Elad et Kapat, 1999).

En conclusion générale, les résultats obtenus montrent que seul l'isolat CT22 peut produire les 3 enzymes, alors que les isolats CS1, CT8, CT20, M4, M6 et 31 sont les seuls qui ne présentent aucune activité enzymatique. Une grande diversité concernant l'activité enzymatique des autres isolats a été enregistrée.

## V. Evaluation de l'effet antagoniste *in vivo* des isolats sur ALG66

L'analyse ANOVA associé au test de comparaison « Dunnett » avec un intervalle de confiance égale à 95% a révélé une différence significative entre les différentes surfaces de lésion provoquées par le champignon (Tableau 14).

**Tableau.14.** Analyse de variance de l'effet antagoniste *in vivo* des isolats sur ALG66

Source	DDL	Somme des carrés	Moyenne des carrés	F	Pr > F
Modèle	30	2027111,704	67570,390	12,186	< 0,0001
Erreur	93	515676,759	5544,911		
Total corrigé	123	2542788,462			

Les isolats T80, CT20, M25, CS9, T18 et M36 sont les plus actifs sur ALG66 qui en présence de ces derniers a provoqué des surfaces de lésion très réduites (27,185 mm<sup>2</sup>, 30,112 mm<sup>2</sup>, 34,38 mm<sup>2</sup>, 81,98 mm<sup>2</sup>, 84,97 mm<sup>2</sup> et 95,43 respectivement) ce qui traduit par des PGI supérieurs à 80% (entre 80,66% et 94,49%) (Annexe VI).

En présence des isolats : M9, CS1, M4, T57, CT3, CS7 et T90 le champignon a provoqué des faibles à moyennes surfaces de lésion (110,70 mm<sup>2</sup>, 175,69 mm<sup>2</sup>, 188,29 mm<sup>2</sup>, 196,24 mm<sup>2</sup>, 218,84 mm<sup>2</sup>, 221,11 mm<sup>2</sup> et 232,60 mm<sup>2</sup> respectivement). Les pourcentages d'inhibition exercés par ces isolats sont compris entre 52,86% et 77,56%.

Comparées au témoin, les surfaces de lésion provoquées par ALG66 en présence des isolats : T29, T75, T23, T83, CT8, T31, CT22, CT6, M6 et M7 sont moyennes (249,20 mm<sup>2</sup>, 253,80

mm<sup>2</sup>, 264,96 mm<sup>2</sup>, 270,23 mm<sup>2</sup>, 274,83 mm<sup>2</sup>, 280,27 mm<sup>2</sup>, 285,40 mm<sup>2</sup>, 289,93 mm<sup>2</sup>, 299,46 mm<sup>2</sup> et 310,12 mm<sup>2</sup> respectivement). Les pourcentages d'inhibition sont compris entre 37,15% et 49,49%.

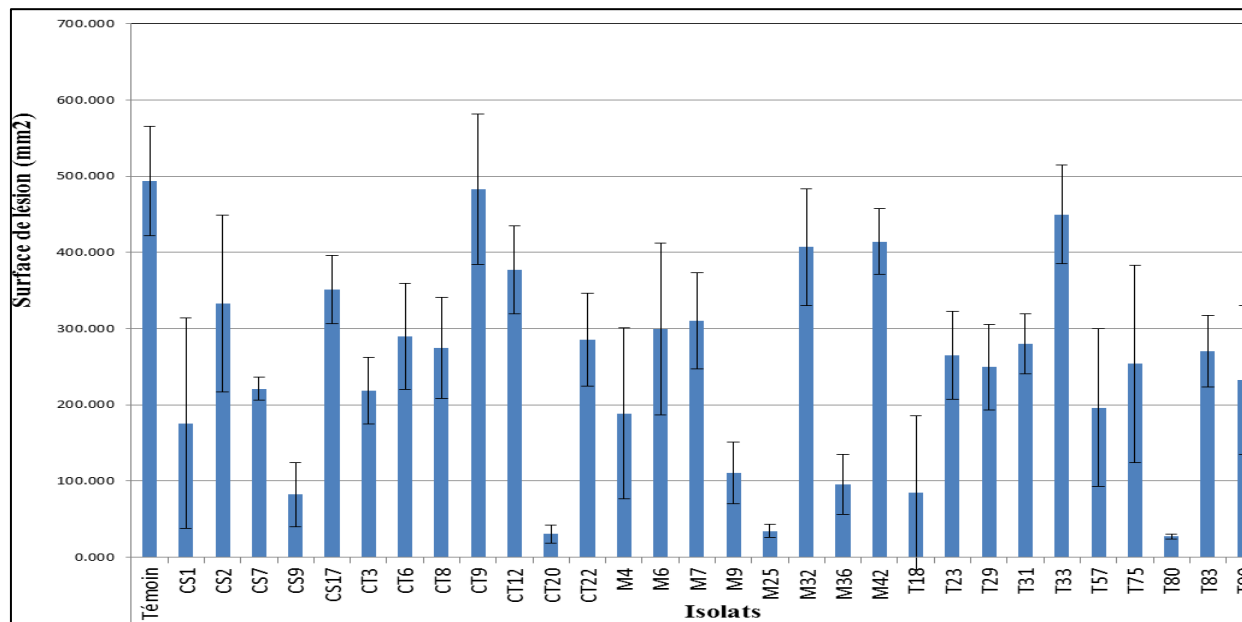


Figure 28 : Effet antagoniste *in vivo* des isolats sur ALG66

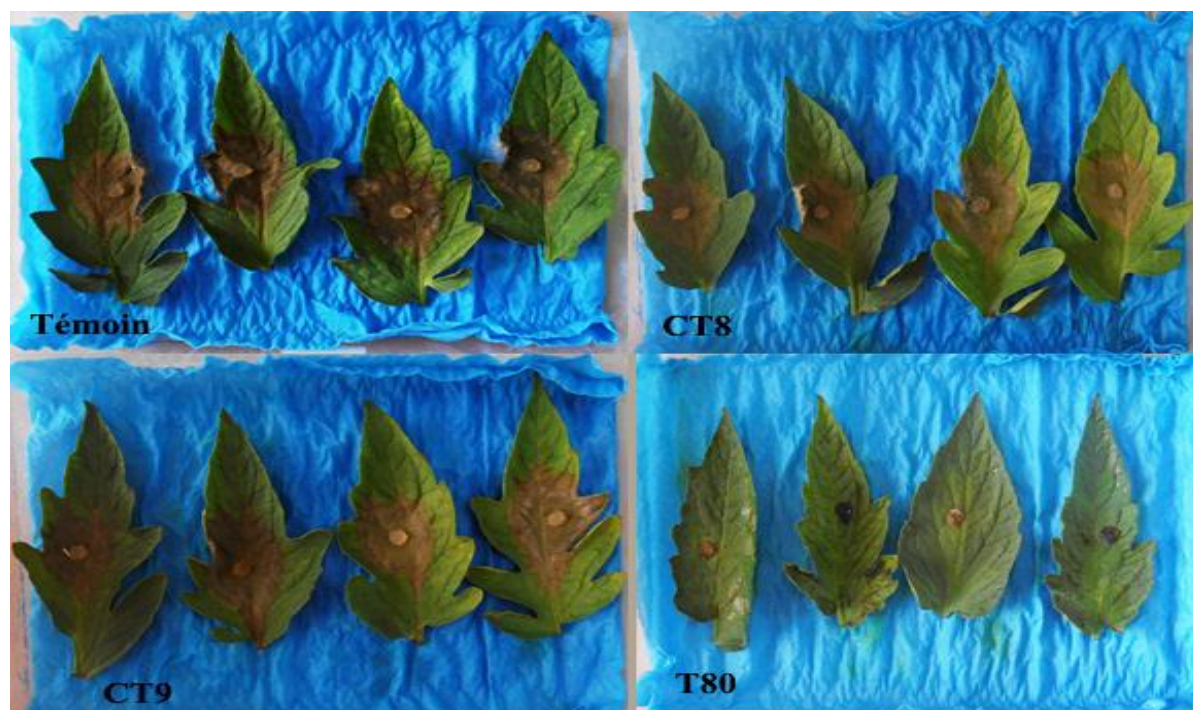


Figure.29. Effet antagoniste *in vivo* de quelques isolats sur ALG66

CS2, CS17, CT12, M32, M42, T33, CT9 ont un faible effet avec des surfaces de lésion du même ordre du témoin. Leurs pourcentages d'inhibition sont compris entre 2,16% et 32,62%. Une absence de différence significative ( $P>0,05$ ) a été enregistrée.

Les isolats les plus actifs et qui réduisent les surfaces de lésion provoquées par *B. cinerea* sur les folioles détachées de la tomate appartiennent aux genres *Bacillus* et *Pseudomonas*, plusieurs travaux ont montré l'efficacité *in vivo* des bactéries de ces deux genres sur la maladie de la pourriture grise :

L'efficacité des deux souches *Bacillus* (B27 et B29) contre *B. cinerea* sur des feuilles détachées de la vigne a été démontrée. Une diminution de symptômes nécrotiques avec inhibition de la maladie allant de 95% à plus de 98% a été observée lorsque les feuilles ont été inoculées par les deux souches (Ben Maachia *et al*, 2015).

Pour étudier l'effet antagoniste de *Bacillus amyloliquefaciens* CNU114001 sur des tomates atteintes de la maladie de la pourriture grise, différentes dilutions ont été préparées (10, 20 et 50 fois), la maladie a été inhibée par 60% pour les deux dilutions (10 et 20 fois) et par 52% pour la dilution de 50 fois (Ji *et al*, 2013).

Xue *et al* (2013) ont étudié la capacité des isolats de *Bacillus* sp et *Pseudomonas* sp à inhiber le développement de la pourriture grise sur des tomates cultivées sous serre, ces isolats sont issus de six microenvironnements de plantes de tomate et sont montrés très efficaces envers *B. cinerea* avec des pourcentages d'inhibition compris entre 52,40% et 67,80%.

Dix souches de *P. fluorescens* isolées à partir de la surface des feuilles et des fruits des pommiers ont respectivement réduit les surfaces de lésion causée par *B. mali* sur les fruits de pommes par 0,7 cm<sup>2</sup> et 15,4 cm<sup>2</sup> par rapport à 29,2 cm<sup>2</sup> du témoin (Mikani *et al*, 2008). Deux autres isolats (1 et 2) de *Pseudomonas* sp ont inhibé *B. cinerea* sur les tiges de la tomate avec un pourcentage d'inhibition égal à 55% et 57% respectivement (Dik *et al*, 1999).

Autres microorganismes mélangés avec des espèces de *Bacillus* ont montré leur effet *in vivo* contre *B. cinerea* :

Zouaoui *et al* (2008) ont réussi de préparer un mélange constitué de *B. subtilis* et *Halomonas* Sp ayant un effet antagoniste *in vivo* sur la pourriture grise de la tomate. Des plantes de tomates atteintes de la pourriture grise traitées par le mélange ont présenté des lésions significativement inférieures à celles du témoin.

Sylla *et al* (2015) ont préparé deux mélanges constitués de microorganismes pour étudier leur efficacité sur la pourriture grise sur fraises, le premier mélange constitué de *Aureobasidium pullulans*+ *Beauveria bassiana* et le deuxième de *B. amyloliquefaciens* + *A. pullulans* + *B. bassiana*. Le traitement des lésions par les deux mélanges a significativement réduit le développement de la maladie par 35,34% pour le premier mélange et 50% pour le deuxième mélange. Tandis que le traitement par *B. amyloliquefaciens* + *A. pullulans* et *B. amyloliquefaciens* + *B. bassiana* a significativement inhibé la maladie par 38, 45% et 62%, respectivement.

Des microorganismes autres que ceux du genre *Bacillus* et *Pseudomonas* sont montrés très actifs *in vivo* sur la pourriture grise de plusieurs espèces des plantes :

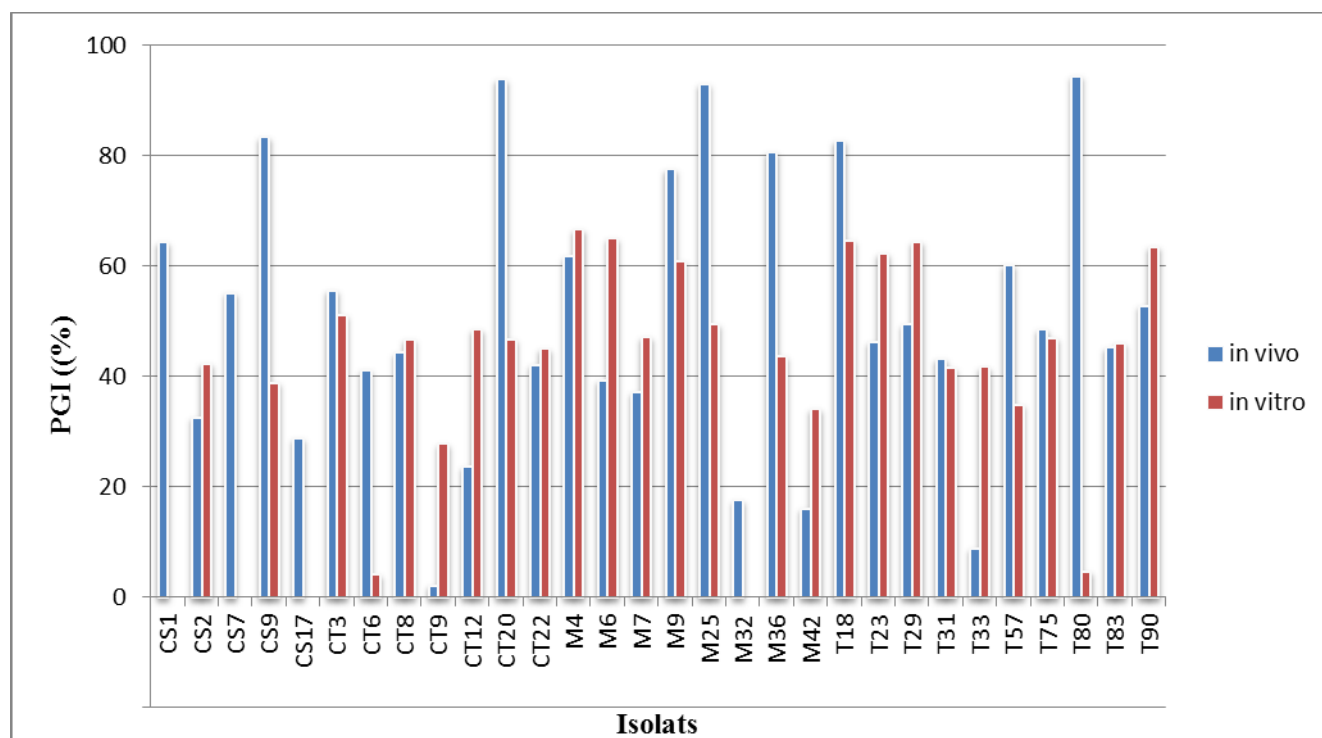
*Hanseniaspora uvarum* et *Metschnikowia pulcherrima* MPR3 ont pu inhiber respectivement la pourriture grise sur grappes de baies et de raisin (Parafati *et al*, 2015 ; Qin *et al*, 2015)

Après avoir infecté des tiges de la tomate par *B. cinerea*, Borges *et al* (2015) les ont traité par le champignon *Clonostachys rosea*, l'incidence moyenne de la pourriture grise était de 18,2% et 46,6% respectivement avec et sans antagoniste et 0 % lorsque l'antagoniste a été appliqué un jour avant l'inoculation de pathogène.

Des suspensions des isolats (118, 252 et 25) de *T. harzianum* ont réduit de façon significative l'incidence de la pourriture grise sur les folioles de la tomate cultivées sous serres de 95% (témoin) à 65% (Dal Bello *et al*, 2011).

### V.1. Comparaison entre l'effet antagoniste *in vitro* et *in vivo* de chaque isolat contre ALG66

Les résultats obtenus concernant la comparaison entre l'effet antagoniste *in vitro* et celui *in vivo* des isolats sur ALG66 sont représentés par la figure 30.



**Figure.30.** Comparaison entre l'effet antagoniste *in vitro* et *in vivo* des isolats bactériens sur ALG66

Les isolats : T18, M9 et M4 sont les plus actifs *in vivo* comme *in vitro* avec des pourcentages d'inhibition dépassant 60%.

Les isolats : CS2, CT3, CT8, CT22, M7, T31, T75, T83 et T90 ont exercé un effet antagoniste *in vivo* de même ordre que celui *in vitro* avec une légère différence. Exercer le même effet antagoniste *in vivo* comme *in vitro* indique que le mode d'action exercé par l'antagoniste sur boîte semble être le même exercé *in vivo* en contact direct avec les organes de la plante hôte.

Cette concordance entre l'effet *in vivo* et celui *in vitro* est montrée par plusieurs études :

Fang *et al* (2014) ont étudié l'effet de *Xenorhabdus nematophila* TB sur *Botrytis cinerea* sur boîtes et sur fruits de tomates détachés infectés par *B. cinerea*. Ils ont trouvé qu'elle peut inhiber



*B. cinerea* sur boîtes avec un PGI égal à 90,39 % comme sur fruits de tomates détachés avec un PGI proche de 80%.

*Bacillus amyloliquefaciens* CNU114001 est montrée active *in vivo* sur fruits de tomates comme *in vitro* avec des PGI très proches entre 52% et 60% (Ji *et al*, 2013).

Les isolats CT9, CT12, M6, M42, T23, T29 et T33 sont montrés plus efficaces *in vitro* qu'*in vivo*. CS9, CT20, M9, M25, M36, T18 et T57 sont plus efficaces *in vivo* qu'*in vitro*, notant que CS1, CS7, CS17, CT6, M32 et T80 exercent un effet inhibiteur *in vivo* sur ALG66, alors qu'aucun effet antagoniste *in vitro* n'a été enregistré. La différence entre l'activité antifongique *in vitro* et celle *in vivo* des isolats testés peut être due aux mécanismes d'action exercés par les différents isolats et qui ne peuvent pas être exprimés que sur boîtes ou seulement dans les conditions *in vivo*. Selon Lepoivre (2003), quelques mécanismes d'action telle que la stimulation des mécanismes de résistance de la plante ne s'expriment pas *in vitro* alors qu'ils peuvent jouer *in vivo* un rôle significatif, les interactions entre plante-hôte, pathogène, antagoniste et autres microorganismes naturellement présents étant très complexes. Un mécanisme d'action identifié *in vitro* peut orienter la recherche du mécanisme *in planta* mais ne le démontre pas.

En fait, les isolats CS1, CS7 et CS17 qui sont actifs seulement *in vivo*, sont issus des plaies saines des tiges de la tomate et ils font partie de la microflore épiphyte des plantes. Les microorganismes épiphytes produisent *in vivo* des biosurfactants et des sidérophores qui peuvent induire la résistance systémique des hôtes en s'agissant comme des éliciteurs (Filho *et al*, 2010). Les isolats CT6, M32 et T80 qui ne sont actifs qu'*in vivo* appartiennent au genre *Pseudomonas* et quelques espèces de ce genre sont connues par leur capacité à induire une résistance systémique chez l'hôte. Plusieurs *Pseudomonas fluorescens* non producteurs d'antibiotiques classés dans le groupe des PGPR capables d'induire chez leurs hôtes une résistance systémique aux agents pathogènes. Ils peuvent par exemple protéger les œillets contre la trachéomyose due à *Fusarium oxysporum* f.sp. *dianthi*. Ces bactéries sont apportées dans le substrat de culture qui contient les plants racinés, le champignon est introduit directement dans le xylème des tiges. Les plantes sont protégées en observant une accumulation de phytoalexine dans les tiges des œillets bactérisés en réponse à l'infection par *Fusarium*, cependant il n'y a pas de phytoalexine dans les œillets bactérisés mais non infectés. Le rôle des *Pseudomonas* rhizosphériques est donc de mettre la

plante en état d'alerte, les lipopolysaccharides des parois bactériennes semblent être les médiateurs de cette activation (Davet, 1996).

Cette différence entre les effets antagonistes *in vitro* et ceux *in vivo* sur le champignon phytopathogène a été montrée par plusieurs travaux :

Fang *et al* (2011) ont trouvé que *Xenorhabdus bovienii* YL002 est plus active *in vitro* contre *B. cinerea* que sur fruits détachées de la tomate. Le PGI *in vitro* a atteint 98,51%, alors que celui *in vivo* a été 73,46%.

Ben Maachia *et al* (2015) ont constaté que les deux souches B27 et B29 de *Bacillus subtilis* sont plus actives *in vivo* sur les feuilles détachées de la vigne (95% à 98%) qu'*in vitro* où les deux souches ont inhibé la croissance mycélienne de *B. cinerea* par 50% pour la souche B27 et 40% pour la souche B29.

L'effet de *Bacillus subtilis* BCB3-19 sur la pourriture grise de la tomate a été étudié par Siripornvisal (2010). Les résultats obtenus ont révélé que cette souche a exercé un effet inhibiteur *in vitro* sur 3 isolats de *B. cinerea* avec des PGI compris entre 55% et 56,7% à une température de 23°C. Par contre elle est montrée très active *in vivo* sur des fruits de tomate avec des PGI compris entre 86% et 100% pour les 3 isolats de *B. cinerea* et avec différentes concentrations.

# CONCLUSION ET PERSPECTIVES

## Conclusion et perspectives

La variabilité génétique de *B. cinerea* augmente sa capacité à s'adapter aux traitements chimiques. Face à ce problème, des nouvelles recherches qui visent à trouver des méthodes de lutte alternatives contre ce champignon phytopathogène sont en cours. La recherche des agents de lutte biologique d'origine microbienne devient l'une des solutions.

C'est dans ce but que s'inscrit notre étude. Elle a consisté à trouver de nouveaux agents de lutte biologique contre *B. cinerea* sur tomate et l'étude de leur effet antagoniste *in vivo* et *in vitro* contre le champignon phytopathogène en recherchant des microorganismes adaptés naturellement à l'écosystème agricole local.

L'identification biochimique des 30 isolats sélectionnés a révélé que la majorité appartient aux genres *Bacillus* et *Pseudomonas*. L'étude de l'antagonisme *in vitro* des isolats a montré que parmi les 30 isolats, 8 isolats (M4, M6, M9, T18, T23, T29, T90 et CT3) sont montrés les plus actifs contre les deux souches fongiques en même temps avec un pourcentage d'inhibition dépassant les 50%. Notant une différence entre l'effet antagoniste *in vitro* des autres isolats sur la croissance mycélienne des deux souches fongiques.

La production des substances volatiles à pouvoir inhibiteur contre les deux souches fongiques a été enregistrée chez 6 isolats (T90, M25, M6, CT9, CT12, T33) qui ont inhibé la croissance mycélienne des deux souches fongiques. Seules 2 isolats (T33 et CT12) parmi les plus actifs ont pu exercer un effet inhibiteur relativement fort dépassant 40% contre les deux souches fongiques.

L'effet des isolats bactériens sur la germination des spores de la souche fongique ALG66 a permis de montrer que les isolats : CT3, CT6, M4, M6 et M25 ont une bonne activité inhibitrice contre la germination des spores d'ALG66, ils peuvent réduire le taux de germination par plus de 50% par rapport au témoin. Une grande diversité concernant l'effet antagoniste *in vitro* des autres isolats sur la germination d'ALG66 a été enregistrée.

Les résultats des activités enzymatiques des 30 isolats ont révélé une grande diversité. L'activité chitinolytique est absente chez la majorité des isolats et seuls 3 isolats (CT3, CT22 et M32) ont été enregistrés comme producteurs des chitinases avec différence d'efficacité. Signalant que CT3 a eu la meilleure activité chitinasique. 19 isolats se sont montrés lipase positive avec une différence enregistrée en terme de l'importance d'activité lipolytique.

Concernant l'activité protéolytique, elle est montrée positive chez 22 isolats parmi les 30 isolats testés avec différence d'importance.

Le deuxième axe de ce travail est consacré à l'activité antagoniste *in vivo* des isolats sélectionnés, l'étude de l'effet antagoniste des 30 isolats sur des folioles détachées de la tomate inoculées par la souche ALG66 de *B. cinerea* a montré que 13 isolats (T80, CT20, M25, CS9, T18, M36, M9, CS1, M4, T57, CT3, CS7 et T90) parmi les 30 isolats ont exercé un bon effet antagoniste *in vivo* avec des pourcentages d'inhibition allant de 52,86% à 94,49%. Seuls les isolats CS2, CT3, CT8, CT22, M4, M7, T31, T75, T83 et T90 ont eu le même effet antagoniste que ce soit *in vivo* ou *in vitro*. Il faut noter la grande diversité enregistrée concernant l'effet antagoniste *in vivo* et celui *in vitro* des autres isolats.

Même s'ils restent préliminaires, les résultats obtenus montrent que la plupart des isolats montrés actifs contre *B. cinerea in vivo* comme *in vitro* peuvent former les premiers pas vers une utilisation ultérieure comme agents de lutte biologique contre *B. cinerea* en prenant en considération la nécessité de ne pas s'arrêter aux tests *in vitro*. Une telle application dans le domaine agricole reste un défi pour compléter ce travail. En conclusion générale et pour donner valeur à ce travail qui reste insuffisant, et pour compléter le reste de cette étude, il est souhaitable de :

1. Poursuivre le travail de screening des souches à partir de l'environnement immédiat de la culture de tomate, ceci nous permettra de sélectionner des souches adaptées à l'environnement où seront testés les isolats sélectionnés.
2. Etudier l'effet antagoniste *in planta* des isolats envers *B. cinerea*
3. Essai d'application sous serre pour évaluer l'efficacité des isolats
4. Identifier les isolats testés par les techniques de biologie moléculaire
5. Etudier les modes d'action des isolats
6. Etudier l'effet synergique des isolats contre *B. cinerea*
7. Caractérisation des différentes substances et métabolites secondaires produits
8. Etudier l'effet des isolats sur la plante hôte pour s'assurer qu'ils n'ont aucun effet secondaire
9. Compléter l'étude de l'effet préventif des isolats par une étude des effets curatifs
10. Etudier l'effet des isolats sur des agents pathogènes autres que *B. cinerea*

**REFERENCES**  
**BIBLIOGRAPHIQUES**

## A

**Agrios G.N. 2005.** Plant pathology. Ed. *Elsevier Academic Press*, Oxford, UK, 922 p.

**Akocak P.B., Chureyb J.J. et Worobo R.W. 2015.** Antagonistic effect of chitinolytic *Pseudomonas* and *Bacillus* on growth of fungal hyphae and spores of aflatoxigenic *Aspergillus flavus*. *Food Bioscience*. **10**: 48–58.

## B

**Barakat F.M., Abada K.A., Abou-Zeid N.M. et El-Gammal Y.H.E. 2014.** Effect of volatile and non-volatile compounds of *Trichoderma* spp. on *Botrytis fabae* the causative agent of *faba bean* chocolate spot. *American Journal of Life Sciences*. **2(6-2)**: 11-18.

**Benfedala S. 2012.** Etude de la variabilité phénotypique des souches de *Botrytis cinerea*, agent de la pourriture grise de la tomate. Thèse présentée en vue de l'obtention du diplôme de magister en microbiologie. Université Abderrahmane Mira. Bejaia, Algérie. 80p.

**Ben Maachia S., Errakhi R., Chérif M., Preeti N., Trupti M. et Paul B. 2015.** Biological control of the grapevine diseases 'grey mold' and 'powdery mildew' by *Bacillus* B27 and B29 strains. *Indian j exp boil*. **53**: 109-115.

**Bhattacharyya P.N. et Jha D.K. 2012.** Plant growth-promoting rhizobacteria (PGPR): emergence in agriculture. *World J Microbiol Biotechnol*. **28(4)**:1327–1350.

**Blancard D. 2009.** Les maladies de la tomate, identifier, connaitre maitriser. Ed. *Quae*, Paris. 691p.

**Blanco J.M. 2015.** *Pseudomonas* Strains that Exert Biocontrol of Plant Pathogens. In Ramos J.L., Goldberg B. et Filloux A. *Pseudomonas*. New Aspects of *Pseudomonas* Biology. Ed. *Springer*. Dordrecht, the Netherlands. 319p.

**Blakeman J.P. 1975.** Germination of *Botrytis Cinerea* conidia *in vitro* in relation to nutrient conditions on leaf surfaces. *Trans. Br, mycol. Soc.* **65(2)**:239-247.

**Blakeman J.P. et Szejnberg A. 1974.** Germination of *Botrytis Cinerea* spores on beetroot leaves treated with antibiotics. *Trans. Br. mycol. Soc.* **62 (3)**: 537- 545.

**Benson H.J. 2002.** Microbiological applications. A laboratory manual in generam microbiology. Ed. *Spiral Bound*, Boston, USA. 496 p.

**Boehm G. et Leuschner R.M. 1987.** Advances in aerobiology proceedings of the 3<sup>rd</sup> International Conference on Aerobiology. Ed. *Birkhauser Verlag*. Basel, Switzerland. 437p.

**Borges Á.V., Saraiva R.M. et Maffia L.A. 2015.** Biocontrol of gray mold in tomato plants by *Clonostachys rosea*. *Trop. plant pathol.* 1-6.

**Borriss R. 2015.** *Bacillus*, A Plant-Beneficial Bacterium. Microbes for Sustainable Agriculture. In Lugtenberg B. Principles of Plant-Microbe Interactions. Microbes for Sustainable Agriculture. Ed. Springer. Dordrecht, the Netherlands. 447p.

**Brenner D.J et Farmer J.J. 2005.** Family I. *Enterobacteriaceae*. In Brenner D.J., Krieg N.R. et Staley J.T. Bergey's manual of systematic bacteriology. Second edition. The Proteobacteria. part B. The Gammaproteobacteria. Vol. 2. Ed. Springer. Dordrecht, the Netherlands. 1106p.

**Brzezinska M.S., Jankiewicz U., Burkowska A. et Walczak M. 2014.** Chitinolytic Microorganisms and Their Possible Application in Environmental Protection. *Curr Microbiol.* **68**:71–81.

**Breuil C. et Gounot A.M. 1972.** Recherches préliminaires sur les bactéries lipolytiques psychrophiles des sols et des eaux. *Can. J. Microbiol.* **18**: 1445-1451.

**Bryk H., Dyki B. et Sobiczewski P. 1998.** Antagonistic effect of *Erwinia herbicola* on *in vitro* spore germination and germ tube elongation of *Botrytis cinerea* and *Penicillium expansum*. *BioControl* **43**: 97–106.

**Butt T.M., Jackson C. et Magan N. 2001.** Fungi as biocontrol agents: Progress, problems and potential. Ed. CABI Publishing. Wallingford, UK. 390p.

## C

**Caicedo A. et Peralta I. 2013.** Basic information about tomatoes and the tomato group. In Genetics, genomics and breeding of tomato. Ed. CRC press. Taylor & Francis Group. NW. USA, 480p.

**Caudal Y.T. 1998.** *Botrytis* sur tomate: le point sur les méthodes de lutte. *Technique Production.* **146**: 36-39.

**Carrim A.J.I., Barbosa E.C. et Vieira G.J.D. 2006.** Enzymatic Activity of Endophytic Bacterial Isolates of *Jacaranda decurrens* Cham. (Carobinha-do-campo). *Brazilian Archives of Biology and Technology.* **49(3)**: 353-359.

**Chen H., Xiao X., Wang J., Wu L., Zheng Z. et Yu Z. 2008.** Antagonistic effects of volatiles generated by *Bacillus subtilis* on spore germination and hyphal growth of the plantpathogen, *Botrytis cinerea*. *Biotechnol Lett.* **30**:919–923.

**Choudhary D. et Johri N.B. 2009.** Interactions of *Bacillus* spp. And plants with special reference to induced systemic resistance (ISR). *Microbiological Research.* **164**:493-513.

**Christen G.L. et Marshall R.T., 1984.** Selected Properties of Lipase and Protease of *Pseudomonas fluorescens* 27 produced in Four Media. *J Dairy Sci.* **67**:1680-1687.

**Cotoras M., Garcia C. et Mendoza L. 2009.** *Botrytis cinerea* isolates collected from grapes present different requirements for conidia germination. *Mycologia.* **101(3)**: 287–295.



**Cohen E. 2010.** Chitin Biochemistry: Synthesis, Hydrolysis and Inhibition. *Advances In Insect Physiology*. **38**: 1-74.

**Csizinszky A.A. 2005.** Production in the open field. *In Tomatoes*. Ed. *CABI Publishing*. London, UK, 339p.

**Cumagun C.J.R. 2012.** Plant pathology. Ed. *InTech*. Rijeka, Croatia. 362p.

## D

**Dal Bello G., Rollan M.C., Lampugnani G., Abramoff C., Ronco L., Larran S., Stocco M. et Monaco C. 2011.** Biological control of leaf grey mould of greenhouse tomatoes caused by *Botrytis cinerea*. *International Journal of Pest Management*. **57 (3)**: 177–182.

**Da Silva D.J.H., Abreu F.B., Caliman F.R.B., Antonio A.C. et Patel V.B. 2008.** Tomatoes: Origin, Cultivation techniques and germplasm resources. *in* Preedy V.R. et Watson R.R. Tomatoes and tomato products: Nutritional, medicinal and therapeutic properties. Ed. *Edenbridge Ltd*. India, 643p.

**Davet P. 1996.** Vie microbienne du sol et production Végétale. Ed. *INRA*. Paris. France. 377p.

**Dean R., Van Kan J.A.L., Pretorius Z.A., H-Kosack K.E., Di Pietro A., Spanu P.D., Rudd J.J., Dickman M., Kahmann R., Ellis J. et Foster G.D. 2012.** The Top 10 fungal pathogens in molecular plant pathology. *Molecular Plant Pathology*. **13(4)**, 414–430.

**Dik A.J., Koning G. et Kohl J., 1999.** Evaluation of microbial antagonists for biological control of *Botrytis cinerea* stem infection in cucumber and tomato. *European Journal of Plant Pathology*. **105**: 115–122.

## E

**Elad Y. 2000.** *Trichoderma harzianum* T39 Preparation for biocontrol of plant diseases- control of *Botrytis cinerea*, *Sclerotinia sclerotiorum* and *Cladosporium fulvum*. *Biocontrol Science and Technology*. **10**: 499-507.

**Elad Y., Malathrakist N.E. et Dik A.J. 1996.** Biological control of *Botrytis*-incited diseases and powdery mildews in greenhouse crops. *Crop Protection* **1(3)**:224-240.

**Elad Y. et Stewart A. 2007.** Microbial control of *Botrytis* spp. *In* Elad Y., Williamson B., Tudzynski P. et Delen N. *Botrytis: Biology, pathology and control*. Ed. *Springer*. Dordrecht, the Netherlands. 403p.

**Elad Y. et Shtienberg D. 1995.** *Botrytis cinerea* in greenhouse vegetables: chemical, cultural, physiological and biological controls and their integration. *Integrated Pest Management Reviews*. **1**: 15-29.

**Elad Y. et Kapat A. 1999.** The role of *Trichoderma harzianum* protease in the biocontrol of *Botrytis cinerea*. *European Journal of Plant Pathology*. **105**: 177–189.

**Elad Y., Kohl J. et Fokkema N. J. 1994.** Control of infection and sporulation of *Botrytis cinerea* on bean and tomato by saprophytic bacteria and fungi. *European Journal of Plant Pathology*. **100**: 315-336.

**El Oirdi M., 2009.** Facteurs qui contrôlent le pouvoir pathogène chez *Botrytis cinerea*. Thèse présentée en vue de l'obtention du grade de docteur en sciences. Université de Sherbrooke. Québec, Canada. 168p.

**EI-Shafei H.A. et Rezkallah L.A. 1997.** Production, purification and characterization of *Bacillus* lipase. *Microbiol. Res.* **152**: 199-208.

**Estrella A.H. et Chet I. 1999.** Chitinases in biological control. In *Chitin and Chitinases*. Ed. Springer. Dordrecht, the Netherlands. 336p.

## F

**Fang X.L., Li Z.Z., Wang Y.H. et Zhang X. 2011.** *In vitro* and *in vivo* antimicrobial activity of *Xenorhabdus bovienii* YL002 against *Phytophthora capsici* and *Botrytis cinerea*. *Journal of Applied Microbiology*. **111**: 145–154.

**Fang X.L, Zhang M., Tang Q., Wang Y. et Zhang X. 2014.** Inhibitory effect of *Xenorhabdus nematophila* TB on plant pathogens *Phytophthora capsici* and *Botrytis cinerea* *in vitro* and *in planta*. *Scientific Reports*. **4**: 1-7.

**Fiddaman P.J. et Rossall S. 1993.** The production of antifungal volatiles by *Bacillus subtilis*. *Journal of Applied Bacteriology*. **74**:119-126.

**Fiddaman P.J. et Rossall S. 1994.** Effect of substrate on the production of antifungal volatiles from *Bacillus subtilis*. *Journal of Applied Bacteriology*. **76**:395-405.

**Filho R.L., Romeiro R.D.S. et Alves E. 2010.** Bacterial spot and early blight biocontrol by epiphytic bacteria in tomato plants. *Pesq. agropec. bras.* **45(12)**:1381-1387.

**Folders J., Roelofs M.S., Van Loon L.C., Tommassen J. et Bitter W. 2001.** Characterization of *Pseudomonas aeruginosa* Chitinase, a Gradually Secreted Protein. *Journal Of Bacteriology*. **183 (24)**: 7044–7052.

## G

**Garrity G.M., Bell J.A. et Lilburn T. 2005.** Order IX. *Pseudomonadales*. in Brenner D.J., Krieg N.R. et Staley J.T. Bergey's manual of systematic bacteriology. Second edition. The Proteobacteria. part B. The Gammaproteobacteria. Vol. 2. Ed. Springer. Dordrecht, the Netherlands. 1106p.

**Gerszberg A., Konka H.K., Kowalczyk T. et Kononowicz K.A. 2014.** Tomato (*Solanum lycopersicum* L.) in the service of biotechnology. *Plant Cell Tiss Organ Cult*. 22p.

**Glick B.R. 2015.** Beneficial Plant-Bacterial Interactions. Ed. *Springer*. Dordrecht, the Netherlands. 243p.

**Gnanamanickam S.S., Vasudevan P., Reddy M.S., Défago G. et Kloepper J.W. 2002.** Principles of biological control. In Gnanamanickam S.S. Biological control of crop diseases. Ed. *Marcel Dekker*. New York, USA. 451p.

**Grierson D. et Kader A.A. 1987.** Fruit ripening and quality. In Atherton J.G. et Rudich J. The tomato crop: A scientific basis for improvement. Ed. *Chapman and Hall Ltd*, London, UK, 661p.

## H

**Hang N.T.T., Oh S.O., Kim G.H., Hur J-S. et Koh Y.J. 2005.** *Bacillus subtilis* S1-0210 as a Biocontrol Agent against Botrytis cinerea in Strawberries. *Plant Pathol. J.* **21(1)**: 59-63.

**Hanson J.R. 2008.** The Chemistry of Fungi. Ed. *RSC Publishing*. Cambridge, UK. 221p.

**Hawksworth D.L. 1993.** Ascomycete Systematics: Problems and perspectives in the nineties. Ed. *Springer Science+ Business Media*, LLC. Paris, France. 453p.

**Herrera R.J. 2012.** Fungal Cell Wall Structure, Synthesis, and Assembly. second edition. Ed. *CRC press. Taylor & Francis Group*. NW. USA, 173P.

**Heuvelink E. et Costa J.M. 2005.** Introduction: the tomato crop and industry. In Heuvelink E. Tomatoes. Ed. *CABI Publishing*. London,UK, 339p.

## I

**Ingold C.T. et Hudson H.J. 1993.** The biology of fungi. Ed. *Springer-Science+Business Media, B.V.* UK. 224p.

**Islam M.T. et Hossain M.M. 2013.** Biological control of peronosporomycete phytopathogen by bacterial antagonist. In Maheshwari D.K. Bacteria in Agrobiolgy: Disease Management. Ed. *Springer*. Dordrecht, the Netherlands. 501p.

## J

**Jamalizadeh M., Etebarian H.R., Alizadeh A. et Aminian H. 2008.** Biological control of gray mold on apple fruits by *Bacillus licheniformis* (EN74-1). *Phytoparasitica.* **36(1)**:23-29.

**Ji S.H., Paul N.C., Deng J.X., Kim Y.S., Yun B-S. et Yu S.H. 2013.** Biocontrol Activity of *Bacillus amyloliquefaciens* CNU114001 against Fungal Plant Diseases. *Mycobiology* . **41(4)**: 234-242.

**Jones B.D.J. 1999.** Tomato plant culture.: In the field, greenhouse and home garden. Ed. *CRC press LLC . Taylor & Francis Group*. New York, 183p.

**Jones B.D.J. 2007.** Tomato plant culture: In the field, greenhouse and home garden. Ed. *CRC press LLC. Taylor & Francis Group.* New York. USA, 399p.

## K

**Koike S.T., Gladders P. et Paulus A.O. 2007.** Vegetable diseases a colour handbook. Ed. *Manson Publishing.* London, UK. 448p.

**Kohlerschmidt D.J., Mingle L.A. et Dumas N.B. 2015.** Identification of Aerobic Gram-Negative Bacteria in Goldman E. et Green L.H. Practical Handbook of Microbiology. Ed. *CRC PressTaylor & Francis Group.* NW.USA, 1032p.

**Kopečný J., Hodrova B. et Stewart C.S. 1996.** The isolation and characterization of a rumen chitinolytic bacterium. *Letters in Applied Microbiology* .**23**: 195-1 98.

## L

**Lepoivre P., 2003.** Phytopathologie: Bases moléculaires et biologiques des pathosystèmes et fondements des stratégies de lutte. Ed. *De Boeck Supérieur.* Bruxelles, Belgique. 427p.

**Leroux P. 2007.** Chemical control of *Botrytis* and its resistance to chemical fungicides. In Elad Y., Williamson B., Tudzynski P. et Delen N. *Botrytis: Biology, pathology and control.* Ed. *Springer.* Dordrecht, the Netherlands. 403p.

**Levrault F.G. 1817.** Dictionnaire des sciences naturelles. Ed. *Le Normant.* Strasbourg, France. 643p.

**Liu W.W., Mu W., Zhu B-Y., Du Y-C. et Liu F. 2008.** Antagonistic Activities of Volatiles from Four Strains of *Bacillus* spp. And *Paenibacillus* spp. Against Soil-Borne Plant Pathogens. *Agricultural Sciences in China.* **7(9)**: 1104-1114.

**Logan N.A. et De Vos P. 2009.** Family I. *Bacillaceae.* In De Vos P., Garrity G.M., Jones D., Krieg N.R., Ludwig W, Rainey F.A., Schleifer K-H. et Whitman W.B. Bergey's manual of systematic Bacteriology. The Firmicutes. Second Edition. Vol 3. Ed. *Springer.* Dordrecht, the Netherlands. 1450p.

**Luo Y., Sun L., Zhu Z., Ran W. et Shen Q. 2013.** Identification and Characterization of an Anti-fungi *Fusarium oxysporum* f. sp. *cucumerium* Protease from the *Bacillus subtilis* Strain N7. *Journal of Microbiology* . **51 (3)**: 359–366.

## M

**Made I.S. U, Ron B. H.W., Shimshon B.Y. et Clem K. 2002.** *in vitro* efficacy of plant volatiles for inhibiting the growth of fruit and vegetable decay microorganisms. *J. Agric. Food Chem.***50**:6371 6377.

**Mansour F.A. 1994.** Studies On Plant Growth Regulators And Enzymes Production By Some Bacteria", *Qatar University Science Journal*. **14 (2):** 281-288.

**Melanie G.R. 2014.** Mise au point d'une méthode par pyroséquençage de détection et de quantification des mutations liées à la résistance au boscalide chez *Botrytis cinerea*. Mémoire présenté en vue de l'obtention du grade de maître en sciences. Université de Sherbrook. Qubec. Canada. 70p.

**Mengiste T., Laluk K. et Abuqamar S. 2010.** Mechanisms of induced resistance against *B. cinerea*. In Postharvest pathology. Plant pathology in the 21<sup>st</sup> century: Contributions to the 9<sup>th</sup> International Congress. Ed. *Springer*. Dordrecht, the Netherlands. 221p.

**Mikani A., Etebarian H.R., Sholberg P.L., O'Gorman D.T., Stokes S. et Alizadeh A. 2008.** Biological control of apple gray mold caused by *Botrytis mali* with *Pseudomonas fluorescens* strains. *Postharvest Biology and Technology*.**48:** 107–112.

## N

**Naika S., De Jeude J.L., De Goffau M., Hilmi M. et Van Dam B. 2005.** La culture de la tomate : production, transformation et commercialisation. Ed. *Fondation Agromisa et CTA*. Wageningen, Pays-Bas. 105p.

**Narayanasamy P., 2013.** Progress in biological control. Biological management of diseases of crops: Volume 1: Characteristics of biological control agents. Ed. *Springer*. Dordrecht, the Netherlands. 673p.

**Newhook F. J. 1951.** Microbiological control of *Botrytis cinerea* Pers.II. Antagonism by fungi and actinomycetes. *Now Mycologist, Plant Diseases Division*. 185-202.

**Nollet L.M.L. et Rathore H.S. 2015.** Biopesticides handbook. Ed. *CRC PressTaylor & Francis Group*. New York. USA. 281P.

## P

**Parafati L., Vitale A., Restuccia C. et Cirvilleri G. 2015.** Biocontrol ability and action mechanism of food-isolated yeast strains against *Botrytis cinerea* causing post-harvest bunch rot of table grape. *Food Microbiology* .**47:** 85-92.

**Paul B., Girardi I., Bhatnagar T. et Bouchet P. 1997.** Suppression of *Botrytis cinerea* causing grey mould disease of grape vine (*Vitis vinifera*) and its pectinolytic activities by a soil bacterium. *Microbiol. Res.***152:**413-420.

**Peet M.M. et Welles G. 2005.** Greenhouse tomato production. In Heuvelink E. Tomatoes. Ed. *CABI Publishing*. London,UK, 339p.

**Peralta I.E. et Spooner D.M. 2007.** History, Origin and Early Cultivation of Tomato (*Solanaceae*). In Razdan. K. et Mattoo A.K. Genetic improvement of Solanaceous Crops. Tomato. Vol 2. Ed. Science Publishers. Enfield,USA. 637p.

**Poritsanos N., Selin C., Fernando W.G.D., Nakkeeran S. et Kievit T.R. 2006.** A GacS deficiency does not affect *Pseudomonas chlororaphis* PA23 fitness when growing on canola, in aged batch culture or as a biofilm. *Can. J. Microbiol.* **52**: 1177–1188.

**Prins T. W., Tudzynski P., Von Tiedemann A., Tudzynski B., Ten Have A., Hansen M.E., Tenberge K. et Van Kan J.A.L. 2000.** Infection strategies of *Botrytis cinerea* and related necrotrophic pathogens. In Fungal pathology. Ed. Ed. Springer. Dordrecht, the Netherlands. 404p.

## Q

**Qin X., Xiao H., Xue C., Yu Z., Yanga R., Caia Z. et Si L. 2015.** Biocontrol of gray mold in grapes with the yeast *Hanseniaspora uvarum* alone and in combination with salicylic acid or sodium bicarbonate. *Postharvest Biology and Technology.* **100**: 160–167.

## R

**Ramyasmruthi S., Pallavi O., Pallavi S., Tilak K. et Srividya S. 2012.** Chitinolytic and secondary metabolite producing *Pseudomonas fluorescens* isolated from *Solanaceae* rhizosphere effective against broad spectrum fungal phytopathogens. *Asian J. Plant Sci. Res.* **2 (1)**:16-24.

**Rettinassababady C. et Jeyalakshmi C. 2014.** Bio-Fungicides: The best alternative for sustainable food security and ecosystem. *Microbial Diversity and Biotechnology in Food Securit.* **2(35)**: 401-411.

**Robertson L.D. et Labate J.A. 2007.** Genetic resources of tomato (*Lycopersicon esculentum* Mill.) and wild relatives. In Heuvelink E. Genetic improvements of solanaceous crops. Volume 2:Tomato. Ed. Edenbridge Ltd. India, 637p.

**Romanazzi G. et Feliziani E. 2014.** *Botrytis cinerea* (Gray Mold). In Postharvest decay Control Strategies. Ed. Academic Pres. Waltham, USA. 383p.

## S

**Sagahón I.P., Anducho-Reyes M.A., Silva-Rojas H.V., Arana-Cuenca A., Tellez-Jurado A., Cárdenas-Álvarez I.O. et Mercado-Flores Y. 2011.** Isolation of Bacteria with Antifungal Activity against the Phytopathogenic Fungi *Stenocarpella maydis* and *Stenocarpella macrospora*. *Int. J. Mol. Sci.* **12**: 5522-5537.

**Saxena R.K., Sheoran A., Giri B. et Davidson W.S. 2003.** Purification strategies for microbial lipases. *Journal of Microbiological Methods.* **52**: 1–18.

**Schleifer K.H. et Bell J.A. 2009.** Family VIII. *Staphylococcaceae* fam. nov. In De Vos P., Garrity G.M., Jones D., Krieg N.R., Ludwig W, Rainey F.A., Schleifer K-H. et Whitman W.B. Bergey's

manual of systematic Bacteriology. The Firmicutes. Second Edition. Vol 3. Ed. *Springer*. Dordrecht, the Netherlands. 1450p.

**Shao W., Zhang Y., Ren W. et Chen C. 2015.** Physiological and biochemical characteristics of laboratory induced mutants of *Botrytis cinerea* with resistance to fluazinam. *Pesticide Biochemistry and Physiology*. **117**: 19–23.

**Sherwani S.I. et Khan H.A. 2015.** Modes of action of biopesticides. In Nollet L.M.L. et Rathore H.S. Biopesticides handbook. Ed. *CRC PressTaylor & Francis Group*. NW, USA. 302.

**Shternshis M.V., Belyaev A.A., Shpatova T.V. et Lelyak A.A. 2015.** Influence of *Bacillus* spp. on Strawberry Gray Mold Causing Agent and Host Plant Resistance to Disease. *Contemporary Problems of Ecology*. **8(3)**:390–396.

**Shtienberg D. et Elad Y. 1997.** Incorporation of Weather Forecasting in Integrated, biological-chemical management of *Botrytis cinerea*. *Phytopathology*. **87(3)**: 332-340.

**Siripornvisal S. 2010.** Biocontrol efficacy of *Bacillus subtilis* BCB3-19 against Tomato Gray Mold. *Kmitl Sci. Tech. J.***10(2)**: 37-44.

**Someya N., Nakajima M., Hirayaet K., Hibi T. et Akutsu K. 2001.** Synergistic antifungal activity of chitinolytic enzymes and prodigiosin produced by biocontrol bacterium, *Serratia marcescens* Strain B2 against Gray Mold Pathogen, *Botrytis cinerea*. *J. Gen. Plant Pathol.* **67**: 312-317.

**Staats M., Baarlen P.V. et Van Kan J.A. L. 2005.** Molecular phylogeny of the plant pathogenic genus *Botrytis* and the evolution of host specificity. *Mol. Biol. Evol.* **22(2)**:333–346.

**Stockwell V.O. et Stack J.P. 2007.** Using *Pseudomonas* spp. for Integrated Biological Control. *The American Phytopathological Society*. **97(2)**: 244-249.

**Szandala E.S. et Backhouse D. 2001.** Suppression of sporulation of *Botrytis cinerea* by antagonists applied after infection. *Australasian Plant Pathology*.**30**: 165–170.

**Sylla J., Beatrix A.W., Krüger E. et Wohanka W. 2015.** Control of *Botrytis cinerea* in strawberries by biological control agents applied as single or combined treatments. *Eur J Plant Pathol.* 1-11.

## T

**Tabak S. et Bensoltane A. 2012.** L'activité antagoniste des bactéries lactiques (*Streptococcus thermophilus*, *Bifidobacterium bifidum* et *Lactobacillus bulgaricus*) vis-à-vis de la souche *Helicobacter pylori* responsable des maladies gastroduodénales. *Nature & Technologie*. **6** : 71-79.

**Tapadar S.A. et Jha D.K. 2013.** Disease Management in Staple Crops: A Bacteriological Approach. In Maheshwari D.K. Bacteria in Agrobiolgy: Disease Management. Ed. *Springer*. Dordrecht, the Netherlands. 501p

**Tommassen J. et Wösten H-A.B. 2015.** Microbial Cell Surfaces and Secretion Systems. *In In* Lugtenberg B. Principles of Plant-Microbe Interactions. Microbes for Sustainable Agriculture. Ed. Springer. Dordrecht, the Netherlands. 447p.

## W

**Walker A.S. 2013.** Diversité et adaptation aux fongicides des populations de *Botrytis cinerea*, agent de la pourriture grise. *Agricultural sciences*.170p.

**Wang S., Hu T., Jiao Y., Wei J. et Cao K. 2009.** Isolation and characterization of *Bacillus subtilis* EB-28, an endophytic bacterium strain displaying biocontrol activity against *Botrytis cinerea* Pers. *Front. Agric. China*. **3 (3):** 247–252.

**Watterson J.C. 1987.** Diseases. *In* Atherton J.G. et Rudich J. The tomato crop: A scientific basis for improvement. Ed. Chapman and Hall Ltd, London, UK, 661p.

**Webster J et Weber R. 2007.** Introduction to fungi. Ed. Cambridge University Press. Cambridge, UK. 841p.

**Williamson B., Tudzynski B., Tudzynski P. et Van Kan J.A.L. 2007.** *Botrytis cinerea* : the cause of grey mould disease. *Molecular Plant Pathology* **8(5):**561–580.

**Whipps J.M. 1987.** Effect of media on growth and Interactions between a range of soilborne Glasshouse pathogens and Antagonistic fungi. *New Phytol.* **107:**127-142.

## X

**Xue Q.Y., Lib J.Q., Zhengb Y., Dinga X.Y. et Guo J.H. 2013.** Screening tomato-associated bacteria for biological control of grey mold on tomato. *Biocontrol Science and Technology*. **23(3):**245-259.

## Y

**Yang C.J., Zhang X.G., Shi G.Y., Zhao H.Y., Chen L., Tao K. et Hou T.P. 2011.** Isolation and identification of endophytic bacterium W4 against tomato *Botrytis cinerea* and antagonistic activity stability. *Afr. J. Microbiol. Res.* **5(2):**131-136.

## Z

**Zouaoui S.N., Hannachi I., Andurand D., Essghaier B., Boudabous A. et Nicot P. 2008.** Biological control of *Botrytis cinerea* on stem wounds with moderately halophilic bacteria. *World J Microbiol Biotechnol.* **24:**2871–2877.





# ANNEXES

**Annexe I : Les milieux de culture utilisés****Soybean-Casein Digest Agar (1L)**

Caséine .....	15 g
Peptone de Soja .....	5 g
NaCl.....	5 g
Agar .....	15 g
pH.....	7,3

**Milieu PDA (1L)**

Infusion de pomme de terre.....	200 g
Dextrose.....	20 g
Agar.....	15 g
pH.....	5,6

**Gélose nutritive (1L)**

Extrait de viande.....	1,0 g
Extrait de levure .....	2,5 g
Peptone .....	5 g
NaCl .....	5 g
Agar .....	15 g
pH .....	7,3

**Mannitol-Mobilité**

Caséine:.....	10 g
Mannitol:.....	7,5 g
Rouge de phénol:.....	0,04 g
Agar:.....	3,5 g
pH .....	7,6

**Bouillon Clark et Lubs**

Peptone.....	5 g
Glucose.....	5 g
Hydrogénophosphate de potassium.....	5 g
Eau distillée .....	1 L
pH .....	7,5

**Milieu à base de Chitine**

Chitine colloïdale.....	0,6 g
$K_2HPO_4$ .....	2,7 g
$KH_2PO_4$ .....	0,3 g
$MgSO_4 \cdot 7H_2O$ .....	0,7 g
NaCl.....	0,5 g
KCl.....	0,5 g
Extrait de levure.....	0,13 g
Agar.....	15 g
pH.....	7

**Milieu pour étudier l'activité lipolytique**

NaCl.....	10 g
$CaCl_2$ .....	5 g
$2H_2O$ .....	0.1 g
Agar.....	18 g
Ph.....	7,4
Tween 20 (après autoclavage).....	1%

## Annexe II : Utilisation de la cellule Malassez

### I. Objet et domaine d'application

Quantification de la concentration d'une suspension de spores de champignon

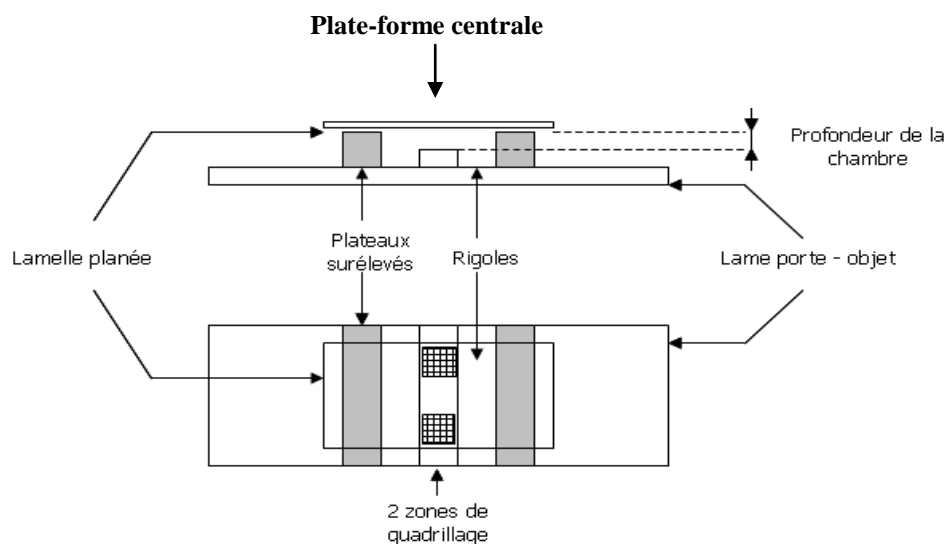
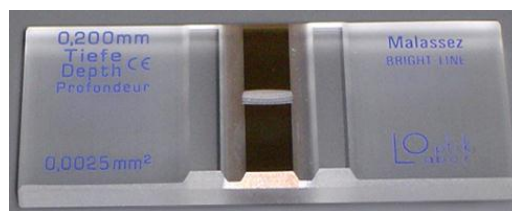
### II. Appareils et matériels

- Microscope
- Compteur
- Micropipettes et cônes
- Tubes d'Eppendorf
- Eau
- Feuille de notation

### III. mode opératoire :

- **Description de la cellule de Malassez**

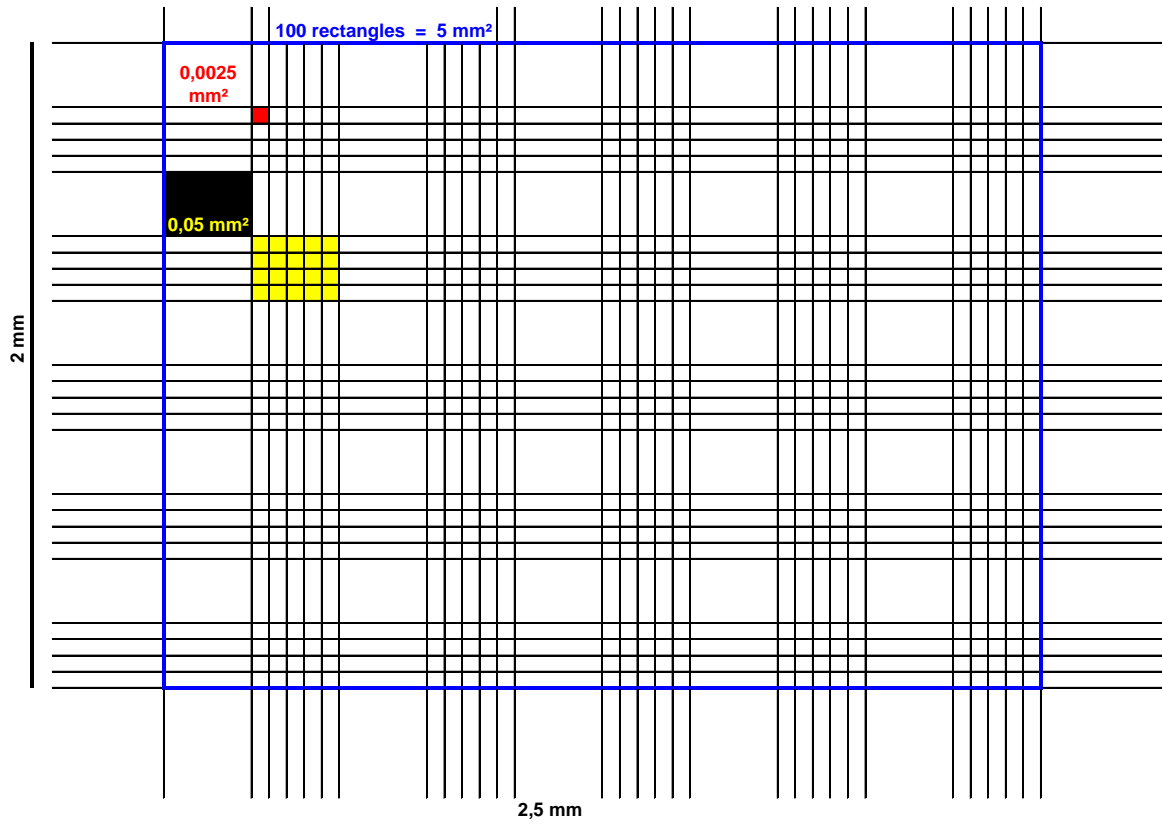
La cellule de numération est une lame épaisse en verre dans laquelle est creusée une chambre de comptage de volume connu. Elle comporte des rigoles et deux zones de quadrillage:



Le volume de comptage est déterminé par :

- la surface du quadrillage gravé sur la lame
- la profondeur de la chambre (0,200 mm)

Les deux zones quadrillées comportent chacune 100 rectangles :



Parmi ces 100 rectangles, 25 sont divisés en 20 petits carrés afin de faciliter le comptage.

→ le volume correspondant au quadrillage total est égal à  $1 \text{ mm}^3 = 1 \text{ }\mu\text{l} = 10^{-3} \text{ ml}$

→ chaque rectangle correspond à un volume 100 fois plus faible, soit  $0,01 \text{ mm}^3 = 10^{-5} \text{ ml}$

- **Dilution préalable de la suspension**

Lorsque la suspension est trop concentrée, il est difficile de compter les spores sur la cellule de Malassez. Il est alors nécessaire de réaliser une dilution préalable. Si tel est le cas, il faut veiller à bien indiquer le taux de dilution sur la feuille de notation.

- **Remplissage de la cellule**

- Humecter les deux plateaux latéraux. Faire adhérer parfaitement la lamelle aux plateaux latéraux : pour cela placer la lamelle sur ces plateaux, puis à l'aide des pouces posés sur la lamelle, exercer une pression sur la lamelle tout en pratiquant un mouvement de va et vient jusqu'à perception d'une résistance.

- Placer la cellule de comptage sur une surface plane. Homogénéiser la suspension cellulaire, et prélever celle-ci à l'aide d'une micropipette. Remplir chacune des deux chambres de comptage par capillarité (deux pipetages indépendants), en plaçant la pointe de la pipette légèrement inclinée près de la lamelle sur la plate-forme centrale quadrillée.

Remarque : Les chambres contiennent environ 17 $\mu$ l de suspension chacune.

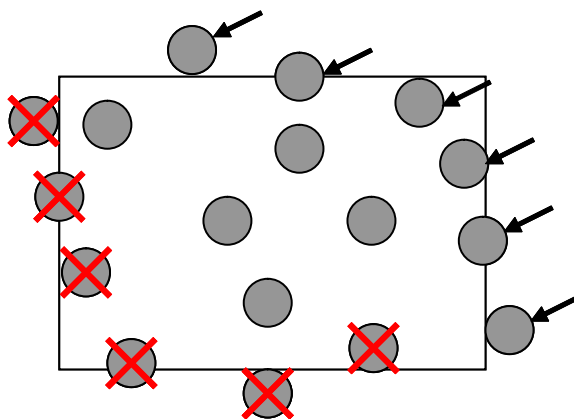
→ Le remplissage doit être fait en une seule fois pour chaque zone, sans bulles d'air, et sans faire déborder le liquide dans les rigoles. Laisser sédimenter les cellules sur le quadrillage quelques minutes, et passer à la numération.

- Après utilisation, la lame porte-objet et la lamelle planée sont rincées avec de l'eau distillée et essuyées avec du papier (sans frotter, en particulier au niveau du quadrillage).

- **Comptage des spores**

- Observer à l'objectif **x10** pour repérer la position du quadrillage, et vérifier l'homogénéité de la répartition des spores à compter (si la répartition est mauvaise, recommencer).
- Observer ensuite à l'objectif **x10** ou **x20** pour réaliser le comptage (1 rectangle par champ).
- Selon la densité de spores observée, compter dans 5, 25 ou dans la totalité des 100 rectangles du quadrillage, pour obtenir un nombre d'au moins 30 spores par comptage.

Remarque : pour les spores chevauchant les lignes de quadrillage, compter seulement celles qui chevauchent 2 arêtes du rectangle sur 4 (en pratique, on choisit de prendre en compte les cellules touchant la ligne horizontale supérieure, et la ligne verticale droite).



**Exemple : numération sur le rectangle = 11 spores**

- Le dénombrement doit être réalisé sur les deux zones de quadrillage de la cellule.

- **Calcul de la concentration**

Après avoir effectué la manipulation, on calcule la concentration C de la suspension.

$$C = N / V \quad \text{Si la suspension avait été diluée: } C = (N / V) \times f$$

- avec :
- N : nombre total de spores comptées
  - V : volume total de comptage (en ml)
  - f : facteur de dilution
  - C : concentration de la suspension en nombre de spores par ml

**En pratique**, si le comptage a été réalisé sur **n** rectangles, la concentration C est égale à:

$$C = (N / n) \times 10^5 \text{ spores / ml, avec } n = \text{nombre de rectangles dénombrés}$$

$$\text{Si la suspension avait été diluée: } (N / n) \times f \times 10^5 \text{ spores / ml}$$



**Annexe III : chronologie des traitements des plantes**

<b>Date</b>	<b>Traitement</b>	<b>Produit</b>
09.02.2015	Fongicide	CURZATE®
11.02.2015	Engrais	FERTIGOFOL®
13.03.2015	Fongicide	VERITA®
15.03.2015	Acaricide	Vertimec®
29.03.2015	Fongicide	VERITA®
31.03.2015	Amendement organique	NPK
03.04.2015	Antimineuse	Singita
05.04.2015	Fongicide	VERITA®

- Ce tableau ne concerne que les traitements que les plantes ont subi après la première opération d'effeuillage

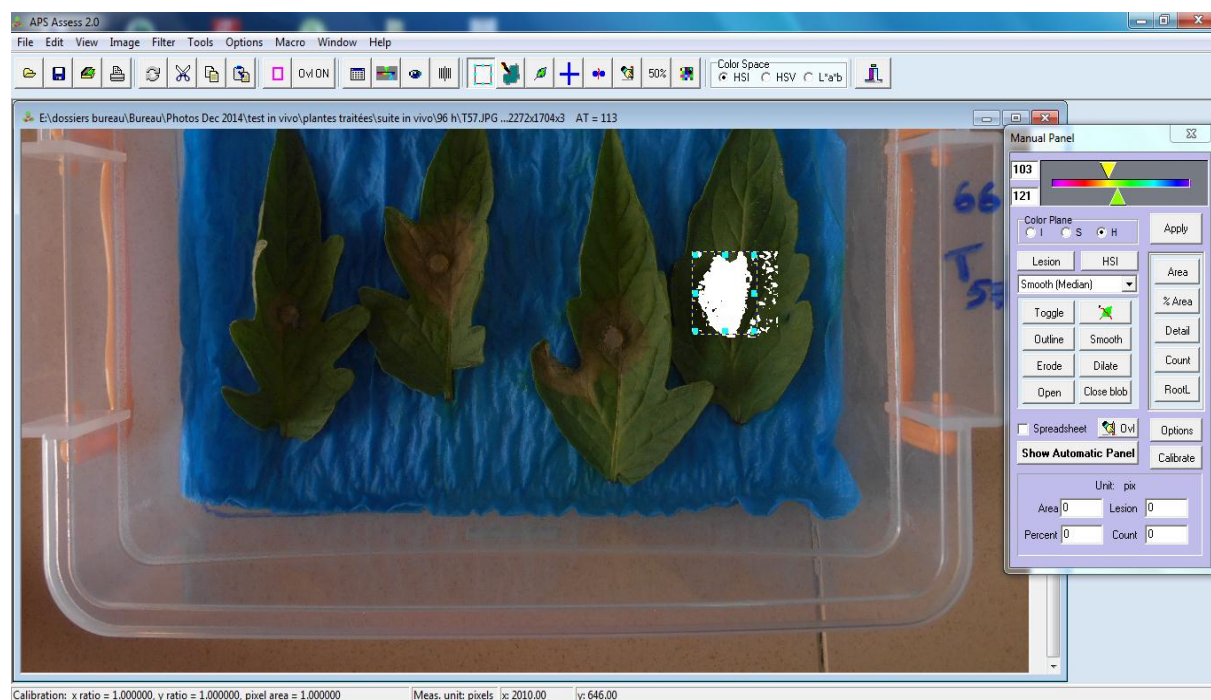
## Annexe IV : Utilisation du logiciel Assess 2.0

Assess est une application d'algorithmes conçue pour l'analyse des images et la mesure de la maladie des plantes.

Il est principalement destiné aux chercheurs qui effectuent régulièrement des mesures de la maladie sur de grands nombres d'échantillons, sans connaissance préalable des notions d'analyse d'images et la programmation informatique.

Le logiciel permet de quantifier les surfaces de lésion provoquées par les maladies. Il faut calibrer les dimensions avant de commencer le traitement et l'analyse.

Toutes les mesures sont fondées sur des objets sélectionnés par l'utilisateur et superposées sur l'image originale. Ce qui est montré à l'écran est ce qui est mesuré.



**Annexe VI : Pourcentages d'inhibition *in vivo* des isolats bactériens****Tableau.** Pourcentages d'inhibition *in vivo* des 30 isolats

<b>Isolat</b>	<b>surface de lésion (mm<sup>2</sup>)</b>	<b>PGI (%)</b>
<b>Témoin</b>	493.473	0
<b>CS1</b>	175.6975	64.3956857
<b>CS2</b>	332.4975	32.6208654
<b>CS7</b>	221.1175	55.1915254
<b>CS9</b>	81.985	83.3861056
<b>CS17</b>	351.51	28.7680671
<b>CT3</b>	218.845	55.6520373
<b>CT6</b>	289.935	41.2459661
<b>CT8</b>	274.83	44.3069269
<b>CT9</b>	482.8	2.1627345
<b>CT12</b>	376.685	23.6664657
<b>CT20</b>	30.1125	93.8978363
<b>CT22</b>	285.4075	42.1634438
<b>M4</b>	188.2925	61.8433651
<b>M6</b>	299.46	39.3157673
<b>M7</b>	310.1275	37.1540461
<b>M9</b>	110.7075	77.5656192
<b>M25</b>	34.38	93.0330464
<b>M32</b>	406.955	17.5323853
<b>M36</b>	95.4375	80.6600165
<b>M42</b>	414.085	16.0875226
<b>T18</b>	84.9775	82.7796888
<b>T23</b>	264.9675	46.3055185
<b>T29</b>	249.2075	49.4992122
<b>T31</b>	280.2725	43.2040286
<b>T33</b>	449.905	8.82875945
<b>T57</b>	196.2425	60.2323331
<b>T75</b>	253.8075	48.5670427
<b>T80</b>	27.185	94.4910811
<b>T83</b>	270.2325	45.2385898
<b>T90</b>	232.605	52.8636348

## Annexe V : Résultats de l'activité antifongique *in vitro* des 132 isolats bactériens envers les deux souches fongiques

**Tableau. Activité antifongique des 132 isolats avant la sélection**

isolats	moyenne des PGI %			isolats	moyenne des PGI %		
	ALG 66	BC 1	BC1 +ALG66/2		ALG 66	BC 1	BC1 +ALG66/2
CT7	0	0	0	M3	0	46.7	23.35
CS17	0	0	0	T20	23.0769231	25.2873563	24.1821397
CS6	0	0	0	T54	32.5133333	16.66	24.5866667
T66	0	0	0	M62	0	49.2333333	24.6166667
M32	0	1.52	0.76	M42	34.1433333	28.57	31.3566667
CS5	0	6.30333333	3.15166667	T76	25.55	26.9233333	26.2366667
CT21	0	8.37438424	4.18719212	CT6	4.06	50.7933333	27.4266667
CS1	0	9.34	4.67	M31	16.3522013	39.93	28.1411006
CT14	9.7	0	4.85	CS2	42.408377	14.18	28.2941885
T30	2.8277635	7.31	5.06888175	CS9	38.9179756	20.7133333	29.8156545
M1	0	10.29	5.145	M41	44.3	15.87	30.085
CS8	12.2333333	0	6.11666667	T40	43.58	18.6566667	31.1183333
CS7	0	15.31	7.655	M28	45.5284553	18.2466667	31.887561
CS4	6.34920635	9.34333333	7.84626984	T44	46.8666667	21.1333333	34
CT10	12.33	3.93333333	8.13166667	T57	34.9533333	33.3066667	34.13
M8	0	18.7866667	9.39333333	M22	45.29	26.63	35.96
M64	0	21.95	10.975	T26	39.8333333	35.7066667	37.77
T19	11.49	10.5066667	10.9983333	T73	40.8366667	34.9766667	37.9066667
T5	13.97	8.04	11.005	T11	47.9666667	30.9466667	39.4566667
T80	4.63	17.88	11.255	M36	43.6507937	37.6770538	40.6639237
T53	0	3.25203252	1.62601626	CT15	0	0	0
CT2	0	49.2385787	24.6192893	CS3	42.408377	41.4366667	41.9225218
CT17	0	24.6266667	12.3133333	M61	47.8566667	36.2	42.0283333
M12	12.6984127	12.1733333	12.435873	T8	47.0866667	37.7966667	42.4416667
M5	16.2533333	8.72666667	12.49	CT9	27.7777778	57.4233333	42.6005556
T74	21.4166667	5.58	13.4983333	T17	39.07	47.1533333	43.1116667
M14	0	27.2333333	13.6166667	T77	40.8366667	45.5266667	43.1816667
M27	12.19	15.0733333	13.6316667	T33	41.72	44.7133333	43.2166667
CT11	0	0	0	T36	39.9533333	47.15	43.5516667
M13	0	ND	ND	CT22	45.026178	42.34	43.683089
M58	12.6984127	16.9066667	14.8025397	CT8	46.7713787	41.44	44.1056894
CS11	26.7015707	4.5	15.6007853	CT20	46.7713787	41.44	44.1056894
CS15	26.3833333	8.04	17.2116667	CT12	48.5165794	40.54	44.5282897
CS14	23.07	12.1466667	17.6083333	T31	41.5992812	47.5433333	44.5713073
T81	22.2433333	17.89	20.0666667	T64	43.9	46.0233333	44.9616667

T82	5.5705301	36.5433333	21.0569317	M17	43.3962264	46.6966667	45.0464465
T85	27.2066667	16.25	21.7283333	T63	43.4566667	48.4066667	45.9316667
M44	45.1931716	46.6966667	45.9449191	T90	63.5555556	64.4874899	64.0215227
T60	45.1931716	47.5433333	46.3682525	M6	65.0366667	67.4533333	66.245
T50	45.1931716	48.3866667	46.7899191	T29	64.4444444	68.5230024	66.4837234
M19	40.8366667	52.8366667	46.8366667	M4	66.6633333	67.4533333	67.0583333
M73	41.72	52.0266667	46.8733333	T28	52.724359	50.5582137	51.6412863
M7	47.1533333	46.8166667	46.985	M53	56.3492063	47.1133333	51.7312698
T58	52.3809524	42.39	47.3854762	M24	52	51.5738499	51.7869249
T1	46.8666667	47.9633333	47.415	M21	53.1746032	51.84	52.5073016
M56	50.7936508	44.28	47.5368254	T92	52.0066667	53.65	52.8283333
T68	45.1931716	50.0766667	47.6349191	M46	58.2222222	49.9596449	54.0909335
T89	45.1931716	50.0766667	47.6349191	M65	54.3269231	54.5454545	54.4361888
M55	46.0916442	49.23	47.6608221	CT3	51.18	57.9333333	54.5566667
T83	46.0916442	49.23	47.6608221	T16	55.5555556	58.0306699	56.7931127
T35	46.9901168	48.3866667	47.6883917	M43	57.5320513	57.7352472	57.6336492
T75	47.0133333	48.78	47.8966667	T25	59.1346154	60.1275917	59.6311035
M66	47.8966667	47.9666667	47.9316667	M9	60.8888889	58.8377724	59.8633306
M18	46.9901168	49.23	48.1100584	T34	59.1111111	61.2590799	60.1850955
M68	47.0133333	49.59	48.3016667	T18	64.7435897	60.1275917	62.4355907
M57	46.0916442	50.9233333	48.5074888	T23	62.3397436	64.1148325	63.2272881
T88	47.8885894	49.23	48.5592947	T14	46.1466667	52.9466667	49.5466667
T62	47.0033333	50.6366667	48.82	T21	46.6666667	53.1880549	49.9273608
T37	47.8885894	50.0766667	48.982628	T2	52.3809524	0	26.1904762
M25	49.5192308	48.9633174	49.2412741	T48	51.89	48.4066667	50.1483333
M54	52.3809524	50.0766667	51.2288095				

## Résumé

Parmi 132 isolats, 30 isolats ont été sélectionnés pour étudier leur antagonisme contre *B. cinerea*. L'effet antagoniste *in vitro* des isolats sur *B. cinerea* a été étudié en utilisant deux souches fongiques ALG66 et BC1. Les activités : chitinolytique, lipolytique et protéolytique des isolats sont étudiées. L'effet *in vitro* des isolats sur la germination des spores et l'effet *in vivo* sont étudiés en utilisant la souche ALG66. Les résultats obtenus montrent que les plupart des isolats appartenant aux deux genres *Bacillus* et *Pseudomonas*, les isolats les plus actifs *in vitro* sur les deux souches fongiques sont : M4, M6, M9, T18, T23, T29, T90 et CT3 avec des PGI supérieurs à 50%. CT9, CT12, M6, M25, T33 et T90 peuvent produire des substances volatiles antifongiques contre les deux souches fongiques avec des PGI variés entre 8,33% et 56,09%. Les isolats : CT3, CT6, M4, M6 et M25 sont les plus actifs sur la germination des spores d'ALG66, ils diminuent le taux de germination de plus de 50%. Seules : CT3, CT22 et M32 sont chitinase positive, 19 isolats sont lipase positive et 22 isolats sont protéase positive. T80, CT20, M25, CS9, T18 et M36 ont un pouvoir inhibiteur *in vivo* sur ALG66 dépassant 80%. T18, M9 et M4 sont les plus actifs sur ALG66 *in vivo* comme *in vitro* avec des PGI dépassant 60%. Les résultats obtenus permettent de sélectionner les isolats les plus actifs *in vivo* comme *in vitro* pour des éventuelles études permettant de les utiliser comme des agents de lutte biologique contre *B. cinerea*.

**Mots clés :** *Botrytis cinerea*. Agent de lutte biologique. Tomate. Lutte biologique

## Abstract

Among 132 isolates, 30 isolates were selected to study their antagonism against *B. cinerea*. The *in vitro* antagonistic effect of isolates against *B. cinerea* was studied using two fungal strains ALG66 and BC1. The chitinolytic, lipolytic and proteolytic activities of isolates were studied. The *in vitro* effect of isolates on spore germination and the *in vivo* effect were studied using ALG66 strain. The obtained results show that the most isolates belonging to *Bacillus* and *Pseudomonas*, the most active isolates *in vitro* on the two fungal strains are: M4, M6, M9, T18, T23, T29, T90 and CT3 with PGI above 50%. CT9, CT12, M6, M25, T33 and T90 can produce antifungals volatiles compounds against the two fungal strains with varying PGI between 8,33% and 56,09%. Isolates: CT3, CT6, M4, M6 and M25 are most active on the spore germination of ALG66; they reduce the germination rate of more than 50%. Only: CT3, CT22 and M32 are positive chitinase, 19 isolates were positive lipase and 22 isolates were positive protease. T80, CT20, M25, CS9, T18 and M36 have an *in vivo* inhibitory power on ALG66 exceeding 80%. T18, M9 and M4 are the most active *in vivo* as *in vitro* against ALG66 with PGI exceeding 60%. The results are used to select the most active isolates *in vivo* as *in vitro* studies allowing for possible use as BAC<sub>s</sub> against *B. cinerea*.

**Keywords:** *Botrytis cinerea*, Biological control agent. Tomato. Biological control

## ملخص

من بين 132 بكتيريا معزولة ، تم اختيار 30 لدراسة قدرتها المضادة ضد بوتريتيس سنيريا. دراسة تأثير البكتيريا المعزولة في المختبر على بوتريتيس سنيريا تمت باستخدام السلالتين الفطريتين ALG66 و BC1. تمت دراسة أنشطة تفكيك الكيتين والبروتين والدهون للبكتيريا المعزولة. السلالة الفطرية ALG66 استخدمت لدراسة تأثير البكتيريا المعزولة على انتشار الأبواغ وكذلك تأثيرها على الفطر فوق وريقات الطماطم. أظهرت النتائج أن أكثرية البكتيريا المعزولة تنتمي إلى الجنس *باسيلوس* و *بسدوموناس* ، البكتيريا الأكثر نشاطا في المختبر على السلالتين الفطريتين هي: M4، M6، M9، T18، T23، T29، T90، و CT3 مع قدرة تثبيط متجاوزة للـ 50%. CT9، CT12، M6، M25، T33 و T90 يمكنها إنتاج مواد طيارة مضادة للسلالتين و مع نسب تثبيط تتراوح بين 8.33% و 56.09%. البكتيريا: CT3، CT6، M4، M6 و M25 هي الأكثر فاعلية على إنتاش أبواغ ALG66، بتقليلها من نسبة الإنتاش بأكثر من 50%. فقط من البكتيريا المعزولة (CT3، CT22، M32) هي كيتيناز موجبة، 19 بكتيريا ليباز موجبة و 22 بكتيريا كانت بروتياز موجبة. T80، CT20، M25، CS9، T18، M36 هي الأكثر تأثير على ALG66 على وريقات الطماطم مع قدرة تثبيط جاوزت الـ 80%. T18، M9 و M4 هي الأكثر نشاطا ضد ALG66 على الوريقات كما في المختبر و بنسب تثبيط تتجاوز الـ 60%. هذه النتائج استخدمت لتحديد السلالات الأكثر نشاطا على الوريقات كما في المختبر لإمكانية السماح باستخدامها كعوامل مكافحة بيولوجية ضد بوتريتيس سنيريا.

**الكلمات المفتاحية :** بوتريتيس سنيريا ، عامل المكافحة البيولوجية. الطماطم. المكافحة البيولوجية