

*République Algérienne Démocratique et Populaire*  
*Ministère de l'enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique*  
Université A. MIRA - Bejaia

Faculté des Sciences et de la Nature et de la Vie  
Département de Micobiologie  
Filière : Sciences biologiques  
Option : Micobiologie de l'environnement



Réf :.....

Mémoire de Fin de Cycle  
En vue de l'obtention du diplôme

**MASTER**

***Thème***

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

Présenté par :

**Laouar Samiya**

Soutenu le : **16 Juin 2015**

Devant le jury composé de :

Mr KECHA Mouloud  
Mr AISSAT Kamel  
Mr LADJOUZI Rachid  
Melle Bouaoud Yousra

Professeur    President  
MCA            Encadreur  
MAA            Examineur  
Doctorante    Copromotrice

**Année universitaire : 2014 / 2015**



# Remerciement

Avant tout, je tiens à remercier Dieu le tout puissant, pour  
m'avoir donné la force et la patience.

Je tiens particulièrement à remercier Monsieur AISSAT. K pour  
m'avoir fait l'honneur d'être mon promoteur, de m'avoir fait  
confiance, m'avoir encouragé et conseillé tout en me laissant une  
grande liberté. Pour son soutien et sa grande générosité

Je tiens à remercier les membres de jury d'avoir accepter  
d'examiner mon travail

Je tiens également à exprimer ma reconnaissance et ma  
sincère gratitude à tous les enseignants qui nous ont accompagnés  
durant ce cursus universitaire.

Je tiens particulièrement à remercier Monsieur Zemmouri. M  
pour m'avoir accueilli au sein de l'exploitation agricole de Tichy,  
pour son aide technique, sa gentillesse et sa grande disponibilité  
et confiance.

Merci à tous mes collègues du laboratoire en particulier (Yousra,  
Hamid, Fatima et Souhila), pour m'avoir encouragé et aidé et  
pour les bons moments passés ensemble.

Merci à a toute personne ayant contribué à l'élaboration de ce  
travail





# *Dédicaces*

*J'ai le plaisir de dédier ce travail à :*

*Mes chers parents*

*A mes frères et mes Sœurs.*

*A Yousra et Hamid*

*A tous mes amis : Nawal, Halima, vida*

*et Djidji*

*Et à toute la promotion de*

*Micobiologie.*

**SAMIYA**

# Liste des figures

<b>Figure 1:</b> Symptômes de la pourriture grise causés par <i>Botrytis cinerea</i> sur tomate .....	06
<b>Figure 2:</b> Cycle de développement de <i>Botrytis cinerea</i> .....	07
<b>Figure 3:</b> Préparation des plantes de tomates .....	12
<b>Figure 4:</b> Test de confrontation direct <i>in vitro</i> .....	15
<b>Figure 5:</b> Test de confrontation à distance <i>in vitro</i> .....	16
<b>Figure 6:</b> Test de détermination de l'activité chitinasique .....	17
<b>Figure 7:</b> Test d'antagonisme <i>in vivo</i> .....	18
<b>Figure 8:</b> Effet <i>in vitro</i> des isolats bactériens sur la croissance mycélienne d'ALG66.....	23
<b>Figure 9:</b> Effet <i>in vitro</i> des isolats bactériens sur la croissance mycélienne de BC1 .....	24
<b>Figure 10:</b> Etude comparative de l'effet antagoniste <i>in vitro</i> sur ALG66 et BC1.....	25
<b>Figure 11:</b> Effet des substances volatiles sur ALG66 .....	27
<b>Figure 12:</b> Effet des substances volatiles sur BC1 .....	27
<b>Figure 13:</b> Effet comparative de l'effet des substances volatiles sur ALG66 et BC1 .....	28
<b>Figure 14:</b> L'activité chitinasique de certains isolats .....	30
<b>Figure 15:</b> Effet antagoniste <i>in vivo</i> des isolats bactériens sur ALG66.....	31
<b>Figure 16:</b> Etude comparative de l'effet antagoniste <i>in vitro</i> et <i>in vivo</i> des isolats bactéries vis-à-vis à d'ALG66 .....	33

# Liste des tableaux

<b>Tableau I:</b> Classification de la tomate.....	03
<b>Tableau II:</b> Classification de <i>Botrytis cinerea</i> .....	05
<b>Tableau III:</b> Souches de <i>Botrytis cinerea</i> étudiées .....	11
<b>Tableau IV:</b> Isolats bactériens testés.....	11
<b>Tableau V:</b> Résultats de l'étude macroscopique et microscopique.....	20
<b>Tableau VI:</b> Résultats des tests biochimiques des isolats bactériens .....	21
<b>Tableau VII:</b> Résultats de l'identification des isolats bactériens .....	22
<b>Tableau VIII:</b> Résultats de test ANOVA à deux facteurs.....	25
<b>Tableau IX:</b> Résultats de l'activité chitinasique .....	29

# *Glossaire*

# Glossaire

**Anamorphe** : Forme asexuée d'un champignon, appelé aussi « stade imparfait », aboutissant à la formation de conidies.

**Apothécies** : Structure en forme de disque ou de trompette sur laquelle se forment des ascospores chez les ascomycètes.

**Ascomycète** : Groupe de champignons produisant leur spore sexuée, les ascospores, par l'intermédiaire d'asque.

**Ascospores** : Spore issue de la reproduction sexuée chez les Ascomycètes, se formant à l'intérieur d'un asque.

**Biosurfactants** : Molécules tensioactives produites par certains micro-organismes.

**Chancre** : Lésion nécrotique plus ou moins localisée.

**Chlamydospores** : spores à paroi épaisse. Cette paroi épaisse leur permet de subsister sur le sol ou dans les débris végétaux en décomposition.

**Chitinases** : Enzymes hydrolitiques qui s'attaquent aux liaisons glycosidiques des molécules de chitine.

**Chitine** : Polysaccharide azoté issu de la polymérisation de N-acétylglucosamine liés entre eux par une liaison osidique du type (1,4).

**Conidies** : Spore issue de la multiplication asexuée et formée à l'extrémité d'un conidiophore.

**Conidiophore** : Hyphe spécialisé sur lequel se forment une ou plusieurs conidies.

**Cutinases** : Enzymes de la famille des hydrolases, notamment ceux agissant sur les liaisons ester d'acide carboxylique.

**Epidémiologie** : Etude de l'apparition, du développement et de la dispersion d'une maladie en relation avec l'environnement.

**Hétérocaryon** : Cellule multinucléé qui contient génétiquement différents noyaux.

**Lycopène** : Tétraterpène de la famille des caroténoïdes, plus précisément des carotènes. C'est un pigment liposoluble rouge que l'on trouve surtout dans la tomate mais également dans d'autres fruits rouges.

**Mycélium** : La partie végétative des champignons. Il est composé d'un ensemble de filaments, plus ou moins ramifiés, appelés hyphes.

**Nécrotrophique** : Mode de vie en parasite d'une plante vivante causant ainsi sa mort. Par la suite, il devient plutôt saprophyte et décompose les tissus morts.

**Polyphage** : Un pathogène pouvant avoir plusieurs organismes hôtes

**Phéromones** : Sont des substances chimiques comparables aux hormones, émises par la plupart des animaux et certains végétaux.

**PGPR** : Bactéries rhizosphériques bénéfiques à la croissance et à la santé des plantes.

**Sclérotés** : Masse compacte de mycélium aggloméré, souvent de couleur brune à noire, adaptée à la survie en conditions défavorables.

**Sclerotinia** : c'est un genre de champignon de la famille des *Sclerotiniaceae*.

**Téléomorphe** : Forme sexuée d'un champignon, appelée aussi « stade parfait », aboutissant après fusion nucléaire à la formation d'ascospores.

**Ubiquiste** : Un organisme qui peut se trouver en plusieurs endroits à la fois.

# *Sommaire*

# Sommaire

Liste des figures

Liste des tableaux

Glossaire

**Introduction** ..... 01

## Synthèse bibliographique

I. Généralités sur la tomate.....	03
I.1. Classification.....	03
I.2. Intérêts de la culture de tomate .....	03
I.2.1. Alimentation humaine.....	03
I.2.2. Phytothérapie .....	04
II.3. Importance économique de la plante .....	04
II. <i>Botrytis cinerea</i> agent de la pourriture grise de la tomate.....	05
II.1. Taxonomie et diversité génétique.....	05
II.2. Symptômes .....	06
II.3. Cycle biologique et épidémiologie .....	06
II.4. Facteurs influençant le développement de <i>B.cinerea</i> .....	07
III. Méthodes de lutte contre <i>Botrytis cinerea</i> .....	08
III.1. Pratiques culturales.....	08
III.2. Lutte chimique.....	08
III.3. Lutte biologique .....	09
III.3.1. Description des agents de lutte biologique.....	09
III.3.2. Mécanismes d'action des microorganismes impliqués dans la lutte biologique.....	09
III.3.2.1. Antibiose .....	09

III.3.2.2. Compétition .....	09
III.3.2.3. Hyperparasitisme et production d'enzymes hydrolytiques .....	10
III.3.2.4. Renforcement de la capacité défensive de la plante .....	10
III.3.2.5. Interférence avec le pouvoir pathogène.....	10
III.3.2.6. Modification des propriétés de surface des plantes.....	10

## **Matériels et méthodes**

I. Matériel biologique .....	11
I.1. Matériel fongique .....	11
I.2. Isolats bactériens .....	11
I.3. Matériel végétal.....	11
II. Méthodes .....	13
II.1. Caractérisation bactérienne .....	13
II.1.1. Etude des caractères morphologiques .....	13
II.1.1.1. Aspect macroscopique .....	13
II.1.1.2. Aspect microscopique.....	13
II.1.2. Etude des caractères biochimique .....	13
II.1.2.1. Test de catalase .....	13
II.1.2.2. Test d'oxydase .....	14
II.1.2.3. Milieu Clark et Lubs .....	14
II.1.2.4. Milieu Mannitol-mobilité .....	14
II.1.2.5. Utilisation des sucres .....	14
II.1.2.6. Production d'indole .....	15
II.2. Evaluation de l'effet antagoniste <i>in vitro</i> des isolats bactériens .....	15
II.2.1. Effet sur la croissance mycélienne par confrontation directe .....	15
II.2.2. Effet sur la croissance mycélienne par confrontation à distance.....	16
II.2.3. Détermination de l'activité chitinasique .....	17

II.3. Evaluation de l'effet antagoniste <i>in vivo</i> des isolats bactériens.....	17
II.4. Analyse statistique .....	19

## **Résultats et discussion**

I. Résultats de la caractérisation des isolats bactériens .....	20
I.1. Résultats de l'étude macroscopique et microscopique. ....	20
I.2. Résultats des tests biochimiques .....	21
II. Evaluation de l'effet antagoniste <i>in vitro</i> des isolats bactériens.....	23
II.1. Effet sur la croissance mycélienne par confrontation directe .....	23
II.1.1. Effet sur la croissance mycélienne d'ALG66 .....	23
II.1.2. Effet sur la croissance mycélienne de BC1 .....	24
II.1.3. Comparaison de l'effet des isolats bactériens sur la croissance mycélienne des deux souches fongiques.....	24
II.2. Effet sur la croissance mycélienne par confrontation à distance .....	26
II.2.1. Effet sur la croissance mycélienne d'ALG66. ....	26
II.2.2. Effet sur la croissance mycélienne de BC1.....	27
II.2.3. Comparaison de l'effet des composés volatiles sur les deux souches fongiques 28	
II.3. Détermination de l'activité chitinasique. ....	29
III. Evaluation de l'effet antagoniste <i>in vivo</i> des isolats bactériens .....	31
IV. Comparaison entre l'activité antagoniste <i>in vivo</i> et <i>in vitro</i> .....	33
<b>Conclusion</b> .....	35

## **Références bibliographiques**

## **Annexes**

# *Introduction*

## Introduction

Les interactions des champignons avec les plantes sont d'une grande diversité. Certaines sont bénéfiques mais beaucoup sont nuisibles en raison des maladies qu'elles engendrent (**Esquerré-Tugayé, 2001**). Les maladies des plantes, et particulièrement celles provoquées par les champignons, sont signalées depuis fort longtemps (**Rapilly, 2001**). *Botrytis cinerea* est l'un des champignons phytopathogènes les plus répandus mondialement et dont les incidences sur les cultures sont les plus graves; il affecte de nombreuses productions végétales d'importance économique en culture sous serre ou en plein champ sur lesquelles il provoque la pourriture grise (**Benito et al., 2000; Ten Have et al., 2001; Elad et al., 2007**). Ce champignon est observé sur tomate dans pratiquement toutes les zones de production dans le monde où il peut être à l'origine de dégâts ponctuellement importants (**Blancard et al., 2009**). En Algérie, *Botrytis cinerea* est considérée comme l'une des principales pathologies sur tomate (**Aissat et al., 2008; Adjebli et al., 2015**).

Le contrôle de la pourriture grise se base principalement sur l'usage des fongicides. La prescription à grande échelle de ces produits phytosanitaires a entraîné la sélection de souches résistantes (**Leyva et al., 2008**). Plusieurs auteurs ont affirmé que l'utilisation inconsidérée des fongicides a d'autres conséquences néfastes sur l'environnement et la santé (**Tucci et al., 2011; Glare et al., 2012**), notamment la réduction de la biodiversité (**Soylu et al., 2010**), la destruction des organismes utiles (**Caron et al., 2002; Naika et al., 2005**) et la perte de la qualité et de la sécurité des aliments (**Robinson-Boyer et al., 2009**). Cela justifie les recherches actuellement menées dans ce domaine, qui tendent à mettre au point de nouvelles méthodes de lutte moins nuisibles pour l'environnement (**Dal Bello et al., 2011; Ronseaux et al., 2013**).

De nos jours, l'utilisation des agents de lutte biologique en phytopathologie a reçu un grand intérêt dans l'agriculture; De nombreux travaux se sont intéressés à l'étude de ces agents pour surmonter les problèmes de résistance et des effets secondaires associés aux fongicides, un grand nombre de bactéries et de champignons antagonistes de *Botrytis cinerea* ont ainsi été mis en évidence mais les résultats les plus intéressants et les plus solidement établis ont été obtenus avec des *Trichoderma spp* (**Caron et al., 2002; Bardin et al., 2008; Kohl et al., 2011**).

L'objectif de notre travail est la recherche de nouveaux agents de lutte biologique. La première étape de cette démarche est un screening de l'effet antagoniste des isolats bactériens isolés dans le milieu agricole.

Pour cela nous avons opté pour la méthodologie suivante :

- Caractérisation des isolats bactériens étudiés;
- Mise en évidence de l'effet antagoniste « *in vitro* » des isolats bactériens;
- Etude « *in vivo* » de l'effet antagoniste des isolats bactériens.

# *Synthèse bibliographique*

## I. Généralités sur la tomate

La tomate est une plante herbacée de la famille des solanacées, originaire des Andes d'Amérique du Sud (Naika et al., 2005). Traditionnellement, classée parmi les légumes, la tomate est aussi un fruit au sens botanique du terme, c'est une baie (fruit de type charnu) (Bénard et al., 2015). Elle présente une très grande variabilité au niveau phénotypique en particulier en ce qui concerne les caractéristiques du fruit (formes, couleurs et goûts) et elle est cultivée sous des latitudes et des climats très divers, y compris les régions relativement froides grâce au développement des cultures sous abri (Watterson, 1987; France, 2002; Tam et al., 2006; Kirankumar, 2007; Chougourou et al., 2012).

### I.1. Classification

Les botanistes modifièrent à plusieurs reprises les noms de genre et d'espèce attribués à la tomate, à savoir : *Solanum esculentum*, *S. lycopersicum*, *Lycopersicon lycopersicum*... Le nom finalement retenu jusqu'à très récemment, *Lycopersicon esculentum* Mill., qui a été attribué par Philip Miller en 1754. Le nom de genre « *Lycopersicon* » est gréco-latin, il signifie « pêche de loup ». Le nom d'espèce « *esculentum* » vient du latin et veut dire « comestible » (Blancard et al., 2009).

**Tableau I : Classification de la tomate (Cronquist, 1981, Gaussen et al., 1982)**

<b>Règne</b>	Plantae	<b>Sous-classe</b>	Asteridae
<b>Sous règne</b>	Trachenobionta	<b>Ordre</b>	Solanales
<b>Embranchement</b>	Magnoliophyta	<b>Genre</b>	<i>Solanum ou Lycopersicon</i>
<b>Classe</b>	Magnoliopsida	<b>Espèce</b>	<i>Lycopersicon esculentum</i> Mill

### I.2. Intérêts de la culture de tomate

#### I.2.1. Alimentation humaine

Les fruits de tomate, sont très largement consommés sous différentes formes soit crue, soit cuite, ou comme un produit transformé. La tomate répond bien aux attentes nutritionnelles de l'organisme car elle est relativement pauvre en calories (environ 15 calories pour 100 g) mais riche en eau (93 et 95%) et en éléments minéraux (potassium, calcium, magnésium, phosphore et autres). Elle est également une excellente source des vitamines A, C, et E. La tomate contient aussi une quantité non négligeable d'acides aminés essentiels, sucres, fibres alimentaires et antioxydants surtout le précieux lycopène (Fagbohoun et Kiki, 1999 ; France, 2002 ; Naika et al., 2005).

### **I.2.2. Phytothérapie**

Plusieurs études associent la consommation de tomates à une réduction des risques de contracter des cancers et des maladies cardiovasculaires. L'OMS (2002), estime qu'une consommation suffisante de ces fruits réduirait l'incidence des maladies cardiaques de 31%, celle des accidents vasculaires cérébraux de 11% et celle des cancers gastro-intestinaux de 20% à 30% (**Chougourou et al., 2012**).

### **I.3. Importance économique de la plante**

La tomate est devenue un des légumes les plus importants du monde. Comme c'est une culture à cycle assez court qui donne un haut rendement, elle a de bonnes perspectives économiques et la superficie cultivée s'agrandit de jour en jour (**Naika et al., 2005**). La consommation par individu, que ce soit en tomates fraîches ou transformées, ne cesse pas d'augmenter à l'échelle mondiale. Dans le monde entier, la tomate occupe la deuxième place après la pomme de terre, que ce soit dans la production ou la consommation. Elle est estimée à plus de 12Kg par habitant et par an. Les pays méditerranéens sont de gros consommateurs et cela en toutes saisons (**Blancard et al., 2009**).

En Algérie, les cultures maraichères occupent une superficie très importante, estimée à 363 030 ha en 2005, et à 372 096 ha en 2006. La tomate représente 5,62% de la production maraichère nationale (**Chougar et Medjdoub-Bensaad, 2014**).

Compte tenu de son importance économique, la tomate est l'objet de nombreuses recherches scientifiques et est considérée comme une plante modèle en génétique (**Sharifova et al., 2013**).

## II. *Botrytis cinerea* agent de la pourriture grise de la tomate

*Botrytis cinerea* est un champignon nécrotrophe et ubiquiste, il attaque une large gamme de plantes (plus de 200 espèces de plantes dicotylédones et monocotylédones) à n'importe quel stade de leur développement ainsi qu'en période de stockage causant ainsi des pertes économiques importantes sur les cultures avant et après récolte. Sur la tomate, *B. cinerea* cause la pourriture grise des feuilles, des pétioles, des tiges et des fruits sous serre et en plein champ (Hmouni et al., 2003 ; Adrian et Jeandet, 2012 ; Mouria et al, 2013).

### II.1. Taxonomie et diversité génétique

*Botrytis cinerea* est la forme asexuée (anamorphe) de téléomorphe *Botryotinia fuckeliana* (la forme sexuée) (Romanazzi et Feliziani, 2014). *Botrytis* a été reconnu comme un genre par Micheli en 1729, au début il a été parfois confondu avec *Sclerotinia* spp. Mais des précisions ont été apportées et la confusion a été dissipée (Elad et al., 2007). La classification commune du genre *Botrytis* est largement basée sur les caractères morphologiques et, dans une moindre mesure, sur la physiologie et la gamme d'hôtes, récemment, une classification du genre a été faite sur la base de données de séquences d'ADN de trois gènes codant des protéines nucléaires (Romanazzi et Feliziani, 2014).

**Tableau II** : Classification de *Botrytis cinerea* (Manzoor, 2013 ; Romanazzi et Feliziani, 2014)

Forme	Forme sexuée	Forme asexuée
Règne	Fungi	Fungi
phylum	Ascomycètes	Deutéromycètes
Classe	Léotiomycètes	Hyphomycètes
Ordre	Helotiales	Moniliales
Famille	<i>Sclerotiniaceae</i>	<i>Moniliaceae</i>
Genre	<i>Botryotinia</i>	<i>Botrytis</i>
Espèce	<i>Botryotinia fuckeliana</i>	<i>Botrytis cinerea</i>

De nombreuses études ont rapporté que ce champignon présente une grande diversité phénotypique et génétique; cette grande diversité pourrait s'expliquer par la nature multi-nucléée et hétérocaryotique du champignon, une partie de cette variation peut également être due à l'activité des éléments transposables (Martinez et al., 2003 ; Decognet et al., 2009).

Giraud et al. (1997, 1999) ont signalé que *B. cinerea* peut être divisé en deux sous-populations sympatriques caractérisées par la présence d'éléments transposables. Un groupe

d'isolats « *transposa* » contient les éléments transposables *Boty* et *Flipper*, l'autre « *vacuma* » ne les possède pas (Martinez et al., 2003, Fekete et al., 2012).

## II.2. Symptômes

*Botrytis cinerea* peut attaquer tout les organes aériens de la tomate, à tout moment de son développement (Blancard et al., 2009). La manifestation des symptômes est caractéristique. En effet, un feutrage grisâtre apparaît sur les feuilles, les tiges mais aussi les fruits, accompagné par des tâches marrons/brunes ainsi que des tâches en anneaux concentriques, des tâches ou des auréoles blanches appelées tâches fantômes peuvent aussi apparaître sur les fruits (Grierson et Kader, 1986 ; Watterson, 1986 ; Koike et al., 2007).

*Botrytis cinerea* colonise la tomate de diverses manières: Il peut directement pénétrer la cuticule d'une foliole ou d'un fruit, profiter de la présence d'une blessure d'ébourgeonnage sur une tige ou de diverses bases nutritives potentielles, comme des pièces florales sénescents ou divers débris végétaux. En outre, une fois qu'il a envahi un tissu, il fructifie très rapidement sous la forme d'une moisissure grise plus ou moins dense constituée de nombreux conidiophores et conidies ; la transmission par le contact du malade avec les parties saines se produit fréquemment (Blancard et al., 2012).

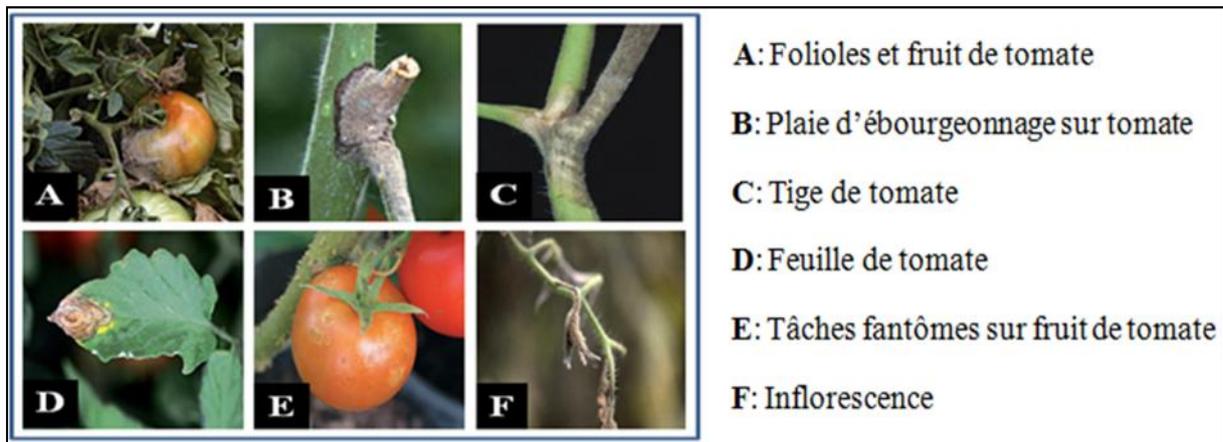
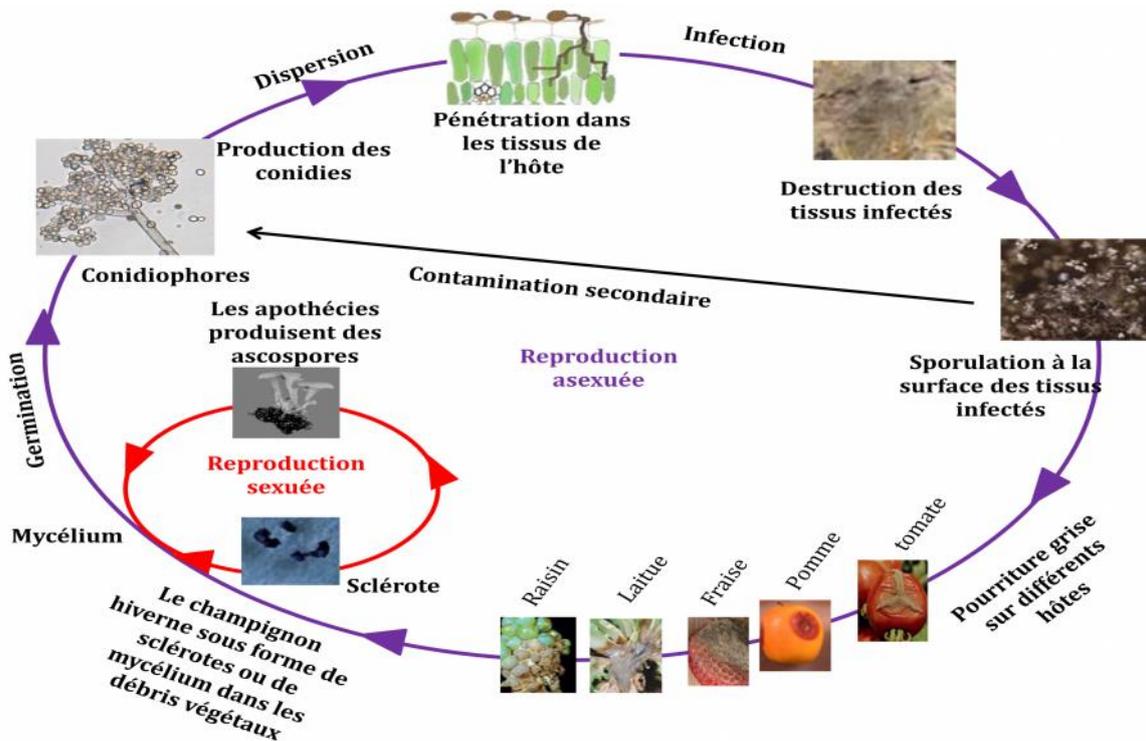


Figure 1 : Symptômes de la pourriture grise causés par *Botrytis cinerea* sur tomate (Blancard et al., 2012 ; Koike et al., 2007)

## II.3. Cycle biologique et épidémiologie

*B.cinerea* existe dans différents habitats sous plusieurs formes : mycélium, conidies (macro et microconidies), chlamydospores, sclérotés, apothécies et ascospores. Lorsque les conditions environnementales sont particulièrement défavorables à son développement, il se conserve sous forme mycélienne dans les débris végétaux ou sous forme de sclérotés (Amselem et al., 2011 ; Romanazzi et Feliziani, 2014). Au printemps, lorsque les conditions climatiques redeviennent favorables, les sclérotés germent à travers l'émission de

conidiophores (reproduction asexuée) ou, après un processus sexuel, l'allongement d'une apothécie. Cependant, le mode le plus fréquent de germination est la production des conidiophores. Dans le cycle de la reproduction sexuée de *B. cinerea*, un grand nombre de microconidies sont observées (Romanazzi et Feliziani, 2014).



**Figure 2 :** Cycle de développement de *Botrytis cinerea* (Agrios, 2005 modifié)

Lors de l'infection, de nouvelles spores vont être produites pouvant mener à une infection secondaire d'autres plantes. La libération des conidies est favorisée par un climat humide et elles sont transportées par le vent, la pluie et les insectes (Holz *et al.*, 2007). Au cours d'une saison, plusieurs cycles peuvent être accomplis : la maladie est dite polycyclique (Williamson *et al.*, 2007).

#### II.4. Facteurs influençant le développement de *B. cinerea*

Les facteurs climatiques, en particulier l'hygrométrie, ont un rôle important sur le développement de la maladie en favorisant la germination des conidies. *Botrytis cinerea* est aussi un parasite de blessures ; si l'inoculum est présent, les facteurs favorisant les attaques sont en particulier les nécroses et les plaies. Enfin *Botrytis cinerea* est un parasite de faiblesse ; toutes les opérations qui provoquent un affaiblissement de la plante (changements climatiques, fertilisation,...) peuvent favoriser les attaques et le développement du champignon (Remuson *et al.*, 2014).

### III. Méthodes de lutte contre *Botrytis cinerea*

La lutte contre la pourriture grise repose principalement sur l'utilisation de traitements chimiques mais également sur des stratégies de lutte culturale, récemment de nombreux travaux ont été effectués pour mettre en place et développer des stratégies de lutte biologique efficaces.

#### III.1. Pratiques culturales

Les pratiques culturales limitant les effets de la pourriture grise sont diverses et souvent spécifiques à des espèces particulières (**Williamson et al., 2007**). Les épidémies causées par *B.cinerea* sont initiées en grande partie par les conidies produites localement à l'intérieur de la culture, le champignon infecte ainsi les différentes parties de la plante, l'élimination des restes végétaux (les feuilles sénescents et les organes infectés) est une pratique culturale de base qui pourrait réduire l'importance de l'inoculum (**Miller et Jevess, 1979; Bristow et al., 1986 ; Sutton, 1990 ; Richard et Boivin, 1994**). La réduction de l'intensité de lumière dans les tunnels plastiques pourrait également réduire l'infection et la sporulation de *B.cinerea* (**Nicot et al., 1996**). Les méthodes culturales qui assurent la ventilation et le séchage du couvert végétal après la pluie, tout en maintenant l'approvisionnement en eau adéquat pour les racines, sont aussi des moyens efficaces pour la prévention des épidémies de *B.cinerea* (**Elad et Shtienberg, 1995**).

L'effeuillage dans les cultures de légumes, peuvent réduire l'infection par *B. cinerea*, dans les cultures sous serres, l'effeuillage au ras de la tige sans laisser de fragments de pétioles, diminue significativement l'incidence des chancre de la tige, même sous une pression élevée de la maladie (**Decognet et al., 2010**).

D'autre part, il à été démontré que l'irrigation par goutte à goutte réduit considérablement le développement de pourriture sur tige de tomate (**Aissat et al., 2008**).

#### III.2. Lutte chimique

En absence de variétés de tomates résistantes à *B.cinerea*, le contrôle de la pourriture grise est basé sur l'usage répété de fongicides, principalement des benzimidazoles et des dicarboximides, qui n'empêchent pas des pertes considérables de rendement, surtout en cultures abritées (**Hmouni et al., 2003**). Malgré cette diversité et la limitation d'utilisation de chaque famille chimique à une application par saison, des souches de *B. cinerea* résistantes à la quasi-totalité de ces fongicides ont été décelées, le coût élevé de ces derniers, leurs effets sur l'environnement et leur incompatibilité avec l'agriculture durable ont fait que leur utilisation est devenue de plus en plus interdite et l'intérêt pour d'autres alternatives a ainsi augmenté (**Mouden et al., 2010 ; Mouria et al., 2013**).

### **III.3. Lutte biologique**

La lutte biologique peut être définie comme étant l'utilisation d'organismes vivants pour supprimer un ravageur pathogène sans avoir d'activité néfaste pour la plante. Ces agents naturels sont réunis sous le concept de biopesticides (**Lepoivre, 2003**).

#### **III.3.1. Description des agents de lutte biologique**

Les biopesticides ou agents de lutte biologique, peuvent être définis comme des produits phytosanitaires dont le principe actif est un organisme vivant ou l'un de ses dérivés. Ils peuvent donc être constitués d'organismes (plantes, insectes, nématodes) ou de micro-organismes (bactéries, levures, champignons, virus) exerçant une activité protectrice sur les plantes vis-à-vis d'agents phytopathogènes, mais aussi de substances d'origine naturelle telles que des extraits végétaux, phéromones, etc. (**Thakore, 2006**).

Les méthodes biologiques sont celles qui offrent le plus de solutions véritables et durables, principalement en raison de leur automatisme, de leur variété, de leur spécificité, de leur compatibilité intrinsèque avec la nature et de leur capacité d'évoluer avec et sans intervention humaine directe (**Vincent et coderre, 1992**).

Une meilleure application d'un agent efficace de la lutte biologique nécessite une bonne compréhension des mécanismes qu'il utilise et les molécules qu'il sécrète pour inhiber les agents phytopathogènes (**Alabouvette et al., 1993**).

#### **III.3.2. Mécanismes d'action des microorganismes impliqués dans la lutte biologique :**

Les microorganismes peuvent exercer une activité antagoniste selon différents mécanismes, un microorganisme donné peut exercer une activité antagoniste en utilisant plusieurs mécanismes à la fois (**Edwards et Seddon, 1992**).

##### **III.3.2.1. Antibiose**

L'antibiose est définie comme « l'inhibition d'un organisme par le produit métabolique d'un autre organisme » (**Cook et Baker, 1974**). Les produits métaboliques sont de différentes natures et sont classés en deux catégories selon leur volatilité (Composés volatils et composés non-volatils) (**Fernando et al., 2006**).

##### **III.3.2.2. Compétition**

La compétition consiste en « la consommation ou le contrôle de l'accès à une ressource comme les nutriments, l'espace ou tout autre facteur dont la disponibilité est limitée » (**Widden, 1994**).

### III.3.2.3. Hyperparasitisme et production d'enzymes hydrolytiques

Certains microorganismes sont des hyperparasites et interviennent directement sur le phytopathogène en le parasitant (**Montesinos et al., 2009**). Elles peuvent sécréter des enzymes dégradant les parois cellulaires des agents pathogènes comme les protéases, les chitinases et les glucanases (**Woo et Lorito, 2007**), ces dernières sont d'une importance majeure car la chitine et les  $\alpha$ -1,3-glucanes sont des composants majeurs de la paroi cellulaire de plusieurs champignons (**Sietsrna et Wessel, 1979**).

### III.3.2.4. Renforcement de la capacité défensive de la plante

Certaines bactéries bénéfiques notamment les PGPR (**Plant Growth Promoting Rhizobacteria**) peuvent protéger les plantes d'une façon indirecte par la stimulation de mécanismes de défense inductibles dans la plante, ce qui peut rendre l'hôte beaucoup plus résistant à l'agression future par des agents pathogènes. Ce phénomène a été nommé «résistance systémique induite» (ISR, Induced Systemic Resistance) (**Van Loon et al., 1998; Pieterse et al., 2002**).

### III.3.2.5. Interférence avec le pouvoir pathogène

Les agents de protection biologique peuvent interférer avec les facteurs du pouvoir pathogène en inhibant ou dégradant certaines enzymes hydrolytiques (cutinases, pectinases, etc.) ; une suppression de l'activité de ces enzymes est corrélée à une réduction importante de la virulence (**Duffy et al., 2003 ; Harman et Shoresh, 2007**).

### III.3.2.6. Modification des propriétés de surface des plantes

Certains microorganismes possèdent la capacité de changer les propriétés de surface des feuilles des plantes en produisant des biosurfactants. Ceci a pour conséquence de gêner le processus d'attachement et de croissance des agents pathogènes sur les feuilles (**Bunster et al., 1989**).

Malgré les avantages des agents biologiques, le marché des biopesticides reste toujours limité à cause de certaines contraintes : l'effet protecteur est parfois insuffisant par rapport aux produits chimiques (**Shishkoff et McGrath, 2002**) ou n'est parfois pas constant, dépendant notamment des conditions environnementales (la température, sol, humidité, la plante hôte, pH, etc...) qui peuvent influencer la survie, la mise en place et l'activité des agents de lutte biologique (**Larkin et Fravel, 2002; Mendoza Garcia et al., 2003 ; Jacobsen, 2006**). Il dépend aussi des facteurs liés au produit lui-même, à son mode d'application, à sa rémanence, à sa compétence écologique et à son mécanisme d'action (**Elad et Stewart, 2004**).

# *Matériel et méthodes*

## I. Matériel biologique

### I.1. Matériel fongique

Les deux souches de *Botrytis cinerea* étudiées sont BC1 et ALG66. Elles proviennent de la collection du laboratoire de mycologie. Elles ont été isolées par la technique monospore (Tableau III).

**Tableau III:** Souches de *Botrytis cinerea* étudiées

Souches	Origine	Année d'isolement
BC1	France	1989
ALG66	Algérie (Merdj Ouamen)	2007

### I.2. Isolats bactériens

Dans le but de rechercher des agents de lutte biologique contre *Botrytis cinerea*, 30 isolats bactériens ont été testés durant notre étude vis-à-vis des deux souches de *Botrytis cinerea* (ALG66 et BC1).

Ces bactéries proviennent d'un isolement réalisé au sein du laboratoire de mycologie dans le cadre des travaux de thèse (en cours), leurs origines sont indiquées dans le Tableau IV.

**Tableau IV:** Isolats bactériens testés

Souches	Origine	Endroit d'isolement	Année d'isolement
CS2, CS1, CS7, CS9, CS17	Tichy	Plaie saine	2014
M4, M6, M7, M9, M25, M32, M36, M42	Merdj-ouamen	sol	
T18, T23, T29, T31, T33, T57, T75, T80, T83, T90	Tichy	sol	
CT22, CT3, CT6, CT8, CT9, CT12, CT20	Tichy	Chancre traité par le sol	

### I.3. Matériel végétal

Notre étude porte sur la plante de tomate *Lycopersicon esculentum*, la variété utilisée est « GF » c'est une variété hybride, cultivée sous abri au sein de l'exploitation agricole de Tichy (BEJAIA).

Ces plantes ont été élevées selon les mêmes conditions que chez l'agriculteur (voir Annexe I)

La préparation des plantes s'est réalisée selon les étapes suivantes :

**Semis :** consiste à placer les graines de tomate dans des petits pots après les avoir préalablement remplis de terre, puis les recouvrir de nouveau d'une fine couche de terre. Une fois arrosés, les pots sont placés en condition favorable en serre.

**Transfert :** au bout de deux mois, les jeunes plantules sont récupérées et transférées dans le sol sous serre.

**Récupération des feuilles :** deux mois suivant le transfert des plantules, les feuilles sont récupérées à partir des jeunes plantes de tomates pour des tests ultérieurs (voir figure 3).



**Semis**



**Plantules âgées de 45 jours**



**Récupération des feuilles de tomate**

**Figure 3:** Préparation des plantes de tomates

## II. Méthodes

### II.1. Caractérisation bactérienne

L'identification des 30 isolats bactériens est établie en se basant sur des caractères morphologiques et biochimiques.

#### II.1.1. Etude des caractères morphologiques

##### II.1.1.1. Aspect macroscopique

Les colonies bactériennes sont examinées à l'œil nu et sont décrites selon leurs pigmentation, opacité, forme, taille et aspect de la surface.

##### II.1.1.2. Aspect microscopique

Pour déterminer l'aspect microscopique de nos isolats, la **coloration de Gram** est réalisée, celle-ci permet de connaître la forme, l'arrangement et la nature biochimique de la paroi cellulaire des bactéries. Elle permet de séparer entre les bactéries Gram négatives (colorées en rose) qui possèdent une couche mince de peptidoglycane et qui sont décolorées lors du lavage à l'éthanol, et les bactéries Gram positives (colorées en violet) possèdent une couche de peptidoglycane épaisse qui va retenir le colorant. La répartition selon le type de Gram est un critère systématique important pour la classification des bactéries.

Parallèlement, un test plus rapide est réalisé avec deux gouttes d'une solution d'hydroxyde de potassium (KOH 3%) qui sont mises en contact avec une colonie bactérienne. La solution devient visqueuse en présence de bactéries Gram négative et la réaction est considérée positive si la viscosité est obtenue après 30 secondes (**Brown, 2001**)

#### II.1.2. Etude des caractères biochimique

L'étude biochimique nous oriente sur le métabolisme suivi par les microorganismes étudiés et les enzymes qu'elles possèdent.

##### II.1.2.1. Test de catalase

La catalase est une enzyme respiratoire qui catalyse la libération de molécules d'eau et d'oxygène à partir du peroxyde d'hydrogène (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) selon la réaction :



Le test de détection de cette enzyme est révélé en déposant une colonie bactérienne sur une lame propre et en ajoutant une ou deux gouttes de solution de peroxyde d'hydrogène. La réaction positive se traduit par un dégagement immédiat de bulles de gaz (effervescence) (**Marchal et al., 1991**).

### II.1.2.2. Test d'oxydase

Ce test permet de mettre en évidence la présence de l'enzyme cytochrome oxydase. Le N-méthyle paraphénylène diamine (PDA) est utilisé comme réactif imprégné sur des disques d'oxydase. Une colonie bactérienne y'est déposée avec une pipette pasteur. Une réaction positive se traduit par l'apparition d'une tâche violette au bout de 30 secondes (Marchal et al., 1991)

### II.1.2.3. Milieu Clark et Lubs

Ce milieu permet l'étude des produits de fermentation du glucose. Il permet une différenciation entre la voie des « acides mixtes » mise en évidence par le test RM (Rouge de Méthyl) et la voie « acétoïne » mise en évidence par le test VP (Voges- Proskauer). La réalisation du test se fait en ensemencant deux tubes contenant 5ml de milieu **Clark et Lubs**. Après incubation à 30°C/18 à 48h, deux gouttes des réactifs VP1 et VP2 sont ajoutées dans l'un des tubes et deux gouttes du réactifs RM dans l'autre.

Une réaction positive est révélée par une coloration rouge du milieu pour les deux tests (VP et RM) (Marchal et al., 1991).

### II.1.2.4. Milieu Mannitol-mobilité

Ce test permet l'étude de la mobilité bactérienne et de la dégradation du mannitol. Les isolats étudiés sont ensemencés dans ce milieu par piqûre centrale, puis incubés à 30°C pendant 24h. Le virage au jaune du milieu indique son acidification due à la fermentation du mannitol, tandis qu'une diffusion dans la gélose indique la mobilité des bactéries (Marchal et al., 1991).

### II.1.2.5. Utilisation des sucres

La dégradation des sucres (glucose, lactose et saccharose) ainsi que la production H<sub>2</sub>S et de gaz sont recherchées sur milieu TSI (Triple Sugar Iron) en ensemencant abondamment la surface par des stries, le culot est inoculé par simple piqure centrale avant de mettre à l'étuve pendant 24h à 30°C. Une réaction positive des sucres se traduit par un virage du milieu vers une coloration jaune, tandis que la production de gaz est révélée par un craquement de gélose et la production d'H<sub>2</sub>S par la formation d'une coloration noire. (Marchal et al., 1991).

### II.1.2.6. Production d'indole

Un tube contenant le milieu eau peptonée exempte d'indole est inoculé par la culture bactérienne, après incubation à 30°C pendant 24h à 48 h, deux gouttes du réactif de Kovacs sont ajoutées au milieu. L'apparition d'un anneau rouge indique une réaction d'indole positive (Marchal *et al.*, 1991).

## II.2. Evaluation de l'effet antagoniste *in vitro* des isolats bactériens

### II.2.1. Effet sur la croissance mycélienne par confrontation direct

La méthode utilisée est préconisée par Petatán-Sagahón *et al* (2011). A l'aide d'un emporte pièce des disques mycéliens de 5 mm de diamètre sont coupés à partir d'une culture de *B.cinerea* âgée de trois jours, ces disques sont par la suite placés au centre des boîtes de Pétri stériles préalablement coulées par la gélose PDA (Potato Dextrose Agar) (Annexe II), de même, trois disques bactériens de 5 mm de diamètre sont placés à une distance de 2.5 cm du disque mycélien. Des témoins ne contenant que le champignon cible sont réalisés en parallèle et selon les mêmes conditions. L'ensemble des boîtes sont incubées à une température de 21° C pendant 4 jours (Figure 4).

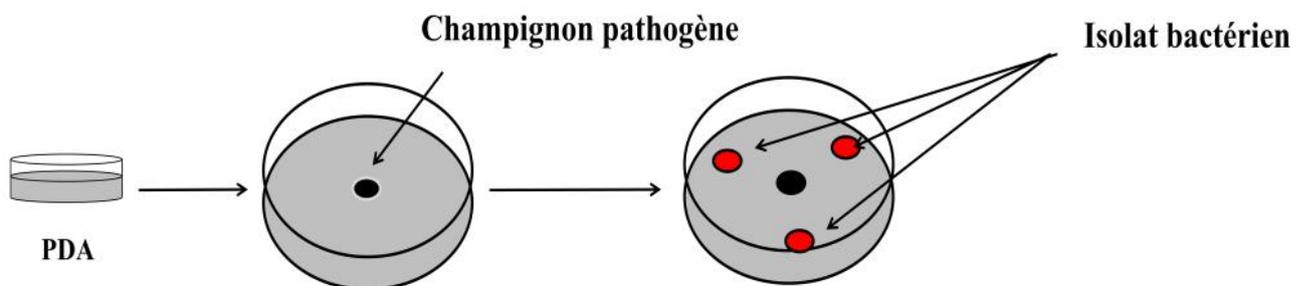
L'évolution de la croissance mycélienne est suivie et mesurée quotidiennement en comparaison avec les témoins.

Le pourcentage de l'inhibition de la croissance mycélienne (PGI%) est calculé selon la formule décrite par Whipps (1987):

$$\text{PGI}\% = (\text{R}_1 - \text{R}_2) / \text{R}_1 \times 100$$

R1 : Rayon du mycélium du champignon cible dans la boîte témoin.

R2 : Rayon du mycélium du champignon cible en présence de l'antagoniste.



**Figure 4:** Test de confrontation direct *in vitro*

### II.2.1.2. Effet sur la croissance mycélienne par confrontation à distance

L'évaluation de la production des substances volatiles par les bactéries est étudiée en se basant sur la méthode décrite par Jamalizadeh et *al* (2008); elle consiste à repiquer l'antagoniste et le pathogène dans deux boîtes séparées contenant du milieu PDA; un assemblage est ensuite réalisé par superposition des deux boîtes (Figure 5).

La jonction entre les deux boîtes est assurée par des couches de parafilm afin d'éviter toute déperdition des substances volatiles.

Le témoin est formé par superposition de deux boîtes, celle du haut contenant une pastille de Champignon alors que celle du bas ne contient que le milieu PDA.

Après incubation à 21°C, le suivi de la croissance mycélienne est réalisé en comparaison avec le témoin.

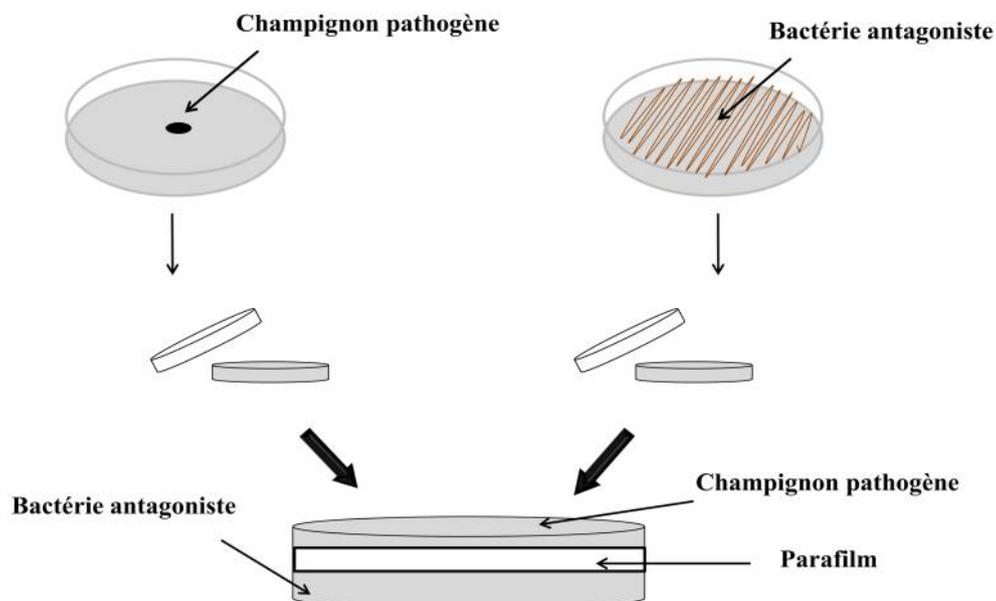
La lecture des résultats s'effectue en calculant le pourcentage de l'inhibition de la croissance mycélienne selon la formule suivante :

$$n = (a-b) / a \times 100$$

**n**= Le pourcentage d'inhibition de la croissance.

**a**= Diamètre du mycélium du champignon en absence de l'antagoniste.

**b**= Diamètre du mycélium du champignon en présence de l'antagoniste.

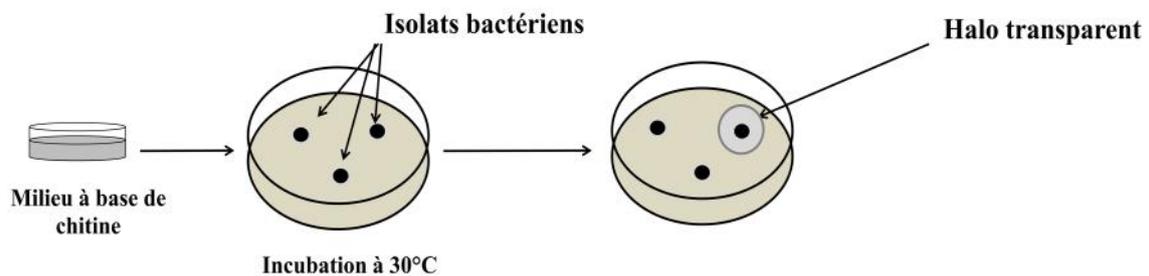


**Figure 5:** Test de confrontation à distance *in vitro*

### II.2.3. Détermination de l'activité chitinasique

La chitine est un constituant important de la paroi cellulaire des champignons, elle entoure et protège les cellules fongiques. De ce fait, l'activité chitinasique des 30 isolats bactériens est évaluée en utilisant un milieu de culture à base de chitine (Annexe II). Le milieu est ensemencé par la méthode des disques (Figure 6).

Trois répétitions sont réalisées pour chaque isolat. Les boîtes sont incubées à 30°C pendant 7 jours au minimum. L'activité chitinasique se manifeste par un halo transparent autour des disques (Kope ný et *al.*, 1996).



**Figure 6 :** Test de détermination de l'activité chitinasique

### II.3. Evaluation de l'effet antagoniste *in vivo* des isolats bactériens

Ce test a pour objectif d'évaluer l'activité antagoniste *in vivo* des 30 isolats vis-à-vis *Botrytis cinerea* en utilisant les feuilles de tomate. Le protocole appliqué dans cette étude a été fourni par l'INRA Avignon France (Figure 7).

Des feuilles de tomates de taille homogène, sont prélevées sur des plantes âgées de 4 mois, puis déposées à raison de 4 feuilles par isolat dans des boîtes en plastique transparentes, tapissées au préalable avec du papier absorbant imbibé d'eau distillée. Une suspension bactérienne âgée de 24 h et ajustée à  $10^8$  UFC/ml, est par la suite, pulvérisée à l'aide d'un pulvérisateur sur les feuilles de tomate puis laissée séchée pendant 30 à 60 min.

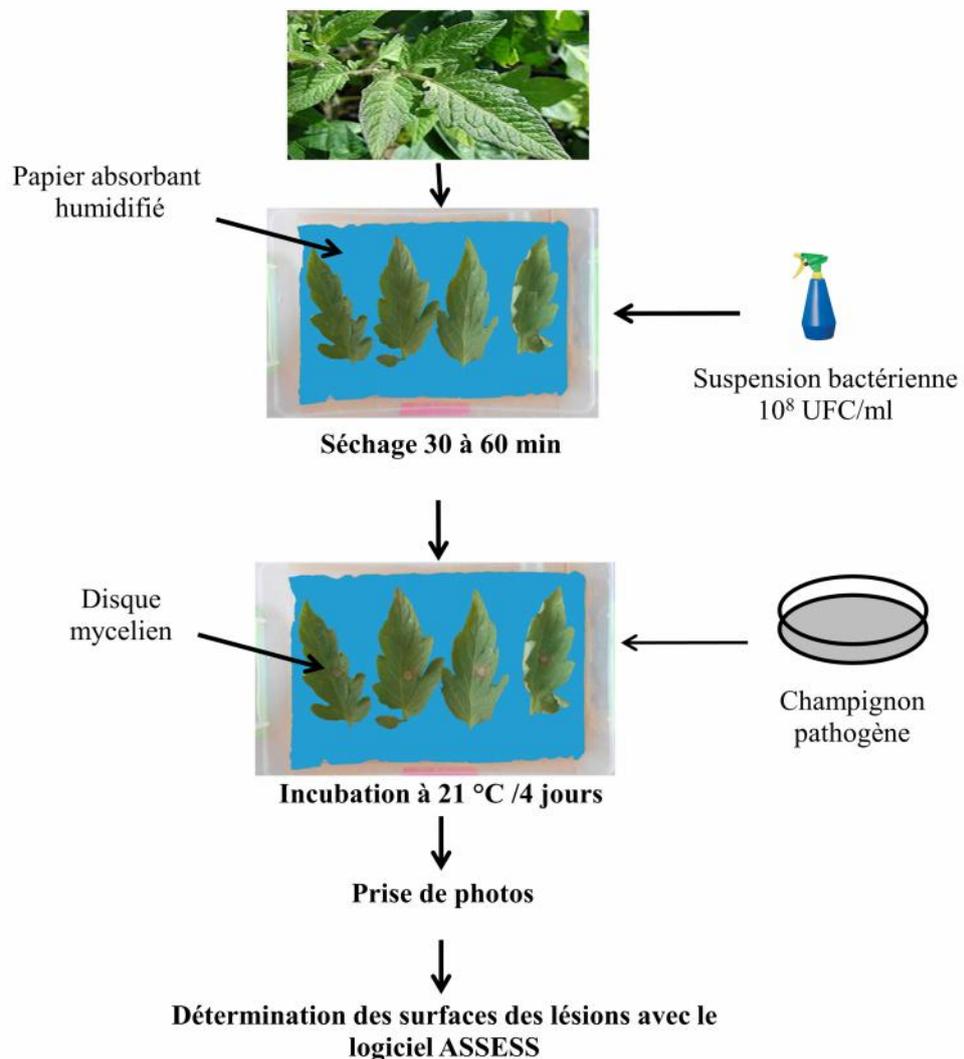
Des implants mycéliens, de 5 mm de diamètre, sont prélevés à partir d'une culture de *B.cinerea* âgée de trois jours. Ils sont déposés au centre de chaque foliole (1 disque par foliole) en veillant à ce que le mycélium soit en contact avec le tissu végétal.

Un témoin en absence d'antagonistes est réalisé. Une fois les boîtes fermées avec leurs couvercles, elles sont placées à 21°C pendant 4 jours.

A partir de 24h suivant l'inoculation, chaque boîte est photographiée quotidiennement afin d'observer l'évolution des lésions causées par le champignon. La surface en mm<sup>2</sup> des lésions est déterminée avec le logiciel ASSESS (Annexe III).

Les résultats obtenus ont été convertis vers la fin en PGI% pour pouvoir les comparer avec ceux obtenus dans le test *in vitro* (Annexe IV).

$$PGI\% = \frac{\text{Surface de lésion du témoin} - \text{Surface de lésion du l'isolat}}{\text{Surface de lésion du témoin}} \times 100$$



**Figure 7:** Test d'antagonisme *in vivo*

#### II.4. Analyse statistique

Les résultats obtenus ont été analysés avec le logiciel XLSTAT version 2009. Les mesures qui ont été reproduites trois fois (*in vitro*) et quatre fois (*in vivo*) sont présentées sous forme de moyenne  $\pm$  écart-type (Annexe IV).

Dans le but d'évaluer l'efficacité « *in vitro* » et « *in vivo* » des isolats étudiés, les méthodes statistiques utilisées sont l'analyse de la variance et le test SNK (Newman et keuls). Tous ces tests sont réalisés avec un intervalle de confiance de 95%. Une probabilité de  $p$  inférieur à 0.05 a été adoptée comme critère de différences significatives.

## *Résultats et discussion*

## I. Résultats de la caractérisation des isolats bactériens

### I.1. Résultats de l'étude macroscopique et microscopique

L'observation de l'aspect cultural et morphologique des colonies des 30 isolats est réalisée sur milieu GN (Gélose Nutritive) après 24h à 48h d'incubation (Annexe II).

Les résultats de l'étude macroscopique et microscopique obtenus sont rassemblés dans le tableau, ci-après

**Tableau V:** Résultats de l'étude macroscopique et microscopique

Isolats	Aspect cultural	Aspect microscopique			Isolats	Aspect cultural	Aspect microscopique		
		G	Forme	Sp			G	Forme	Sp
M4	Ronde, translucide, lisse et régulière	-	micrococcie	-	T31	Translucide, brillante et lisse	+	micrococcie	-
M6	Ronde, translucide, lisse et régulière	-	micrococcie	-	T75	Colonie beige, lisse régulière légèrement bombée	+	Bacille	+
M9	Blanche, rugueuse et irrégulière	+	Bacille	+	CS7	Ronde, petite, orange et lisse	+	Cocci fin	-
M25	Blanche, rugueuse et irrégulière	+	Bacille	+	T33	Translucide, brillante et lisse	-	Cocobacille	-
M42	Ronde, petite, lisse et plate	+	Petit Bacille	+	M32	Ronde, opaque, blanche et brillante	-	Bacille	-
T18	Blanche, opaque et irrégulière	+	Gros bacille	+	CS17	Petite, beige, lisse et régulière	+	Cocci	-
T57	petite, couleur crème, irrégulière	+	Bacille	+	T83	Jaune, brillante et lisse	-	Cocci	-
T80	Ronde, couleur jaune, lisse et régulière	-	Petit bacille	-	M7	Beige, brillante et lisse	-	Cocci	-
T90	Blanche, opaque et irrégulière	+	Bacille	+	CT3	Crème, lisse, brillante avec pigmentation verte sur GN	-	Petit bacille	-
CT20	Petite, translucide et lisse	-	Petit bacille	-	CS1	Ronde, petite, jaune et lisse	+	Cocci	-
CT22	Blanche, opaque et lisse	+	micrococcie	-	CT6	Blanche, rugueuse et irrégulière	-	Bacille	-
CT12	Ronde, blanche, plate et opaque	+	Bacille	+	CS2	Blanche, rugueuse et irrégulière	+	Gros bacille	+
CT8	Ronde, orange, régulière et lisse	-	Petit bacille	-	CS9	Blanche, rugueuse et irrégulière	-	Bacille	-
CT9	Ronde, jaune, régulière et lisse	+	Bacille	+	T23	Blanche, opaque et irrégulière	+	Bacille	+
M36	Colonie rhizoïde	+	Bacille	+	T29	Blanche, opaque et irrégulière	+	Bacille	+

+ : Présence / - : Absence / Sp : spore / G : Gram

L'étude microscopique réalisée après coloration de Gram, a permis de constater que la majorité des isolats se présentent sous forme de bâtonnets de taille variable (fins, moyens et gros) à Gram positif, sporulés.

## I.2. Résultats des tests biochimiques

Les résultats des tests biochimiques effectués sur les isolats sont regroupés dans le tableau VI.

**Tableau VI :** Résultats des tests biochimiques des isolats bactériens

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

**Mob :** Mobilité/ **Cat :** Catalase/ **Ox :** Oxydase/ **Ind:** Indole/**Man:** Mannitol/**Glu:** Glucose/**Lac:** Lactose  
**Sac :**Saccharose/ **ND :** non déterminé

- ✓ Les isolats: **CT22, CS17, T31** et **CS1** sont des cocci Gram positive, catalase positive. D'après les résultats des tests biochimiques et en les comparant avec ceux établis par **Avril et al (1992)** et **Khelil et al (2014)**. Il est probable que ces souches correspondent au genre *Micrococcus*. Les bactéries du genre *Micrococcus* sont des coques Gram positives, Elles sont généralement immobiles, asporulées, catalase positive et oxydase variable (**Holt et al., 1994 ; Khelil et al., 2014**).
- ✓ Les isolats: **M9, M25, M42, T18, T57, T90, CT12, CT9, M36, T75, CS2, T23** et **T29** se présentent sous la forme de bâtonnets de taille variable (fins, moyens et gros), sporulés. Selon les observations décrites dans la littérature, ces isolats peuvent être affiliés au genre *Bacillus* (**Avril et al., 1992**). L'isolat **M36** donne des colonies rhyzoïdales, ce qui caractérise l'espèce *Bacillus mycoides* (**Goodwin et al., 1994, Wintzingerode et al., 1997**).
- ✓ Les isolats: **M4, M6, T83, M7** sont apparentés à la famille des *Entérobactériaceae*, ils présentent les caractéristiques suivantes : une forme bacillaire, Gram négatif, catalase positive (**Madigan et Martinko, 2007**).
- ✓ Les isolats : **T80, CT20, CT3, CT8, M32, CS9** et **CT6** peuvent être affiliés au genre *Pseudomonas*. Ce sont des bactéries Gram négative en forme de bacilles, oxydase positive (**Delarra, 2007**). L'isolat **CT3** se caractérise par la production d'un pigment qui colore le milieu en jaune verdâtre, la mise en évidence de ce dernier sur le milieu King B a permis de montrer qu'il s'agit de pyoverdine, ce pigment est caractéristique de quelques espèces regroupées sous le nom de *Pseudomonas* fluorescents (**Palleroni et al., 1992**).
- ✓ L'isolat **T33** peut être affilié au genre *Acinetobacter*, c'est un coccobacille immobile (catalase positive, oxydase positive) en raison de l'aspect de ses colonies et de la forme de ces cellules qui sont des coccobacilles groupés par deux ou parfois en chaînes de longueur variable (**Lothorlary, 1995 ; Delarra, 2007 ; Trotel-Aziz et al., 2008**).

**Tableau VII:** Résultats de l'identification des isolats bactériens

<i>Bacillus</i>	M9, M25, M42, T18, T57, T90, CT12, CT9, M36, T75, CS2, T23, T29
<i>Pseudomonas</i>	T80, CT20, CT3, M32, CS9, CT6, CT8
<i>Entérobactériaceae</i>	M4, M6, T83, M7
<i>Micrococcus</i>	CT22, CS17, T31, CS1
<i>Acinetobacter</i>	T33
Non déterminé	CS7

Ces résultats restent préliminaires et nécessitent d'autres études plus approfondies pour la caractérisation des isolats.

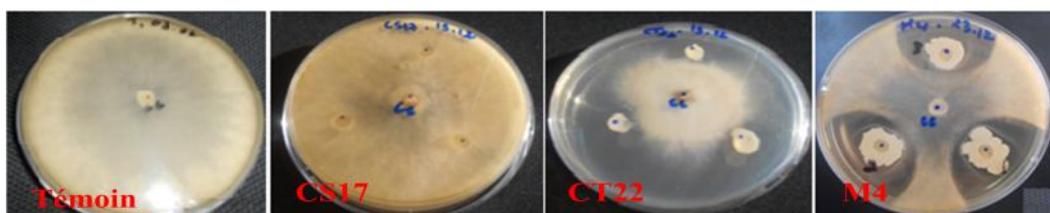
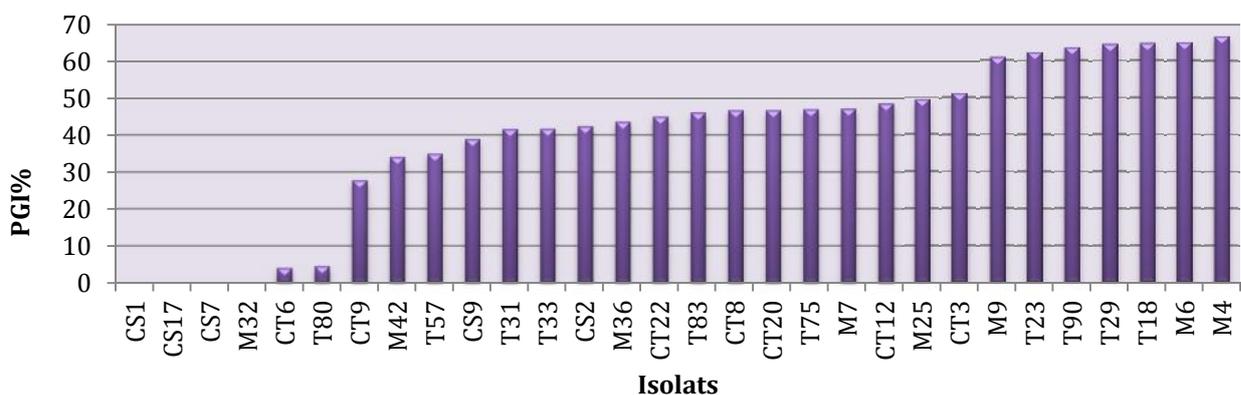
On constate que la majorité des isolats sélectionnés pour étudier leur capacité antagoniste envers *Botrytis cinerea* appartiennent aux groupes de *Bacillus* et *Pseudomonas*. Durant les dernières décennies, de nombreuses études ont montré l'intérêt potentiel des bactéries de ces deux genres en tant qu'agents de lutte biologique contre les pathogènes responsables de maladies de plantes notamment contre la pourriture grise causée par *Botrytis cinerea* (Haas et Defago, 2005 ; Killani et al., 2011).

## II. Evaluation de l'effet antagoniste *in vitro* des isolats bactériens

### II.1. Effet sur la croissance mycélienne par confrontation direct

#### II.1.1. Effet sur la croissance mycélienne d'ALG66

L'analyse statistique montre une différence significative ( $p < 0,05$ ) au niveau des activités antagonistes des isolats bactériens. Sur les 30 isolats testés, 24 isolats ont montré un effet antagoniste contre la souche ALG66. Les isolats bactériens (M4, M6, T18, T29, T90, T23, M9, CT3) ont été les plus actifs avec des PGI% supérieurs à 51%. L'activité antagoniste des isolats (M25, CT12, M7, T75, CT20, CT8, T83, CT22, M36, CS2, T33, T31, CS9, T57, M42, CT9) a été moins importante avec des PGI% allant de  $27,778 \pm 17,22\%$  à  $49,519 \pm 2,4\%$ . L'activité est toutefois négligeable pour les isolats T80 et CT6 (PGI% de 4,63% et  $4,06 \pm 3,72\%$  respectivement).



**Figure 8:** Effet *in vitro* des isolats bactériens sur la croissance mycélienne d'ALG66

PGI% : Pourcentage d'inhibition de la croissance mycélienne

### II.1.2. Effet sur la croissance mycélienne de BC1

La comparaison des PGI% par le test Newman Keuls (SNK) montre une différence significative ( $p < 0,05$ ) au niveau des activités antagonistes des isolats bactériens envers BC1. Sur les 30 isolats testés, 28 isolats ont montré un effet antagoniste contre la souche BC1. Les isolats bactériens (T29, M6, M4, T90, T23, T18, M9, CT3, CT9 et CT6) ont été les plus actifs avec des PGI% supérieurs à 50%. L'activité antagoniste des isolats (T83, M25, T75, T31, M7, T33, CT22, CT20, CT8, CT12, M36, T57, M42, CS9) a été moins favorable avec des PGI% allant de 20,713±8,25% à 49,23%. L'activité est toutefois faible pour les isolats T80, CS7, CS2 et CS1 avec des PGI% variant de 9,34% à 17,88±7,83% et négligeable pour M32 avec un PGI% de 1,52±1,82%.

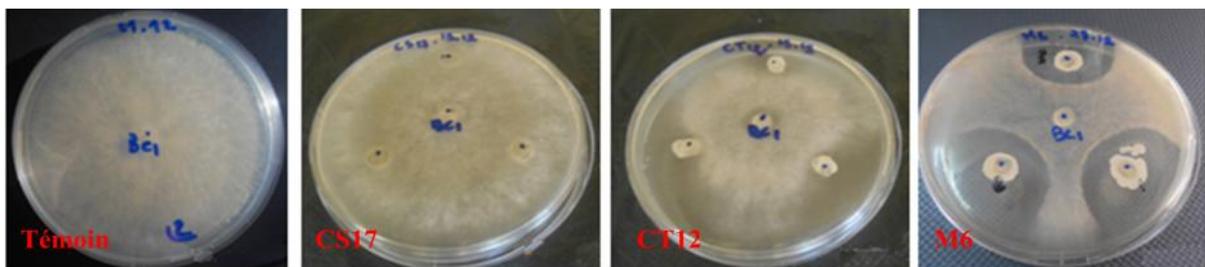
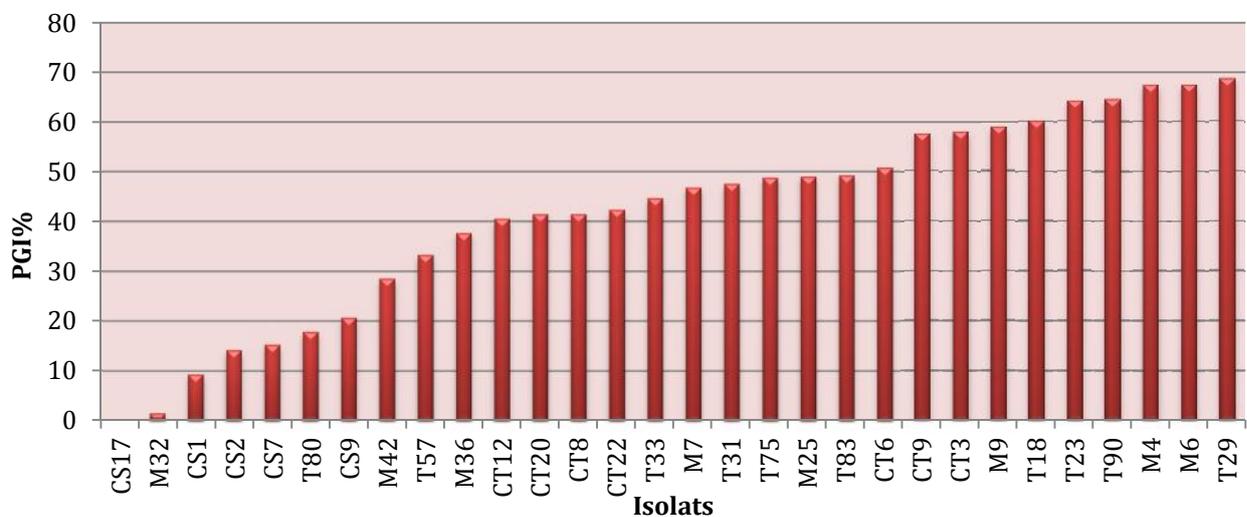


Figure 9: Effet *in vitro* des isolats bactériens sur la croissance mycélienne de BC1

### II.1.3. Comparaison de l'effet des isolats bactériens sur la croissance mycélienne des deux souches fongiques

Pour comparer entre les résultats obtenus sur les deux souches fongiques, on a utilisé le test ANOVA à deux facteurs. Les analyses statistiques (Tableau VIII) ne révèlent aucune différence significative au seuil de 5% entre la sensibilité des deux souches fongiques à l'effet des isolats bactériens ( $P=0,139$ ). Une différence significative au niveau des activités

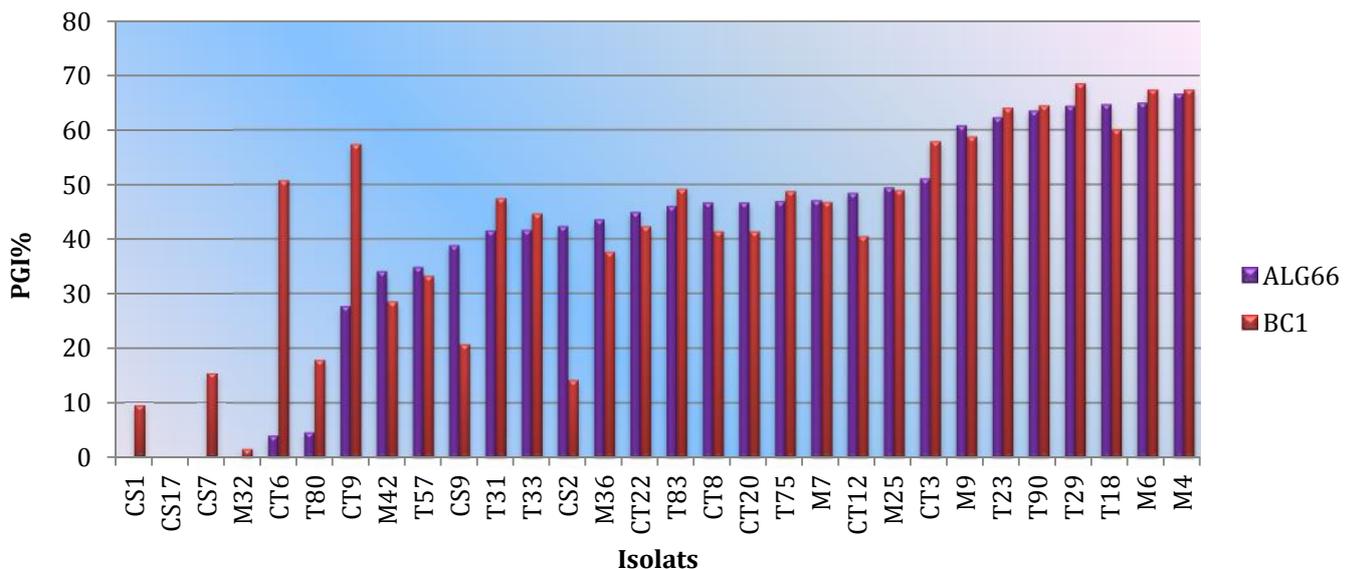
antagonistes des isolats bactériens a été constatée ( $P < 0,0001$ ), les isolats sont classés en différents groupes selon leurs activités (Annexe IV, Tableau I).

**Tableau VIII:** Résultats de test ANOVA à deux facteurs

Source	Degré de liberté	Somme des carrés	Moyenne des carrés	F	Pr > F
Isolats	29	68803,135	2372,522	31,393	< 0,0001
champignon	1	167,475	167,475	2,216	0,139

Les effets antagonistes des isolats sont presque de même ordre à l'exception des isolats (CS1 et CS7) qui manifestent une faible action sur BC1 (PGI% de 9,34%, 15,31±4,12% respectivement) et une activité nulle sur ALG66, et des isolats (T80, CT6 et CT9) qui donnent un faible effet sur ALG66 (PGI% de 4,63%, 4,06±3,72%, 27,778±17,22% respectivement) et une activité plus au moins marquée à l'encontre de BC1 (PGI% de 17,88±7,83%, 50,793±1,37%, 57,423±2,61% respectivement). Inversement l'effet antagoniste des isolats CS2 et CS9 a été meilleur à l'égard de la souche ALG66 (PGI% de 42,403% et de 38,918±3,02% respectivement) et faible à l'encontre de BC1 (PGI% de 14,18±22,85% et de 20,713±8,25%).

L'isolat CS17 n'a montré aucun effet sur les deux souches fongiques. Par ailleurs, les isolats (M4, M6, T18, T29, T90, T23, M9 et CT3) se sont montrés les plus actifs sur les deux souches de *B. cinerea* avec des PGI% supérieurs à 51%.



**Figure 10:** Etude comparative de l'effet antagoniste *in vitro* sur ALG66 et BC1

La majorité des isolats qui présentent des effets antagonistes les plus marqués à l'égard des deux souches fongiques appartient au genre *Bacillus*.

Wang *et al.* (2009) ont démontré l'efficacité *in vitro* de certaines bactéries contre *B.cinerea* ; l'isolat EB-28 identifié en tant que *Bacillus subtilis* a donné la meilleure activité antagoniste à l'encontre de la souche fongique avec un PGI% de 70,05%.

Les mécanismes d'inhibition observés n'étaient pas caractérisés dans notre étude, mais plusieurs travaux ont suggéré que les effets inhibiteurs des microorganismes à effet antagoniste pourraient être dus à la production de certains composés diffusibles tels que les antibiotiques (Chaurasia *et al.*, 2005). En outre, des études précédentes ont indiqué que *Bacillus spp* produit des polypeptides et des antibiotiques. Cela permet de supposer que ces derniers peuvent être responsables de l'inhibition *in vitro* de la croissance mycélienne de *Botrytis cinerea* (Kim *et al.*, 2008).

La sécrétion de substances antibiotiques par les microorganismes est un phénomène fréquent. Certains métabolites sont capables d'interférer avec la germination, la croissance mycélienne et/ou la sporulation des agents phytopathogènes. D'autres provoquent la distorsion des hyphes fongiques, modifiant l'aspect des colonies ou entraînant le relargage de composés cellulaires suite à la perturbation de la perméabilité membranaire. L'antibiose est le mode d'action le plus étudié chez les agents de lutte biologique ; ceci est lié à l'adoption fréquente de protocoles de sélection *in vitro* de souches antagonistes qui favorisent ce mécanisme et à la simplicité expérimentale de telles études ( Lepoivre, 2003).

## **II.2. Effet sur la croissance mycélienne par confrontation à distance**

### **II.2.1. Effet sur la croissance mycélienne d'ALG66**

Sur les 30 isolats bactériens, 17 ont montré un effet antagoniste contre la souche ALG66 ; M6 et M4 se sont avérés les plus actifs avec un pourcentage d'inhibition de croissance (PGI%) supérieure à 50 %. Le reste des isolats a montré une inhibition moyenne et parfois faible (Figure 11).

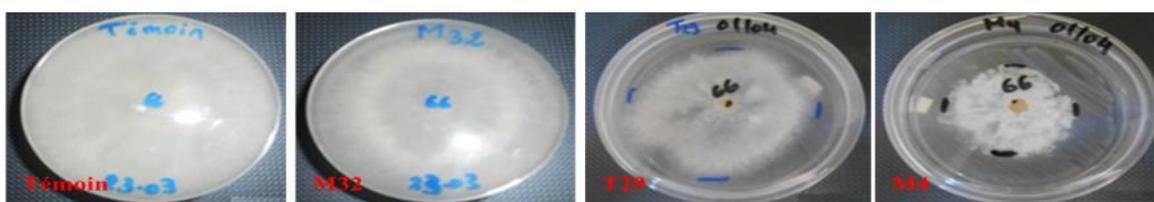
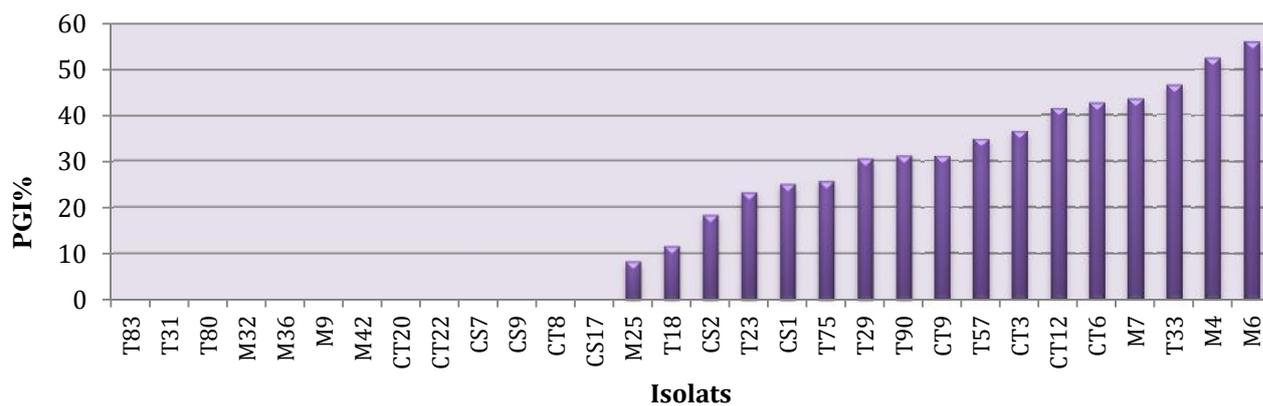


Figure 11: Effet des substances volatiles sur ALG66

### II.2.2. Effet sur la croissance mycélienne de BC1

Sur les 30 isolats bactériens, 8 ont montré un effet antagoniste contre la souche BC1; mais il est bien clair que l'effet des deux isolats T33 et CT12 est le plus important avec des PGI% de 50% et 40,85% respectivement. Par ailleurs, les isolats (T31, CT9, M6, M25, T90, CS7) apparaissent moins actifs avec des PGI% variant de 29,76% à 4,76%.

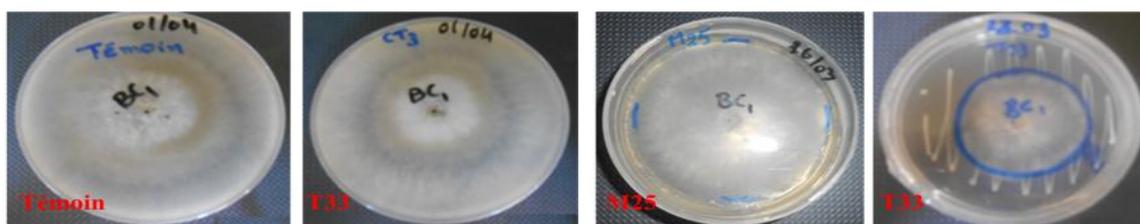
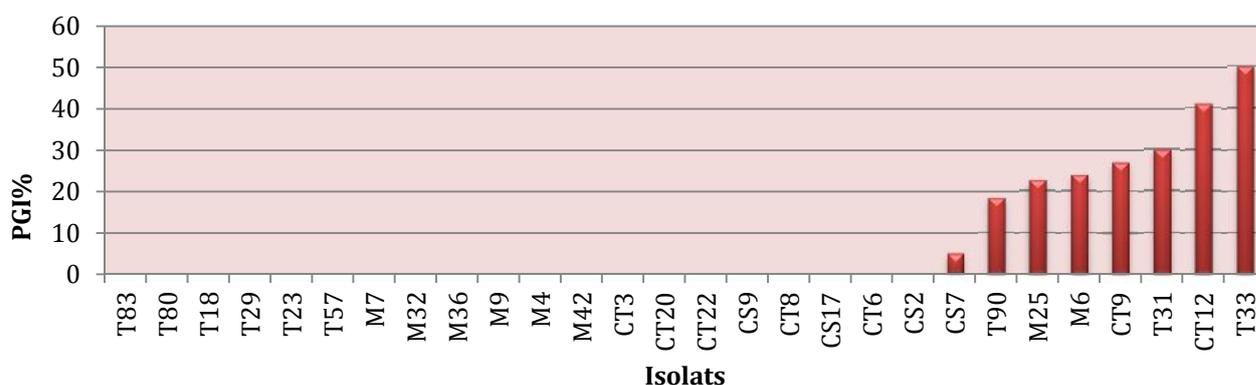
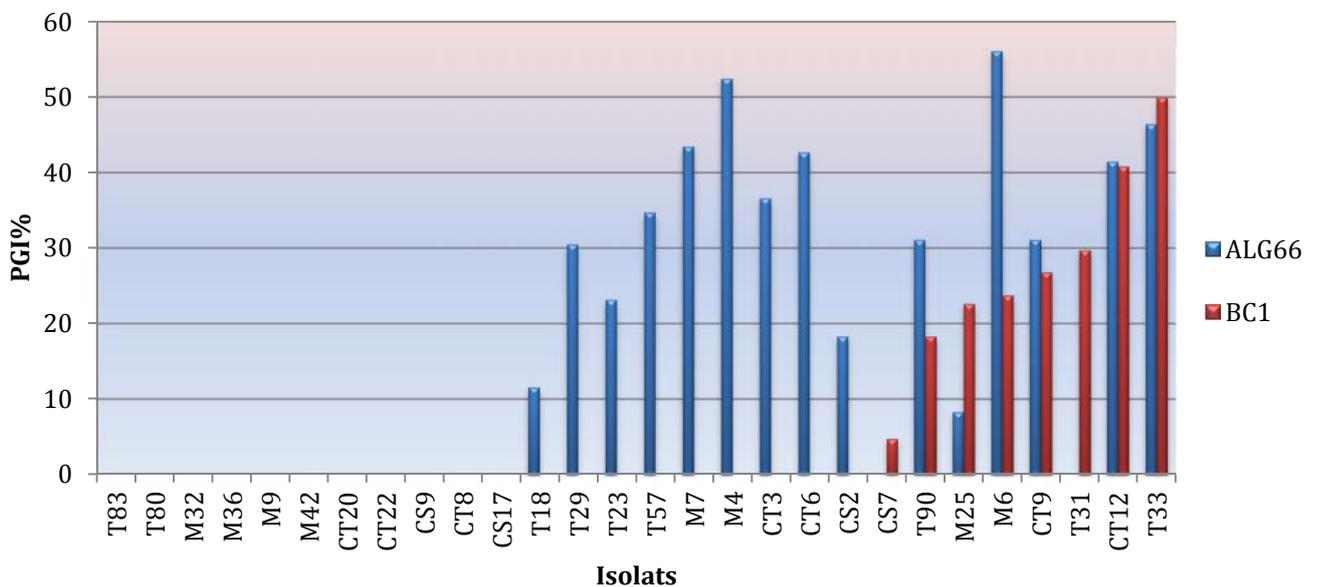


Figure 12: Effet des substances volatiles sur BC1

### II.2.3. Comparaison de l'effet des composés volatiles sur la croissance mycélienne sur les deux souches fongiques

D'après les résultats obtenus, nous constatons que les isolats (T83, T80, M32, M36, M9, M42, CT20, CT22, CS9, CT8, CS17) se sont montrés inactifs sur les deux souches de *B. cinerea*, ceci est peut être dû à l'incapacité de ces derniers à produire des substances volatiles à effet antagoniste. Par ailleurs, les isolats (T90, M25, M6, CT9, CT12, T33) se sont avérés actifs sur les deux souches mais avec des PGI% différents.

Les isolats (T18, T29, T23, T57, M7, M4, CT3, CT6, CS2) se sont montrés actifs sur ALG66 et inactifs sur BC1 à l'inverse des isolats (CS7, T31) qui sont actifs sur ALG66 et inactifs sur BC1.



**Figure 13:** Etude comparative de l'effet des substances volatiles sur ALG66 et BC1

D'après les résultats obtenus, il apparaît que les isolats inhibent la croissance mycélienne des deux souches fongiques (ALG66 et BC1) avec des degrés de sensibilité différents. Les différences du pouvoir inhibiteur de nos isolats pourraient être liées à la nature, la quantité et le mode d'action des substances volatiles secrétées.

Les composés volatiles sont des substances à faible poids moléculaire et qui s'évaporent facilement à température et à pression normales. La production de ces derniers par les microorganismes est à la fois complexe et dynamique (Wang et al., 2013).

Les composés volatiles sont produits par un grand nombre de bactéries et jouent un rôle très important dans le biocontrôle (Fiddaman et Rossall, 1993, Kai et al., 2009). Il a été démontré que ces composés (y compris des alcools, cétones, aldéhydes, éthers, esters, terpène,

dérivés terpéniques) peuvent influencer la croissance des champignons (Alstrom, 2001 ; Wheatley, 2002 ; Schalchli et al., 2011 ).

Jamalizadeh et al (2008) ont montré que la croissance de deux isolats de *Botrytis mali* (agent de la pourriture grise de la pomme) exposé aux substances volatiles de *Bacillus licheniformis* (EN74-1) est réduite par rapport au témoin non exposé, les PGI% obtenus étaient entre 28,4% et 33,8%. Une autre étude réalisée par Mikani et al (2008) a montré aussi que les substances volatiles produites par *Pseudomonas fluorescens* ont un effet sur la croissance de *Botrytis mali* avec des PGI% variant de 52% à 97%.

Arrebola et al. (2010) ont annoncé dans leur étude que *Bacillus subtilis* et *Bacillus amyloliquefaciens* pourraient également produire des composants volatiles antifongiques.

L'inhibition de la croissance mycélienne par les différents isolats antagonistes se fait de manière plus ou moins intense selon l'isolat testé et le mode d'action étudié. Ainsi, certains isolats sont plus actifs via la libération des substances volatiles que diffusibles et *vice versa*. On peut supposer que certaines molécules émises par nos isolats auraient une action préliminaire ayant pour effet d'affaiblir le pathogène cible préparant la mise en œuvre d'autres mécanismes.

Toutefois, en raison de la non répétition du test, ces résultats doivent être considérés avec prudence.

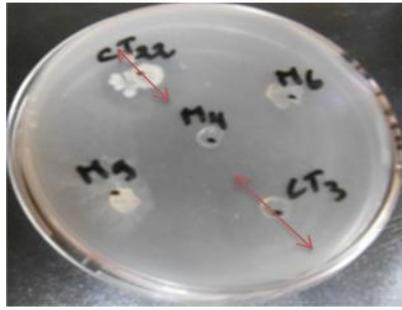
### II.3. Détermination de l'activité chitinasique

D'après les résultats obtenus, nous constatons que la totalité des isolats se sont montrés chitinase négatifs à l'exception de CT3, CT22 et M32. L'activité chitinasique de l'isolat CT3 s'est avérée la plus importante. Par ailleurs, les deux autres apparaissent moins actives. Cette différence suggère que les chitinases produites par les trois isolats n'ont pas la même efficacité (tableau IX).

**Tableau IX:** Résultats de l'activité chitinasique

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

+++ : Forte activité /++ : Moyenne /+ : Faible /- : absence d'activité



**Figure 14:** L'activité chitinasique de certains isolats

Les chitinases se divisent en trois groupes soit, les (1,4) N-acetylglucosaminidases, les endochitinases et les exochitinases (Kullnig *et al.*, 2000; Lorito *et al.*, 1994; Viterbo, 2002). Les chitinases bactériennes sont souvent des exochitinases de masse moléculaire élevée qui semblent être sécrétées dans les écosystèmes pour assurer le catabolisme de la chitine, ce dernier est présent dans la cuticule des insectes et dans les parois de la plupart des champignons (Asselin, 1993).

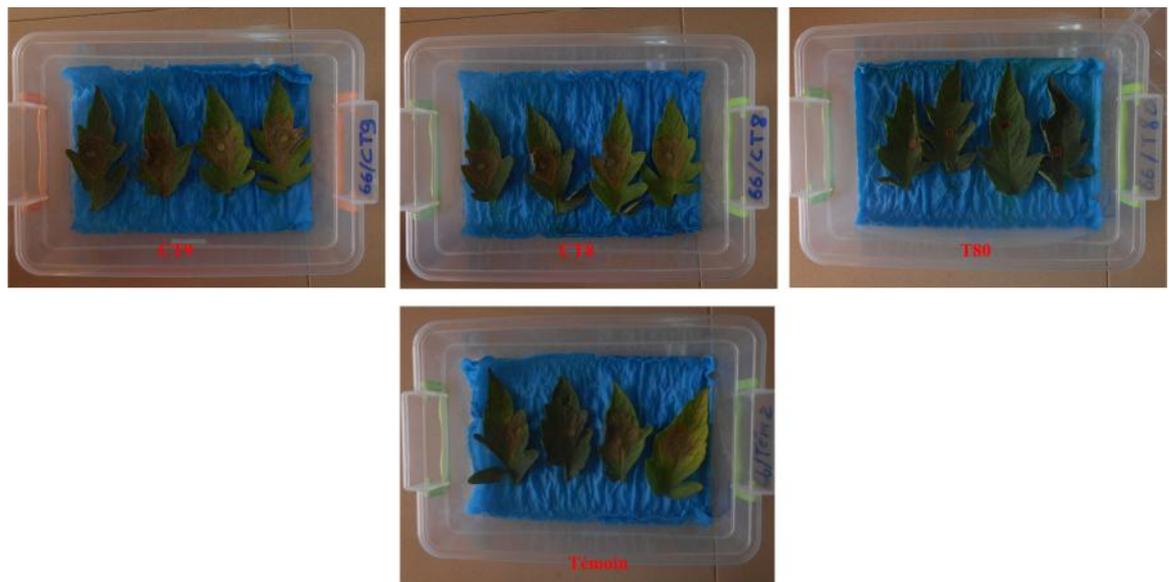
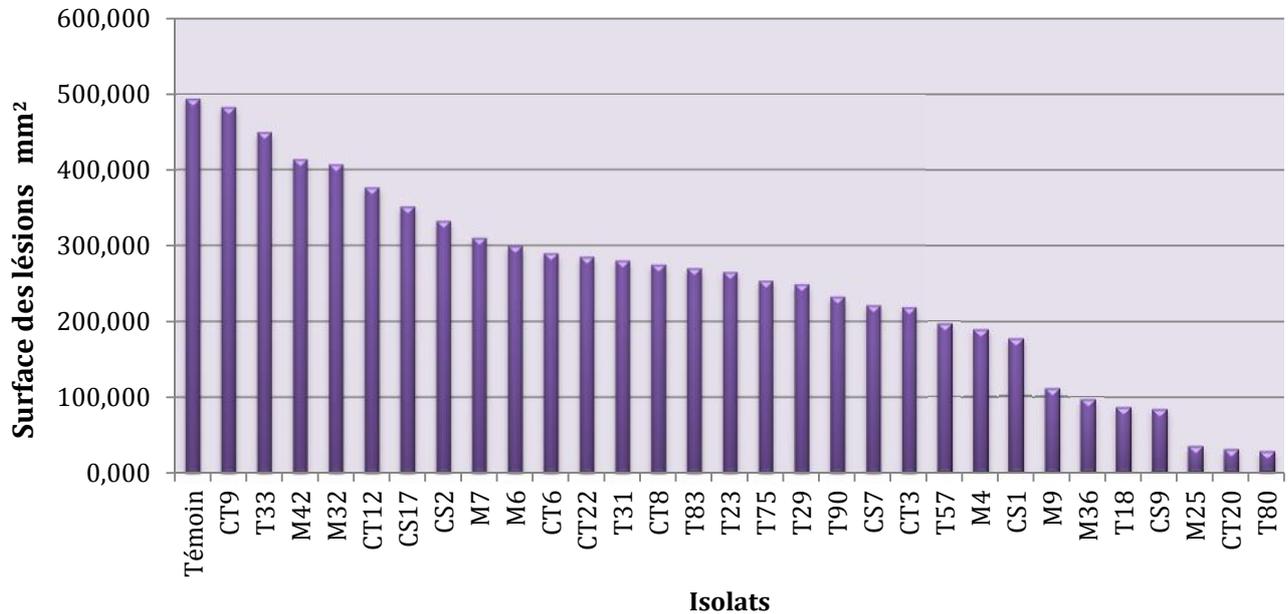
Les bactéries chitinolytiques les mieux connues proviennent des espèces *Aeromonas*, *Bacillus*, *Chromobacterium*, *Myxobacter*, *Vibrio*, *Pseudomonas* et de *Flavobacterium* (Asselin, 1993 ; Bennett et Hood, 1980 ; Faure-Reynaud, 1981). D'après Quecine *et al.* (2008), la quasi-totalité des souches de *Bacillus sp.* sont connues par une activité chitinasique positive.

Les microorganismes producteurs de chitinases sont qualifiés comme agents de biocontrôle contre plusieurs maladies fongiques des plantes. Un gène codant pour une chitinase du *Serratia marcescens* a été évalué pour une forme de lutte biologique envers certains champignons phytopathogènes (Asselin, 1993).

A l'issue des résultats *in vitro*, il paraît que les bactéries isolées pour leur antagonisme à l'encontre de *Botrytis cinerea* ne montrent pas des activités inhibitrices et des modes d'action similaires. Compte-tenu de la diversité des molécules produites par les bactéries, l'activité antagoniste semble résulter d'une combinaison de plusieurs modes d'action, impliquant différentes cibles cellulaires.

### III. Evaluation de l'effet antagoniste *in vivo* des isolats bactériens

Pour comparer les résultats obtenus de l'activité antagoniste *in vivo* des isolats bactériens à l'égard d'ALG66, on a utilisé le test de Newman Keuls (SNK) (Figure 15).



**Figure 15:** Effet antagoniste *in vivo* des isolats bactériens sur ALG66

Parmi les 30 isolats, 23 isolats présentent une différence significative en les comparant avec le témoin ( $p < 0,05$ ) ; ces isolats ont donc un effet antagoniste sur le champignon. Les isolats (T80, CT20, M25) se sont avérés les plus efficaces avec des surfaces de lésions inférieures à celle du témoin ( $27,185 \pm 3,31 \text{ mm}^2$ ,  $30,112 \pm 12,38 \text{ mm}^2$ ,  $34,38 \pm 8,51 \text{ mm}^2$  respectivement). Par ailleurs, les surfaces de lésions obtenues en présence des isolats (CS2, CS17, CT12, M32, T33, CT9 et M42) sont de même ordre que le témoin. On constate donc

que ces isolats n'ont pas d'effet antagoniste à l'encontre de champignon et ne présentent aucune différence significative ( $P > 0,05$ ) en les comparant avec ce dernier.

Les isolats restants ont montré des effets antagonistes plus au moins marqués ; les surfaces de lésions générées en présence de ces derniers varient entre  $81,985 \pm 42,45524 \text{ mm}^2$  et  $310,128 \pm 63,56733 \text{ mm}^2$ .

La différence entre les surfaces de lésions obtenues après l'application des différents isolats, peut être expliquée par les modes d'action différents de ces derniers, les bactéries qui sont taxonomiquement différentes ne réagissent pas de la même manière en les combinant avec *B. cinerea*.

L'intensité des symptômes de *B. cinerea* sur feuilles de haricot est réduite en présence de la souche T39 de *Trichoderma*, La réduction du développement du parasite ne s'observant qu'au cours du second jour d'incubation. Ce retard s'expliquerait par la production réduite des enzymes fongiques qui dégradent la pectine (**lepoivre, 2003**).

On suppose que les isolats bactériens affectent les facteurs de pathogénicité de l'agent pathogène et/ou stimulent la résistance de l'hôte, ce qui réduit les symptômes causés par ce dernier. L'activité antagoniste est peut être due aussi au phénomène de compétition contre les isolats et le champignon (compétition pour les nutriments et/ou pour l'espace).

Beaucoup de travaux ont étudié le potentiel des bactéries antagonistes à l'encontre de *B. cinerea* et ce dans une large gamme de cultures fruitières, y compris les tomates, les fraises, les pommes et les poires. Certaines bactéries telles que : *Bacillus circulans*, *Brevibacillus brevis*, *Bacillus subtilis*, *Pseudomonas fluorescens* et *Serratia liquefaciens* ont montré un effet antagoniste contre *B. cinerea* sur les tissus de raisin (**Elmer et al., 2006**).

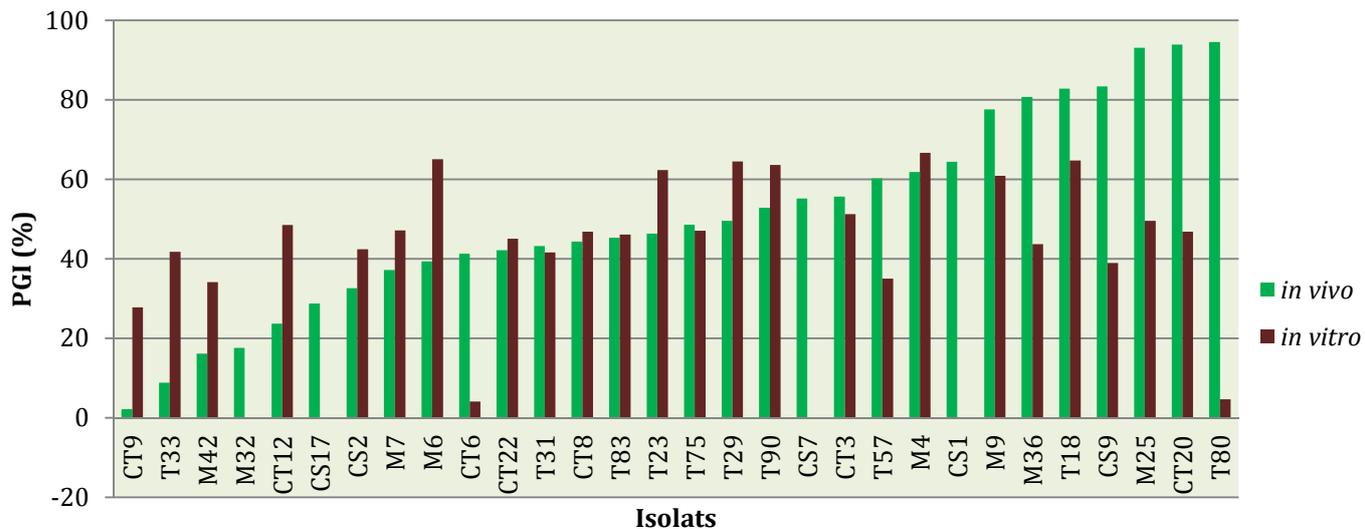
Wang et al (2009) ont étudié l'activité antagoniste de certaines bactéries contre *B. cinerea* sur foliole de tomate détachées. EB-28 identifiée comme *Bacillus subtilis* s'est montrée la plus active avec un PGI% de 52,4%.

Trotel-Aziz et al. 2008 ont montré que 26 isolats parmi 282 isolats bactériens testés ont réduit effectivement le développement de *B. cinerea* sur des feuilles de vigne. Dans la plupart des cas, les réductions de diamètre des lésions nécrotiques ont varié de 61 à 87%.

#### IV. Comparaison entre l'activité antagoniste *in vitro* et *in vivo*

D'après les résultats obtenus, nous constatons que l'effet antagoniste *in vitro* n'est pas traduit dans l'étude *in vivo*. Les isolats (T80, CT20, M25, CS9, T18, M36, M9, CS1, T57, CS7, CT6, CS17, M32) se sont montrés plus actifs dans l'étude *in vivo* à l'inverse des isolats (T90, T29, T23, M6, M7, CS2, CT12, M42, T33, CT9) qui manifestent un effet antagoniste plus favorable dans l'étude *in vitro*.

Les effets antagonistes des isolats (CT22, T31, CT8, T83, T75, CT3) sont presque de même ordre que soit *in vivo* ou *in vitro*.



**Figure 16:** Etude comparative de l'effet antagoniste *in vitro* et *in vivo* des isolats bactériens vis à vis d'ALG66

Wang et al (2009) ont montré l'efficacité de certaines bactéries notamment *Bacillus subtilis* contre *B.cinerea*, mais les résultats obtenus dans l'étude *in vitro* (sur milieu de culture) ont été différents de ceux obtenus dans le test *in vivo* (sur feuilles de tomate détachées).

Ce manque de concordance entre les activités antagonistes exprimées *in vitro* et celles observées *in vivo* est très fréquent, l'antagonisme *in vitro* étant influencé par un ensemble de facteurs propres à cette méthodologie. Ainsi, la sélection *in vitro* de bactéries antagonistes vis-à-vis de *Agrobacterium vitis* est influencée par de nombreux paramètres : la souche du pathogène, la souche antagoniste, les conditions préalables de croissance des pathogènes et antagonistes (température d'incubation, pH du milieu de culture) et enfin les milieux de culture utilisés pour la révélation de l'antagonisme. La sélection *in vitro* privilégie l'antibiose

comme mode d'action de la protection biologique, alors que d'autres mécanismes de protection qui ne s'expriment pas *in vitro* (compétition, stimulation des mécanismes de résistance de la plante, etc) peuvent jouer un rôle significatif *in vivo* (**Lepoivre, 2003**).

L'utilisation de tout agent de lutte biologique est fondée sur une bonne connaissance des processus mis en jeu par ce dernier lors de son activité antagoniste, cette dernière est en général la résultante d'un ensemble de mécanismes dont les principaux sont la compétition pour les nutriments et l'espace, l'antibiose et le mycoparasitisme. La compétition est le mode d'action le plus important dans la relation antagoniste mais son impact est difficile à quantifier. Cette difficulté est liée à la nature des relations qui existent entre les différents mécanismes d'antagonisme qui peuvent agir en synergie ou séparément. En effet, il est difficile de dissocier l'effet de la compétition de celui de l'antibiose (**Hmouni et al., 1999**).

Les isolats testés ont montré que différents genres de bactéries, pourraient être utilisés dans la lutte biologique contre *B.cinerea*. Leur potentiel en tant qu'agents de lutte biologique semble être intéressant.

*Conclusion et perspectives*

*Botrytis cinerea* est un agent phytopathogène connu par l'importance des dégâts économiques qu'il occasionne, sa polyphagie, sa variabilité génétique et le développement rapide de souches résistantes aux fongicides. L'application de certains agents antagonistes, utilisés comme moyen de lutte biologique, a permis de réduire le potentiel d'infection de ce pathogène sur plusieurs plantes hôtes. L'utilisation de ces derniers en tant que biopesticides est une technologie émergente, écologiquement compatible et considérée comme une alternative prometteuse aux pesticides chimiques.

La présente étude nous a permis d'évaluer l'activité antagoniste de certaines bactéries *vis-à-vis* de deux souches de *B.cinerea* à travers un screening qui a porté sur 30 isolats. L'identification préliminaire de ces isolats a montré que la majorité appartient aux groupes de *Bacillus* et *Pseudomonas*.

La méthode de confrontation directe a été utilisée pour évaluer l'effet des isolats sur la croissance mycélienne des deux souches fongiques, les isolats ont donné des activités variables, plus au moins marquées avec un effet plus prononcé par les isolats M4, M6 et T29. D'autre part, la méthode de confrontation à distance a montré que 6 isolats (T33, CT12, CT9, M6, M25 et T90) pouvaient produire des substances volatiles contre les deux souches de *B.cinerea*.

Les résultats de l'activité chitinasique ont révélé que seuls les isolats : CT3, CT22 et M32 étaient chitinase positive.

Les résultats du test d'antagonisme *in vivo* utilisé pour évaluer l'effet des isolats à l'égard de la souche fongique ALG66 ont montré une réponse variable des isolats. Dans cette étude, les isolats (T80, CT20, M25) se sont avérés les plus efficaces. Ces résultats, laissent supposer pour certains cas, la non concordance entre les tests menés *in vitro* et ceux réalisés *in vivo* et nous pousse à rester vigilants concernant les procédés de screening utilisés pour la recherche des agents de lutte biologique.

Les isolats testés ont montré que différents genres de bactéries, pourraient être utilisés dans la lutte biologique contre *B.cinerea*. Ces résultats préliminaires obtenus s'avèrent donc prometteurs et permettent d'envisager une éventuelle application de ces isolats comme agent de lutte biologique contre *Botrytis cinerea* et constituerait une alternative à l'usage des fongicides devenus inefficaces et controversés. Toutefois, ces travaux restent insuffisants.

Pour une meilleure application, il est nécessaire de compléter ce travail avec des approches plus approfondies, à savoir :

- ✚ L'identification génotypique des isolats.
- ✚ Etude de l'effet des isolats sur la germination et la production des spores de *B.cinerea*.
- ✚ Etude des enzymes à pouvoir hydrolytique autre que les chitinases.
- ✚ Etude des mécanismes d'action des isolats et caractérisation des métabolites impliqués dans la lutte biologique.
- ✚ Etude plus approfondie de l'activité d'antagonisme *in vivo* des isolats sur autre organes détachés (tige) et *in planta* (plante entière)
- ✚ Effectuer des essais sur le terrain pour évaluer la faisabilité du traitement.
- ✚ Etude de l'activité antagoniste des isolats contre d'autres agents phytopathogènes de la tomate.

Le but final des travaux en cours dans le laboratoire de mycologie est d'aboutir à la mise sur le marché d'un biopesticide homologué.

# *Références bibliographiques*

# Références bibliographiques

## A

Adjebli A, Leyronas C, Aissat K et Nicot PC. (2015). Comparison of *Botrytis cinerea* Populations Collected from Tomato Greenhouses in Northern Algeria. Journal of Phytopathology. **163**, 124–132.

Adrian M et Jeandet P.(2012). Effects of resveratrol on the ultrastructure of *Botrytis cinerea* conidia and biological significance in plant/pathogen interactions. Fitoterapia. **83**,1345-1350.

Alstrom S. (2001) Characteristics of bacteria from oil seed rape in relation to their biocontrol of activity against *Verticillium dahlia*. J. Phytopathol. **149**, 57–64.

Aissat K, Nicot PC, Guechi A, Bardin M et Chibane M. (2008). Grey mould development in greenhouse tomatoes under drip and furrow irrigation. Agron. Sustain. Dev. **28**, 403-409.

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

Alabouvette C, Eparvier A, Couteaudier Y et Steinberg C. (1991) Methods to be used to study the competitive interactions between pathogenic and non-pathogenic *Fusarium* spp. In the rhizosphere and at the root surface. Proceeding workshop on new approaches in biological control of soilborne disease, Copenhagen, Denmark.

Amselem J, Cuomo CA, Van Kan JAL, et al. (2011). Genomic analysis of the necrotrophic fungal pathogens *Sclerotinia sclerotiorum* and *Botrytis cinerea*. Plos Genet. **7**, 1–27.

Arrebola E, Sivakumar D et Korsten L. (2010) Effect of volatile compounds produced by *Bacillus* strains on postharvest decay in citrus. Biol Control. **53**, 122–128.

Asselin A. (1993). Quelques enzymes végétales à potentiel antimicrobien. Phytoprotection. **74**,3-18.

Avril JL, Dabernat H, Denis F et Monteil H. (1992). Bactériologie clinique. Edition: Marketing.Paris. pp 9-10-135.

## B

Bardin M, Fragues J et Nicot PC. (2008). Compatibility between biopesticides used to control grey mould, powdery mildew and whitefly on tomato. *Biological Control*. **46**, 476-483.

Blancard D., Laterrot H., Marchoux G. et Candresse T. (2009). Les maladies de la tomate, identifier, connaître maîtriser. Ed,Quae. Paris, pp 21-423.

Blancard D., Laterrot H., Marchoux G. et Candresse T. (2012). Tomato Diseases Identification, Biology and Control. Ed,Quae. Paris. pp.181-182.

Bénard C, Bernillon S, Biais B, Osorio S, Maucourt V, Ballias P, Deborde C, Colombié S, Cabasson C, Jacob D, Vercambre G, Gautier H, Rolin D, Génard M, Fernie AR, Gibon Y et Moing A. (2015). Metabolomic profiling in tomato reveals diel compositional changes in fruit affected by source–sink relationships. *Journal of Experimental Botany*. **66**, 3391–3404.

Benito EP, Arranz M et Eslava AP. (2000). Factores de patogenicidad de *Botrytis cinerea*. *Rev Iberoam Micol*. **17**, 43-46.

Bennett C B, Hood MA. (1980). Effects of cultural conditions on the production of chitinase by a strain of *Bacillus megaterium*. *Dev. Indust. Microbiol*. **2**, 357-368.

Bristow PR, McNichol, RJ, Williamson, B.(1986). Infection of strawberry flowers by *Botrytis cinerea* and its relevance to Grey mould development. *Ann. Appl. Biol*. **109**, 545-554.

Brown A. (2001). Microbiological Applications Laboratory Manual in General Microbiology. Edition: Benson. 65p.

Bunster L, Fokkema N J et Schippers B. (1989). Effect of surface-active *Pseudomonas* spp. on leaf wettability. *Applied and Environmental Microbiology*. **55**, 1340-1345.

## C

Caron J, Laverdière L, Thibodeau PO et Bélanger RR. (2002). Utilisation d'une souche indigène de *Trichoderma harzianum* contre cinq agents pathogènes chez le concombre et la tomate de serre au Québec. *Phytoprotection*. **83**, 73-87.

Chaurasia B, Pandey A, Palni MS, Trivedi P, Kumar P, Colvin N. (2005). Diffusible and volatile compounds produced by an antagonistic *Bacillus subtilis* strain cause structural deformations in pathogenic fungi in vitro. *Microbiol Res*. **160**,75-81.

Chougar S et Medjdoub-Bensaad F. (2014). Biologie et dynamique des populations de *Tuta absoluta* (meyrick, 1917) sur deux variétés de tomate (dawson et zahra) sur le littoral de la région de tizi-ouzou. Dixième Conférence Internationale Sur Les Ravageurs En Agriculture Montpellier.

Chougourou D C, Agbaka A, Adjakpa J B, Koutchika RE, Kponhinto U G et Adjalian E J. N. (2012). Inventaire préliminaire de l'entomofaune des champs de tomates (*Lycopersicon esculentum* Mill) dans la Commune de Djakotomey au Bénin. Int J Biol Chem Sci. **6** Suppl 4: 1798-1804.

Cook R et Baker K. (1974). Biological control of plant pathogens. Freeman, San Francisco, CA, USA. 380 p.

Cronquist A., (1981). An integrated system of classification of following plants. Colombia University. 1256p

## D

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

Decognet V, Bardin M, Trottin-Caudal Y et Nicot PC. (2009). Rapid change in the genetic diversity of *Botrytis cinerea* populations after the introduction of strains in a tomato glasshouse. Phytopathology. **99**, 185-193.

Decognet V, Ravetti F, Martin C et Nicot PC. (2010). Improved leaf pruning reduces development of stem cankers caused by grey mould in greenhouse tomatoes. Agronomy for Sustainable Development. **30**, 465-472.

Delarra C. (2007). Microbiologie pratique pour le laboratoire d'analyses ou de contrôle sanitaire, pp 427-150.

Duffy B, Schouten A et Raaijmakers J M. (2003). Pathogen self-defense: mechanisms to counteract microbial antagonism. Annual Review of Phytopathology. **41**, 501-538.

## E

Edwards SG et Seddon B. (1992). *Bacillus brevis* a biocontrol agent against *Botrytis cinerea* on protected chinese cabbage, , in: Verhoeff K, Malathrakis NE et Williamson B. Recent advances in *Botrytis* research. (Eds), Pudoc Scientific Publishers, Wageningen, The Netherlands. pp.267-271.

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, Williamson B, Tudzynski P et Delen N. (2007). *Botrytis* spp and diseases they cause in agricultural systems. An Introduction. in: Elad Y., Williamson B., Tudzynski P. and Delen N. *Botrytis: biology, pathology and control*. Springer, Dordrecht, The Netherlands, pp2-3.

Elmer PAG et Reglinski T. (2006). Biosuppression of *Botrytis cinerea* in grapes. Plant Pathology, **55**, 155–177

Esquerré-Tugayé MT. (2001). Plantes et agents pathogènes, une liaison raffinée et dangereuse : l'exemple des champignons. Life des Sciences. **324**,899-903.

## F

Fagbohoun O et Kiki G. (1999). Aperçu sur les principales variétés de tomate locale cultivées dans le sud du Bénin. Bulletin de la Recherche Agronomique.

Faure–Raynaud M. (1981). Détermination de l'activité chitinolytique de microorganismes, bactéries et levures, de la litière du sapin *Abies alba mill*. Ann. Microbiol. (Inst. Pasteur). **132**, 267 - 279.

Fiddaman P J et Rossall S. (1993). The production of antifungal volatiles by *Bacillus subtilis*. J. Appl. Bacteriol. **74**, 119-126.

Fekete E, Fekete E, Irinyi L, Karaffa L, Arnyasi M, Asadollahi M et Sndor E.(2012). Genetic diversity of a *Botrytis cinerea* cryptic species complex in Hungary. Microbiological Research. **167**, 283– 291.

Fernando W, Nakkeeran S et Zhang Y. (2006). Biosynthesis of antibiotics by PGPR and its relation in biocontrol of plant diseases. In: Siddiqui, Z.A. PGPR: Biocontrol and Biofertilization. Springer, Dordrecht, The Netherlands. pp. 67-109.

France C. (2002). LA TOMATE. Edition: Manise. France. 06p.

## G

Gaussen H, Lefoy J et Ozenda P. (1982). Précis de Botanique. 2ème ed. Masson. Paris. 172p.

Glare T, Caradus J, Gelernter W, Jackson T, Keyhani N, Kohl J, Marrone P, Morin L et Stewart A. (2012). Have biopesticides come of age?. Trends in Biotechnology. **30**, 5.

Goodwin AE, Spencer Roy J, Grizzle M et Terrell Goldsby M. (1994). *Bacillus mycoides*: a bacterial pathogen of channel catfish. Dis. aquat. Org. **18**, 173-179.

Grierson D et Kader AA. (1986). Fruit ripening and quality. In: Atherton JG et Rudich J. The Tomato Crop A scientific Basis For Improvement. Chapman and Hall. USA. p275.

## H

Haas D et Défago G. (2005). Biological control of soil-borne pathogens by *fluorescent pseudomonads*. Nat. Rev. Microbiol. **3**, 307–319.

Harman G E et Shores M. (2007). The Mechanisms and Applications of Symbiotic Opportunistic Plant Symbionts. In: Vurro M et Gressel J. (Eds.), Novel Biotechnologies for Biocontrol Agent Enhancement and Management, pp.131-155.

Hmouni A, Oihabi L, Badoc A, Douira A. (2003). Etude de la résistance de *Botrytis Cinerea* aux benzimidazoles, Dicarboximides et dithiocarbamates dans les cultures abritées de tomate de la région du Gharb (Maroc). Bull. Soc. Pharm. Bordeaux. **142**, 79-100.

Hmouni A. Massoui M et Douira A M. (1999). Etude de l'activité antagonistes de *Trichoderma spp* .et de *Gliocladium spp* à l'égard de *Botrytis cinerea* agent causal de la pourriture grise de la tomate. Al Awamia 99.

Holt J G, Krieg N R, Sneath P H A, Staley JT et Williams S T. (1994). Genus *Pseudomonas*. In: Holt J G, Krieg N R, Sneath P H A, Staley J T, Williams S T. (Eds) Bergey's manual of determinative bacteriology. Williams and Wilkins, pp. 93-94.

Holz G., Coertze S et Williamson B. (2007). The ecology of *Botrytis* on plant surfaces. In : Elad Y, Williamson B, Tudzynski P et Delen N. *Botrytis: Biology, Pathology and Control*. (Ed). Springer, Dordrecht, The Netherlands. 402p.

## J

Jacobsen B J. (2006). Biological control of plant diseases by phyllosphere applied biological control agents. In: Bailey MJ, Lilley AK et Timms-Wilson TM. Spencer-Phillips Microbial ecology of aerial plant surfaces.(Eds), Atheneum Press, Gateshead, UK, pp.133-147.

Jamalizadeh M, Etebarian HR, Alizadeh I et Aminian A. (2008). Biological Control of Gray Mold on Apple Fruits by *Bacillus licheniformis* (EN74-1).Phytopathology. **36**, 23-29.

## K

Kai M, Haustein M, Molina F, Petri A, Scholz B, Piechulla B. (2009). Bacterial volatiles and their action potential. Applied Microbiology and Biotechnology. **81**, 1001-1012.

Khelil F, Matallah-Boutiba A, Chemlal-Kherraz D, Boutiba Z. (2014). Characterization of hydrocarbonoclastes bacteria isolated from marine waters west algeria: evolution analysis in presence of crude oil. **2**, 557-563.

Killani A S, Abaidoo R C, Akintokun A K, et Abiala M A. (2011). Antagonistic Effect of Indigenous *Bacillus subtilis* on Root-/Soil-borne Fungal Pathogens of Cowpea. **3**, 11-18.

Kim W G, Weon HY, Seok S J et Lee K H. (2008). In Vitro Antagonistic Characteristics of *Bacilli* Isolates against *Trichoderma spp.* and Three Species of Mushrooms. Mycobiology.**36**, 266-269.

Kirankumar Z Z. (2007). Evaluation of plant growth promoting rhizobacterial strains against TMV on tomato. Master of science (agriculture) in agricultural microbiology. University of Agricultural Sciences, Dharwad. department of agricultural microbiology college of agriculture. 98 p.

Kohl J, Postma J, Nicot P, Ruocco M et Blum B. (2011). Stepwise screening of microorganisms for commercial use in biological control of plant-pathogenic fungi and bacteria. Biological Control. **57**, 1-12.

Koike ST, Gladders P et Paulus AO. (2007). Vegetable diseases. Manson. London. 342p.

Kope ný J, Hodrová B et Stewart C S. (1996). The isolation and characterization of a rumen chitinolytic bacterium. Lett. Appl. Microbiol. **23**, 195-198.

Kullnig C, R , Mach L, Lorito M et Kubicek CP. (2000). Enzyme diffusion from *Trichoderma atroviride* (= *T. harzianum* P1) to *Rhizoctonia solani* is a prerequisite for triggering of *Trichoderma ech42* gene expression before mycoparasitic contact. Applied and Environmental Microbiology. **66**, 2232-2234.

## L

Larkin R P et Fravel D R. (2002). Effects of varying environmental conditions on biological control of *Fusarium* wilt of tomato by nonpathogenic *Fusarium* spp. *Phytopathology*. **92**, 1160–1166.

Lepoivre P. (2003). Phytopathologie. Editions : De Boeck. Belgique. 291p.

Leyva MO, Vicedo B, Finiti I, Flors V, Del Amo G, Real MD, Garcia-Agustin P et Gonzalez-Bosch. (2008). Preventive and post-infection control of *Botrytis cinerea* in tomato plants by hexanoic acid. Plant Pathology. **57**, 1038-1046.

Lorito M, Hayes CK, Di Pietro A, Woo SL et Harman GE. (1994). Purification, characterization, and synergistic activity of glucan 1,3- -glucosidase and an N-acetyl- -glucosaminidase from *Trichoderma harzianum*. *Phytopathology*. **84**, 398-405.

Lothorlary O, Fagon JY et HOI AB. (1995). Nosocomial acquisition of multi resistant *Acinetobacter baumannii* : risk factors and prognosis. Clin Infect Dis. **20**, 790-796.

## M

Madigan M et Martinko J. (2007). Biologie des micro-organismes, 11ème édition, p 357

Marchal N, Bourdon J L et Richard CL. (1991). Les milieux de culture pour l'isolement et l'identification biochimique des bactéries .3ème Edition : Doin. Paris.

Manzoor A B. (2013). Nitrogen fertilization of the host plant influences susceptibility, production and pathogenicity of *Botrytis cinerea* secondary inoculum, as well as the efficacy

of biological control. Thèse de doctorat de phytopathology. Université d'Avignon et des Pays de Vaucluse. France. 14p.

Martinez F, Blancard D, Lecomte P, Levis C, Dubos B et Fermaud M. (2003). Phenotypic differences between *vacuina* and *transposa* subpopulations of *Botrytis cinerea*. *European Journal of Plant Pathology*. **109**, 479–488.

Mendoza Garcia RA, Martijn ten Hoopen G, Kass D C J, Sanchez Garita V A et Krauss U. (2003). Evaluation of mycoparasites as biocontrol agents of *Rosellinia* root rot in cocoa. *Biol. Control*. **27**, 210-227.

Miller, MW et Jerves, TM. (1979). The persistence of benomyl tolerance in *Botrytis cinerea* in glass house tomato crops. *Plant Pathol*. **28**, 119-122.

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

Mouden N, Benkirane R, Ouazzani Touhami A, Badoc A, Douira A. (2010). Effet de six fongicides sur Le développement de six souches de *Botrytis Cinerea* isolées de Fraises. *Bull. Soc. Pharm. Bordeaux*. **149**, 85-102.

Mouria B, Ouazzani-Touhami A, Mouria A et Douira A. (2013). Mise en évidence d'une variation intra spécifique chez *Botrytis cinerea* et lutte biologique in vitro par l'extrait de compost. *J. Appl. Biosci*.

## N

Naika S, Jeude JVL, De Goffau M, Hilmi M, Dam BV. (2005). La culture de la tomate, Production, transformation et commercialisation. *Agrodok 17*. Fondation Agromisa et CTA, Wageningen. 64p

Nicot PC, Mermier M, Vaissière BE et Lagier J. (1996). Differential spore production by *Botrytis cinerea* on agar medium and plant tissue under near-ultraviolet light absorbing polyethylene film. *Plant Disease*. **80**, 555-558.

## P

Palleroni N J. (1992). Present situation of the taxonomy of the aerobic *Pseudomonads*. In: Galli E, Silver S. Wiltholt B. *Pseudomonas: Molecular Biology and Biotechnology*. (Eds.), American Society for Microbiology, Washington, pp. 105–1105.

Petatán-Sagahón I, Anducho-Reyes MA, Silva-Rojas HV, Arana-Cuenca A, Tellez-Jurado A, Cárdenas-Álvarez IO 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.

Pieterse CM.J , Van Wees S C M , Ton J, Van Pelt J A et Van Loon LC. (2002). Signaling in rhizobacteria-induced systemic resistance in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Biol.* **4**:535-544.

## Q

Quecine MC, Araujo W L, Marcon J, Gai C S, Azevedo J L et Pizzirani- Kleiner A A. (2008). Chitinolytic activity of endophytic *Streptomyces* and potential for biocontrol. Original Article.

## R

Rapilly F. (2001). Champignons des plantes : les premiers agents pathogènes reconnus dans l'histoire des sciences. *Life Sciences.* **324**, 893-898.

Remuson F, Le Guellec M, Micoud A. (2014). Résistance du Botrytis de la tomate (*Botrytis cinerea*) vis-à-vis des fongicides. *Ecophyto.2p*

Robinson-Boyer, Jeger MJ, Xu XM et Jeffries P. (2009). Management of strawberry grey mould using mixtures of biocontrol agents with different mechanisms of action. *Biocontrol Science and Technology.* **19**, 1051-1065.

Romanazzi G et Feliziani E. (2014). *Botrytis cinerea* (Gray Mold).In: Bautista-Banos S. *Postharvest Decay Control Strategies*. Elsevier Inc. pp133-136.

Ronseaux S, Clément C et Ait Barka E. (2013). Interaction of *Ulocladium atrum*, a Potential Biological Control Agent, with *Botrytis cinerea* and Grapevine Plantlets. *Agronomy.* **3**, 632-647.

Richard C et Boivin G. (1994). Maladies et ravageurs des cultures légumières au Canada. Société canadienne de phytopathologie et Société d'entomologie, Canada. 590p.

## S

Schalchli H, Hormazabal E, Becerra J, Birkett M, Alvear, M, Vidal J, Quiroz A. (2011). Antifungal activity of volatile metabolites emitted by mycelial cultures of saprophytic fungi. *J. Chem. Ecol.* **27**, 503–513.

Sharifova S, Mehdiyeva S et Theodorikas K. (2013). Assessment of genetic diversity in cultivated tomato (*solanum lycopersicum* L.) Genotypes using rapd primers. *Journal of Horticultural Research.* **21**Suppl 1:83-89.

Shishkoff N et McGrath M T. (2002). AQ10 biofungicide combined with chemical fungicides or AddQ spray adjuvant for control of cucurbit powdery mildew in detached leaf culture. *Plant Dis.* **86**, 915-918.

Sietsma J A. et Wessels J G H. (1979). Evidence of covalent linkages between chitin and  $\beta$ -D-glucan in a fungal wall. *J. Gen. Microbiol.* **114**, 99-108.

Soylu EM, Kurt S et Soylu S. (2010). In vitro and in vivo antifungal activities of the essential oils of various plants against tomato grey mould disease agent *Botrytis cinerea*. *International Journal of Food Microbiology.* **143**, 183–189.

Sutton, JC.(1990). Epidemiology and management of *Botrytis* leaf blight of onion and gray mold of strawberry : a comparative analysis. *Can. J. Plant Pathology.* **12**, 100-110.

## T

Tam S M, Faurobert M, Pawlowski T, Garchery C, Burck H, Mhiri C, Causse M, Grandbastien MA . (2006). Caractérisation de la diversité génétique chez la tomate. *Les Actes du BRG.* **6**, 81-96.

Ten Have A, Breuil WO, Wubben JP, Visser J et Van Kan JAL. (2001). *Botrytis cinerea* Endopolygalacturonase Genes Are Differentially Expressed in Various Plant Tissues. *Fungal Genetics and Biology.* **33**, 97–105.

Thakore Y. (2006). The biopesticide market for global agricultural use. *Industrial Biotechnology.* **2**, 194-208.

Trotel-Aziz P, Couderchet M, Biagianti S, Aziz A. (2008). Characterization of new bacterial biocontrol agents *Acinetobacter*, *Bacillus*, *Pantoea* and *Pseudomonas* spp. Mediating grapevine resistance against *Botrytis cinerea*. *Environmental and Experimental Botany*. **64**, 21–32.

Tucci M, Ruocco M, De Masi L, De Palma M et Lorito M. (2011). The beneficial effect of *Trichoderma* spp. on tomato is modulated by the plant genotype. *Molecular Plant Pathology*. **12**, 341–354.

## V

Van Loon L C, Bakker P et Pieterse C M J. (1998). Systemic resistance induced by rhizosphere bacteria. *Annu. Rev. Phytopathol.* **36**, 453-483.

Vincent et coderre, 1992. La lutte biologique. Edition : Lavoisier TEC et DOC, p19.

Viterbo A, Ramot O, Chernin L et Chet I. (2002). Expression regulation of the endochitinase chit36 from *Trichoderma asperellum* (*T. harzianum* T-203). *Current Genetics*. **42**, 114-122.

## W

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**,247–252.

Wang C, Wang Z, Qiao X, Li Z, Li F, Chen M, Wang Y, Huang Y & Cui H. (2013). Antifungal activity of volatile organic compounds from *Streptomyces alboflavus* TD-1. *FEMS Microbiol Lett.* **341**, 45–51.

Watterson J C.(1987). Diseases. In: Atherton J G et Rudich J. *The Tomato Crop A Scientific Basis For Improvement*. USA, pp 443-46.

Widden P. (1994). Competition and the fungal community. In: Esser K, Wicklow D T et Svderstrvm B E. *The mycota IV. Environmental and Microbiological* (Eds.), Springer-Verlag, Berlin, Allemagne. pp. 135-147.

Williamson B, Tudzynski B, Tudzynski P et VanKan JAL. (2007). *Botrytis cinerea*: the cause of grey mould disease. *Molecular Plant Pathology*. **8**, 561-580.

Wheatley R E. (2002). The consequences of volatile organic compound mediated bacterial and fungal interactions. *Antonie van Leeuwenhoek*. **81**, 357–364.

Whipps JM. (1987). Effect of media on growth and interactions between a range of soilborne glasshouse pathogens and antagonistic fungi. **107**, 127-142.

Wintzingerode FV, Rainey FA, Kroppenstedt RM et Stackebrandt E. (1997). Identification of environmental strains of *Bacillus mycoides* by fatty acid analysis and species-specific 16S rDNA oligonucleotide probe. *FEMS Microbiology Ecology*. **24**, 201-209.

Woo S L et Lorito M. (2007). Exploiting the Interactions Between Fungal Antagonist, Pathogens and The Plant For Biocontrol. In: Vurro M et Gressel J. (Eds.), *Novel Biotechnologies for Biocontrol Agent Enhancement and Management*. p. 107-130.

# *Annexes*

**Annexe I: Culture des plantes de tomate sous serre**

Date	Nom du produit utilisé	Type de produit
09.02.2015	Cursate	Fongicide
11.02.2015	Fertigol	Engrais
13.03.2015	Verita	Fongicide
15.03.2015	Vertimec	Acarien
29.03.2015	Verita	Fongicide
31.03.2015	NPK	Amendement organique
03.04.2015	Singita	Antimineux
05.04.2015	Verita	Fongicide

**Annexe II.** Milieux de culture (pour 1L)**Milieu PDA**

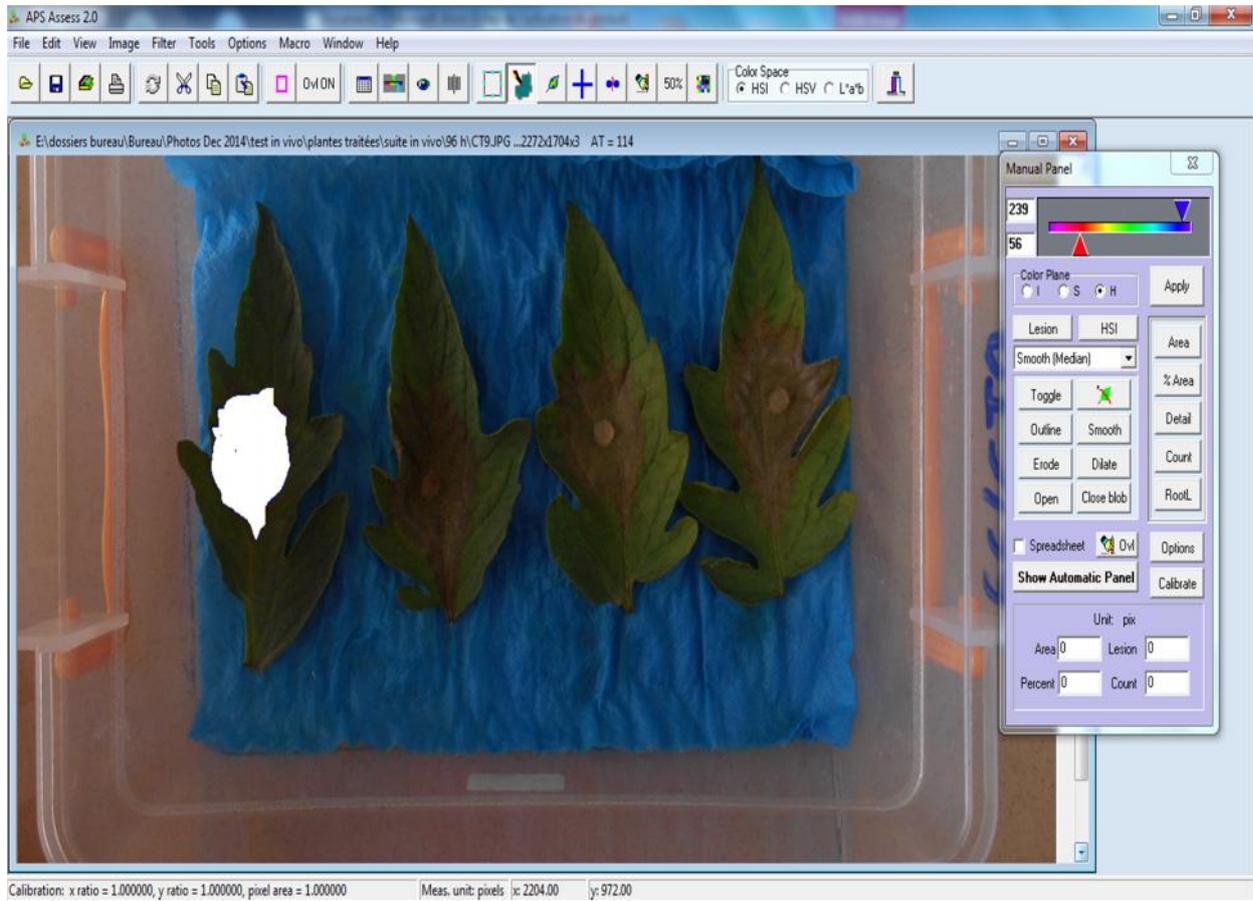
Dextrose.....	20g
Infusion de pomme de terre.....	200g
Agar.....	15g
PH.....	5,6
Autoclavage.....	120°C/20min

**Milieu GN**

Peptone.....	6g
Extrait de levure.....	2g
Extrait de viande.....	1g
NaCl.....	5g
Agar.....	14g
PH.....	7,3
Autoclavage.....	120°C/20min

**Milieu à base de chitine**

La chitine colloïdale.....	0.8 à 0.6 g
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> .....	2.7 g
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> .....	0.3 g
MgSO <sub>4</sub> 7H <sub>2</sub> O.....	0.7 g
NaCl.....	0.5 g
KCl.....	0.5 g
Extrait de levure.....	0.13 g
Agar.....	15 g
PH.....	<b>7</b>
Autoclavage.....	120°C/20min

**Annexe III:** Analyse d'une photographie avec le logiciel ASSESS 2.0

## Annexe IV. Analyse statistique

Tableau I : Analyse statistique *in vitro*

Isolats	ALG 66			BC1		
	Moyenne Des PGI%	Ecartype	groupes	Moyenne PGI%	Ecartype	Groupes
CS17	0	0	F	0	0	J
M32	0	0	F	1,52	1,82912547	J
CS7	0	0	F	15,31	4,12431813	I
T80	4,63	0	F	17,88	7,83779944	HI
CT22	45,02618	2,617801	CD	42,34	2,54558441	DEFG
M42	34,14333	16,89904	DE	28,57	4,35E-15	GH
CT6	4,06	3,721707	F	50,79333	1,37409364	BCDE
CS2	42,40838	0	CD	14,18	22,8503217	I
CS9	38,91798	3,022776	CDE	20,71333	8,25409192	HI
T57	34,95333	10,15853	DE	33,30667	14,517253	FG
M36	43,65079	6,873217	CD	37,67705	0	EFG
CS1	0	0	F	9,34	0	IJ
CT9	27,77778	17,22423	E	57,42333	2,61584276	ABCD
T33	41,72	0	CD	44,71333	2,81746931	CDEF
CT8	46,77138	2,468086	BCD	41,44	1,55884573	EFG
CT20	46,77138	5,449387	BCD	41,44	1,55884573	EFG
CT12	48,51658	1,511388	BCD	40,54	0	EFG
T31	41,59928	1,5562	CD	47,54333	3,8744591	CDEF
M7	47,15333	1,408735	BCD	46,81667	1,37409364	CDEF
T83	46,09164	0	CD	49,23	0	CDE
T75	47,01333	2,645002	BCD	48,78	0	CDE
M25	49,51923	2,403846	BCD	48,96332	3,65436658	CDE
CT3	51,18	2,385142	BC	57,93333	1,37409364	ABC
M9	60,88889	4,073401	AB	58,83777	2,42130751	ABC
T18	64,74359	4,085753	A	60,12759	1,38122074	ABC
T23	62,33974	1,387861	A	64,11483	4,784689	AB
T90	63,55556	4,073401	A	64,48749	2,79588508	AB
M6	65,03667	1,408735	A	67,45333	1,37409364	A
T29	64,44444	3,079201	A	68,523	2,42130751	A
M4	66,66333	5,634939	A	67,45333	1,37409364	A

**Tableau II** : Analyse statistique *in vivo*

Isolat	Moyennes des surfaces des lésions (mm <sup>2</sup> )	Ecartype	Groupes	Moyennes des PGI%
CT9	482,8	98,87189	A	2,162734
T33	449,905	64,8973	A B	8,828759
M42	414,085	43,40815	ABC	16,08752
M32	406,955	76,44444	ABC	17,53239
CT12	376,685	57,7911	ABCD	23,66647
CS17	351,51	44,8292	ABCDE	28,76807
CS2	332,4975	116,209	ABCDE	32,62087
M7	310,1275	63,56733	BCDE	37,15405
M6	299,46	112,7395	BCDE	39,31577
CT6	289,935	69,38583	BCDEF	41,24597
CT22	285,4075	61,30323	BCDEF	42,16344
T31	280,2725	39,34983	BCDEF	43,20403
CT8	274,83	66,35513	BCDEF	44,30693
T83	270,2325	46,44627	CDEFG	45,23859
T23	264,9675	57,62153	CDEFG	46,30552
T75	253,8075	129,5179	CDEFGH	48,56704
T29	249,2075	56,55514	CDEFGH	49,49921
T90	232,605	97,32785	CDEFGH	52,86363
CS7	221,1175	14,85642	DEFGH	55,19153
CT3	218,845	43,59484	DEFGH	55,65204
T57	196,2425	104,0223	DEFGHI	60,23233
M4	188,2925	112,1926	DEFGHI	61,84337
CS1	175,6975	137,9333	EFGHI	64,39569
M9	110,7075	40,54617	FGHI	77,56562
M36	95,4375	39,39702	GHI	80,66002
T18	84,9775	100,9956	HI	82,77969
CS9	81,985	42,45524	HI	83,38611
M25	34,38	8,510057	I	93,03305
CT20	30,1125	12,3883	I	93,89784
T80	27,185	3,316831	I	94,49108

## Résumé

L'objectif de cette étude est d'évaluer l'activité antagoniste de 30 isolats bactériens à l'encontre de *Botrytis cinerea*. Sur la base des caractéristiques morphologiques et biochimiques, la majorité des isolats ont été rattachés au genre *Bacillus* et *Pseudomonas*. Des tests de confrontations *in vitro* aussi bien que *in vivo* sur feuilles de tomate ont été réalisées. Les résultats obtenus ont montré des réponses variables des isolats avec un effet antagoniste sur le champignon pour certaines. Les PGI% obtenus ont varié de 1,52% à 68,52% pour le test de confrontation direct *in vitro* et de 4,76% à 56,09% pour le test de confrontation à distance. Sur les feuilles de tomate détachées, l'application des isolats testés a permis de réduire de manière significative les surfaces de lésions causées par *B.cinerea* avec des PGI% variant de 2,16% à 94,49%. Les isolats ayant montré une grande efficacité *in vitro* ne sont pas les plus actifs *in vivo*.

Les isolats testés ont montré que différents genres de bactéries, pourraient être utilisés dans la lutte biologique contre *B.cinerea*. Leur potentiel en tant qu'agents de lutte biologique semble être intéressant et une étude plus approfondie est nécessaire pour mieux comprendre leur fonctionnement.

**Mots clés :** *Botrytis cinerea*, Tomate, Biopesticide, Lutte biologique

## Abstract

The aim of this study is to evaluate the antagonistic activity of 30 bacterial isolates against *Botrytis cinerea*. Based on morphological and chemical characteristics, the majority of isolates were related to the genus *Bacillus* and *Pseudomonas*. Direct confrontations *in vitro* assay as well as *in vivo* in tomato leaves were performed. The results showed variable responses of isolates with antagonistic effect against the fungus in some isolates. The PGI% vary between 1.52% and 68.52% for the direct confrontation *in vitro* assay, and 4.76% and 56.09% for indirect confrontation assay. On detached tomato leaves, the application of the isolates tested has significantly reduced the area of lesions caused by *B.cinerea* with a PGI% ranging from 2.16% to 94.49%. Isolates with great *in vitro* efficacy are not more effective *in vivo*.

The isolates tested have showed that different genus of bacteria could be used in biological control against *B.cinerea*. Their potential as biological control agents seems to be interesting and further studies are needed to better understand how their functioning

**Keywords:** *Botrytis cinerea*, Tomato, biopesticide, Biological control