

Réf :.....

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

MASTER

Thème

**Isolement et sélection d'agents de
biocontrôle de quelques champignons
phytopathogènes de la tomate**

Présenté par :

Mlle SALHI Hanane et Mlle SMAIL Cylia

Soutenu le : **06 Juillet 2022**

Devant le jury composé de :

M. BENSALD K.

M^{me}. BENSIDHOUM L.

M^{elle}. BOUAOUD Y.

MAA

MCB

MCB

Président

Promotrice

Examinatrice

Année universitaire : 2021 / 2022

Remerciements

Avant tous on remercie Dieu le tout puissant de nous avoir donné la santé et la volonté d'entamer et de terminer ce mémoire.

Nous tenons à exprimer toutes nos gratitudees à Madame BENSIDHOUM Leila pour nous avoir fait l'honneur d'être notre promotrice, de nous avoir fait confiance, de nous encourager et pour ses constantes orientations durant nos travaux de laboratoire, sa méticuleuse attention, ses précieux conseils, sa disponibilité et son extrême amabilité malgré sa grande charge de travail.

Merci à tous les membres de jury M. BENSALD K, et M^{lle}. BOUAOU D Y. pour avoir accepté d'examiner et d'évaluer ce travail.

Nous tenons particulièrement à remercier M. NABTI El-Hafid pour nous avoir accueillies au sein de laboratoire LMER,

Egalement, nous adressons nos vifs remerciements à M. BOURDJIOUA Samir l'agriculteur de la serre de Merdj Ouamen qui nous a accueillies et permis de réaliser l'expérimentation, sans sa collaboration ce travail n'aurait jamais vu le jour.

Nous tenons également à remercier M^{lle}. BOUAOU D Yousra et l'équipe Biomasse et Environnement du Laboratoire de Maitrise des Energies Renouvelables Ahlam, Noria, Nassira et M. ABBACI. H.

Nous remercions tous nos chers professeurs qui nous ont enseigné durant notre parcours universitaire.

Merci à Sarah, Mebarqa, Tasaadit et Lydia pour leurs aides et les bons moments passés ensemble.

Dédicace

À la mémoire de mon père

J'aurais souhaité ta présence en ce moment pour partager ma joie. Tu m'as toujours fait preuve d'amour et d'affection, tu es toujours présent dans mon esprit et dans mon cœur. Aussi dans ce moment de joie, tu as toutes mes pensées.

Que ton âme repose en paix mon cher papa.

À ma chère mère

Tous les mots ne pourraient témoigner de ma gratitude, aussi je te dédie ce mémoire comme fruit de ton dévouement et l'expression de mon profond amour, merci maman pour toute la force que tu m'as donnée dans ma vie.

À mes frères et sœurs

Nabil, Nassim, Doudou, Sabrina, Latifa et Chahinez.

À mes amis

Salima, Tami, Lydia, Nani.

À ma chère binôme Hanane.

Cyfia

Dédicace

Au nom de l'amour et du respect, je dédie ce modeste travail à :

Mon Cher Père, aucun mot ne serait exprimé tout mon amour et ma gratitude, je te remercie pour tous les sacrifices que tu as fait pour moi, tes encouragements, ta préoccupation et surtout de m'avoir accordé toute ta confiance pour me voir réussir. La lumière de mes jours ma très Chère Maman qui a consacré toute sa vie pour mon éducation et ma réussite, celle qui m'a soutenue et encouragée durant toutes ces années d'études avec sa tendresse, compréhension, son soutien moral et surtout ses prières pour moi.

Mon unique frère Zahir, je te remerciais énormément pour tout ce que tu fais pour moi, tu étais là pour moi à chaque moment et je te serais toujours reconnaissante, que Dieu te protège et te garde pour moi, sans oublier ma belle-sœur Ouafa. Ma sœur du cœur Assia, tous les jolis mots ne suffisent pas pour te remercier pour tout ce que tu fais pour moi ainsi mon beau-frère Bachir pour ses conseils et son aide et bien sûr mon adorable neveu Enzo, que le bénisse.

Ma grand-mère maternelle pour son soutien, ses prières et son amour inconditionnel, merci pour tout et que Dieu te donne une bonne santé et longue vie.

Ma famille, mes tantes et mes cousins.

Mes Chers Ami(e)s Yacine, Nadine et Mima qui ont été là pour moi dans les moments difficiles, je vous souhaite plus de succès.

Ma binôme Cylia qui a partagé avec moi ce mémoire de fin de cycle.

Toute personne que je connais de près ou de loin, toute la promotion Master 2 Microbiologie Appliquée 2022, je vous dis Merci.

Hanane

Liste des abréviations

DO : Densité optique

DSA : Direction des services agricoles

FAO : Food and Agriculture Organization of the United Nations (Organisation des nations unies pour l'Alimentation et l'Agriculture).

FAOSTAT : Food and Agriculture Organization Corporate Statistical Database

GN : Gélose Nutritive

LB : Lauria Bertani

PCA : Plate Count Agar

PDA : Potato Dextrose Agar

HCN : Cyanure d'hydrogène

Liste des Figures

Figure 1 : Les différents organes de la tomate.....3

Figure 2 : La pourriture grise sur les différents organes de la tomate.....8

Figure 3 : Site de prélèvement des échantillons.....15

Figure 4 : Echantillon du sol.....15

Figure 5 : Les étapes d'isolement à partir d'un échantillon de sol.....16

Figure 6 : Isolement à partir de l'eau de puits.....17

Figure 7 : Mise en évidence de l'effet antagoniste des isolats sur la croissance mycélienne....18

Figure 8 : les différentes étapes de test *in vivo* sur les feuilles de tomate.....21

Figure 9 : les différentes étapes de test *in vivo* sur les fruits de tomate.....22

Figure 10 : les différentes étapes de test *in vivo* sur la plante de tomate.....23

Figure 11 : Pourcentage d'inhibition de la croissance du champignon phytopathogène *Botrytis cinerea* par les 48 isolats testés.....25

Figure 12 : Résultats de test *in vitro* de l'action antagoniste des isolats bactériens vis-à-vis de *B.cinerea*.....26

Figure 13 : Aspect macroscopique des isolats bactériens sélectionnés.....27

Figure 14 : Résultats de test *in vivo* sur les feuilles de tomate.....29

Figure 15 : Résultats de test *in vivo* sur les fruits de tomate.....31

Figure 16 : Diamètre de lésion en cm des zones pourries sur les fruits de tomate traitées par les isolats bactériens.....31

Figure 17 : Résultats de test *in vivo* sur les plantes de tomate.....33

Liste des tableaux

Tableau I : Evolution de la superficie, production et rendement de la tomate en Algérie entre 2014 à 2019.....5

Tableau II : Evolution de la production et rendement en superficies réservées à la culture de la tomate (plain champs et sous serre) à Béjaia de 2011 à 2016.....5

Tableau III : Classification de *Botrytis cinerea*.....9

Tableau IV : Résultats de la coloration de Gram et de test de catalase des 4 isolats bactériens..28

Sommaire

Liste des figures

Liste des tableaux

Liste des abréviations

Introduction générale.....1

Synthèse bibliographique

Chapitre I : Généralités sur les tomates

1. Origine et historique.....	3
2. Principales exigences écologiques et climatiques de la plante.....	3
3. Valeur nutritionnelle.....	4
4. Importance économique.....	4
5. Principales pathologies fongiques de la tomate.....	5
5.1. Cladosporiose.....	6
5.2. Oïdium.....	6
5.3. Mildiou.....	6
5.4. Alternariose.....	7
5.5. Fusariose.....	7
5.6. Verticilliose.....	7
5.7. Pourriture grise.....	8

Chapitre II : La lutte biologique

1. La lutte biologique.....	10
2. Le biocontrôle.....	10
3. Action des agents de biocontrôle	11
3.1. Mécanismes direct.....	11
3.2. Mécanismes indirect.....	12

Matériels et méthodes

1. Echantillonnage.....	15
2. Isolement de bactéries rhizosphériques	16
2.1. A partir du sol.....	16

2.2. A partir de l'eau de puits.....	16
3. Préparation d'une culture de champignon <i>Botrytis cinerea</i>	17
4. Test d'activité antifongique.....	17
4.1. Etude <i>in vitro</i>	17
4.1.1. Test de confrontation directe sur gélose.....	17
5. Identification des isolats bactériens sélectionnés.....	18
5.1. Les caractères morphologique.....	18
5.2. Etude des caractères biochimique.....	19
6. Etude <i>in vivo</i>	20
6.1. Préparation de la suspension bactérienne et fongique.....	20
6.2. Test de biocontrôle de <i>B.cinerea</i> sur feuilles de tomates.....	20
6.3. Test de biocontrôle de <i>B.cinerea</i> sur fruits de tomates.....	21
6.4. Test de biocontrôle de <i>B.cinerea</i> sur plantes de tomates.....	22

Résultats et discussion

1. Isolement de bactéries rhizosphériques.....	25
2. Activité antifongique des isolats bactériens.....	25
3. Identification des isolats sélectionnés.....	27
4. Test de biocontrôle sur les feuilles de tomate.....	29
5. Test de biocontrôle sur les fruits de tomate.....	30
6. Test de biocontrôle sur les plantes de tomate.....	33

Conclusion et perspectives.....35

Références bibliographiques.....37

Annexe

Résumé

Synthèse Bibliographique

Introduction

La tomate *Lycopersicon esculentum* Mill, de la famille des solanacées est classée parmi les plantes les plus importantes sur le plan nutritive et économique, que ce soit dans la production ou la consommation, à travers le monde (AbdAlla *et al.*, 2014). Dans le monde, la tomate occupe la seconde place des légumes après la pomme de terre, elle est disponible durant toutes les saisons, grâce à la culture en serre.

Au cours de leur cycle de vie, et comme toute culture végétale, les tomates sont sujette à de nombreuses attaques, notamment celles causées par des bioagresseurs qui entraînent des réductions significatives de la production agricole avec une estimation de pertes mondiale de 20 à 40 % par année. Ces pertes représentant une menace sérieuse pour la sécurité alimentaire (Miller *et al.*, 2017 ; Worrall *et al.*, 2018).

Botrytis cinerea est l'un de ces bioagresseurs qui peut affecter une large gamme d'espèces végétales, dans plusieurs conditions et sur une vaste zone géographique, en plein champ ou dans des serres. *B. cinerea* attaque également les produits agricoles après la récolte car il peut être actif à très basse température (Elad, 1997). En Algérie, ce champignons est considéré comme l'un des principaux agents pathogènes des tomates (Aissat *et al.*, 2008; Adjebli *et al.*, 2015).

L'utilisation illimitée de produits chimiques pour lutter contre ces bioagresseurs, est à l'origine de plusieurs problèmes, entre autres, risques sur la santé humaine, animale et environnementale et le déséquilibre de la flore rhizosphérique. En outre, l'efficacité des fongicides chimiques est souvent compromise par l'émergence de pathogènes résistants. (Gerhardson, 2002 ; Nasraoui, 2006).

Des solutions alternatives sont alors recherchées pour résoudre ces problèmes. Les nouvelles stratégies biotechnologiques ayant comme but d'introduire des microorganismes bénéfiques afin d'augmenter les capacités défensives naturelles des plantes et d'interférer avec les mécanismes employés par les bioagresseurs (Gust *et al.*, 2010) s'avèrent être très prometteuses.

L'utilisation des agents de lutte biologique en phytopathologie a reçu un grand intérêt dans le domaine agricole. De nombreux travaux se sont intéressés à l'étude de ces agents pour surmonter les problèmes de résistance et des effets indésirables associés aux fongicides, un grand nombre de bactéries antagonistes de *Botrytis cinerea* tels que *Bacillus sp.* et *Pseudomonas sp.* ont ainsi été mis en évidence (Caron et al., 2002; Bardin et al., 2008; Kohl et al., 2011).

L'objectif principal de ce travail est la sélection d'un agent de biocontrôle de champignon phytopathogène *Botrytis cinerea* *in vitro* et *in vivo*.

Pour atteindre l'objectif fixé, plusieurs étapes ont été réalisées :

- Prélèvement, isolement et sélection des isolats bactériens.
- Etude *in vitro* de l'effet antagoniste des isolats bactériens contre *Botrytis cinerea*.
- Etude *in vivo* de l'effet antagoniste des isolats bactériens sélectionnés contre *Botrytis cinerea* sur trois parties de plante de tomate, tiges, feuilles et fruit.

1. Origine et historique

La tomate, inconnue dans le vieux monde jusqu'au XVI^e siècle et encore très peu consommée au XIX^e siècle, est devenue le légume vedette du XX^e siècle, aussi bien en culture commerciale que dans les jardins familiaux (Blancard et *al.*, 2009).

La tomate est originaire du nord-ouest de l'Amérique de sud dans la région de Pérou et de l'Equateur. Les espagnols ont introduit la forme domestiquée de la tomate en Europe en 1523 puis en le Philippines et la Malaisie en 1650. Les tomates ont également été introduite en Amérique du Nord à la fin du 18^{ème} siècle (Iqbal et *al.*, 2019).

En Algérie, la tomate a été introduite par les cultivateurs du Sud de l'Espagne en raison des conditions climatiques propices pour sa culture, cette cultivation a commencé dans la région d'Oran en 1905 puis dans le centre, notamment au littoral Algérois (Rekibi, 2015).

Les botanistes ont attribué plusieurs nominations à la tomate, à savoir, *Solanum esculentum*, *Solanum lycopersicum* L., ou *Lycopersicon lycopersicum*, le nom *Lycopersicon esculentum* Mil. attribué par Philip Miller en 1754 a été retenu (Blancard et *al.*, 2009).

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 est classée comme l'un des aliments les plus importants dans l'alimentation humaine, qui se consomme frais ou transformé (Abbas, 2020).

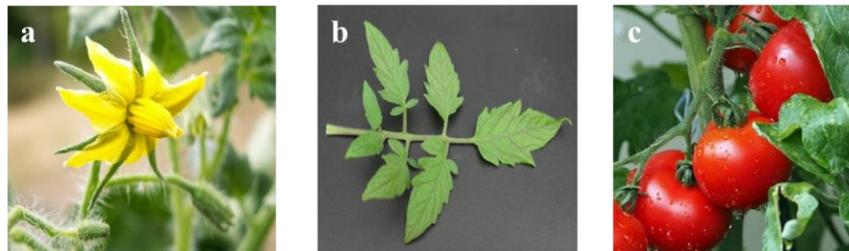


Figure 1 : Les différents organes de la tomate (Si Mohammed, 2017).
(a) Fleur ; (b) Feuilles ; (c) Fruit

2. Principales exigences écologique et climatique de la plante

La tomate est une plante de saison chaude qui exige des températures qui varient de 20 à 25°C pour une croissance optimale et lorsque les températures nocturnes sont inférieures à 15°C, les fécondations s'arrêtent, en dessous de 10°C et au-dessus de 38°C, les tissus végétaux sont endommagés (Chaux et Foury, 1994 ; Naika et *al.*, 2005). Elle aime les endroits ensoleillés (Toussaint et Baudoin, 2009) et un taux d'humidité entre 50 et 60% (Naika et *al.*, 2005). Les conditions optimales au bon développement de système

racinaire de la tomate sont un sol riche en matière organique, ameubli, léger et bien drainé, avec un pH qui varie entre 5,5 et 7 (Direction de l'agriculture, 2018).

3. Valeur nutritionnelle

La tomate est très prisée pour son intérêt alimentaire et sa valeur nutritive. Le fruit est très riche en vitamine C, en sucre et en acide organique. Ses teneurs en potassium, en vitamine A, en β carotène et sa richesse en pigment lycopène en font d'elle un légume à propriétés anticancéreuses (Blancard et *al.*, 2009). Les principaux minéraux qui entrent dans la constitution de la tomate sont le calcium, le magnésium, le fer, le phosphore, le potassium et le sodium (Turcotte et *al.*, 2015).

4. Importance économique

La tomate a une place importante dans l'alimentation humaine puisqu'elle est consommée toute l'année, dans le monde entier. La tomate étant le produit le plus consommé et commercialisé dans le monde (Rekibi, 2015). Elle se positionne au premier rang mondial des fruits cultivés avec une production d'environ 177 millions de tonnes par an (Anonyme 1). La plante est cultivée sous serre et en plein champ, sur une superficie d'environ 4.7 millions d'hectares, ce qui présente près d'un tiers (1/3) des surfaces mondiales cultivées consacrées aux légumes (FAOSTAT, 2016). 177'118'248 tonnes de tomates sont produites par an, la Chine est le plus grand producteur avec un volume de production de 56'423'811 tonnes par an (Anonyme 1). En Algérie, la culture de la tomate occupe une place prépondérante dans l'économie agricole algérienne. Près de 33000 ha sont consacrés annuellement à la culture de la tomate (maraîchère et industrielle), en 2019, 24 000 ha ont été consacrés pour cette dernière, donnant une production moyenne d'environ 1 477 878 tonnes et un rendement moyen d'environ 591 246 hg/ha (Direction des statistiques agricoles et des systèmes d'information, 2021). D'après les statistiques fournies par la direction des services agricoles, dans la wilaya de Bejaïa, la superficie utilisée pour la culture des tomates est estimée à 326,59 ha avec une production dépassant 99765 Qx en 2021. L'évolution de la superficie, la production et le rendement de la tomate en Algérie et à Bejaïa est présentée dans les tableaux I et II respectivement.

Tableau I : Evolution de la superficie, production et rendement de la tomate en Algérie entre 2014 à 2019 (FAO, 2019).

Année	Superficie (hectares)	Production (tonnes)	Rendement (hg /ha)
2014	22646	1065609	470551
2015	24065	1163766	483593
2016	22556	1280570	567729
2017	23977	1286286	536467
2018	22323	1309745	586724
2019	24996	1477878	591246

Tableau II : Evolution de la production et de rendement en superficies réservées à la culture de la tomate (plain champs et sous serre) à Bejaïa de 2011 à 2016 (DSA, 2017)

Année	Production (tonnes)	Rendement (tonnes/ha)	Surface cultivée (ha)
2011	6153,5	28,55	215,51
2012	12887,4	46,49	277,19
2013	12831,7	43,96	291,88
2014	9860,2	35,82	275,2
2015	6321,0	24,73	255,5
2016	6199,0	25,27	245,25

5. Principales pathologies fongiques de la tomate

Plusieurs pathologies sont observées chez les plantes de tomates. Ces maladies sont le résultat de l'attaque par des ravageurs (Insectes, acariens et nématodes), ou par des agents infectieux (virus, bactéries et champignons).

En Algérie, les données sur la situation phytosanitaire de la tomate sont rares, cependant, les études faites jusqu'à présent ainsi que les informations recueillies auprès des agriculteurs, affirment la prédominance des pathologies fongiques. Ci-après les champignons les plus répandus sur les plantes de tomates.

5.1. Cladosporiose

Cette maladie est causée par *Pasalora fulva* très spécifique de la tomate est mondialement répandu. Ce mycètes, parasite essentiellement foliaire, provoque des taches vert clair à jaune pâle. Les tissus situés au centre des taches brunissent, se nécrose et se dessèche tandis que les feuilles s'enroulent. La tige peut aussi être affectée (Blancard, 2009). Aussi elle peut être causée par *Mycovellosiella fulva*. Elle se manifeste par des tâches jaunes sur le dessus des veilles feuilles et des spores de couleur chamois sur leurs faces inférieures. Par la suite, la maladie peut gagner les parties hautes des plantes tandis que les anciennes feuilles finissent par se dessécher entièrement (Ruocco et al., 2011).

5.2. Oïdium

L'oïdium est très répandu sur les cultures de tomate sous serre. Il est causé par différentes espèces, le plus souvent *Oidium neolycopersici*. Cette maladie se manifeste dès les premiers stades par des taches blanches poudreuses, qui couvrent la face supérieure des folioles de la tomate formant ainsi un feutrage blanc. Lorsque l'humidité est élevée, des taches comparables peuvent être observées sur la tige, cependant les fruits ne semblent pas être affectés (Jones et al., 2001). Une autre espèce d'oïdium, *Leveillula taurica* responsable de l'oïdium interne est rapportée particulièrement dans le climat méditerranéen durant la saison sèche. Contrairement aux autres espèces, elle pénètre le limbe et l'envahit progressivement formant ainsi des taches vert clair à jaunes plus ou moins intenses à la face supérieurs et un discret feutrage blanc sur la face inférieure (Kiss et al., 2001).

5.3. Mildiou

Le mildiou est causé par l'oomycète *Phytophthora infestans* est l'une des principales menaces pour la production de tomates à l'échelle mondiale (Mulugeta et al., 2019), il est appelé Mildiou classique qualifié également « Mildiou aérien », il s'attaque à toutes les parties aériennes de la plante provoquant ainsi de larges plages huileuses à la face supérieure avec un duvet blanc à la face inférieure (Agrios, 2005). Il existe aussi le mildiou terrestre qui est dû à *Phytophthora nicotianae*, il se manifeste essentiellement sur le système racinaire, le collet et les fruits en contact du sol. Lorsque l'humidité est très élevée, le mycélium peut se développer en surface sous forme d'un feutrage cotonneux blanc (Blancard et al., 2009).

5.4. Alternariose

L'alternariose de la tomate est une maladie importante et largement distribuée dans le monde entier causant des pertes économiques considérables (Milet, 2017). Cette maladie est provoquée par plusieurs espèces d'*Alternaria*, dont les plus connues sont *A. tomatophila* et *A. alternata f. sp. Lycopersici* (Kumar et al., 2008). Ils s'attaquent à tous les organes aériens de la tomate et à tous les stades de croissances de la plante. Les symptômes courants de l'Alternariose sont des lésions nécrotiques sur les feuilles, qui sont principalement concentriques et sont souvent entourées de tissu chlorotique jaune (Belosokhov et al., 2017). Les infections dues à ce champignon sont particulièrement graves dans les périodes humides et les climats chauds. Elle se propage par le biais des graines, le vent, les pluies ainsi que des restes de cultures infectées (Trottin-Caudal et al., 2011).

5.5. Fusariose

Pour la tomate cette maladie est provoquée par *Fusarium oxysporum f.sp. lycopersici*. (Gnancadja et al., 2015) ils font subir de lourdes pertes à ces cultures. Dans les région tempérées, de nombreuses cultures sont attaquées par le *Fusarium* engendrant des dégâts économique conséquents (Dossa et al., 2019). Les plantes infectées par *Fusarium oxysporum f. sp. lycopersici* présentent un jaunissement des feuilles et un flétrissement se propageant à partir de la base de la tige. Au début, les symptômes ne sont visibles que sur une seule moitié de la surface des feuilles, des branches ou des plantes, avant de se propager à l'ensemble de la plante. Des taches brunes sont visibles sur les coupes transversales de la tige et de la racine (Baysal et al., 2009).

5.6. Verticilliose

Causée par *Verticillium albo-atrum* et *Verticillium dahliae*. Tout comme la fusariose, cette maladie se manifeste en premier lieu au niveau des feuilles inférieures et progresse vers la partie supérieure de la plante. Contrairement à la fusariose, les symptômes de la Verticilliose se manifestent sur l'ensemble de la surface des feuilles, des branches ou des plantes (Ruocco et al., 2011).

5.7. Pourriture grise

Causée par *Botrytis cinerea*, la pourriture grise est une maladie répandue dans les cultures de tomate sous abris. Le climat modéré, humide et la densité élevée de plantation sont les facteurs favorisant cette maladie (Baptista et al., 2012). Les symptômes observables sur fleurs, fruits, tiges et feuilles, se traduisent généralement par un pourrissement des tissus infectés, suivi par l'apparition d'un feutrage gris due à une production importante de spores. Ce champignon peut entraîner des pertes de rendements importantes en affaiblissant les plantes et en les détruisant (Williamson 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 sénescentes 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 (Blancard et al., 2012).



Figure 2 : La pourriture grise sur les différents organes de la tomate (Marc Bardin., 2021).

❖ *Botrytis cinerea*

Botrytis cinerea est un champignon nécrotrophe et ubiquiste, il attaque une large gamme de plantes 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).

❖ **Classification**

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 III: Classification de *B. cinerea* (Manzoor, 2013 ; Romanazzi et Feliziani, 2014)

Forme Classification	<i>Forme sexuée</i>	<i>Forme asexuée</i>
Règne	Fungi	Fungi
Phylum	Ascomycètes	Deutéromycètes
Classe	Léotiomycètes	Hyphomycètes
Ordre	Helotiales	Moniliale
Famille	<i>Sclérotiniaceae</i>	<i>Moniliaceae</i>
Genre	<i>Botryotinia</i>	<i>Botrytis</i>
Espèce	<i>Botrytina fuckeliana</i>	<i>Botrytis cinerea</i>

❖ **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 un parasite de blessures ; si l'inoculum est présent, les facteurs favorisant les attaques sont en particulier les nécroses et les plaies. *B. cinerea* est aussi un parasite de faiblesse ; toutes les opérations qui provoquent un affaiblissement de la plante (changements climatiques, fertilisation,...) peuvent favoriser les attaques et le développement de ce champignon (Remuson et al., 2014).

L'utilisation excessive de pesticides chimiques pour le contrôle des agents phytopathogènes peut entraîner des effets secondaires nocifs pour les humains, les animaux et l'environnement. Les traitements chimiques peuvent également affecter les caractéristiques du sol ou induire le développement d'une résistance chez ces agents pathogènes (Ursan et *al.*, 2018).

Des moyens alternatifs pour le contrôle de ces agents impliquent l'utilisation des produits naturels et des micro-organismes qui sont aujourd'hui disponibles. La sélection et la caractérisation de nouveaux agents biologiques utiles pour la lutte contre les agents phytopathogènes sont les objectifs principaux des chercheurs (Ursan et *al.*, 2018). Le contrôle biologique avec les microorganismes bénéfiques permet d'augmenter le rendement en supprimant directement l'inoculum pathogène et/ou en induisant la résistance des plantes. Plusieurs travaux ont été entrepris pour la sélection des antagonistes aux microorganismes phytopathogènes afin de les utiliser comme agents potentiels de lutte biologique (Si Amar, 2017).

1. La lutte biologique

Au début du XXème siècle l'appellation "lutte biologique" a été proposée pour désigner toute méthode phytosanitaire mettant en œuvre un organisme vivant. En 1919, Harry Scott Smith a défini la lutte biologique comme l'utilisation des ennemis naturels pour le contrôle des maladies phytopathogènes (Driesche et Bellous, 1996). En 1964, De Bach a donné une nouvelle définition à la lutte biologique : « c'est l'action des parasites, prédateurs ou pathogènes dans le maintien de la densité de la population des microorganismes à un niveau inférieur de celle observée en leur absence » (Toussaint, 1996).

Par ailleurs, plusieurs microorganismes et insectes présents dans l'environnement naturel servent d'agents potentiels de lutte biologique. Ils ne sont pas pathogènes et n'affectent pas l'environnement, sont plus facile à reproduire et à manipuler, et peuvent créer des effets durables (Chinnasamy, 2005).

2. Le Biocontrôle

Il est basé sur l'utilisation de mécanismes naturels tels que les antagonistes microbiens pour contrôler les maladies provoquées par les bactéries et les champignons phytopathogènes, afin de maintenir les dégâts causés sur une espèce végétale cultivée en dessous du seuil de nuisibilité économique supportable par le producteur.

Il se compose de quatre catégories de produits : Des macro-organismes (insectes, nématodes, acariens) ; des micro-organismes (champignons, bactéries, virus) ; des médiateurs chimiques (phéromones, kairomones) et des substances naturelles d'origine végétale, minérale ou animale (IBMA, 2014).

Le biocontrôle est une alternative sûre aux pesticides chimiques, son objectif est de remplacer les méthodes existantes de lutte chimique et d'éviter l'utilisation intensive de fongicides qui conduisent souvent à une résistance des agents phytopathogènes (Vurukonda *et al.*, 2018 ; Rashad et Moussa, 2020).

3. Mode d'action des agents de biocontrôle

Les populations microbiennes de la rhizosphère constituent la première barrière contre les maladies telluriques (Barea *et al.*, 2005). Il est primordial de bien connaître les mécanismes d'action de la protection biologique pour sélectionner des agents de lutte plus performants. Ces agents de biocontrôle possèdent différentes capacités selon l'espèce et la souche utilisée qui peuvent être classées en lutte directes ou indirectes contre les agents pathogènes, ou enfin un mélange des deux actions. Les actions directes sont les mécanismes mis en place par l'agent de biocontrôle contre le pathogène. Il s'agit de l'antibiose et de la compétition. Les actions indirectes sont les effets de l'agent de biocontrôle sur la plante hôte. Il s'agit principalement de la stimulation de la croissance des plantes et de l'induction des mécanismes de défense des cellules du végétal (Mc Quilken, 1990). La plante devient alors plus résistante aux agents pathogènes.

3.1 Mécanismes direct

- **Antibiose**

Ce mécanisme d'action est le plus utilisé dans le cadre du biocontrôle. Le terme antibiose consiste en la production d'un ou plusieurs métabolites bioactifs (antibiotiques, antifongiques ...) par des microorganismes antagoniste. Ces métabolites peuvent affecter la germination ou la croissance des hyphes ou inhiber les activités métaboliques d'autres microorganismes (Al-Shugairan, 2008).

- **Compétition :**

La compétition est définie comme un phénomène général régissant la dynamique des populations des micro-organismes qui partagent la même niche écologique et les mêmes exigences physiologiques lorsque les ressources sont limitées. Pour être un compétiteur efficace, un agent antagoniste doit être capable d'utiliser rapidement et efficacement les éléments nutritifs présents en faible concentration sur les organes de la plante (Jijakli, 2003).

La compétition pour le carbone, l'azote et d'autres facteurs de croissance (lorsqu'il y a simultanément consommation du même composé par plusieurs microorganismes), ainsi que la compétition pour l'espace ou les sites d'infection spécifiques peuvent également être utilisés par les agents de biocontrôle pour lutter contre les phytopathogènes (Al-Shugairan, 2008).

- **Hyperparasitisme :**

Le terme hyperparasitisme peut être utilisé pour les actinomycètes sécrètent des enzymes de dégradation de la paroi cellulaire du champignon hôte et d'autres bactéries qui parasitent les champignons phytopathogènes. Le processus complexe du mycoparasitisme consiste en plusieurs événements dont la reconnaissance de l'hôte, l'attaque, la pénétration et la destruction (Kohl et al., 2019).

3.2 Mécanismes indirect

- **Stimulation de la croissance**

La croissance de la plante peut notamment être améliorée grâce à la synthèse de phytohormones par les micro-organismes, telles que l'auxine (Faessel et al., 2014). Ces phytohormones stimulent la rhizogénèse, ce qui augmente le volume de sol exploré et par conséquent, une meilleure absorption des nutriments du sol. Un autre moyen de stimulation est la capacité de ces microorganismes à rendre certains éléments nutritifs solubles et disponibles pour la plante. Dans la zone rhizosphérique, peuvent coexister : les bactéries fixatrices d'azote atmosphérique N₂ (comme les *Rhizobium*), les bactéries et champignons qui solubilisent le Phosphore ou le Potassium, ou encore les mycorhizes qui établissent une symbiose avec la plante en prolongeant son système racinaire (Richardson et al., 2009).

- **Stimulation de la défense des plantes**

Les SDP concernent «*toute substance ou tout micro-organisme vivant non pathogène qui, appliqué sur une plante, est capable de promouvoir un état de résistance significativement plus élevé par rapport à une plante non traitée, face à des stress biotiques*» (RMT Elicitra, 2017).

Ils permettent la reconnaissance du bioagresseur par des éliciteurs généraux exogènes : les MAMPs (Microbe-Associated Molecular Patterns). Ces éliciteurs déclenchent une réponse de défense de la plante qui est non spécifique *vis-à-vis* de l'espèce pathogène (Garcia-Brugger *et al.*, 2006). Ils induisent chez la plante une réaction de résistance directe, ou un effet potentialisateur (Faessel *et al.*, 2014). Suite à l'interaction entre l'éliciteur et le récepteur, une cascade d'évènements de signalisation va se déclencher, entraînant la synthèse de molécules de défense (phytoalexines, protéines PR...) et de formes actives de l'oxygène. La transmission du signal au sein de la plante peut se terminer par la mise en place d'une résistance systémique acquise(SAR).

Partie Expérimentale

Ce travail est réalisé au niveau du Laboratoire de Maitrise des Energies Renouvelables (Equipe Biomasse et Environnement) et dans la serre agricole de Monsieur Bourdjioua Samir situé à Merdj Ouamen. Les expériences ont été menées durant une période de 3 mois (Avril-juin 2022). Notre objectif était de sélectionner un isolat bactérien avec un potentiel de biocontrôle du champignon *Botrytis cinerea*, agent pathogène de la tomate.

1. Echantillonnage

Dans le but de rechercher des isolats bactériens à pouvoir antifongique, plusieurs prélèvements de sol rhizosphérique (rhizosphère de la tomate, chou-fleur, épinard et des oranges) ont été réalisés en mois d'Avril 2022 à Bejaia dans la région de Merdj ouaman ($36^{\circ}41'04.5''\text{N}$ $4^{\circ}57'12.3''\text{E}$).

Les échantillons de sol ont été placés dans des flacons stériles et transporter directement au laboratoire pour analyse (figure 3). Un échantillon d'eau prélevé à partir d'un puit situé à Bejaia dans la région de Djebira, commune Boukhelifa, ($36^{\circ}42'21.0''\text{N}$ $5^{\circ}04'37.9''\text{E}$) a été également utilisé pour la recherche de bactéries antagonistes.



Figure 3 : Sites de prélèvement des échantillons



Figure 4 : Echantillons du sol

2. Isolement de bactéries rhizosphériques

2.1. A partir du sol

Une solution mère est préparée par addition de 1g de sol à 9 ml d'eau physiologique stérile. Cette dernière est bien agitée au vortex puis une série de dilutions décimales (10^{-1} à 10^{-8}) est préparée à partir de la solution mère. 1 ml de chaque dilution est inoculé sur milieu PCA (annexe I), les boîtes sont ensuite incubées à 30°C pendant 24h à 48h. Enfin, des repiquages successifs de toutes les colonies apparues sont effectués jusqu'à l'obtention de colonies pures (Figure 4).

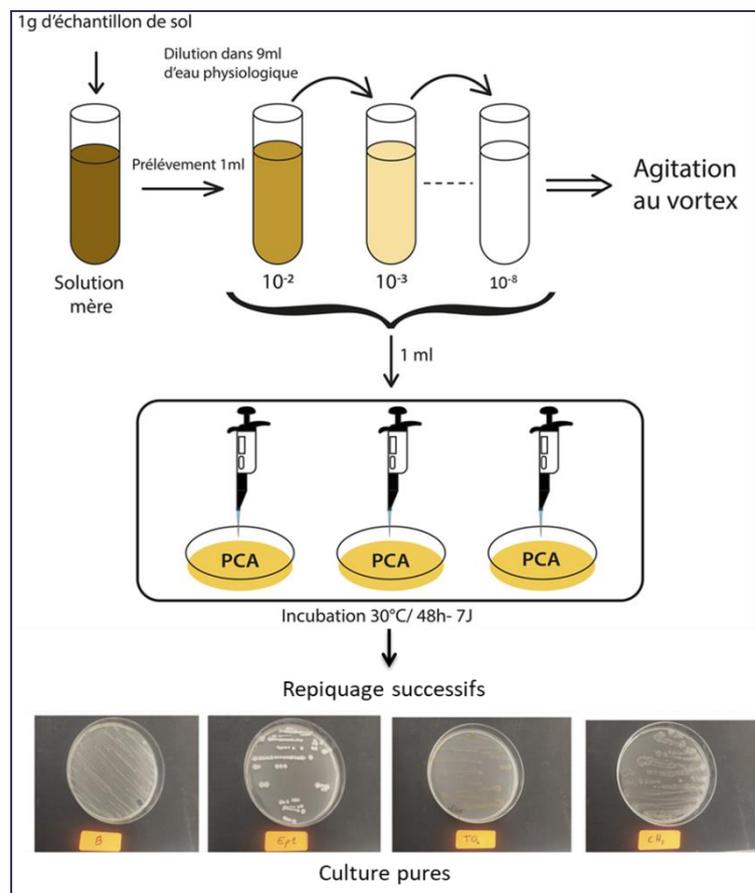


Figure 5 : Les étapes d'isolement à partir d'un échantillon de sol

2.2. A partir de l'eau de puits

1ml de l'eau sontensemencé par inondation sur milieu PCA, les boîtes sont ensuite incubées à 30°C pendant 24h à 48h.

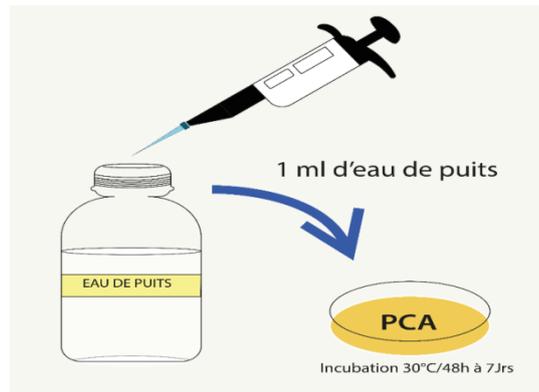


Figure 6 : Isolement à partir de l'eau de puits

Des repiquages successifs de toutes les colonies apparues sont effectués jusqu'à l'obtention de colonies pures (Figure 5).

3. Préparation d'une culture de champignon *Botrytis cinerea*

L'espèce fongique utilisée dans notre travail est *Botrytis cinerea* ALG66 (souche offerte par Madame Bouaoud Yousra). Le champignon est repiquée sur milieu PDA puis incubé à 22°C/48h dans le but d'obtenir des cultures jeunes afin de les utiliser dans les tests.

4. Test d'activité antifongique

L'action antagoniste des bactéries a été évaluée par deux tests. Le premier test réalisé *in vitro*, c'est un test de confrontation directe sur gélose entre les isolats bactériens et le champignon test. Le second test est réalisé *in vivo* sur les plantes de tomate.

4.1. Etude *in vitro*

4.1.1. Test de confrontation directe sur gélose

Les 48 isolats bactériens obtenus sont évalués *in vitro* selon le protocole décrit par Petatàn-Sagahón et al. (2011). Un disque mycélien de 5mm de diamètre est déposé au centre de la boîte de pétri contenant le milieu de culture PDA (annexe I). Quatre spots de suspensions bactériennes (à raison de deux spots pour chaque isolat) sont déposés à une distance de 2,5 cm du champignon. Des boîtes de Pétri ne contenant que le champignon cible sont préparées en parallèle pour servir de témoin. Les boîtes sont incubées à une température de 25°C pendant 3 à 7 jours (figure 6).

L'activité antifongique est évaluée par la détermination du pourcentage d'inhibition de la croissance (PGI%) selon la formule décrite par Saddiki (1999).

$$\text{PGI}\% = \frac{\text{KR} - \text{R1}}{\text{KR}} \times 100$$

KR : Distance en cm entre le point de dépôt du champignon et la marge de la colonie contenue dans le témoin.

R1 : Distance en cm entre le point de dépôt du champignon et la marge de la colonie contenue dans la boîte de pétri traité.

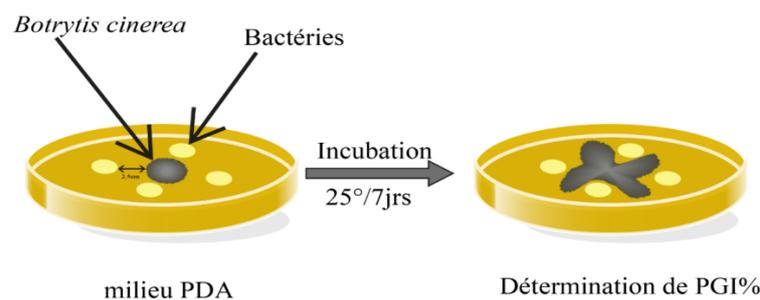


Figure 7 : Mise en évidence de l'effet antagoniste des isolats sur la croissance mycélienne.

5. Identification des isolats bactériens sélectionnés

Les isolats bactériens présentant des PGI% importants sont sélectionnés pour une identification préliminaire.

5.1. Les caractères morphologiques

- **Aspect macroscopique des colonies**

Afin d'identifier un isolat bactérien, la première étape est la description macroscopique des colonies bien isolées à l'œil nu préalablement cultivées sur une gélose GN à 30°C pendant 24h. Les principaux caractères à étudier sont : la forme, le relief, le contour, la taille, la surface, la couleur, l'opacité, la consistance, etc.

- **Aspect microscopique des isolats bactériens**

Pour déterminer l'aspect microscopique de nos isolats, une coloration de GRAM est réalisée. Elle 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 négative (coloré en rose) qui possèdent une couche mince de peptidoglycane et les bactéries Gram positive (colorées en violet) possèdent une couche de peptidoglycane épaisse.

La répartition selon le type de Gram est un critère systématique important pour la classification des bactéries.

Avant de commencer la coloration, un frottis doit être préparé. Une fois refroidi, on entame la coloration de Gram comme suit :

- Recouvrir la lame de violet de Gentiane et laisser agir 1 minute ;
- Rincer rapidement à l'eau de robinet et éliminer l'excès d'eau ;
- Recouvrir la lame avec le Lugol et laisser agir 45 secondes ;
- Rincer rapidement à l'eau de robinet et éliminer l'excès d'eau ;
- Recouvrir la lame de l'alcool pendant 30 secondes ;
- Rincer rapidement à l'eau de robinet ;
- Recouvrir la lame de la fuchsine pendant 1 minute ;
- Rincer rapidement à l'eau de robinet ;
- Sécher puis observer au microscope optique (objectif x 100 à immersion) (Singleton, 2005).

5.2. Etude de caractères biochimique

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

- **Test de catalase**

La catalase est une enzyme respiratoire qui catalyse la libération de molécule d'eau et d'oxygène à partir de peroxyde d'hydrogène (H₂O₂) 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).

6. Etude *in vivo*

Après la sélection des isolats bactériens antagonistes (4 isolats bactériens) et la mise en évidence de leur effet inhibiteur sur le développement du champignon pathogène *Botrytis cinerea*, des tests *in vivo* ont été réalisés sur les feuilles, les fruits et les plantes entières de tomate afin de déterminer l'efficacité de ces isolats sur champ. Les tomates cerise sont utilisées pour le test sur fruit et les tomates de variété Marmande sont utilisées pour le test sur feuilles et sur plante.

6.1. Préparation de la suspension bactérienne et fongique

Des cultures des isolats sélectionnés sont préparées sur milieu PCA. Les suspensions bactériennes utilisées pour les tests *in vivo* sont préparées dans l'eau physiologique 10^7 UFC/ml et une DO ajusté à 0.08 (Touaibia 2015)

La suspension sporale (10^7 spore/ml) de *B. cinerea* est préparée dans l'eau physiologique a une DO qui varie de 0.04 et 0.05, à partir d'une culture fongique âgée de 7 jours.

6.2. Test de biocontrôle de *B. cinerea* sur feuilles détachées de tomates

Pour la réalisation de ce test, des feuilles de tomates saines âgées de 2 mois (ne présentant pas de blessure) sont choisies puis nettoyées. 4 lots sont préparés durant cette expérience.

- **Lot 1** : 3 feuilles, pulvérisées avec l'eau physiologique (lot témoin)
- **Lot 2** : 3 feuilles, pulvérisées avec l'eau physiologique + un disque de *B. cinerea*.
- **Lot 3** : 3 feuilles, pulvérisées avec la suspension bactérienne
- **Lot4** : 3 feuilles pulvérisées avec la suspension bactérienne + un disque de *B. cinerea*.

Les expériences sont réalisées comme suit :

- Après la pulvérisation des différents traitements, les feuilles sont mises dans des boites de pétri stériles préalablement tapissées avec du papier absorbant stérile et pulvérisé avec l'eau stérile à raison d'une seule feuille de tomate par boite.
- Pulvérisation des feuilles de lot 3 et 4 par la suspension bactérienne.
- Dépôt des disques d'une culture jeune de *B. cinerea* sur chaque feuille de tomate des lots 2 et 3
- Incubation des boites à 22°C pendant 7j (Bouaoud, 2018).

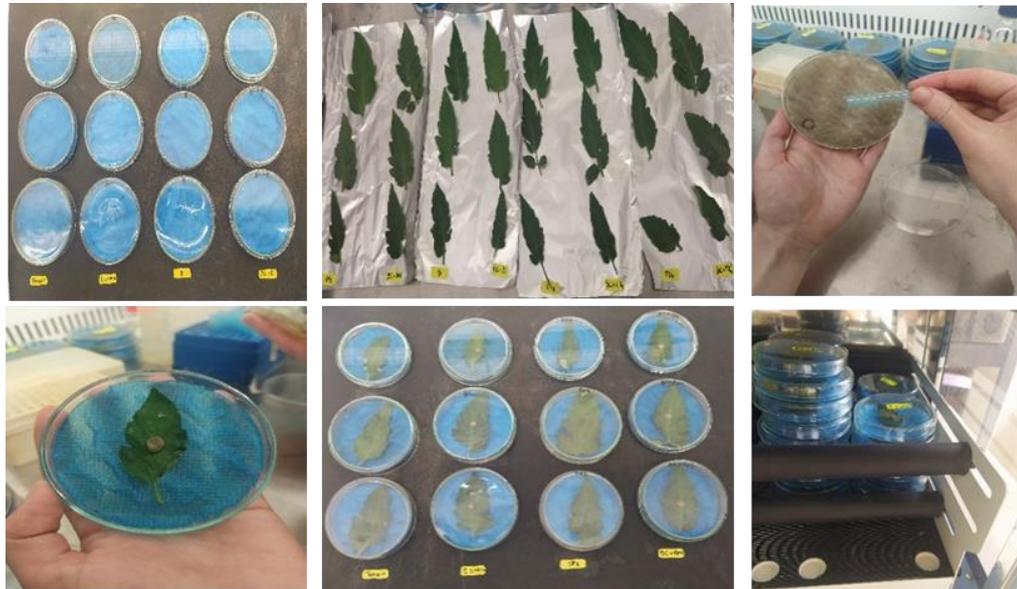


Figure 8 : les différentes étapes du test *in vivo* sur feuilles de tomate

6.3. Test de biocontrôle de *B. cinerea* sur fruit détachés de tomates

Les expériences sont réalisées comme suit :

- Choisir des fruits sains (pas de blessure, pourriture...) de même taille ;
- Désinfection de la surface des tomates (par immersion des tomates dans l'eau de javel (2%) pendant 1 à 2 minutes, suivie d'un lavage avec l'eau stérile ;
- Laisser sécher à température ambiante ;
- Blessier les tomates dans la zone équatoriale (2 puits) ;
- Inoculer 30 μ l de l'antagoniste dans chaque puits, (témoin : 30 μ l de l'eau physiologique) ;
- Laisser 1h.
- Rajouter dans chaque puits 15 μ l de la suspension fongique.
- Mettre les tomates dans des boites, préalablement tapissées avec du papier absorbant imbibé d'eau, à raison de trois tomates par boite.
- Incuber pendant 4 à 7j / 22°C.

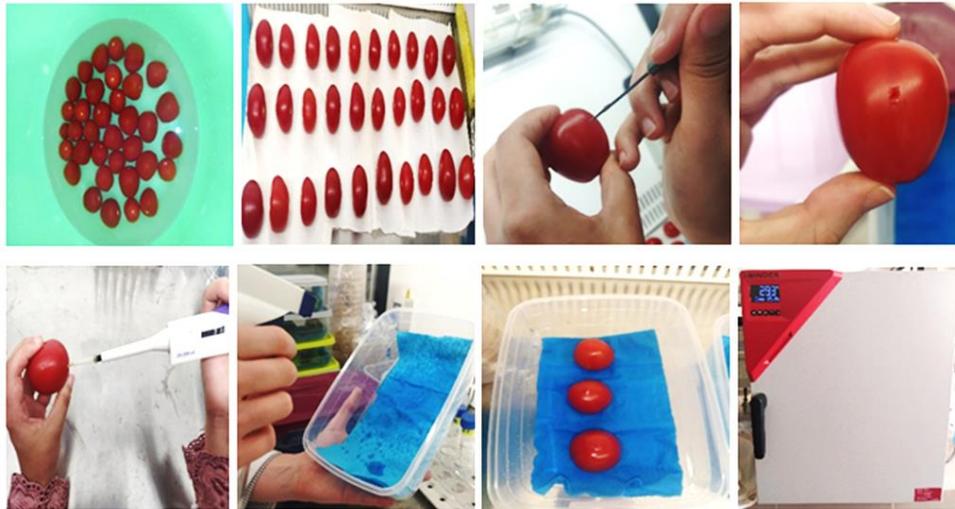


Figure 9 : Les différentes étapes de test *in vivo* sur les fruits de tomate.

6.4. Test de biocontrôle de *B. cinerea* sur plante de tomates

Le protocole suivi pour réaliser ce test est présenté ci-dessous (Bardin et al, 2008) :

- Trois feuilles de tomate sont coupées par plante en laissant des fragments de pétiole (chicots) de 1cm environ sur la tige.
- Réalisation des trous au niveau des chicots.
- 10 μ l de la suspension sporale de *B. cinerea* sont déposés dans les chicots suivi d'une inoculation de 10 μ l de la suspension bactérienne.
- Un témoin négatif et un témoin positif en absence de bactérie sont également réalisés en parallèle.
- Les tests sont réalisés en triplicata.

L'expérience est réalisée dans des conditions naturelles pendant 15 jours. La longueur des chancres sur tige sont mesurée chaque jour du 4^{ème} au 15^{ème} jour.



Figure 10 : Les différentes étapes de test *in vivo* sur la plante de tomate

Résultats et Discussion

1. Isolement de bactéries rhizosphériques

A partir des échantillons prélevés, 48 isolats bactériens ont été obtenus, 44 isolats bactériens à partir les échantillons du sol de la région de Merdj Ouaman, dont 18 isolats obtenus du sol rhizosphérique de chou-fleur, 9 isolats à partir du sol rhizosphérique des épinards, 4 isolats à partir du sol rhizosphérique de l’oranger, 8 ; 5 isolats obtenus à partir du terreau de tomate et de poivron respectivement cultivés sous serre. 4 isolats ont été obtenus à partir de l’échantillon d’eau de puits prélevé à Djebira.

2. Activité antifongique des isolats bactériens

L’activité antagoniste des isolats obtenus est évaluée par mesure de pourcentage d’inhibition de la croissance (PGI%). Les résultats de ce test ont montré que les isolats testés présentes des activités remarquables avec des taux d’inhibition variables, qui se traduisent par l’apparition des zones d’inhibition de la croissance mycélienne.

Les valeurs des PGI% des différents isolats et l’aspect des zones d’inhibition sont présentés dans les figures 11 et 12 respectivement.

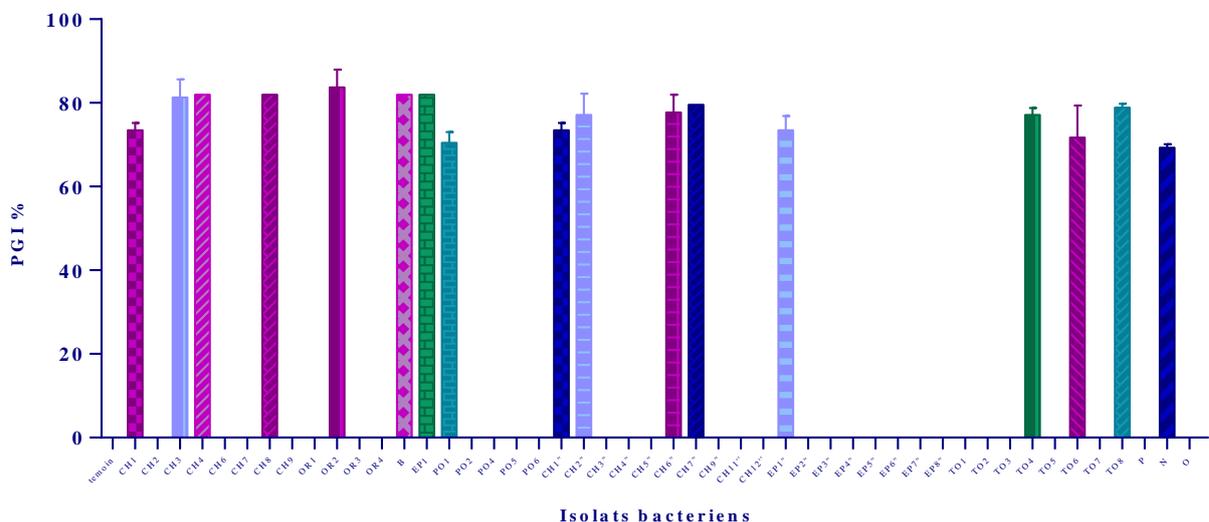


Figure 11 : Pourcentage d’inhibition de la croissance du champignon phytopathogène *Botrytis cinerea* par les 48 isolats testés

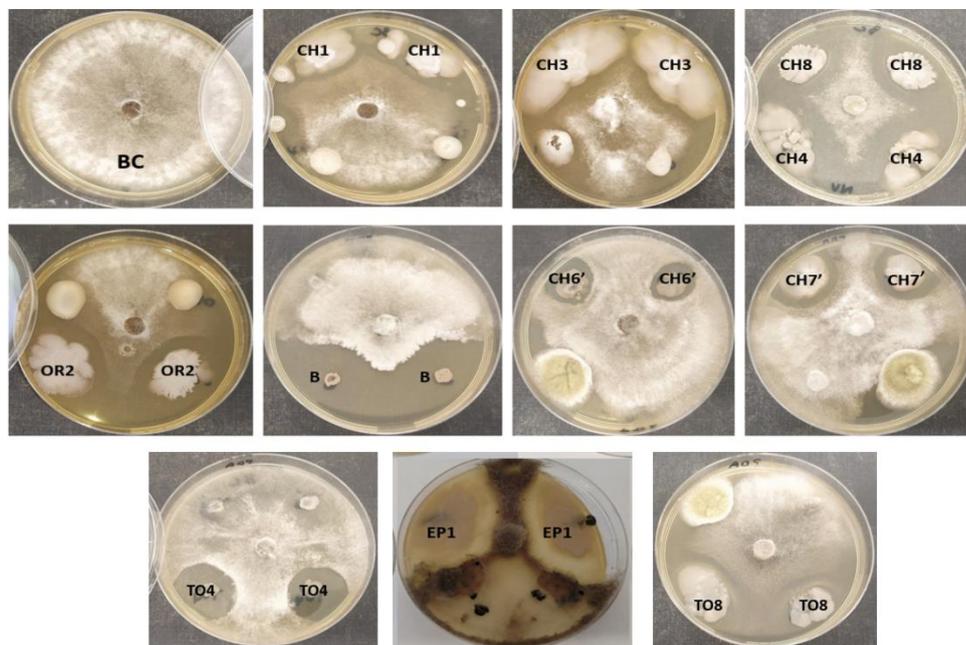


Figure 12: Résultat de test *in vitro* de l'action antagoniste des isolats bactériens *vis-à-vis* de *B.cinerea*.

L'évaluation de l'effet des 48 isolats bactériens sur le développement *in vitro* de la souche de *B. cinerea* (ALG66) lors du test de confrontation direct, met en évidence une variabilité de l'effet des isolats bactériens *vis-à-vis* de *B. cinerea*. Certains isolats ne présentent aucun effet antagoniste (PGI%=0%), d'autres entraînent plus de 70% d'inhibition de la croissance mycélienne (Figure 11 et 12). En effet, sur les 48 isolats bactériens, 17 isolats ont montrés un effet antagoniste contre *Botrytis cinerea*. Les isolats : CH1, CH3, CH4, CH8, OR2, B, EP1, CH1'', CH2'', CH6'', CH7'', EP1'', TO4, TO8) sont les plus actifs avec des PGI% qui varient entre 70% et 85%, alors que les isolats : PO1, TO6 et N ont montré un pourcentage entre 60% et 70%.

Les isolats CH8, TO4 et EP1 provient des sols rhizosphériques de chou-fleur ; tomate et épinards respectivement, l'isolat B provient de l'eau de puits. Vu leur site de prélèvement, ces isolats peuvent tolérer un intervalle de températures proportionnelles à celui de développement de champignon *Botrytis cinerea*, et de ce fait ils peuvent être efficace comme agent de biocontrôle de ce dernier sur les cultures de tomate (Bouaoud, 2018).

L'inhibition de la croissance du pathogène *Botrytis cinerea* *in vitro* et la formation des zones d'inhibition est probablement dues aux métabolites bioactifs libérés par les bactéries antagonistes dans le milieu de culture (Essghaier et *al.*, 2012). Thongkamngam et Jaenaksorn, (2017) suggèrent que la zone d'inhibition qui apparait sans contact physique entre l'antagoniste et la

cible est liée à la sécrétion de substances inhibitrices diffusibles non volatiles. Plusieurs études ont rapporté l'efficacité des bactéries rhizosphériques dans la lutte contre les phytopathogènes, en particulier les espèces fongiques. Ces bactéries disposent de plusieurs mécanismes (production de molécules antibiotiques, des enzymes hydrolytiques tel que les chitinase, protéase et cellulase, la compétition pour l'espace et les nutriments, la modification des caractéristique du sol, induction de système de résistance de la plante, etc. (Adesina et al, 2007). Alabouvette et al., (1993) ont démontré que l'efficacité d'un agent de contrôle biologique n'était pas due à un seul mécanisme mais une combinaison de différents modes d'action.

La différence entre le pourcentage d'inhibition de la souche fongique testée pourrait être liée au type des métabolites produits par les antagonistes et/ou le mode d'action qui diffèrent entre les bactéries (Williams et Asher., 1996). Cette variabilité des PGI peut être également liée à la nature et la quantité de substances bioactives produites par la bactérie antagoniste ou les conditions de production des métabolites antifongiques (composition de milieu de culture, pH, température d'incubation, temps d'incubation etc.).

En raison de leur activité antagoniste remarquable (PGI % > 75%), les isolats CH8, TO4, EP1 et B ont été sélectionnés pour les tests sur plante de tomate et l'identification préliminaire

3. Identification des isolats sélectionnés

- **Observation macroscopique :** l'observation macroscopique de l'aspect cultural et morphologique des quatre souches bactériennes a révélé des colonies de tailles, de formes et de couleurs différentes (figure 13).

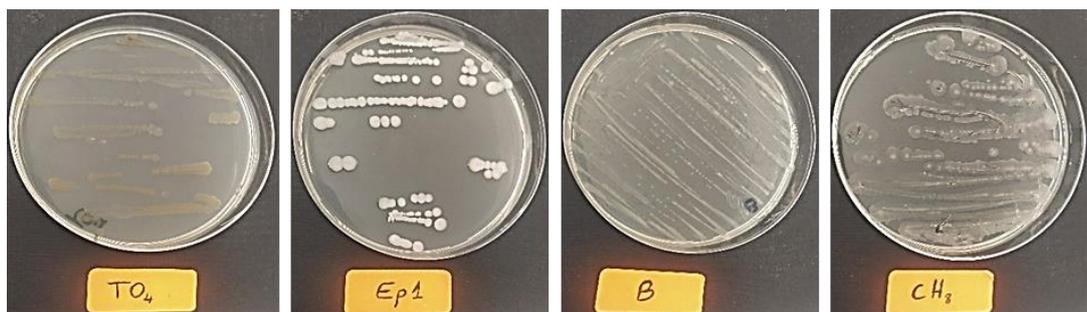
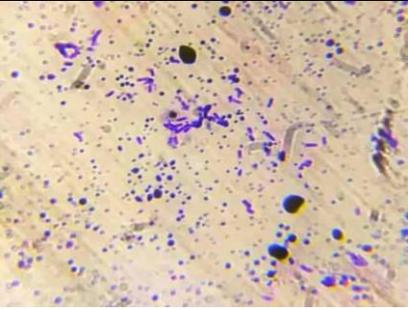
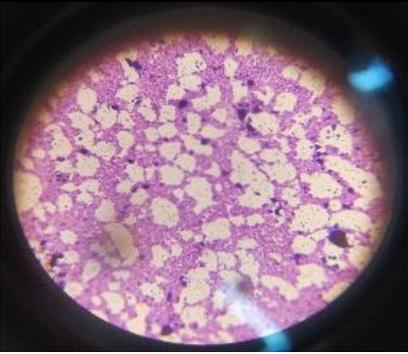
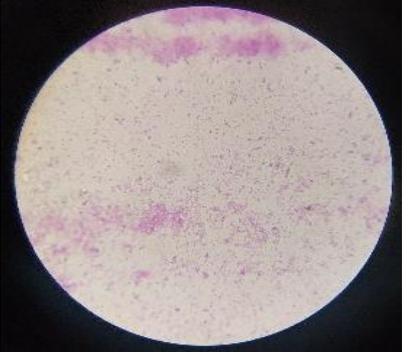


Figure 13 : Aspect macroscopique des isolats bactériens sélectionnés.

- **Observation microscopique :** l'observation microscopique est réalisée après coloration de gram. Elle a permis d'observer les différentes formes, tailles, Gram et regroupement des isolats bactériens (tableau IV).

Tableau IV : Résultat de la coloration de Gram et de test catalase des 4 isolats bactériens

Origine	Isolats	Catalase	Coloration de Gram		
			Gram	Forme	Aspect microscopique
Epinard	EP1	+	+	Bacille	
Chou-fleur	CH8	+	+	Bacille	
L'eau de puits	B	+	-	Coccobacille	
Tomate	TO4	+	-	Bacille	

L'ensemble des caractères phénotypiques comprenant l'aspect des colonies, la forme le Gram des bactéries ainsi que le test catalase (Tableau IV) nous laissent supposer que les isolats peuvent appartenir aux genres *Bacillus* et *Pseudomonas*.

Les isolats CH8 et EP1 présentent des critères similaires à ceux des *Bacillus* (Gram positif, catalase positive et forme bacille). Les isolats TO4 et B, présentent des critères similaires à ceux des *Pseudomonas* (Gram négatif, catalase positive et bacille ou coccobacilles, production de pigment bleu-vert) (Delarra, 2007).

4. Test de biocontrôle sur les feuilles détachées de tomate

Après 7 jours d'incubation des feuilles détachées de tomates infectées par le champignon *B. cinerea* et traitées par les isolats sélectionnés (CH8, TO4, EP1 et B), les lots sont examinés. Les résultats montrent un développement important de champignon sur la surface des feuilles de témoin positif (*B. cinerea* sans traitement). Les feuilles traitées avec les isolats présentent également les mêmes surfaces de lésion (figure 14) ce qui signifie que les isolats ne présentent aucun effet antagoniste à l'encontre du champignon *Botrytis cinerea* sur feuille de tomate.

L'absence d'activité dans notre étude, est peut être également dû aux conditions de la réalisation du test (charge d'inoculum bactérien ou fongique, la température d'incubation, l'âge des cultures, etc.).

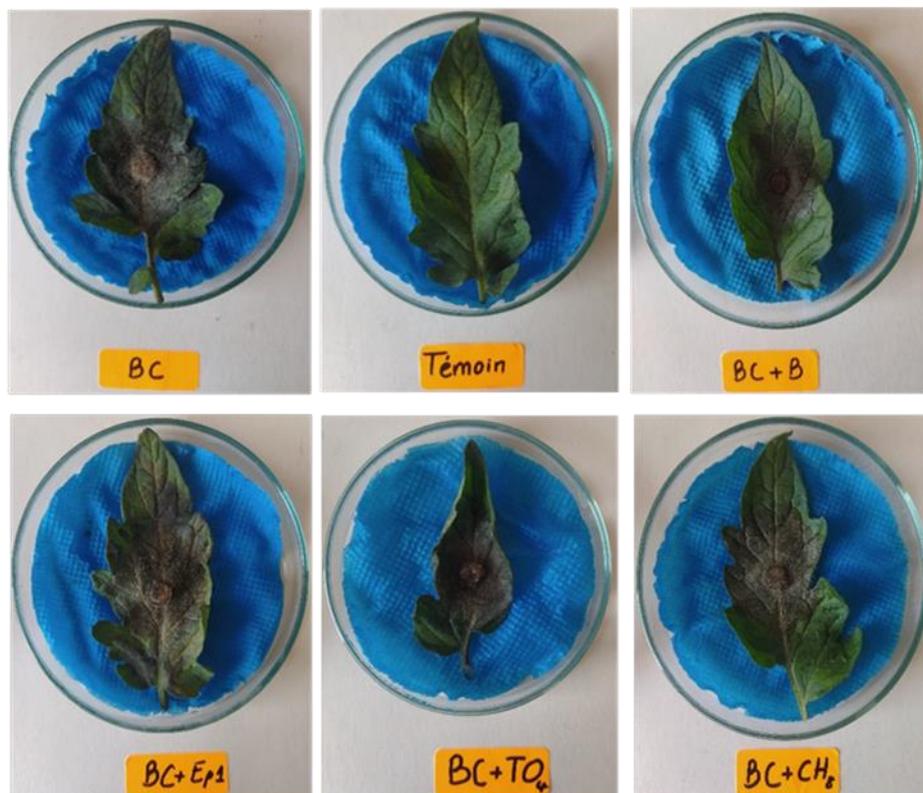


Figure 14 : Résultats de test *in vivo* sur les feuilles de tomate

Une bactérie ayant les meilleurs résultats d'antagonisme *in vitro* n'est pas forcément la plus efficace *in vivo* (Tabli, 2018) ce que confirme nos résultats, où on a obtenues des pourcentages d'inhibition importants des isolats bactériens sur milieu PDA à l'égard de *B. cinerea* et les même isolats n'ont donné aucun effet sur les feuilles de tomate.

Essghaier et al. (2012) ont constatés que la souche de *Bacillus* J9 réduisait la pourriture grise sur tomate cultivée sous serre toutefois *in vitro*, elle n'inhibait pas le développement de *B. cinerea* sur milieu PDA. De plus, les auteurs stipulent que l'efficacité d'un antagoniste doit être d'abord testé *in vivo* et pas *in vitro*.

Le pouvoir des bactéries rhizosphériques à contrôler les champignons phytopathogène *in vivo*, a été rapporté par plusieurs auteurs (Donmez et al., 2011 ; Bensidhoum et al., 2015 ; Tabli et al., 2018).

Wang et al. ont montré que la souche EB-28, identifiée comme *Bacillus subtilis* , a réduit la croissance de *B. cinerea* sur feuille de tomate détachées avec un PGI % d'environ 53%. Des expériences *in vivo* ont montré que l'activité de biocontrôle de certaines souches du genre *Pseudomonas sp* et *Bacillus sp*, peuvent efficacement protéger les feuilles de vigne contre la pourriture grise causée par *B. cinerea*, par l'induction des réponses liées à la défense : lipoxigénase, phénylalanine, ammonialyase, chitinase (Trotel-Aziz et al., 2008), de même Bouaoud (2018) suggère que l'effet significatif de la souche *P. helmanticensis* CT22 est dû à sa capacité à induire les mécanismes de défense de la tomate ou à sa capacité de survie sur les feuilles de tomates.

5. Test de biocontrôle sur les fruits de tomate

Le test d'antagonisme *in vivo* à l'égard de *Botrytis cinerea* est réalisé sur les tomates cerise, infectée par la suspension sporale de *Botrytis cinerea* en présence et en absence des suspensions bactériennes des quatre isolats. Les résultats sont obtenus par la mesure de diamètre de lésion autour des blessures. Les images et les valeurs des diamètres de lésions sur fruit de tomate causées par *B. cinerea* en présence et en absence des isolats bactériens sont présentées dans les figures 15 et 16.

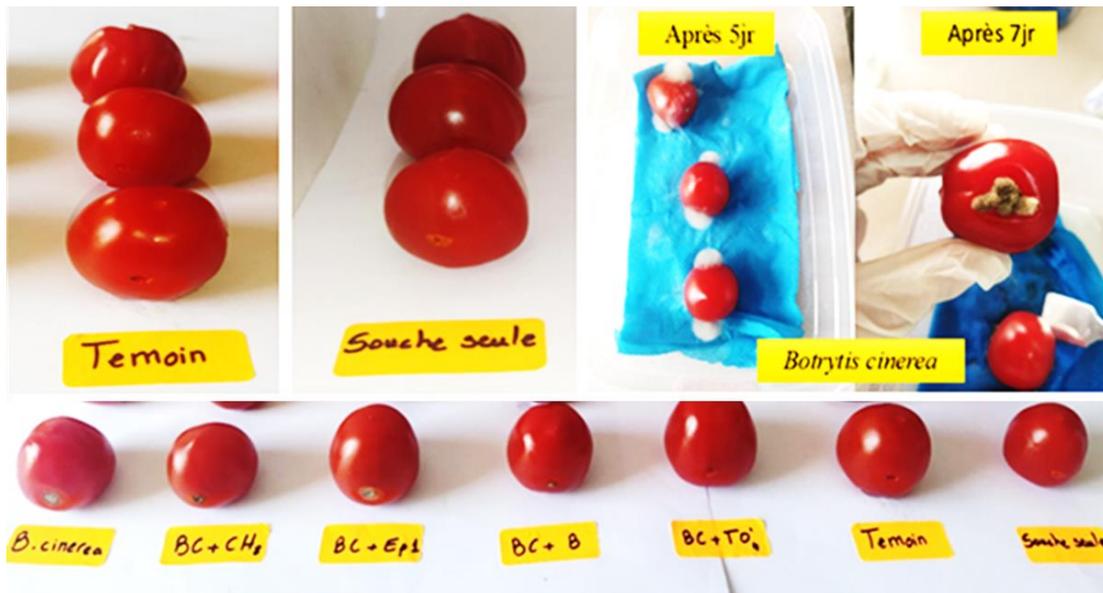


Figure 15 : Résultats de test *in vivo* sur les fruits de tomate

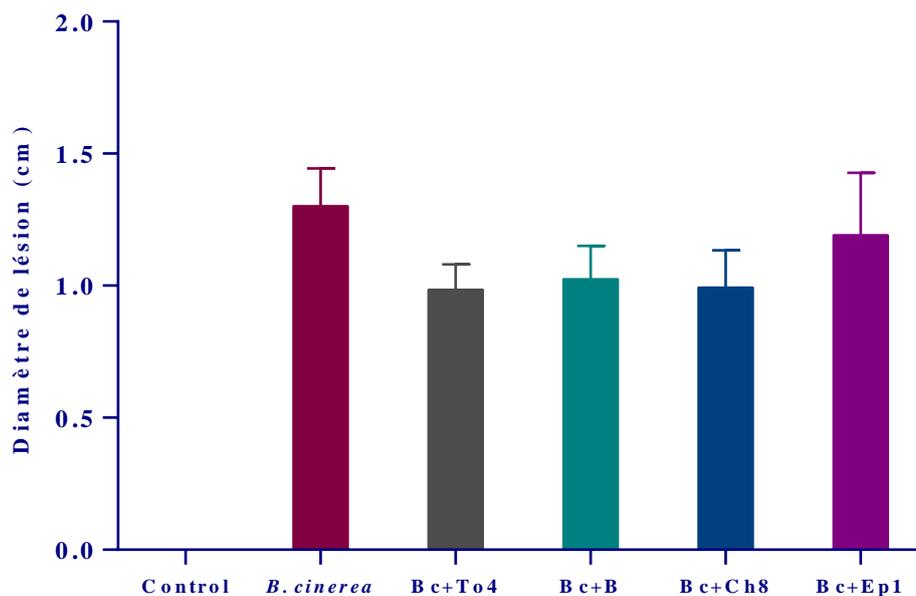


Figure 16 : Diamètre de lésion en cm des zones pourries sur les fruits de tomate traités par les isolats bactériens.

Après 5 jours d'incubation des fruits de tomate à 22°C dans des boîtes humidifiées, les puits inoculés avec uniquement les spores de *B. cinerea* ont montré une surface de lésion plus

importante avec une grande quantité de mycélium et de spores, par rapports aux fruits traités avec les isolats. Ces derniers ont pu réduire les lésions causées par *B. cinerea* (figure 15 et 16).

Dans cette expérience, les fruits de tomates testés avec *Botrytis cinerea* ALG66 ont montré des symptômes caractéristiques de champignon *B. cinerea* (pourriture grise). Les quatre isolats antagonistes ont exprimés une activité inhibitrice *vis-à-vis* le développement de *B. cinerea* sur les tomates. Comparés aux isolats B et EP1 qui ont montré un effet inhibiteur modéré avec une réduction de 20% et 7% respectivement, les isolats TO4 et CH8, ont permet une réduction plus en moins importante (réduction d'environ 33% des surfaces de lésion).

Les résultats de l'identification préliminaire des isolats TO4 et CH8, cités précédemment, ont montré qu'ils peuvent appartenir au genre *Pseudomonas* et *Bacillus* respectivement. Ces deux genres bactériens sont très connus par leur potentiel de biocontrôle.

Certaines souches de *Bacillus sp* ont réduit de manière significative la pourriture de *B. cinerea* sur les fruits de tomate, en particulier *B. pumilus* PTB180 (Bochard-Rochette M., 2020). Donmez *et al.*, en 2011 ont rapporté dans leur recherches que la souche antagoniste *Bacillus* MFDU-2 est efficace (diamètre de 14,41mm) dans le contrôle de développement mycélien de *Botrytis cinerea* (diamètre de 19,20 mm) et qu'elle peut jouer un rôle important dans la production des fraises. D'autres autre ont rapporté le pouvoir remarquables des souches de *Pseudomonas sp* a contrôler le développement de *B.cinerea* sur les fruits de pomme (Rai *et al.*, 2016 ; Janisiewicz et Korsten., 2002 ; Nunes *et al.*, 2002).

Les isolats de *pseudomonas sp.* peuvent produire certains composés antibiotiques qui inhibent la croissance des champignons (Hammad N F *et al.*, 2010). D'autres études ont indiqué que *Bacillus sp.* comme *Pseudomonas sp.*, produit également des antibiotiques, qui peuvent être responsables de l'inhibition de la croissance mycélienne de *Botrytis cinerea* (Kim *et al.*, 2008), tel que la fengycine produite par *B. subtilis* qui est capable d'affecter la perméabilité de la membrane des spores (Kefi *et al.*, 2015).

Les bactéries du genre *Pseudomonas* ont la capacité de produire également des composés de sédirophores, qui sont définit comme des ligases à faible poids moléculaire produits par les organismes tel que les agents chélateurs du fer (Höfte and Bakker, 2007 ; Saha *et al.*, 2015). Ces métabolites fournissent des avantages concurrentiels a l'organisme producteur pour l'absorption de fer (Suresh *et al.*, 2010). Selon Bensidhoum *et al.*, (2016), la production de sédirophores bactériens stimule de façon indirecte la croissance des plantes grâce à l'inhibition des phytopathogènes et la compétition pour les ressources en fer ferrique dans le sol.

Les bactéries du genre *Bacillus* ont la capacité de produire des lipopeptides comme l'iturine, la surfactine et la fengycine ou de protéases et des chitinases qui dégradent les polymères structurels des champignons et des substances volatiles antifongiques (Kefi *et al.*, 2015), de même certaines souches de *Pseudomonas sp* produisent ces dernières substances, c'est le cas de la souche CT22 qui a l'aptitude d'agir par antibiose contre *B.cinerea* en libèrent des substances volatiles et non volatiles actives sur la croissance mycélienne (Bouaoud Y., 2018).

Des travaux antérieurs ont rapporté que *Pseudomonas* est parmi les PGPR les plus dominant dans la rhizosphère, et que les protéases, lipases et l'HCN extracellulaire peuvent contribuer à l'inhibition et l'élimination des maladies fongiques (Ghodsalavi *et al.*, 2013).

La production d'enzymes lytique comme la chitinase, glucanase, cellulase, lipase et protéase joue en effet un rôle crucial dans la dégradation de la paroi cellulaire des agents pathogènes et est reconnue comme l'un des mécanismes d'action les plus important dans la lutte biologique contre les agents nuisibles (Kobayashi *et al.*, 2002 ; Haider *et al.*, 2016).

6. Test de biocontrôle sur les plantes de tomate

Le suivi de la croissance des plantes de tomates a montré les résultats représentés dans la figure ci-dessous :



Figure 17 : Résultats de test *in vivo* sur les plantes de tomate.

Après 15 jours d'inoculation des chicots de plantes de tomates avec la suspension sporale et les suspensions bactériennes (TO4, CH8 et B), le champignon n'a pas pu se développer sur la plante et de ce fait l'activité de biocontrôle des trois isolats n'a pas pu être vérifiée. L'absence de développement de champignon est peut lier à plusieurs facteurs :

- Condition environnementales (température et humidité)
- Absence de chambre de culture qui favorise le développement de *Botrytis cinerea* grâce à ses conditions optimales qui sont 22°C, 14h de photopériode et humidité relative supérieur à 90°C (Bardin *et al.*, 2008).
- La qualité et la charge de la suspension sporale
- Plantules traitées préalablement contre *B. cinerea*

La majorité des travaux sur le biocontrôle des champignons pathogènes des plantes sont concentrés sur l'utilisation de bactéries du genre *Pseudomonas* et *Bacillus* qui sont principalement rhizosphériques et endophytiques, ces bactéries sont bien adaptées pour vivre à l'intérieur de la plante et pourraient donc se comporter comme des agents de contrôle biologique efficace (Lin *et al.*, 2013).

Contrairement à nos résultats, plusieurs d'autres étude ont rapporté l'efficacité des bactéries rhizosphérique à contrôler *B. cinerea* sur les cultures cultivées sur champs ou sous serre. Bouaoud (2018) a rapporté la capacité des souches appartenant au genre *Pseudomonas* sp. à protéger les plantes de tomates, cultivées dans une chambre de culture conditionnée, contre les attaques de *B.cinerea* ALG66. Siddiqui (2005) a également révélé l'effet de *Pseudomonas* PsJN sur la réduction de la maladie de la tomate causée par *Botrytis cinerea*. La réduction de la sporulation de *Botrytis cinerea* par les agents de biocontrôle est une cible importante pour lutter efficacement contre le champignon pathogène en particulier dans les cultures sous serre (Decognet *et al.*, 2009 ; Bardin *et al.*, 2014).

Conclusion

La tomate (*Lycopersicon esculentum* L.) est parmi les cultures les plus importantes dans le monde, c'est un aliment sain grâce à sa valeur nutritionnelle particulière. C'est l'un des légumes frais les plus cultivés en pépinières pour ses fruits. Elle est attaquée par plusieurs phytopathogènes qui lui causent de graves maladies (Maheshwari et Vidhya, 2016). *Botrytis cinerea* est l'un de ces champignons pathogènes qui occasionnent des dégâts économiques importants pour cette culture. L'application de certains pesticides chimiques pour lutter contre les agents pathogènes peut engendrer des effets secondaires nocifs pour l'être humain, les animaux, et l'environnement (Ursan et al., 2018). Pour cela des bactéries antagonistes rhizosphériques sont utilisées en tant que moyen de lutte biologique sous forme de biopesticides.

La présente étude s'intéresse à la recherche et à l'évaluation de l'activité antagoniste de 48 isolats *vis-à-vis* la souche *Botrytis cinerea* ALG66, par la méthode de confrontation directe *in vitro* sur boîte de pétri qui a révélé la capacité de 11 isolats bactériens à inhiber le développement de ce champignon. Quatre isolats ont montré des PGI % importants ; 77% pour TO4 et 82% pour CH8, EP1 et B. Sur la base de ces pourcentages d'inhibition des tests *in vivo* ont été réalisés sur plantes, feuilles et fruits de tomate pour vérifier leur efficacité.

L'identification préliminaire de ces isolats a montré que les isolats TO4 et B présentent des caractéristiques des *Pseudomonas* et pour les isolats CH8 et EP1, ils présentent des caractéristiques de genre *Bacillus*.

Les résultats du test *in vivo* sur les fruits de tomate ont montrés la capacité de ces souches à réduire la pourriture grise, un résultat encourageant qui nous laisse envisager une éventuelle application de ces isolats comme agents de lutte biologique contre *Botrytis cinerea*. Par contre sur les feuilles, ces isolats n'ont montré aucun effet inhibiteur.

L'efficacité de nos isolats à contrôler le développement de *B. cinerea* sur plante entière, n'a pas pu être vérifié (le champignon ne s'est pas développé durant l'expérience).

Au terme de ce travail, et pour une meilleur exploitation de ces isolats certains aspects méritent d'être approfondis par des travaux complémentaires :

- Installation des chambres de cultures qui permettent de réaliser des expériences sur plantes dans des conditions optimales.
- Identification phénotypiques et phylogénétique des isolats.
- Réalisation des tests d'antagonisme sur d'autres microorganismes phytopathogènes.
- Déterminer les mécanismes d'action des isolats antagonistes.

Références bibliographiques

- **Abbas M M. (2020).** Enhancement of the nutrients efficiency and productivity of tomato (*lycopersicum esculentum mill.*) Plants by using nano silver. Plant Nutrition Department, NRC - Cairo, Egypt. *Plant Archives* Vol. 20, Supplement 2, 4242-4244 pp.
- **AbdAlla S.A., Algam S.A., Elshiekh I., Ahmed M. El Naim. (2014).** *In Vitro* Screening of *Bacillus* Isolates for Biological Control of Early Blight Disease of Tomato in Shambat Soil. *World Journal of Agricultural Research.* 2 :147-150.
- **Adesina MF., Lembke A., Costa R., Speksnijder A., Smalla K., (2007).** Screening of bacterial isolates from various European soils for in vitro antagonistic activity towards *Rhizoctonia solani* and *fusarium oxysporum* :site_dependent composition and diversity revealed. *Soil biology and Biochemistry.* 39:2818_2828.
- **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.*
- **Agrios G. N. (2005).** Plant pathology. Edition: Elsevier Academic Press, Oxford, 922p.
- **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.
- **Alabouvette, C., Lemanceau, P., & Steinberg, C. (1993).** Recent advances in the biological control of *Fusarium* wilts. *Pesticide Science*, 37 (4), 365-373.
- **Al-Shugairan, I. N. M. (2008).** Biological Control of *Fusarium oxysporum* Wilt Disease of Tomato by Antagonistic and Plant Growth Promoting Actinomycetes. (these doctorat in environnemental sciences, United Arab Emirates university) .
- **Anonyme 1 :** <https://www.atlasbig.com/fr-ch/pays-par-production-de-tomates#:~:text=La%20Chine%20est%20le%20plus.est%20class%C3%A9e%20au%2097%C3%A8me%20rang>. Consulté en 12 avril 2022
- **Baptista F. J., Bailey B. J., et Meneses J. F. (2012).** Effect of nocturnal ventilation on the occurrence of *Botrytis cinerea* in Mediterranean unheated tomato greenhouses. *Crop Protection*, 32 : 144-149.
- **Bardin M (2021).** Introduction à la pathologie végétale. UR0407 Pathologie Végétale, Avignon, 37p.

- **Bardin M, Decognet V, Nicot PC (2014)** Remarkable predominance of a small number of genotypes in greenhouse populations of *Botrytis cinerea*. *Phytopathology* 104: 859-864.
- **Bardin M, Fargues J, Nicot PC (2008)** Compatibility between biopesticides used to control grey mould, powdery mildew and whitefly on tomato. *Biol Control* 46: 476-483.
- **Barea J. M., Pozo M. J., Azcón R., Azcón-Aguilar C. (2005)**. Microbial co-operation in the rhizosphere. *Journal of Experimental Botany*, 56:1761–1778.
- **Baysal O., Siragusa M., Ikten H., Polat I., Gumrukcu E., Yigit F., Carimi F., Teixeira D. et Silva J. A. (2009)**. *Fusarium oxysporum f. sp. lycopersici* races and their genetic discrimination by molecular markers in West Mediterranean region of Turkey. *Physiological and Molecular Plant Pathology*, 74 : 68-75.
- **Belosokhov, A.F. Belov, G.L. Chudinova, E.M. Kokaeva, L.YU. Elansky, S.N. (2017)**. *Alternaria spp.* and *Colletotrichum coccodes* in potato leaves with early blight symptoms. *PAGV -Special Report*. (18). 181-190.
- **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.
- **Bensidhoum L., Nabti El-H., Tabli N., Kupfers chmied P., Weiss A., Rothballer M., Schmid M., Keel C. et Hartmann A. 2016**. Heavy metal tolerant *Pseudomonas protegens* isolates from agricultural well water in northeastern Algeria with plant growth promoting, insecticidal and antifungal activities. *Eur. J. Soil. Biol.* 75, 38–46.
- **Bensidhoum L., Rai A., Tabli N., Kahouadji N., Khaber M., & Nabti E. (2015)**. Biological control of *Botrytis cinerea* by *Bacillus sp.* Strain S7LiBe under abiotic stress. *Int. J. Sci. Res. Sci. Technol*, 1, 07-14.
- **Blancard D., Laterrot H., Marchoux G. et Candresse T. (2012)**. *Tomato Diseases Identification, Biology and Control*. Ed,Quæ. Paris. pp.181-182.
- **Blancard D., Laterrot H., Marchoux G., et Candresse T. (2009)**. *Les maladies de la tomate, identifier, connaitre et maitriser*. Edition : Quæ. Paris. 691p.
- **Bochard-Rochette M (2020)**. *Bacillus pumilus* et *Bacillus subtilis* pour lutter contre la pourriture grise chez la tomate et le concombre de serre. Université LAVAL Québec, Maîtrise en biologie végétale. Canada, 77p.

- **Bouaoud, Y., Troulet, C., Foughalia, A., Berge, O., Aissat, K. et Bardin, M.** (2018). A multi-criteria approach for the selection of efficient biocontrol agents against *Botrytis cinerea* on tomato in Algeria. *BioControl*. 63 (2), 299-311.
- **Bouaoud.Y** (2018). Protection biologique contre la pourriture grise de la tomate sous serre en Algérie. Thèse de Doctorat, université A.MIRA-BEJAIA, faculté des sciences de la nature et de la vie, département Microbiologie, Bejaia, 137p
- **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.
- **Chaux C. et Foury C.** (1994). Production légumière. Tome3 : Légumineuses potagère, légumes et fruits. Edition : Technique et documentation – Lavoisier. Paris. 455p.
- **Chinnasamy, G.** (2005) A proteomics perspective on biocontrol and plant defense mechanism in PGPR: Biocontrol and Biofertilization. Springer. 233–255.
- **Decognet V, Bardin M, Trottin-Caudal Y, Nicot PC** (2009) Rapid change in the genetic diversity of *Botrytis cinerea* populations after the introduction of strains in a tomato glasshouse. *Phytopathol* 99: 185-193.
- **Delarra C.** (2007). Microbiologie pratique pour le laboratoire d'analyses ou de contrôle sanitaire, pp 427-150.
- **Direction de l'agriculture** (2018). Fiche technique : La tomate-*Solanum lycopersicum* L., <https://www.service-public.pf/dag/wp-content/uploads/sites/28/2018/12/tomate-ft-culture SDRdag v2016.pdf>. consulté en 14 avril 2022.
- **Direction des Statistiques Agricole et des Systèmes d'information** (2021) Statistique Agricole Superficie et production Série B. <https://madr.gov.dz/wp-content/uploads/2022/04/SERIE-B-2019.pdf>. Consulté en 26 juin 2022.
- **Donmez, M. F., Esitken, A., Yildiz, H., & Ercisli, S.** (2011). Biocontrol of *Botrytis cinerea* on strawberry fruit by plant growth promoting bacteria. *Journal of Animal and Plant Sciences*, 21(4).
- **Dossa, S. B. J. Togbe, E.C. Pernaci, M. Agbossou, E. K. Ahohuendo, B.C.** (2019). Effet des facteurs de l'environnement sur les *Fusarium* pathogènes des plantes cultivées. *International Journal of Biological and Chemical Sciences*. (13).493-502.
- **Driesche Van R.G. and Bellows T.S.** (1996). Biological control. Chapman and Hall. U.S.A.
- **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.
- **Elad Y. (1997)**. Responses of plants to infection by *Botrytis cinerea* and novel means involved in reducing their susceptibility to infection. *Biol Rev Camb Philos Soc*, 72:381-422.
 - **Essghaier B., Hedi1 A., HajlaouiM. R., Boudabous A. and Sadfi-Zouaoui. N. 2012**. *In vivo* and *in vitro* evaluation of antifungal activities from a halotolerant *Bacillus subtilis* strain J9. *Afr. J. Microbiolog. Res*,6 19: 4073-4083.
 - **Faessel L., Gomy C., Tostivint C., Dechanteloup A., Nassr N., Hipper C. (2014)**. Etude réalisée par BIO by Deloitte et RITMO Agroenvironnement et commanditée par le Centre d'Études et de Prospective du Ministère de l'Agriculture, de l'Agroalimentaire et de la Forêt (MAAF). Rapport final : Produits de stimulation en agriculture visant à améliorer les fonctionnalités biologiques des sols et des plantes –Étude des connaissances disponibles et recommandations stratégiques. 155p.
 - **FAO. (2019)**. <https://www.fao.org/faostat/fr/#data/FBS>. Consulté en 26 juin 2022.
 - **FAOSTAT (2016)**. <https://www.fao.org/faostat/fr/#data/FBS>. Consulté en 26 juin 2022.
 - **Garcia-Brugger A., Lamotte O., Vandelle E., Bourque S., Lecourieux D., Poinssot B., Wendehenne D., Pugin A. (2006)**. Early signaling events induced by elicitors of plant defenses. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 19(7):711-24.
 - **Gerhardson B. (2002)**. Biological substitutes for pesticides. *Trends in Biotechnology*.20. (8): 338-343.
 - **Ghodsalavi B., Ahmadzadeh M., Soleimani M., Madloo P.B and Taghizad-Farid R (2013)**. Isolation and characterization of rhizobacteria and their effects on root extracts of *Valeriana officinalis*. *Aust. J. Crop. Sci.* 7 3: 338-344.
 - **Gnancadja, LS. Tonon, DHE. Faton, EMO. Douro, KKO. Dannon, E. Akoegninou, A. (2015)**. Efficacité de l'agent antagoniste *Trichoderma harzianum* sur *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* agent pathogène de la tomate. *International Journal of Biological and Chemical Sciences*. (9). 770-782.
 - **Gust A.A., Brunner F et Nurnberger T. (2010)**. Biotechnological concepts for improving plant innate immunity. *Current Opinion in Biotechnology*. 21: 204-210.
 - **Haider R, Fermaud M, Calvo-Garridos C, Roudet J, Deschamps A (2016)**. Modes of action for biological control of *Botrytis cinerea* by antagonistic bacteria. *Phytopathol Mediterr* 55: 301-322.
 - **Hammad N F., Basher H A and Ashwaq T H (2010)**. The biological activity of bacterial vaccine of *Pseudomonas putida*2 and *Pseudomonas fluorescens*3 isolates of

- protect sesame crop (*sesamum indicum*) from *Fusarium* Fungi under field conditions. Agriculture and Biology Journal of North America. 1(5): 803-811.
- **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.
 - **Höfte M. and Bakker P.A.H.M. 2007.** Competition for Iron and Induced Systemic Resistance by Siderophores of Plant Growth Promoting Rhizobacteria. In Varma, A., Chincholkar, S.B. (eds.), Microbial siderophores. p121-133.
 - **IBMA (2017).** Perspectives du Biocontrôle en France. https://www.ibmafrance.com/biocontrole/?fbclid=IwAR2pMYqhm6rdd6xuSCtnd-odHeEzwYC7oZkb6riSAoIS-nO6_CpEEzdVi3c. consulté en 23 avril 2022
 - **Iqbal RK., Saeed K., Khan A., Noreen I., Bashir R. (2019).** Tomato (*Lycopersicum Esculentum*) Fruit Improvement through Breeding. Sch J Appl Sci Res Vol: 2, Issu: 7 (21-25).
 - **Janisiewicz W.J. and Korsten L. 2002.** Biological Control of Postharvest Diseases of Fruits. *Annu. Rev. Phytopathol*, 40: 411-41.
 - **Jijakly M.H. (2003).** La lutte biologique en phytopathologie, In : Phytopathology. Lepoivre P. (Eds). De Boeck, Bruxelles.
 - **Jones H., Whipps J. A., et Gurr S. J. (2001).** The tomato powdery mildew fungus *Oidium neolyopersici*. *Molecular Plant Pathologie*, 2 : 303 - 309.
 - **Kefi A, Slimene IB, Karkouch I, Rihouey C, Azaeiz S, Bejaoui M, Belaid R, Cosette P, Jouenne T, Limam F (2015).** Characterization of endophytic *Bacillus* strains from tomato plants (*Lycopersicon esculentum*) displaying antifungal activity against *Botrytis cinerea* Pers. *World J Microbiol Biotechnol* 31: 1967-1976.
 - **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.
 - **Kiss L., Cook R.A.T., Saen Z. G .S., Cunnington J. H., Takamatsu S., Pascoei, Bardin M, Nicot PC., Sato Y. et Rossman A. Y.(2001).** Identification of two powdery mildew fungi, *Oidium neolyopersici sp. nov.* and *O. lycopersici*, infecting tomato in deferent parts of the world. *Mycology Resarch*, 105 (6): 684-697.
 - **Kobayashi DY, Reedy RM, Bick JA, Oudemans PV (2002).** Characterization of a chitinase gene from *Stenotrophomonas maltophilia* strain 34S1 and its involvement in biological control. *Appl Environ Microbiol* 68: 1047-1054.

- **Köhl, J., Kolnaar, R., & Ravensberg, W. J. (2019).** Mode of action of microbial biological control agents against plant diseases: relevance beyond efficacy. *Frontiers in plant science*, 10, 845.
- **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.
- **Kumar V., Haldar S., Pandey K. K., Singh R.P., Singh A. K., et Singh P.C. (2008).** Cultural, morphological, pathogenic and molecular variability amongst tomato isolates of *Alternaria solani* in India. *World Journal Microbiol Biotechnoology*, 24 : 1003-1009.
- **Lin T, Zhao L, Yang Y, Guan Q, Gong M (2013)** Potential of endophytic bacteria from *Sophora alopecuroides* nodule in biological control against *Verticillium* wilt disease. *Aust J Crop Sci* 7:139–146.
- **Maheshwari U.N. and Vidhya K. 2016.** Antagonistic Effect of *Trichoderma* Species against Various Fruit Pathogens. *Int. J. Pharm. Sci. Rev. Res*, 36 1: 167-172.
- **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 phytopathologie. Université d'Avignon et des Pays de Vaucluse. France.14p.
- **Marchal N, Bourdon J L et Richard CL. (1991).** Les milieux de culture pour l'isolement et l'identification biochimique des bacteries .3eme Edition : Doin. Paris.
- **Mc Quilken M.P. (1990).** Development of *Pythium oligandrum Drechsler* for biological control of fungal soil-borne diseases. Thèse, Philosophie, University of Sheffield, 307 p.
- **Milet, A. (2017).** Isolement de microorganismes à partir du sol des régions arides et sélection d'isolats à effet antagoniste sur l'agent de l'Alternariose. Thèse de Doctorat en Biotechnologies, Biologie et Environnement. Université des Frères Mentouri - Constantine1.31-34.
- **Miller, R. N. G., Costa Alves, G. S., & Van Sluys, M. A. (2017).** Plant immunity: unravelling the complexity of plant responses to biotic stresses. *Annals of botany*, 119(5), 681-687.
- **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*.
- **Mulugeta, T. Abreha, K. Tekie, H. Mulatu, B. Yesuf, M. Andreasson, E. Liljeroth, E. Alexandersson, E. (2019).** Phosphite protects against potato and tomato late blight in

- tropical climates and has varying toxicity depending on the *Phytophthora infestans* isolate. Crop Protection. (121). 139-146.
- **Naika S., De Jeude J., De Goffau M., Hilmi M., et B.Vam Dam. (2005).** La culture de la tomate : production, transformation et commercialisation, Edition : Wageningen, pays-bas. 105p.
 - **Nasraoui B, (2006).** Les champignons parasites des plantes cultivées, biologie, systématique, pathologie, maladies. Centre de publication universitaire. Tunis. P456
 - **Nunes C., Usall J., Teixido N., Fons E. and Vinas. I. 2002.** Post-harvest biological control by *Pantoea agglomerans* (CPA-2) on Golden Delicious apples. *J. Appl. Microbiol*, 92: 247–255.
 - **Petatan-Sagahon I, Anducho-Reyes MA, Silva-Rojas HV, Arena-Cuenca A, Tellez-Jurado A, Cardenas-Alvarez IO, Mercado-Flores Y (2011).** Isolation of bacteria with antifungal activity against the phytopathogenic fungi *Stenocarpella mydis* and *Stenocarpella macrospora*. *Int Mol Sci* 12: 5522-5537.
 - **Rai A., Bensidhoum L., Tabli N., Bouaoud Y., Naili F., Cruz C. et Nabti E (2016).** A *Pseudomonas Protegens* with High Antifungal Activity Protects Apple Fruits Against *Botrytis Cinerea* Gray Mold. *I.J.S.R.S.T*, 2 6: 227-237.
 - **Rashad, Y., Moussa, T.A.A .(2020).** Biocontrol agents for fungal plant diseases management .Cottage industry of biocontrol agents and their application , 337-363
 - **Rekibi, F. (2015).** Analyse compétitive de la filière tomate sous serre. Cas de la Wilaya de Biskra. *Thèse de magister*.
 - **Remuson F, Le Guellec M, Micoud A. (2014).** Résistance du *Botrytis* de la tomate (*Botrytis cinerea*) vis-à-vis des fongicides. *Ecophyto*.2p.
 - **Richardson A.E, Barea J.M., McNeill A.M. et Prigent-Combaret C. (2009).** Acquisition of Phosphorus and Nitrogen in the rhizosphere and plant. *Plant and Soil*, 321:305–339.
 - **RMT Elicitra (2017).** http://elicitra.org/index.php?rub=definition_des_sdp. (consulté le 23 avril).
 - **Romanazzi G et Feliziani E. (2014).** Botrytis cinerea (Gray Mold).In: Bautista-Banos S. Postharvest Decay Control Strategies. Elsevier Inc. pp133-136
 - **Ruocco M. Giorgini M., Alomar O., Blum B., Kohl J., et Nicot P. (2011).** Lutte Biologique : Numéro 2: Tomate.CNR Italie. 10p.
 - **Saddiki S. (1999).** Utilisation du Bradyrhizobium japonicum comme rhizobactéries favorisant la croissance des plantes chez le maïs. Thèse pour l’obtention du grade de maitre en Science. Université LAVAL, 65P.

- **Saha M., Sarkar S., Sarkar B., Sharma B.K., Bhattacharjee S. and Tribedi. P (2015).** Microbial siderophores and their potential applications: a review. *Environ. Sci. Pollut. Res.* <http://dx.doi.org/10.1007/s11356-015-4294-0> consulté en 05 mai 2022
- **Si Amar H., (2017).** Application des bacilles thermophiles dans la lutte biologique. Mémoire de Master en Microbiologie Appliquée. L'université de Tlemcen. p43.
- **Si Mohammed A. (2017).** Caractérisation et lutte biologique vis-à-vis de *fusarium oxysporum*. Thèse de doctorat, université Ahmed BEN BELLA, ORAN1. Facult » des sciences de la nature et de la vie, ORAN1, 124p.
- **Siddiqui ZA. (2005).** PGPR: prospective biocontrol agents of plant pathogens. In Siddiqui ZA (Ed.), PGPR: Biocontrôle and biofertilization. Springer, Pays-Bas, P. 111-142.
- **Singleton P. (2005).** Bactériologie : Pour la médecine, la biologie et la bactériologie. 6ème édition. Dunod-Paris. 480-490.
- **Suresh, A., Pallavi, P., Srinivas, P., Praveen Kumar, V., Jeevan Chandra, S., Ram Reddy, S., 2010.** Plant growth promoting activities of fluorescent pseudomonads associated with some crop plants. *Afr. J. Microbiol. Res.*, 14:1491–1494.
- **Tabli, N., Rai, A., Bensidhoum, L., Palmieri, G, Gogliettino, M., Cocca, E,...& Nabti, E. (2018).** plant growth promoting and inducible antifungal activities of irrigation well water-bacteria. *Biological Control*, 117, 78-86.
- **Thongkamngam T. and Jaenaksorn T. 2017.** *Fusarium oxysporum* (F221-B) as Biocontrol Agent against Plant Pathogenic Fungi *in vitro* and in Hydroponics. *Plant Protect. Sci.*, 53 2: 85-95.
- **Touibia M (2015).** Composition chimique et activité antifongique de l'huile essentiel de *Myrtus comunis* L. sur milieu de laboratoire et sur les fruits du fraisier. « Nature & Technologie ». B- Science Agronomiques et Biologiques, 12 : 65-70.
- **Toussaint A. et Baudoin JP. (2009) .** Biodiversité chez la tomate, stratégie de conservation et valorisation de la collection « Luc Fichot* ». Gembloux Agro Bio Tech.
- **Toussaint V. (1996).** Caractérisation d'un antibiotique produit par la souche d'actinomycète EF-76 antagoniste à *Phytophthora Fragariae* var. *rubi* causant le pourridié des racines du framboisier. Mémoire de Maitrise ès science. Université de Sherbrooke, Québec, Canada.
- **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.

- **Trottin-Caudal Y., Baffert V. Monnet Y. et Vileneuve F. (2011).** Maitrise de la protection intégrée : Tomate sous serre et abris, Edition : Ctifl, Paris, 281p.
- **Turcotte, G., Larouche, R., Carrier, A., Lambert, L. (2015).** Production de la tomate de serre au Québec. Ministère de l'agriculture, des pêcheries et de l'alimentation du Québec (MAPAQ).
- **Ursan, M. Boiu-sicua, OA. Voaides,C. Stan ,V. Bubueanu,C. Cornea,C.P.(2018).** The potential of new *Streptomyces* isolates as biocontrol agents against *Fusarium* spp. Agriculture for Life, Life for Agriculture. (1).594- 600.
- **Vurukonda, S. S. K. P., Giovanardi, D., & Stefani, E. (2018).** Plant growth promoting and biocontrol activity of *Streptomyces spp.* as endophytes. International journal of molecular sciences, 19(4), 952.
- **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.
- **Williams G.F., Asher M.J.C. (1996).** Selection of rhizobacteria for the control of *Pythium ultimum* and *Aphanomyces cochlioides* on sugar-beet seedlings. *Crops Protection*. 15: 479-486.
- **Williamson B., Tudzynski B., Tudzynski P. et Van Kan JAL.(2007).** *Botrytis cinerea*: the cause of grey mould disease. *Molecular Plant Pathology*. 8: 561–580.
- **Worrall, E. A., Hamid, A., Mody, K. T., Mitter, N., & Pappu, H. R. (2018).** Nanotechnology for plant disease management. *Agronomy*, 8(12), 285.

Annexe 1: Milieux de culture en g/l**• Milieu GN**

Peptone.....	6g
Extrait de levure.....	2g
Extrait de viande.....	1g
NaCl.....	5g
Agar.....	14g
PH.....	7,3

• Milieu PDA :

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

• Milieu PCA :

Extrait de levure.....	2.50g
Peptone de caséine.....	5.00g
Glucose.....	1.00g
Agar.....	15,00g
pH final.....	7,0 ±0,2

• Milieu LB :

Peptone.....	10g
Extrait de levure.....	5g
NaCl.....	10g
pH final.....	7,2 ± 0,2

Résumé

L'objectif de cette étude est vérifier l'activité antagoniste de 48 isolats bactériens à l'égard de *Botrytis cinerea*. Les résultats obtenus après le test de confrontation direct sur gélose, ont révélé la capacité de 11 isolats bactériens à inhiber le développement de ce champignon. Quatre isolats ont montré des PGI % importants ; 77% pour TO4 et 82% pour CH8, EP1 et B. L'identification préliminaire de ces isolats a montré qu'ils présentent des caractéristiques similaires au genre *Bacillus* pour CH8 et EP1 et *Pseudomonas* pour B et TO4. Des essais d'antagonisme *in vivo* ont été réalisé sur plantes, feuilles et fruits de tomate afin d'assurer leur efficacité. Sur les fruits, les isolats ont montré un pouvoir inhibiteur appréciable et variable, par contre sur les feuilles détachées aucun effet inhibiteur n'a été observé. L'efficacité de nos isolats à contrôler le développement de *B. cinerea* sur plante entière, n'a pas pu être vérifié (le champignon ne s'est pas développé durant l'expérience).

Mots clés : *Botrytis cinerea*, Lutte biologique, Tomate, Phytopathogène, Rhizobactéries

Abstract

The aim of this investigation is to verify the antagonistic activity of 48 bacterial isolates against *Botrytis cinerea*. The obtained data concerning the direct confrontation test on agar, revealed the ability of 11 bacterial isolates to inhibit the development of this fungal species. Four isolates showed significant PGI% ; 77% for TO4 and 82% for CH8, EP1 and B. The preliminary identification of these isolates showed that they present the same characteristics of *Bacillus* genus for CH8 and EP1 and *Pseudomonas* genus for B and TO4. *In vivo* antagonism tests were performed on tomato plants, leaves and fruits to confirm their effectiveness. On fruits, the isolates showed an appreciable and variable inhibitory effect, on the other hand on the detached leaves no inhibitory effect was observed. The ability of our isolates to control the development of *B. cinerea* on the whole plant could not be verified (the fungus did not grown during the experiment).

Key words: *Botrytis cinerea*, Biological control, Tomato, Phytopathogen, Rhizobacteria