



Université Mohamed Khider de Biskra
Faculté des sciences exactes et sciences de la nature et de la vie
Département des sciences de la nature et de la vie

THESE DE DOCTORAT EN SCIENCES

Domaine : Sciences de la
nature et de la vie

Filière : Sciences biologiques
Spécialité : Microbiologie

Réf. :

Présentée par :
Abdelhamid FOUGHALIA

Thème **Recherche d'agents de lutte biologique d'origine microbienne contre des champignons phytopathogènes**

Jury :

Président	TITAOUINE Mohamed	Université de Biskra
Promoteur	AISSAT Kamel	Université de Batna 2
Co-promoteur	NICOT Philippe	INRAE-Avignon
Examineur	MOUSSI Abdelhamid	Université de Biskra
Examineur	Si BACHIR Abdelkrim	Université de Batna 2

Année universitaire : 2021 - 2022

Dédicaces

Je dédie cette thèse à :

La mémoire de mon père

Ma mère

Mon épouse

Mon fils Sanad

Mes frères et mes sœurs

Toute ma famille

Mes amis

Remerciements

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

Je remercie le Ministère algérien de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique pour la bourse qui m'a octroyé à travers le programme « PNE » pour finaliser cette thèse.

Mes remerciements au professeur Mr. Titaouine Mohammed, d'avoir accepté de présider ce jury.

Je remercie les professeurs : Mr Moussi Abdelhamid et Mr Si Bachir Abdelkrim d'avoir accepté d'examiner cette thèse.

Ma reconnaissance et profonde gratitude vont à Kamel Aissat et Philippe Nicot de m'avoir guidé et assisté tout au long de ce travail ; aussi de diriger les manipulations et les travaux de cette thèse. Je vous remercie pour votre aide à travers vos conseils qui m'ont été utiles pour finaliser ce travail. Merci également pour les connaissances et l'expérience que vous m'avez transféré. Merci pour votre disponibilité et le temps que vous m'avez consacré.

Je tiens également à remercier Marc Bardin de m'avoir accueilli dans l'unité de pathologie végétale d'INRAE Avignon et dans le laboratoire de Mycologie. Je vous tire le chapeau pour votre gestion lors de l'épidémie.

Merci également à Magali Eygrier, Magali Dufaud, Jean-François Bourgeay, Claire Troulet, Caroline Guilbaud et Chrystelle Lacroix pour leur aide et conseils précieux.

Je remercie Nathalie Truglio, Joël Beraud, Jérémy Theodore et Michel Pascal pour leur aide dans la préparation et la culture des plantes de tomates qui ont servi à cette étude.

Mes remerciements à Thomas Pressecq, Jonathan Gaudin pour leur aide et soutien lors de l'épidémie. Merci pour votre gentillesse et votre sourire.

Je voudrais remercier Corinne Michel pour les conseils et les informations intéressantes qui m'ont aidé lors de mes manips.

Je remercie tous les membres de l'équipe « Mycologie » et l'équipe « Mistral » d'INRAE Avignon pour leurs conseils, leurs gentillesse et pour l'accueil chaleureux qui m'ont réservé.

Mes profonds remerciements sont adressés à Claudine Laurent, Pascale Favier, pour leur aide administrative qui a accéléré la procédure de mon accueil au sein de l'unité de pathologie végétale.

Merci à Hélène Lopusziak pour sa disponibilité, son sourire et sa sympathie.

Je tiens également à adresser mes remerciements à Michel Riqueau pour son aide technique, son assistance informatique et sa compétence.

J'adresse mes remerciements aux membres de laboratoire d'Ecologie microbienne de l'université de Bejaia. Un remerciement particulier à Yousra Bouaoud pour l'aide qu'elle m'a apporté et le temps qu'elle a consacré pour moi lors de la réalisation de la première partie de cette thèse.

Je suis reconnaissant à Mawahib Djedidi et à Souad Hammadi leur aide, leur soutien et leur disponibilité au sein de laboratoire de microbiologie de CRSTRA Biskra.

Je remercie Mohamed Tahirine pour son aide et son expertise en tant que spécialiste en pathologie végétale.

Merci à tous

Liste des tableaux

Tableau 1 : Liste de quelques biofongicides d'origine microbienne disponibles dans le marché international	21
Tableau 2 : La composition du Mix PCR pour le séquençage de la région ITS.....	30
Tableau 3 : Composition du Mix PCR pour l'amplification du gène de l'ADNr 16S.....	36
Tableau 4 : Les différents champignons testés <i>in vitro</i>	42
Tableau 5 : Identification des 40 bactéries sélectionnées.....	59
Tableau 6 : Effet antagoniste <i>in vitro</i> (confrontation directe) des sept bactéries sélectionnées contre huit champignons phytopathogènes.....	68
Tableau 7 : Effet <i>in vitro</i> des deux isolats bactériens SJ14 et SJ19 contre plusieurs souches de <i>B. cinerea</i>	76
Tableau 8 : Effet des traitements avec les deux bactéries rhizosphériques sur le diamètre de la tige, la teneur en chlorophylle et le nombre de feuilles des plants de tomates.....	80

Liste des figures

Figure 1 : Schéma représentatif des spores et des différents organes de fructifications des principaux groupes de champignons vrais et Oomycètes.....	7
Figure 2 : Les deux sites d'échantillonnage.....	25
Figure 3 : Echantillons du sol rhizosphérique.....	26
Figure 4 : Pétiole attaqué par <i>B. cinerea</i> (A), la souche BCJ2 de <i>B. cinerea</i> après l'isolement sur gélose PDA (B), <i>B. cinerea</i> souche BCJ2 sous microscope optique (X100).....	28
Figure 5 : Test de confrontation directe.....	32
Figure 6 : Test de confrontation indirecte.....	33
Figure 7 : Plantes de tomate utilisées pour le test d'antagonisme <i>in planta</i>	38
Figure 8 : Test d'antagonisme <i>in planta</i> sur plantes de tomate entières.....	39
Figure 9 : Test d'antagonisme <i>in vivo</i> en utilisant des segments de tiges de tomate... ..	40
Figure 10 : Préparation de l'inoculum de l' <i>O. neolycopersici</i>	41
Figure 11 : Les conidiophores et les spores des champignons utilisés pour le test d'antagonisme <i>in vivo</i> sous microscope photonique (x100).	43
Figure 12 : Test <i>in vivo</i> contre des champignons responsables des pourritures poste-récolte.	45
Figure 13 : graines de tomate après traitement (A) et après incubation (B)	46
Figure 14 : Mise en évidence de la réaction d'hypersensibilité sur feuilles de tabac.....	47
Figure 15 : Aspect macroscopique des deux bactéries ; <i>Bacillus safensis</i> SJ4 et <i>Acinetobacter calcoaceticus</i> SJ19 sur gélose ordinaire.....	48
Figure 16 : Effet antagoniste <i>in vitro</i> (confrontation directe) sur la croissance mycélienne de <i>B. cinerea</i> (souche BC1) de 142 isolats bactériens provenant du sol rhizosphérique (barres bleues) ou non rhizosphérique (barres rouges).	54
Figure 17 : Inhibition <i>in vitro</i> de la croissance mycélienne de <i>B. cinerea</i> (souche BC1) par la production des composés volatils.	55

Figure 18 : Inhibition <i>in vitro</i> de la germination des spores de <i>B. cinerea</i> (souche BC1) par les 40 isolats bactériens retenus (20 isolats rhizosphériques (barres bleues) et 20 isolats non rhizosphériques (barres rouges)).	56
Figure 19 : Activité protéolytique (A) et lipolytique (B) de la souche SJ11.	57
Figure 20 : Production des sidérophores par les isolats : SJ11 (A), SJ55 (B) et SJ2 (C).	57
Figure 21 : Carte thermique de la production des enzymes et des sidérophores par les quarante bactéries sélectionnées.	58
Figure 22 : Répartition des espèces identifiées.	60
Figure 23 : Effet protecteur des 40 isolats sélectionnés (20 isolats rhizosphériques (barres bleues) et 20 isolats non-rhizosphériques (barres rouges)) sur plantes et sur segments de tiges de tomate contre trois souches de <i>B. cinerea</i> .	61
Figure 24 : Comparaison entre l'effet <i>in vivo</i> des bactéries rhizosphériques et celui des bactéries non rhizosphériques contre trois souches de <i>B. cinerea</i> .	62
Figure 25 : Relation entre l'effet <i>in vitro</i> sur la germination des spores de BC1 et l'effet <i>in vivo</i> des quarante souches bactériennes sélectionnées.	63
Figure 26 : Aspect macroscopique des sept bactéries sélectionnées sur gélose ordinaire.	63
Figure 27 : Effet de différentes doses des bactéries sélectionnées contre la souche BC1 de <i>B. cinerea</i> .	64
Figure 28 : Effet de différentes doses des bactéries sélectionnées contre la souche BCJ2 de <i>B. cinerea</i> .	65
Figure 29 : Les concentrations inhibitrices médianes (IC ₅₀ %) des différentes souches bactériennes sélectionnées contre deux souches de <i>B. cinerea</i> (BC1 et BCJ2).	65
Figure 30 : Effet antagoniste <i>in planta</i> des sept isolats bactériens sélectionnés contre l' <i>O. neolycopersici</i> .	66
Figure 31 : Effet antagoniste de l'isolat bactérien SJ11 contre l'oïdium de la tomate.	67
Figure 32 : Effet antagoniste <i>in vivo</i> des sept bactéries sélectionnées sur cinq champignons phytopathogènes.	69

Figure 33 : Effet antagoniste <i>in vivo</i> de la souche SJ55 (la plus efficace) sur 5 champignons phytopathogènes.	70
Figure 34 : Effet des bactéries sélectionnées sur la germination des graines de tomate.....	71
Figure 35 : Effet des bactéries sélectionnées sur la promotion de la croissance des tomates..	72
Figure 36 : Indice de vigueur des plantules de tomates traitées avec les sept bactéries sélectionnées.	73
Figure 37 : Feuilles de tabac (après incubation) inoculées avec la souche CC94 de <i>P. syringae</i> (A) et les bactéries sélectionnées (B)	73
Figure 38 : Effet <i>in vitro</i> des deux isolats bactériens (SJ19 et SJ4) contre 5 souches de <i>B. cinerea</i>	74
Figure 39 : Effet protecteur des deux isolats bactériens (SJ19 et SJ4) contre <i>B. cinerea</i> souche BC21 sur plantes de tomate.	75
Figure 40 : Effet des traitements des graines de tomates avec les deux isolats bactériens sur la germination et l'indice de vigueur.	78
Figure 41 : Effet des deux bactéries (SJ19 et SJ4) sur la longueur des racines et des parties aériennes des tomates quatre semaines après le deuxième traitement.	78
Figure 42 : Effet des différents traitements sur le poids frais des parties aériennes (A) et des racines (B) des plantules de tomate.	79

Table des matières

Liste des tableaux

Liste des figures

Introduction générale	1
Partie I : Synthèse bibliographique	5
I. Généralités sur les champignons.....	5
II. Les champignons phytopathogènes	7
II.2. Caractéristiques des champignons phytopathogènes.....	8
II.1.1. Morphologie	8
II.1.2. Cycle de vie	9
II.2. Les symptômes causés par les champignons phytopathogènes	9
III. La lutte contre les champignons phytopathogènes	11
III.1. Méthodes prophylactiques et pratiques culturales	12
III.2. Méthodes chimiques	13
III.3. La lutte biologique.....	14
III.3.1. Mécanismes d'action des biofongicides	16
a. Pénétration des hyphes du pathogène.....	16
b. Compétition de l'espace et des nutriments.....	16
c. L'antibiose.....	17
d. Parasitisme, mycoparasitisme et production d'enzymes	18
e. Induction de la résistance systémique de la plante.....	19
f. Interférence avec le processus de pathogénicité	19
g. combinaison de plusieurs modes d'action	20
III.3.2. Critères d'un bio-fongicide idéal.....	20
III.3.3. Commercialisation des bio-fongicides.....	20
IV. Exemple d'un champignon phytopathogène cible de la lutte biologique; <i>B. cinerea</i> agent causal de la pourriture grise.....	22
Partie II : Etude expérimentale	25
I. Matériels et méthodes	25
I.1. Sites d'échantillonnage.	25
I.2. Echantillonnage et prélèvement.....	25
I.3. Isolement des antagonistes bactériens.....	26
I.4. Souches de <i>Botrytis cinerea</i> , préparation de l'inoculum et conditions de culture.....	27
I.5. Identification moléculaire de la souche BCJ2 de <i>B. cinerea</i>	28
I.5. 1. Préparation de l'échantillon.....	28
I.5. 2. Extraction de l'ADN	28
I.5. 3. Amplification par PCR.....	29
I.5. 4. Electrophorèse.....	30
I.5. 5. Séquençage de l'ADN amplifié et traitement des séquences.....	31
I.6. Evaluation de l'effet antagoniste <i>in vitro</i> des isolats contre <i>B. cinerea</i>	31

I.6.1. Test de confrontation directe.....	31
I.6.2. Test de confrontation indirecte (production des substances volatiles).....	32
I.6.3. Evaluation de l'effet <i>in vitro</i> des isolats sur la germination des spores de <i>B. cinerea</i>	33
I.7. Propriétés physiologiques et caractérisation moléculaires des isolats bactériens sélectionnés.....	34
I.7.1. Croissance bactérienne à différentes températures.....	34
I.7.2. Mise en évidence de la production des enzymes hydrolytiques.....	34
I.7.3. Production des sidérophores	35
I.7.4. Identification moléculaire des isolats sélectionnés.....	35
I.7.4.1. Etape de PCR.....	36
I.7.4.2. Etape d'électrophorèse	37
I.7.4.3. Séquençage des amplicons et traitement des séquences	37
I.8. Evaluation de l'effet antagoniste <i>in vivo</i> contre <i>B. cinerea</i>	37
I.9. Tests complémentaires réalisés sur une sélection de sept isolats bactériens.....	40
I.9.1. Evaluation de l'effet de différentes concentrations cellulaires sur le pouvoir protecteur des isolats bactériens sélectionnés contre <i>B. cinerea</i>	40
I.9.2. Etude de l'effet <i>in planta</i> contre l'oïdium de la tomate « <i>Oidium neolycopersici</i> »	41
I.9.3. Evaluation de l'effet antagoniste contre autres champignons phytopathogènes.....	42
I.9.3.1. Effet <i>in vitro</i>	42
I.9.3.2. Effet <i>in vivo</i>	42
Les souches fongiques.....	43
Le matériel Végétal	43
Inoculation artificielle.....	44
I.9.3. Etude de l'effet des isolats sélectionnés sur la promotion de la croissance des tomates.....	45
I.9.4. Pathogénicité et induction d'hypersensibilité (HR).....	46
I.10. Evaluation de l'effet de deux bactéries rhizosphériques (<i>Acinetobacter calcoaceticus</i> SJ19 et <i>Bacillus safensis</i> SJ4) sur <i>Botrytis cinerea</i> et leur pouvoir favorisant la croissance de la tomate.....	47
I.10.1. Les isolats bactériens.....	47
I.10.2. Souches de <i>Botrytis cinerea</i>	48
I.10.3. Plantes de tomates.....	48
I.10.4. Etude de l'effet antagoniste <i>in vitro</i> des deux bactéries contre <i>Botrytis cinerea</i>	49
I.10.4.1. Confrontation directe	49
I.10.4.2. confrontation indirecte	49
I.10.5. Tests de biocontrôle <i>in planta</i>	49
I.10.6. Pathogénicité et induction de la réponse d'hypersensibilité	50
I.10.7. Evaluation de l'effet des deux bactéries sur la promotion de la croissance des tomates.....	50
I.11. Analyses statistiques.....	51
II. Résultats.....	53

II.1. Les isolats bactériens.....	53
II.2. Effet antagoniste <i>in vitro</i> contre <i>B. cinerea</i>	53
II.2.1. Confrontation directe des 142 isolats contre <i>B. cinerea</i>	53
II.2.2. Production des composés volatils anti- <i>B. cinerea</i>	54
II.2.3. Inhibition de la germination des spores	55
II.3. Propriétés physiologiques et caractérisation moléculaires des isolats bactériens sélectionnés.....	56
II.3.1. Croissance à différentes températures.....	56
II.3.2. Activités enzymatiques.....	56
II.3.3. Production des sidérophores	57
II.3.4. Identification moléculaire des bactéries.....	58
II.4. Effet <i>in vivo</i> contre <i>B. cinerea</i>	60
II.5. Tests complémentaires réalisés sur la sélection des sept isolats bactériens.....	63
II.5.1. Effet <i>in vivo</i> de différentes concentrations des isolats les plus efficaces contre <i>B. cinerea</i>	63
II.5.2. Effet <i>in planta</i> sur l'oïdium de la tomate.....	66
II.5.3. Effet antagoniste contre autres champignons phytopathogènes.....	67
II.5.3.1. Effet <i>in vitro</i> par confrontation directe.....	67
II.5.3.2. Effet <i>in vivo</i>	69
II.5.4. Promotion de la croissance de la tomate	
II.5.4.1. Germination des graines et paramètres morphométriques	
II.5.4. Promotion de la croissance des plantes de tomate.....	70
II.5.4.1. Germination des graines et paramètres morphométriques.....	70
II.5.5. Pathogénicité et induction de la réponse d'hypersensibilité.....	73
II.6. Effet d' <i>Acinetobacter calcoaceticus</i> SJ19 et <i>Bacillus safensis</i> SJ4 sur <i>Botrytis cinerea</i>	74
II.6.1. Effet <i>in vitro</i>	74
II.6.1.1. Confrontation directe	74
II.6.1.2. Confrontation indirecte.....	74
II.6.2. Effet <i>in planta</i>	75
II.6.3. Effet des deux bactéries sur la croissance des tomates.....	77
II.6.4. Pathogénicité et induction de la réponse d'hypersensibilité.....	80
III. Discussion	80
Conclusion générale et perspectives	91
Références Bibliographiques	97

Introduction générale

Introduction générale

Introduction générale

Les produits alimentaires d'origine végétale constituent l'une des principales sources de la nutrition humaine. A cause de la demande croissante de la population mondiale, la production végétale devrait augmenter de 60% d'ici 2050 pour pouvoir assurer les besoins alimentaires (Booth et al., 2022).

Cependant, pour avoir une meilleure production annuelle, les agriculteurs doivent faire face aux différents problèmes auxquels ils sont confrontés chaque année. Parmi les problèmes les plus inquiétants, les maladies des plantes constituent la principale préoccupation des agriculteurs à travers le monde entier. Des pertes considérables (16% de la production annuelle) sont enregistrées chaque année à cause de différents types de maladies (d'origine biotiques ou abiotiques) (Booth et al., 2022).

En revanche, comparées aux maladies causées par autres agents pathogènes, les maladies cryptogamiques sont à l'origine des pertes les plus graves. En effet, plus de 10 000 espèces de champignons sont connues pour causer des maladies chez les plantes. Ces espèces sont responsables d'une multitude de symptômes dont les pertes sont plus au moins considérables (Agrios, 2005).

Pour certains systèmes de production agricoles tels que la production sous serre, les champignons y trouvent leurs conditions propices pour survivre et se développer et éventuellement attaquer les plantes y cultivées. Par exemple, en Algérie, les agriculteurs des régions côtières, tels que Bejaia et Jijel, ont l'habitude d'installer leurs serres près de la mer ce qui entraîne une augmentation importante de l'humidité relative. Dans ces conditions, plusieurs champignons phytopathogènes comme *Botrytis cinerea* l'agent de la pourriture grise et l'*Oidium neolycopersici* l'agent causal de l'oïdium de la tomate deviennent des problèmes difficile à gérer (Aissat et al., 2008).

L'autre problème inquiétant des champignons phytopathogènes est leur capacité d'attaquer les produits végétaux en post-récolte notamment les fruits et légumes. En général, les infections fongiques sont signalées comme ayant une plus grande capacité d'infecter un plus large éventail d'hôtes tout au long de la chaîne post-récolte. Bien que les pertes économiques dues aux attaques fongiques des fruits et légumes en poste-récolte soient variables et mal documentées, elles atteignent généralement entre 30 et 50 %, et dans certains cas, les pourritures peuvent entraîner la perte totale du produit (Bautista-Banos, 2014).

Introduction générale

Pour faire face aux maladies cryptogamiques (post et pré-récolte), l'application de fongicides de synthèse reste souvent la principale méthode de lutte (Blancard et al., 2009; Romanazzi et Feliziani, 2014). Cette méthode consiste à appliquer des fongicides chimiques en préventif ou en curatif afin d'inhiber, éliminer ou nuire à la capacité des champignons d'attaquer les plantes. Les traitements s'effectuent soit en pulvérisant les fruits et légumes stockés (après récolte) ou les parties aériennes des plantes (avant la récolte), en mélangeant les fongicides dans l'eau d'irrigation ou en badigeonnant les plaies d'effeuillage et les blessures des plantes (Leroux, 2007 ; Blancard et al., 2009; Cumagun, 2012).

Selon les statistiques de l'organisation internationale des nations unies pour l'alimentation et l'agriculture (FAO) (<https://www.fao.org/faostat/fr/#home>), l'utilisation des fongicides de synthèse chimique a atteint 969061 tonnes en 2019 dont 1499 tonnes sont destinés aux traitements des semences.

En 2017, l'utilisation totale des pesticides par surface cultivée en Algérie a été estimée à environ 0,71 kg/ha. En 2019, 1577 tonnes de fongicides ont été utilisés.

Cependant, malgré l'efficacité indiscutable des fongicides chimiques, leur utilisation accrue et parfois irrationnelle est souvent accompagnée de plusieurs problèmes sanitaires et environnementaux (Walia et al., 2021). Généralement, les pesticides chimiques sont à l'origine de certaines maladies chez l'homme aussi bien chez l'agriculteur que chez le consommateur. Leurs résidus restent dans presque 40% des aliments commercialisés (Elnahal et al., 2022). Par ailleurs, il a été démontré que, les pesticides chimiques menacent la biodiversité. Ils nuisent souvent aux microorganismes bénéfiques et provoquent la disparition de quelques espèces importantes pour l'équilibre de l'environnement. Ils constituent également l'une des principales causes de la pollution des eaux souterraines (Walia et al., 2021 ; Booth et al., 2022 ; Elnahal et al., 2022)

De même, l'application répétée et l'usage irrationnel des fongicides chimiques a conduit à l'apparition des souches de résistance à un ou plusieurs fongicides chez plusieurs champignons phytopathogènes (Romanazzi et Feliziani, 2014 ; Booth et al., 2022 ; Elnahal et al., 2022). A titre d'exemple, *B. cinerea* est un champignon polyphage connu pour sa grande variabilité génétique. Il a pu développer des résistances à plusieurs familles de fongicides chimiques couramment utilisées telles que les dicarboximides et les benzimidazoles (Blancard et al., 2009; Cumagun, 2012 ; Liu et al., 2021). Des mutants de ce pathogène résistants aux fenhexamide, boscalide, pyraclostrobine, carbendazime, pyriméthanile, cyprodinile,

Introduction générale

l'iprodione, procymidone, diéthofencarbe, thiophanate-méthyl, l'azoxystrobine, fluopyrame et au fluaziname sont également rapportés (Romanazzi et Feliziani, 2014 ; Shao et al., 2015 ; Alzohairy et al., 2021; Maia et al., 2021).

En fait, malgré le développement de nouveaux intrants chimiques avec apparemment moins d'effets secondaires, les spécialistes tirent la sonnette d'alarme et les agriculteurs sont soumis à une forte pression pour réduire ou éliminer l'application des pesticides chimiques (Bautista-Banos, 2014), ce qui rend plus urgent la recherche de nouvelles méthodes de lutte alternative efficaces, sûres et respectueuses de l'environnement (Walia et al., 2021 ; Elnahal et al., 2022).

C'est dans ce cadre que la lutte biologique est devenue l'une des solutions qui attirent l'attention des chercheurs à travers le monde. Cette méthode de lutte consiste à appliquer des produits vivants tels que les micro-organismes ou non vivants d'origine naturelle, tels que les huiles essentielles et les extraits de plantes pour lutter contre les maladies des plantes (Nollet, 2015 ; Elnahal et al., 2022).

En effet, le marché mondial des agents de lutte biologique est aujourd'hui d'environ 5 à 6% du total des pesticides (Booth et al., 2022).

Parmi les agents de lutte biologiques, les biopesticides à base de microorganismes commencent à prendre leur place dans le marché des agents de biocontrôle. Le premier biopesticide d'origine microbienne a été enregistré en 1979 aux Etats-Unis (Elnahal et al., 2022). Aujourd'hui, 91 agents de lutte biologique d'origine microbienne (49 champignons, 37 bactéries et 5 virus) sont commercialisés aux États-Unis, en Australie, au Brésil, au Canada, dans l'Union européenne, au Japon et en Nouvelle-Zélande (Nicot et al., 2016 ; Bardin et Pugliese., 2020).

Cependant, selon l'institut national de la protection des végétaux INPV, un seul biopesticide est commercialisé en Algérie, il s'agit du fameux bioinsecticide « Bt ». Par contre, pour lutter contre les maladies cryptogamiques aucun bio-fongicide d'origine microbienne n'est homologué ou autorisé pour un usage agricole (Anonyme 2017, <https://www.inpv.edu.dz/>). Ce manque de bio-fongicides d'origine microbienne dans le marché algérien, nous a encouragé à rechercher et à développer des nouveaux agents de lutte biologique d'origine microbienne contre des champignons phytopathogènes.

Introduction générale

C'est dans cette optique que cette thèse est initiée avec l'objectif général de la recherche, le screening puis le développement des agents de lutte biologique d'origine microbienne contre des champignons phytopathogènes.

Pour ce faire, nous avons opté pour la division de ce travail en 2 grandes parties:

Partie I : Synthèse bibliographique

Cette partie est consacrée aux champignons phytopathogènes où nous avons mis en lumière leurs différentes caractéristiques et les méthodes de lutte adoptées par les agriculteurs dont la lutte biologique. *B. cinerea* est pris comme exemple d'un champignon phytopathogène largement répandu en Algérie.

Partie II : Étude expérimentale

Cette deuxième partie est divisée en 3 sous parties, :

- 1) Matériels et méthodes ; consacré aux protocoles suivis pour l'isolement, la sélection, l'étude des différentes activités antagonistes et biologiques et l'identification des agents de lutte biologique d'origine microbienne efficaces contre différents champignons phytopathogènes.
- 2) Résultats ; traite les résultats obtenus,
- 3) Discussion: porte sur la et l'interprétation et la discussion des résultats obtenus.

Partie I

SYNTHESE BIBLIOGRAPHIQUE

I. Généralités sur les champignons

Les champignons (Règne : Fungi ou Mycota) forment un groupe important et diversifié d'organismes (Richardson et Warnock, 2012). À ce jour, environ 150000 espèces de champignons ont été décrites, bien que le nombre total d'espèces existantes est estimé à environ de 2,2 à 3,8 millions. Cela ferait des champignons l'une des ressources de biodiversité les moins explorées de notre planète (Hawksworth et Lücking, 2017; Webster et Weber, 2007; Balaalid et Khomich, 2021).

Ce sont des organismes eucaryotes généralement, filamenteux, ramifiés, porteurs de spores, hétérotrophes et non photosynthétiques. Ils possèdent un mycélium ou des hyphes contenant des noyaux bien marqués (Agrios, 2005; Horst, 2013; Richardson et Warnock, 2012).

Leur paroi rigide est principalement constituée de la chitine et des glucanes qui sont les composants squelettiques de base, ils sont intégrés dans une matrice de polysaccharides et de glycoprotéines. Cette caractéristique les distingue des animaux, qui sont dépourvus de parois cellulaires, et des plantes dont le principal composant de leurs paroi cellulaires est la cellulose (Agrios, 2005; Richardson et Warnock, 2012).

Pour leur nutrition, les champignons ont besoin de la matière organique composée de carbone. Ils secrètent des enzymes pour la digestion et l'absorption des nutriments à travers leur paroi cellulaire (Richardson et Warnock, 2012). En effet, la majorité des espèces fongiques connues et décrites sont des saprophytes qui se nourrissent de la matière organique morte ou en décomposition (Dickinson, 2003; Agrios, 2005).

Certaines espèces de champignons peuvent se développer dans des milieux extrêmes et dans des conditions hostiles, c'est le cas des champignons psychrophiles, thermophiles, thermotolérants, xérophiles et osmophiles...etc (Dix et Webster, 1994).

D'autres champignons dits « endophytes » peuvent se développer à l'intérieur des tissus végétaux des plantes vivantes sans provoquer des symptômes. Cependant, il y a plus de 10 000 espèces fongiques qui peuvent provoquer des maladies chez les plantes. D'autres espèces, sont responsables de quelques maladies chez l'homme appelées « mycoses » (Dickinson, 2003; Agrios, 2005).

A l'exception de quelques champignons stériles qui survivent et se multiplient uniquement grâce aux mycéliums et sclérotés (Webster et Weber, 2007), les champignons se reproduisent

principalement au moyen des spores (sexuées ou asexuées). Ces dernières sont des organes reproducteurs constitués d'une (unicellulaires) ou plusieurs cellules (pluricellulaires ou multicellulaires) (Agrios, 2005). Leur morphologie et structure sont très diversifiées, elles peuvent être, ramifiées ou non ramifiées (ou parfois enroulées en spirale), à paroi mince ou épaisse, hyaline ou pigmentée, sèche ou collante et lisse ou rugueuse (Agrios, 2005; Webster et Weber, 2007).

Quelques champignons produisent des spores asexuées (conidies) issues souvent des cellules terminales ou latérales des hyphes appelés conidiophores. Chez d'autres champignons, les conidiophores donnent de courts hyphes (phialides) qui produisent et transportent les conidies de manière endogène et parfois en chaînes. Chez certains champignons, les cellules terminales ou intercalaires d'un hyphe s'agrandissent et s'arrondissent pour former une épaisse paroi qui donne naissance aux chlamydospores (Agrios, 2005).

En fait, les spores jouent plusieurs rôles dans la vie des champignons, elles assurent la survie, la migration, la dispersion et la répartition de la variabilité génétique des espèces. Selon, Gregory (1966), les spores fongiques peuvent être classées en deux groupes selon leur fonction biologique :

- les xénospores ou spores de dispersion : ce sont des spores légères avec des parois minces. Elles peuvent être portées par le vent et les animaux et distribuées par les éclaboussures de pluie et le ruissellement de l'eau. Ce type de spores possède peu de réserves nutritives (Gregory, 1966 ; Dix et Webster, 1994).
- les memnospores ou spores sédentaires: comme leur nom l'indique, ce sont des spores qui ne migrent pas. Elles ont des parois épaisses et contiennent souvent des nutriments en réserves. Leur rôle principal est d'assurer la survie de l'espèce (Gregory, 1966 ; Dix et Webster, 1994).

De nombreuses espèces produisent à la fois des xénospores et des memnospores et les deux types peuvent être produits à la suite d'une reproduction sexuée ou asexuée. La production de spores morphologiquement différentes sur le même mycélium est connue sous le nom de « pléomorphisme » (Dix et Webster, 1994).

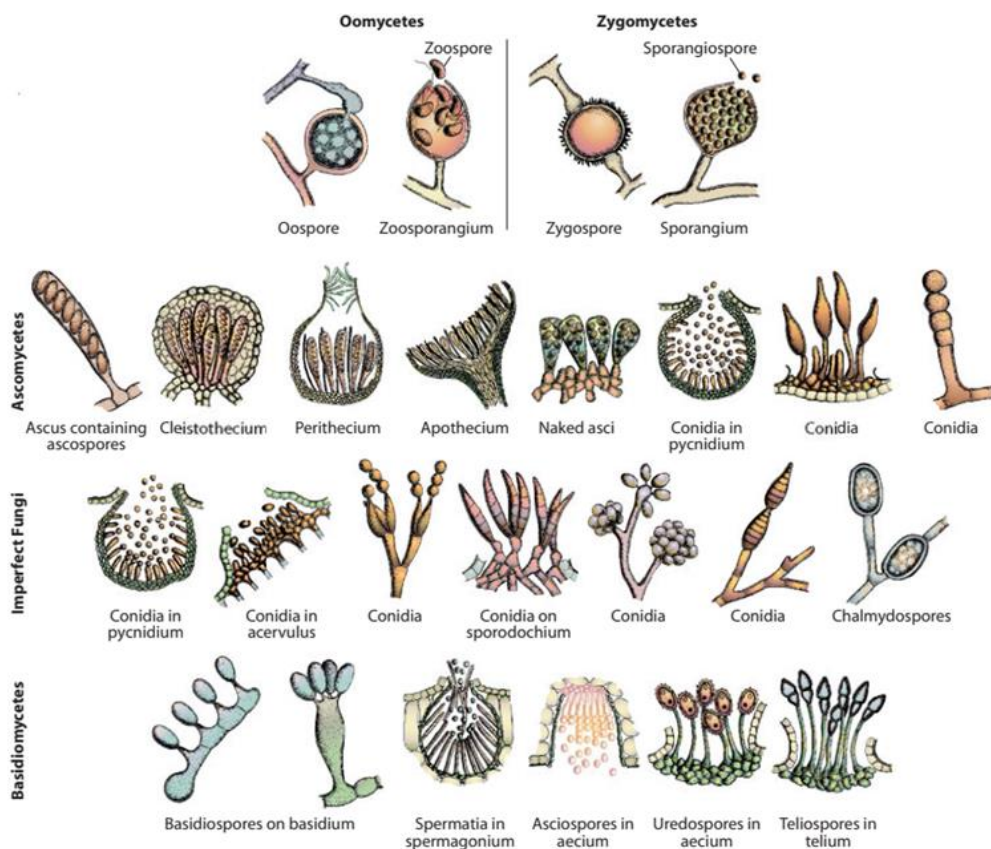


Figure 1 : Schéma représentatif des spores et des différents organes de fructifications des principaux groupes de champignons vrais et Oomycètes (Agrios, 2005)

II. Les champignons phytopathogènes

Les champignons constituent le plus grand groupe des agents pathogènes affectant les plantes (Ainsworth, 1981). Ces dernières sont attaquées par certains types de champignons et chacun de ces pathogènes peut être spécifique à un seul type de plantes ou polyphage qui peut attaquer plusieurs types de plantes (comme *Botrytis cinerea*). Certains champignons, appelés « biotrophes ou parasites obligatoires », ont développé un mode de vie nécessitant la présence de la plante hôte durant toutes les phases de leur cycle de vie. Ils ne peuvent ni croître ni se multiplier qu'en présence de leurs plantes hôtes, c'est le cas d'*Oidium neolycopersici*. Cependant, les champignons dits « parasites non obligatoires », ont besoin de la plante hôte pour uniquement une partie de leur cycle de vie. C'est le cas de la tavelure du pommier causée par *Venturia inaequalis*. Ces pathogènes peuvent compléter leurs cycles de vie sur la matière organique morte, c'est à dire être des « saprophytes facultatifs » ou des « parasites facultatifs ». Les champignons appelés « nécrotrophes » comme *Botrytis cinerea* utilisent un arsenal de métabolites secondaires comme les toxines et les enzymes pour dégrader la paroi

cellulaire de la plante cible et éliminer ses cellules et ensuite métaboliser les nutriments libérés (Dickinson, 2003; Agrios, 2005).

II.1. Caractéristiques des champignons phytopathogènes

II.1.1. Morphologie

A l'exception de quelques espèces appartenant aux Chytridiomycètes et aux levures. Les champignons ont en général un corps végétatif filamenteux appelé mycélium qui se ramifie dans toutes les directions (Dix et Webster, 1994; Agrios, 2005).

Il est composé de plusieurs unités ou branches cylindriques appelées « hyphes ». Ces derniers sont typiquement filamenteux, sauf dans certaines conditions physiologiques anormales. Cependant, des formes d'hyphes avec une structure plus diversifiée sont signalées (Dix et Webster, 1994). Les hyphes sont généralement d'épaisseur d'environ 2 à 10 micromètres, mais chez certains champignons, l'épaisseur des hyphes peut atteindre plus de 100 micromètres. La longueur du mycélium diffère d'un champignon à l'autre mais généralement elle est comprise entre quelques micromètres et plusieurs mètres. Chez certains champignons, le mycélium se compose de plusieurs cellules contenant un ou deux noyaux par cellule. L'une des rares caractéristiques de distinction qu'offrent les hyphes est la présence ou l'absence de cloisons. En fait, il existe des champignons avec un mycélium qui contient plusieurs noyaux séparés par des cloisons. Les Oomycètes et les Zygomycètes ont généralement des hyphes non cloisonnés dans lesquels les noyaux baignent dans une masse de cytoplasme (Agrios, 2005; Webster et Weber, 2007). La zone de croissance réelle du mycélium se trouve à l'extrémité des hyphes à quelques micromètres derrière la pointe. Cette dernière n'étant pas extensible et formant un bouclier résistant qui lui permet de pénétrer facilement dans le substrat solide. À l'exception des oomycètes et de certaines levures ascomycètes, les parois des hyphes contiennent de petites quantités de chitine. Il s'agit d'un polymère dur synthétisé à partir de N-acétyl glucosamine, il n'est pas élastique mais assure une certaine résistance à la paroi. Pour un mycélium, le taux d'extension vers l'avant dépend directement de la disponibilité de ressources exploitables dans la zone de croissance périphérique. Si les conditions sont favorables, l'extension vers l'avant des hyphes est exponentielle (Dix et Webster, 1994). Certains champignons inférieurs n'ont pas de vrais mycéliums mais ils produisent un système de brins appelé « rhizomycélium ». Autres champignons (myxomycota, plasmodiophoromycètes) produisent un corps multi-nucléé nu et amiboïde appelé plasmodium (Agrios, 2005).

II.1.2. Cycle de vie

Dans leurs cycles de vie, la majorité des champignons passent par une série d'étapes assez similaires. La quasi-totalité de ces organismes ont un stade de spores haploïde (1N). Cette spore germe et donne naissance à un hyphe qui contient à son tour des noyaux haploïdes. À nouveau, l'hyphe peut soit produire des spores haploïdes simples (c'est le seul cas connu chez les champignons imparfaits) ou produire un hyphe fécondé après la fusion avec un autre hyphe. A l'intérieur de l'hyphe fécondé, les noyaux s'unissent pour former un noyau diploïde appelé zygote (2N). À l'intérieur des gamétanges produits par le mycélium, la méiose et la fécondation se déclenchent pour produire à la fin le zygote (Agrios, 2005).

Dans un cas particulier notamment chez la plupart des ascomycètes et des basidiomycètes, les noyaux de l'hyphe fécondé restent séparés par paires, c'est ce qui est communément appelé « dicaryon » (N + N) et se divisent simultanément pour produire davantage de cellules hyphes avec des paires de noyaux (Agrios, 2005).

Dans le cas des ascomycètes, les hyphes dicaryotiques ne se trouvent qu'à l'intérieur du corps de fructification où ils deviennent ascogènes et les deux noyaux de chaque hyphe s'unissent pour donner un zygote (2N) qui se divise par méiose pour donner naissance à des ascospores contenant des noyaux haploïdes (Agrios, 2005).

Cependant, chez les Basidiomycètes, les spores haploïdes sont à l'origine des hyphes haploïdes. A la fin de la fécondation, un hyphe dicaryotique (N+N) est produit et se développe à l'intérieur du corps principal du champignon. Les hyphes dicaryotiques peuvent produire de manière asexuée des spores dicaryotiques qui se développeront à nouveau en un mycélium dicaryotique. Enfin, les noyaux appariés s'unissent et forment des noyaux diploïdes. Ceux-ci peuvent se reproduire par mitose ou agissent comme des zygotes qui se divisent par méiose cette fois-ci et produisent des basidiospores contenant des noyaux haploïdes (Agrios, 2005).

II.2. Les symptômes causés par les champignons phytopathogènes

Les champignons phytopathogènes sont à l'origine de plusieurs symptômes sur plantes qui peuvent être locaux ou généraux et qui peuvent se produire séparément ou simultanément ou peuvent se succéder. En général, les champignons provoquent des nécroses locales ou générales des tissus végétaux, et ils provoquent souvent une croissance réduite (rabougrissement) des organes végétaux ou des plantes entières. Certains champignons

provoquent une croissance excessive des plantes ou des parties de plantes infectées. Dans de nombreuses maladies, l'agent pathogène fongique se développe ou produit diverses structures à la surface de l'hôte. Ces structures peuvent comprendre du mycélium, des sclérotés, des sporophores, des fructifications et des spores et sont appelés « signes » (Agrios, 2005).

Le plus commun des symptômes nécrotiques sont les suivants (Agrios, 2005):

- **Tâches foliaires** : Lésions localisées sur les feuilles de l'hôte constituées de cellules mortes et effondrées.
- **Brûlure** : Brunissement général et extrêmement rapide accompagné de la mort des feuilles, des branches et des organes floraux.
- **Chancre** : Lésion nécrotique localisée sur une tige ou sur un organe d'une plante.
- **Dépérissement** : Nécrose étendue des rameaux commençant à leurs pointes et avançant vers leurs bases.
- **Pourriture des racines** : Désintégration ou décomposition d'une partie ou de la totalité du système racinaire d'une plante.
- **Fonte des semis** : Mort rapide et effondrement des semis jeunes.
- **Pourriture basale de la tige** : Désintégration de la partie inférieure de la tige.
- **Pourriture molle et pourriture sèche** : Macération et délitage des fruits, racines, bulbes, tubercules et feuilles charnues.
- **Anthraxnose** : Lésion nécrotique et enfoncée ressemblant à un ulcère sur la tige, la feuille, le fruit ou la fleur de la plante hôte.
- **Tavelure** : Lésions localisées sur le fruit hôte, les feuilles, les tubercules, etc., généralement légèrement surélevé ou enfoncé et fissuré, donnant une apparence galeuse.
- **Déclin** : Perte progressive de vigueur ; plantes qui poussent pauvrement; feuilles petites, cassantes, jaunâtres ou rouges; certaines défoliations et dépérissements présentent presque tous les symptômes susmentionnés pouvant également être associés à un retard de croissance. De plus, certaines autres maladies, comme les rouilles, les moisissures, les flétrissements et même ceux qui provoquent une croissance excessive de certains organes végétaux, peuvent causer un rabougrissement de la plante dans son ensemble.
- **Hernie du chou** : Racines agrandies apparaissant comme des fuseaux.
- **Galles** : Parties agrandies d'organes végétaux (tiges, feuilles, fleurs, racines).

- **Balais de sorcière** : Ramification abondante et ascendante de brindilles.
- **Boucles des feuilles** : déformation, épaissement et gondolage de feuilles.

A ces symptômes, quatre groupes de symptômes peuvent être ajoutés (Agrios, 2005):

- **Flétrissement** : Perte généralisée de turgescence et affaissement des feuilles ou des pousses.
- **Rouille** : Nombreuses petites lésions sur les feuilles ou les tiges, généralement d'une couleur de rouille.
- **Charbon** : Graines ou galle remplie de mycélium ou de spores noires des champignons du charbon.
- **Mildiou** : Zones sur les feuilles, les tiges, les fleurs et les fruits, recouvertes de mycélium blanchâtre et des fructifications du champignon.

III. La lutte contre les champignons phytopathogènes

Le contrôle des maladies des plantes a pour objectif principal la réduction des dommages causés par les agents pathogènes. Un contrôle parfait est généralement rare, en revanche, un contrôle rentable est possible lorsque le rendement final de la production couvre plus que le coût des produits de lutte et de la main-d'œuvre (Horst, 2013). La variabilité et la complexité des nombreuses maladies cryptogamiques ont conduit au développement d'un nombre aussi important d'approches pour leur contrôle. Pour une lutte efficace contre une maladie cryptogamique donnée, il est nécessaire de prendre en considération les caractéristiques particulières du cycle de vie du champignon responsable de la maladie, ainsi que son habitat préféré et son comportement dans certaines conditions environnementales (Agrios, 2005). Certaines maladies peuvent être contrôlées par un seul type de lutte, cependant, une combinaison de mesures de lutte est généralement nécessaire pour un contrôle efficace du pathogène. Une approche de lutte intégrée est indispensable pour la plupart des maladies fongiques des plantes (Agrios, 2005).

Plusieurs méthodes de lutte contre les maladies cryptogamiques sont connues et toutes ces dernières répondent aux cinq principes fondamentaux de la lutte contre les pathogènes des plantes ; l'exclusion, l'éradication, la protection, la résistance et la thérapie (Horst, 2013):

- **L'exclusion** signifie l'empêchement de l'entrée et de l'installation d'un agent pathogène dans des champs, des jardins, des états ou des pays non touchés. Pour les

agriculteurs amateurs, cela signifie d'utiliser des semences ou des plantes certifiées, trier les bulbes, les tubercules ou les graines avant la plantation, jeter ceux qui sont douteux et éventuellement les traiter avant leur plantation et surtout exclure les spécimens manifestant les symptômes d'une maladie. Pour les états et les pays, l'exclusion signifie les quarantaines, l'interdiction par la loi et parfois, l'entrée restreinte du matériel végétal autorisé, dans ce cas-là, les plantes doivent être cultivées de manière isolée et inspectées pendant un ou deux ans avant l'autorisation de leur distribution (Horst, 2013).

- **L'éradication** c'est l'élimination totale d'un agent pathogène une fois installé sur une plante ou dans un champ. Cela peut être accompli par l'élimination des spécimens ou des parties malades comme lors de la lutte contre les maladies virales où les branches d'arbres chancreuses doivent être éliminées ou lors de la lutte contre la fusariose du palmier dattier (Elbayoud) où les arbres malades doivent être brûlés et le sol doit être traité par un fongicide efficace contre les champignons vasculaires (Horst, 2013).
- **La protection** : c'est l'interposition d'une barrière protectrice entre la partie sensible de la plante hôte et l'agent pathogène. Dans la plupart des cas, il s'agit d'un spray protecteur ou d'une poudre appliquée sur la plante (badigeonnage) avant l'arrivée éventuelle du champignon (traitement en préventif) (Horst, 2013).
- **La résistance** : c'est l'utilisation des variétés résistantes pour lutter contre une maladie (lutte génétique) (Horst, 2013).
- **La thérapie ou la guérison** : c'est le contrôle par traitement de la plante malade (traitement en curatif) avec un produit capable de stopper ou inhiber la croissance du pathogène (Horst, 2013).

En effet, plusieurs méthodes de lutte contre les maladies des plantes en général et les maladies cryptogamiques en particulier sont connues dont les plus couramment utilisées sont :

III.1. Méthodes prophylactiques et pratiques culturales

L'objectif principal de cette méthode est d'éliminer ou de réduire l'inoculum primaire du pathogène et cela est assuré par plusieurs pratiques comme la destruction des parties des plantes ou des déchets abritant l'agent pathogène, la destruction des plantes spontanées ou d'hôtes alternatifs du pathogène, l'utilisation d'outils et des conteneurs propres; le drainage correct des champs, la gestion d'irrigation, l'aération des plantes, la rotation des cultures sensibles avec des cultures résistantes, l'utilisation des semences et de plants exempts de

maladies, la solarisation du sol et le remplacement du sol cultivé (30 à 60 cm de profondeur) par un sol non cultivé (Agrios, 2005; Al-Sadi, 2016).

III.2. Méthodes chimiques

Pour de nombreuses maladies cryptogamiques, cette méthode est la plus efficace et parfois la seule disponible pour leur contrôle (Agrios, 2005). Elle consiste à utiliser des fongicides de synthèse chimique pour lutter contre les champignons pathogènes des plantes. Par définition, un fongicide est une substance capable de détruire ou d'inhiber la croissance des champignons. Il peut agir comme agent d'éradication appliqué à une plante, à une partie de la plante ou à l'environnement en tant que traitement curatif dont le but principal est de détruire les champignons colonisant une zone ou une plante donnée ; comme il peut agir en préventif pour protéger la plante ou une partie de la plante d'une éventuelle infection d'origine fongique (Horst, 2013).

L'application des fongicides chimiques se fait par plusieurs manières, soit par pulvérisation des parties aériennes de la plante (traitement foliaire), ou par l'application des poudres fongicides (badigeonnage) sur les plaies d'effeuillages ou par traitement (enrobage) des graines et des semences pour les protéger contre les maladies transmises par les semences comme la maladie de la fonte des semis (Agrios, 2005). Il convient de souligner que certains agriculteurs mélangent des fongicides chimiques avec l'eau d'irrigation (goute à goutte ou irrigation par aspersion) pour minimiser les coûts et gagner le temps.

Auparavant, les fongicides chimiques inorganiques composés de cuivre et de soufre ont été utilisés comme fongicides de protection (en préventif) (Horst, 2013), ce sont les premiers produits chimiques développés pour lutter contre les maladies cryptogamiques. Ces fongicides restent à la surface foliaire de la plante (fongicides non systémiques). Une bonne couverture végétale est essentielle pour ce type de produits. Certains fongicides qui sont produits après ces composés inorganiques, tels que les dithiocarbamates sont connus pour leur mode d'action multisites (Finch et al., 2014), ils peuvent agir sur les processus respiratoires et la production d'énergie cellulaire chez le pathogène (Blancard et al., 2009).

Les fongicides à base de soufre et de chaux sont utilisés comme agents d'éradication (en curatif). Par contre ceux dont le chlorure de mercure est le constituant de base sont appliqués comme désinfectants. Cependant les fongicides composés de formol et de bisulfure de carbone sont utilisés comme agents de fumigation (Horst, 2013).

Les fongicides systémiques ont été développés depuis les années 1960 et sont aujourd'hui les fongicides les plus utilisés. Contrairement aux fongicides non systémiques ils peuvent se déplacer généralement dans les vaisseaux du xylème de la plante (avec la sève) jusqu'au site d'infection. En général ils n'affectent qu'une seule voie biochimique au sein de l'agent pathogène et sont donc appelés « spécifiques » au site (contrairement aux fongicides multisites). Plusieurs fongicides systémiques peuvent être appliqués en période de latence du pathogène, c'est-à-dire juste après l'infection initiale de la plante et avant l'apparition des symptômes (Finch et al., 2014).

III.3. La lutte biologique

Les méthodes traditionnelles et conventionnelles de la lutte contre les maladies et les ravageurs des plantes consistent à utiliser des produits chimiques ; pesticides, insecticides, fongicides, herbicides et d'autres formulations chimiques. Ces substances contrôlent en grande partie les agents pathogènes des plantes, mais leurs effets indésirables sont également observés et ressentis dans la chaîne alimentaire. Les nombreux effets nocifs pour la santé humaine qui ont été associés aux pesticides chimiques comprennent, entre autres effets, des effets dermatologiques, gastro-intestinaux, neurologiques, cancérigènes, respiratoires, reproductifs et endocriniens. De plus, une exposition professionnelle, accidentelle ou intentionnelle élevée aux pesticides peut entraîner la mort. Les intrants chimiques ont contribué de manière significative à la pollution de l'environnement sans oublier le problème de la bioaccumulation (Walia et al., 2021). En plus des effets néfastes des produits phytosanitaires de synthèse chimique sur l'environnement et la santé humaine, un autre problème qui commence à semer l'inquiétude chez les agriculteurs et les biologistes est le phénomène de l'apparition des souches résistantes chez les pathogènes (Walia et al., 2021). Toutes ces limites de la méthode chimique de lutte obligent les agronomes de concentrer leurs efforts sur le développement d'intrants alternatifs à ces produits chimiques (Walia et al., 2021).

La lutte biologique est l'une des méthodes de lutte alternative qui visent à trouver un agent de lutte d'origine naturelle, respectueux de l'environnement, non offensif et efficace contre les maladies des plantes. Par définition, la lutte biologique est l'utilisation des parasitoïdes, prédateurs, pathogènes, antagonistes ou concurrents pour supprimer une population de ravageurs et la rendant moins abondante et donc moins dommageable. Les insectes, les acariens, les mauvaises herbes, et les vertébrés et les agents pathogènes des plantes peuvent

tous être des cibles de la lutte biologique (Van Driesche et Bellows, 1996). D'après Pal et Gardener, (2006), le terme « lutte biologique » et son synonyme « bio-contrôle » signifient en phytopathologie, l'utilisation d'antagonistes microbiens pour lutter contre les maladies des plantes. Un organisme qui inhibe ou stoppe la croissance d'un parasite ou d'un pathogène est appelé agent de lutte biologique. Plus largement, le terme « lutte biologique » est également appliqué à l'utilisation des produits naturels extraits ou fermentés de différentes sources naturelles. Selon, Narayanasamy, (2013), les agents de lutte biologique peuvent être divisés en deux grands groupes : (i) agents biotiques et (ii) agents abiotiques.

- i. **Les agents biotiques** comprennent des champignons microscopiques, des bactéries, des virus (ou phages) et même des insectes qui ont un effet inhibiteur sur les agents pathogènes ou les ravageurs à travers plusieurs mécanismes d'action (Narayanasamy, 2013).
- ii. **Les agents abiotiques de lutte biologique** sont dérivés de diverses sources de matières d'origine organique (les extraits de plantes, les métabolites secondaires et les huiles essentielles) et inorganique comme les sels de phosphate et de silicium (Narayanasamy, 2013).

Un cas particulier d'agents de lutte biologique est « les biofongicides ». En effet, un biofongicide est un agent de lutte biologique dont sa cible principale est un ou plusieurs champignons phytopathogènes. Ce sont des champignons (levures et moisissures), des virus (ou phages), des bactéries et actinomycètes antagonistes et/ou leurs dérivés. Les formulations de biofongicides peuvent être des mélanges très simples d'antagonistes ou des complexes spécifiques des mélanges ayant des effets multiples sur l'agent pathogène cible (Rettinassababady et Jeyalakshmi, 2014).

Les biofongicides d'origine microbienne semblent être une alternative aux fongicides de synthèse. La diversité riche, la complexité des interactions et les nombreuses voies métaboliques font des microorganismes une très bonne ressource pour l'activité biologique. Au cours des dernières années plusieurs agents de lutte biologique ont été développés en tant que biofongicides commerciaux pour lutter contre des maladies cryptogamiques transmises par les semences, le sol et l'air ainsi que les maladies poste-récolte, en particulier dans les cultures stockées à température contrôlée (Rettinassababady et Jeyalakshmi, 2014).

En général, la majorité des biofongicides sont à base de différentes souches de *Trichoderma* telles que *T. harzianum*, *T. virens* et *T. viride*. En plus de ça, plusieurs espèces de PGPRs

appartenant aux genres *Bacillus* et *Pseudomonas* sont commercialisées en tant que biofongicides. Ce type de biofongicides est capable de favoriser la croissance des plantes directement ou indirectement en inhibant les phytopathogènes (Rettinassababady et Jeyalakshmi, 2014).

III.3.1. Mécanismes d'action des biofongicides

Contrairement aux fongicides de synthèse chimique, les biopesticides y compris les biofongicides sont connus par leurs modes d'action uniques et complexes, leurs volumes d'application relativement faibles et leurs cibles spécifiques. Généralement, il est difficile à un pathogène de développer une résistance contre un agent de lutte avec un mode d'action complexe (Nollet & Rathore, 2015).

Pour inhiber leurs cibles ou stopper leur croissance, les biopesticides en général et les biofongicides en particulier peuvent agir via différents modes d'action (Nollet et Rathore, 2015). Les modes d'action les plus importants et par lesquels les biofongicides interviennent sont les suivant :

a. Pénétration des hyphes du pathogène

La pénétration des hyphes du pathogènes est facilitée par les enzymes dégradant leurs paroi cellulaires, telles que la protéase, la chitinase, la β -glucanase, les endoprotéases, les aminopeptidases, les N-acétylglucosaminidases et également par la pression mécanique (Nollet et Rathore, 2015).

b. Compétition de l'espace et des nutriments

Pour conquérir les agents pathogènes et assurer une bonne compétition de l'espace avec eux, les biopesticides en général doivent s'adapter et se développer rapidement dans des conditions hostiles (Nollet et Rathore, 2015).

Une faible concentration d'un nutriment dans le milieu peut conduire à l'inhibition du pathogène. D'un point de vue microbien, les sols et les surfaces végétales sont souvent des environnements limités en nutriments. Pour réussir la colonisation de la phytosphère, un microorganisme doit trouver un moyen efficace pour chasser les nutriments disponibles (Pal et Gardener, 2006).

En effet, les antagonistes microbiens peuvent inhiber les champignons pathogènes par compétition de nutriments. L'absorption rapide des nutriments par les agents de lutte

biologique empêche la germination des spores et perturbe la croissance des agents pathogènes. A titre d'exemple, dans un milieu contenant des acides aminés, la croissance du *B. cinerea* peut être inhibée en présence des *Pseudomonas spp* qui utilisent ces acides aminés plus vite que le pathogène (Elad et Stewart, 2007; Nollet et Rathore, 2015).

De même, la compétition pour le fer en produisant des sidérophores est un mécanisme important pour les agents de lutte biologique (Rettinassababady et Jeyalakshmi, 2014). Le fer est très limité dans la rhizosphère. Dans les sols fortement oxydés et aérés, le fer est présent sous forme ferrique insoluble dans l'eau et souvent la concentration ne dépasse pas 10^{-18} M. Cette concentration est insuffisante pour favoriser la croissance des microorganismes qui ont généralement besoin de concentrations approchant 10^{-6} M. Pour survivre dans un tel milieu, les microorganismes produisent des sidérophores qui sont des molécules de faible poids moléculaire capable de fixer et transporter le fer disponible dans le milieu (Pal et Gardener, 2006).

c. L'antibiose

L'antibiose est un type d'antagonisme connu par la production des métabolites spécifiques ou non spécifiques d'origine microbienne, des agents lytiques, des composés volatils ou d'autres substances toxiques ayant un effet direct sur autres organismes. Les antibiotiques sont généralement des composés organiques de faible poids moléculaire produits par des microorganismes et à faibles concentrations, ils sont délétères pour d'autres micro-organismes (Rettinassababady et Jeyalakshmi, 2014).

Pour un agent de lutte biologique comme les biofongicide d'origine microbienne, l'antibiose est l'un des modes d'action les plus importants. Certaines antagonistes inhibent la croissance des agents pathogènes par la production d'antibiotiques (Sharma et al., 2009). En fait, Il a été démontré que plusieurs biofongicides peuvent produire des antibiotiques capables d'inhiber la germination des spores, la croissance mycélienne et la sporulation des champignons phytopathogènes (Nollet et Rathore, 2015).

Par exemple, *Bacillus subtilis* est capable de produire un antibiotique appelé « iturine » connu pour son pouvoir inhibiteur envers un large spectre d'agents pathogènes pour les plantes (Sharma et al., 2009). En plus ; d'autres *Bacillus* telles que *B.licheniformis*, *B.cereus*, *B. subtilis*, *B.mycoides* et *B.amyloliquefaciens*, produisent dans leur environnement naturel des lipopeptides à pouvoir antifongique tels que la fengycine, la surfactine et la bacillomycine, ces

métabolites peuvent creuser les membranes cellulaires des champignons en formant des pores (orifices), ce qui entraîne la mort des cellules pathogènes (Nollet et Rathore, 2015).

La phénazine, la pyolutéorine, la tropolone, la pyocyanine, le 2,4-diacétyl phloroglucinal et la pyrrolnitrine sont des métabolites produits par certaines souches de *Pseudomonas fluorescens*. Ils ont un large spectre d'activité contre plusieurs champignons pathogènes des plantes (Rettinassababady et Jeyalakshmi, 2014).

d. Parasitisme, mycoparasitisme et production d'enzymes

Dans le phénomène de parasitisme plusieurs événements peuvent avoir lieu et qui conduisent à la prédation de la cible, à savoir, la pénétration, la formation de barrière et la lyse du pathogène. On parle du phénomène de mycoparasitisme lorsqu'un champignon parasite un autre champignon. Le champignon parasite est appelé « hyperparasite » et le champignon parasité est appelé « hypoparasite » (Rettinassababady et Jeyalakshmi, 2014).

Trichoderma virens peut fonctionner comme un mycoparasite des champignons phytopathogènes. Il peut parasiter les hyphes et même pénétrer et détruire les formes de résistance de quelques champignons telles que les sclérotés (Narayanasamy, 2013).

Le parasitisme est un mode d'action qui repose également sur la production des enzymes pour dégrader la paroi du pathogène. Ces enzymes doivent être capables de dégrader les polymères de glucose qui sont les constituants de base de la paroi des champignons. En fait, l'inhibition de la croissance et de la sporulation des champignons pathogènes par les biofongicides peut être due en grande partie à l'activité des enzymes lytiques, notamment les β -1,3-glucanases et les enzymes chitinolytiques .

La production d'enzymes par les biofongicides n'a pas toujours un effet direct sur la croissance des champignons phytopathogènes. En effet, certains produits issus de la dégradation enzymatique peuvent avoir un effet antagoniste contre le pathogène. Par exemple, après la dégradation de la paroi fongique par les enzymes produites par des biofongicides, les oligosaccharides dérivés sont connus pour leur puissant pouvoir inducteur de la défense de la plante. Le chitosane est un polymère non toxique et biodégradable de bêta-1,4-glucosamine issu de la dégradation de la chitine. Lorsque il est appliqué en poste-récolte il stimule l'inhibition des pathogènes (Pal et Gardener, 2006).

e. Induction de la résistance systémique de la plante

Certains biofongicides protègent les plantes contre les champignons phytopathogènes d'une manière indirecte par le moyen de l'induction de la résistance systémique (le contraire de la résistance locale) de la plante cible. Plusieurs composés sont impliqués dans ce type de mécanismes ; composés structuraux, protéines de défense (éliciteurs) et les composés issus du métabolisme secondaire (Benhamou et Picard, 1999).

L'induction de la résistance de la plante conduit au renforcement physique de la paroi végétale par lignification et dépôt de callose, l'accumulation de métabolites secondaires antimicrobiens de faible poids moléculaire tels que les phytoalexines ainsi que des protéines de défense comme les protéines PR (pour pathogenesis-related). En plus, l'acide salicylique, les sidérophores et les lipopolysaccharides (LPS) produits par les PGPRs, ainsi que les peptides et les protéines secrétés par les différentes espèces de *Trichoderma* agissent comme éliciteurs de défense des plantes cultivées (Benhamou et Picard, 1999; Rettinassababady et Jeyalakshmi, 2014).

f. Interférence avec le processus de pathogénicité

Certains agents de lutte biologiques peuvent s'interférer avec le processus de l'infection des champignons phytopathogènes en intervenant lors de la première phase de l'infection. Cette phase est cruciale pour le pathogène car lors de laquelle il synthétise des enzymes hydrolytiques telles que les cutinases, les pectinases et les cellulases nécessaires pour franchir les premières barrières physiques de la plante. Les agents de biocontrôle peuvent à leur tour produire des enzymes capables de dégrader les enzymes hydrolytiques synthétisées par le pathogène ce qui avorte le processus de l'infection et par conséquent protège la plante contre l'attaque (Agrios, 2005; Bardin et Pugliese, 2020).

T. harzianum souche T39 peut produire des protéases capables de dégrader les polygalacturonases, les pectine méthyle estérases, les pectate lyases, les chitinases, les β -1,3-glucanases et les cutinases synthétisées par *B. cinerea* (Paul et al., 1997 ; Elad et Stewart, 2007).

Autres agents de lutte biologiques sont capables de modifier les caractéristiques de la surface de la plante soit par la production des tensioactifs tels que les surfactines ou par le changement du pH du milieu ce qui rend difficile l'attachement de l'agent pathogène à la surface de la plante cible (Elad et Stewart, 2007; Bardin et Pugliese, 2020).

g. combinaison de plusieurs modes d'action

Les biofongicides peuvent protéger les plantes contre les champignons pathogènes par plusieurs mode d'action. Le cas le plus connu est celui de *T. harzianum* souche T39. Ce biofongicide peut agir par la combinaison d'au moins trois modes d'action ; l'interférence avec l'activité pectinase du pathogène, la compétition des nutriments et l'induction de la résistance systémique de la plante cible (Elad et Stewart, 2007).

III.3.2. Critères d'un biofongicide idéal

Pour avoir une meilleure efficacité sur terrain, chaque agent de lutte biologique doit répondre aux critères suivants : il doit être : génétiquement stable, efficace même à faibles concentrations, non exigeant pour les nutriments, tolère les conditions environnementales défavorables (la dessiccation, la chaleur, les agents oxydants et les rayons UV), avoir un large spectre d'activité contre les pathogènes et peu importe la plante hôte, non-producteur de métabolites nocifs pour l'homme et l'environnement, non pathogène pour la plante hôte, facile à stocker et à distribuer, compatible avec d'autres traitements chimiques et physiques (lutte intégrée), très compétent dans la rhizosphère, de bonne capacité saprophyte compétitive (CSA), stimulateur de la croissance des plantes, compatible avec le processus de multiplication en masse et compatible avec les biofertilisants et les rhizobactéries (Wilson et Wisniewski, 1989 ; Nakkeeran et al., 2005; Sharma et al., 2009; Rettinassababady et Jeyalakshmi, 2014).

Il convient de rappeler que c'est le facteur économique qui décide si un nouvel agent de lutte biologique peut être commercialisé ou non même s'il possède tous ces critères. En effet s'il n'y a pas de marché potentiel pour le produit, il ne peut pas être commercialisé (Sharma et al., 2009).

III.3.3. Commercialisation des biofongicides d'origine microbienne

Les dernières années ont connu une augmentation importante des ventes d'agents de lutte biologique à travers le monde entier et cela est dû au processus d'homologation et d'enregistrement des agents de biocontrôle adopté par les organismes spécialisés qui est relativement moins sévère comparé à celui des pesticides chimiques. Aux états unis et aux années 1990, le processus d'homologation et d'enregistrement d'un nouveau biopesticide prenait 12 mois contre 36 mois pour toutes les autres nouvelles homologations de pesticides

chimiques avec un coût huit fois inférieur à celui d'un produit chimique (Rettinassababady et Jeyalakshmi, 2014).

En fait, une nouvelle étude a identifié 91 agents de lutte biologique d'origine microbienne dont 49 champignons, 37 bactéries ou actinomycètes et 5 virus ou phages. Ces derniers sont enregistrés et commercialisés dans plusieurs pays pour lutter contre différents pathogènes de plantes (Bardin et Pugliese, 2020). Le tableau 1 résume quelques biofongicides d'origine microbienne commercialisés à travers le monde entier.

Tableau 1 : Liste de quelques biofongicides d'origine microbienne disponibles dans le marché international (Elad et Stewart, 2007; Sharma et al., 2009; Romanazzi et Feliziani, 2014 ; Nicot et al., 2016 ; Lahlali et al., 2022 ; Shahriar et al., 2022)

Nom commercial	Souche (s) microbienne (s)	Compagnie- Pays
Binab	<i>Trichoderma harzianum</i> et <i>T. polysporum</i>	Binab Bio-Innovation AB, Suède
Mycostop	<i>Streptomyces griseoviridis</i> (K61)	Kemira Gro Oy, Finlande
Plantshield	<i>Trichoderma harzianum</i> (T22)	Bioworks Inc., USA
Serenade	<i>Bacillus subtilis</i> QST713 (désormais réaffectée à <i>Bacillus amyloliquefaciens</i>)	Agra Quest, USA
Trichodex	<i>T. harzianum</i> (T39)	Makhteshim Chemical Works,ltd
BotryZen	<i>Ulocladium oudemansii</i>	Botry-Zen Ltd, Nouvelle Zeelande
Aspire	<i>Candida oleophila</i> (I-182)	Ecogen, USA
Bio-save	<i>Pseudomonas syringae</i>	Eco Science Corp, USA
YieldPlus	<i>Cryptococcus albidus</i>	Lallemand, Canada
Amylo-X,	<i>Bacillus amyloliquefaciens</i>	Biogard CBC Grassobbio, Italie

Candifruit,	<i>Candida sake</i>	IRTA, Lleida, Espagne
Pantovital	<i>Pantoea agglomerans</i>	Domca, Espagne
Boni Protector	<i>Aurobasidium pullulans</i>	Bio-Ferm, Autriche. Botector, Manica, , Italie
Nexy	<i>Candida oleophila</i>	BioNext, France
Shemer	<i>Metschnikowia fructicola</i>	Bayer, Allemagne
AQ-10	<i>Ampelomyces quisqualis</i>	Ecogen, Inc., USA
Blight Ban A 506	<i>Pseudomonas fluorescense</i>	Nu Farm, Inc., USA
Contans WG,	<i>Coniothyrium minitans</i>	Prohyta Biologischer, Allemagne
Rhio-plus	<i>Bacillus subtilis</i> FZB 24	KFZB Biotechnick, Allemagne
Actinovate® AG	<i>Streptomyces lydicus</i>	Novozymes BioAg, Canada
Binab TF	<i>T. polysporum</i>	BINAB Bio-Innovation AB, USA
BioFungo™	<i>T. virens</i>	Orius Biotechnologia, Colombie
Esquive	<i>T. atroviride</i>	Agrauxine, France
Floragard	<i>T. hamatum</i>	Sellew Associates LLC, USA
Companion	<i>Bacillus subtilis</i> GB03	Growth products, USA
Subtilex	<i>Bacillus subtilis</i> MBI 600	Becker Underwood,USA
AtEze	<i>Pseudomonas chlororaphis</i>	EcoSoil Systems, USA
Spot Less	<i>Pseudomonas aureofaciens</i>	EcoSoil system,USA

IV. Exemple d'un champignon phytopathogène cible de la lutte biologique; *B. cinerea* agent causal de la pourriture grise

Botrytis cinerea Pers (anamorphe de *Botryotinia fuckeliana* (de Bary) Whetzel) est l'un des agents pathogènes les plus répandus dans les serres non chauffées. C'est l'agent causal de la

pourriture grise de la tomate et plus de 500 genres de plantes différentes (Aissat et al., 2008 ; Dean et al., 2012 ; Elad et al., 2016). C'est un champignon ascomycète nécrotrophe et polyphage (Mercier et al., 2019). Il fait partie des champignons Deutéromycètes (champignons imparfaits) dont sa forme sexuée ou téléomorphe est rarement détectée dans la nature (Prins et al., 2000; Staats et al., 2005). La forme asexuée appartient à la classe des Hyphomycètes, ordre des Moniliales, famille des Moniliaceae et genre *Botrytis*. Cependant, la forme sexuée appartient à la classe des Leotiomycètes, ordre des Helotiales, famille des Sclerotiniaceae et genre *Botryotinia* (El Oirdi, 2010; Romanazzi et Feliziani, 2014).

Ce pathogène attaque les plantes à différents stades de croissance et presque toutes les parties aériennes peuvent être affectées. Les symptômes les plus importants sont; les lésions et les chancres de la tige et les tâches concentriques sur les feuilles. Les fruits, que ce soit en pré ou en poste-récolte, peuvent être également affectés par ce champignon. Les symptômes les plus rencontrés sur les fruits de tomates sont les "tâches fantômes" et la pourriture molle (Koike et al., 2007 ; Aissat et al., 2008; Blancard et al., 2009 ; Panno et al., 2021).

B. cinerea se reproduit au moyen des spores sexuées (microconidies) ou asexuées (macroconidies et parfois des sclérotés). Cependant, il est connu par le nom de sa forme asexuée car les apothécies sont rarement observés (Webster et Weber, 2007). Les spores peuvent être transportées par le vent et leur libération est relativement facile dans les conditions humides. Les sclérotés sont également produits lorsque les conditions deviennent défavorables (Boehm et Leuschner, 1987 ; Ingold et Hudson, 1993).

Lors de la reproduction asexuée, les sclérotés aident *B. cinerea* à se conserver durant l'hiver (Webster et Weber, 2007). Au début du printemps, ces formes de survie trouvent les meilleures conditions pour germer, émettre les conidiophores, puis produire les spores asexuées ou macroconidies considérées comme source primaire de l'inoculum infectant le prochain hôte. Le vent et les insectes jouent le rôle des transporteurs des conidies avant la prochaine infection (Prins et al., 2000 ; Williamson et al., 2007 ; Romanazzi et Feliziani, 2014).

A la surface de l'hôte, et lorsque les conditions sont favorables, les conidies germent puis produisent un tube germinatif qui franchit les premières barrières physiques de défense de la plante hôte (l'épiderme). Pour le bon déroulement de cette étape d'infection et notamment pour la germination des spores et la pénétration, une humidité relative supérieure à 93% est nécessaire. Lors de la deuxième étape de l'infection, le champignon a besoin de son arsenal

d'enzymes hydrolytiques telles que les cutinases pour dépasser les autres barrières physiques et éliminer les cellules fondamentales de la plante (la lésion primaire). A la fin du cycle, une macération du tissu végétal est établie lors de la croissance du champignon. Sur les tissus macérés, le champignon sporule pour produire de l'inoculum pour la prochaine infection. Généralement, lorsque les conditions sont favorables, un cycle d'infection dure entre trois et quatre jours (Prins et al., 2000).

Concernant le cycle de reproduction sexuée, des spores sexuées (microconidies ou spermaties) se forment à partir des macroconidies ou du mycélium végétatif. Une étape de spermatisation des sclérotés est nécessaire pour la production des apothécies et des asques (Williamson et al., 2007 ; Romanazzi et Feliziani, 2014). Ces derniers contiennent huit ascospores binucléées et constituent les gamètes femelles qui fusionnent avec les microconidies (Webster et Weber, 2007 ; Melanie, 2014).

B. cinerea est connu pour sa grande variabilité génétique, cette caractéristique rend de ce pathogène l'un des champignons les plus difficiles à contrôler. Il a été démontré que *B. cinerea*, en raison de sa variabilité génétique, a pu développer une résistance à plusieurs fongicides chimiques couramment utilisés (Liu et al., 2021). En effet, pour contrôler cette maladie, responsable de pertes annuelles importantes à travers le monde entier, les agriculteurs ont souvent recours aux fongicides chimiques, considérés comme le moyen le plus efficace pour lutter contre ce pathogène (Panno et al., 2021). L'application courante des fongicides consiste à pulvériser les parties aériennes des plantes comme stratégie préventive avant l'apparition des symptômes (Liu et al., 2021).

Aujourd'hui, plusieurs agents de lutte biologique d'origine microbienne sont également commercialisés à travers le monde pour lutter contre *B. cinerea*. Ces biofongicides sont à base de microorganismes, y compris les bactéries (ex. *Bacillus*, *Pseudomonas*), actinomycètes (ex. *Streptomyces*), levures (ex. *Aureobasidium*, *Candida*) et des champignons (ex. *Trichoderma*, *Gliocladium*, *Chlonostachys*, *Ulocladium*) (Nicot et al., 2016).

Partie II

ETUDE EXPERIMENTALE

MATERIEL ET METHODES

I. Matériels et méthodes

I.1. Sites d'échantillonnage

Deux sites agricoles ont été choisis pour faire l'échantillonnage et effectuer les différents prélèvements. Le premier site d'échantillonnage ($36^{\circ}49'50.9''\text{N}$ $5^{\circ}57'31.2''\text{E}$) se situe au nord de la wilaya de Jijel (20 Km) (Figure 2) dans la région d'Elkenar Nouchfi. A 15 Km de Jijel (Nord) à la région d'Achouat (commune de l'Emir Abdelkader) se situe le deuxième site d'échantillonnage ($36^{\circ}47'38.8''\text{N}$ $5^{\circ}52'07.1''\text{E}$) (Figure 2).

Le choix de ces deux sites était essentiellement motivé par le fait que les deux régions choisies regroupent la majeure partie des serres non chauffées à Jijel. Sachant que la plasticulture constitue la première source des revenus des agriculteurs de ces deux régions.



Figure 2 : Les deux sites d'échantillonnage

I.2. Echantillonnage et prélèvement

Comme première étape et en vue d'isoler des agents de lutte biologiques d'origine microbienne contre *B. cinerea*, des tunnels de tomate hautement attaqués par *B. cinerea* ont été ciblés. A l'intérieur des tunnels, des échantillons du sol (500 g par serre pour chaque modalité) ont été prélevés :

1. à partir de la rhizosphère des plantes de tomates saines « sol rhizosphérique » (Figure 3).

2. à distance du système racinaire des plantes « sol non rhizosphérique ». Les couches superficielles du sol (entre 5 et 10 cm) ont été écartées, puis à l'aide des instruments stériles nous avons prélevés des quantités suffisantes du sol.

Les échantillons collectés ont été placés dans des sachets stériles en plastique à fermeture métallique avant d'être acheminés au laboratoire (Figure 3).

I.3. Isolement des antagonistes bactériens

Au laboratoire nous avons procédé au séchage des échantillons du sol (rhizosphérique et non rhizosphérique) à température ambiante pendant 3 jours puis à l'élimination des débris végétaux et au tamisage. Une aliquote d'un gramme de sol séché a été mise en suspension dans 10 mL d'une solution saline stérile à 0,85 % (eau physiologique stérile), cette suspension constitue la solution mère.

Après quelques minutes d'agitation (à l'aide d'un vortex), plusieurs dilutions décimales (jusqu'à 10^{-6}) ont été préparées dans l'eau physiologique stérile à partir de la solution mère. Deux aliquotes (0,1 mL) par chaque dilution ont été étalées à la surface d'une gélose nutritive ordinaire (GN) (Biokar diagnostics France, 20 g L⁻¹) additionnée de l'amphotéricine B (1%) et les boîtes de Pétri ont ensuite été incubées à 28°C (Akter et al., 2015).

Après plusieurs jours d'incubation, les colonies morphologiquement différentes ont été purifiées puis conservées à -20°C dans un tampon phosphate glycérolé à 20% (conservation à long terme).



Figure 3 : Echantillons du sol rhizosphérique

I.4. Souches de *Botrytis cinerea*, préparation de l'inoculum et conditions de culture

Trois souches de *B. cinerea* ont été utilisées dans cette première partie ;

1) : Les souches ALG66 (Béjaia, Algérie) et BC1 (Plougastel, France) nous ont été fournies par le laboratoire de Mycologie (INRAE, Avignon, France).

2) : La souche BCJ2 (Figure 4) a été isolée en 2018 à partir d'une plante de tomate (chicot de pétiole) cultivée dans une serre non chauffée à Jijel et présentant les symptômes de la pourriture grise (Figure 4, A).

Des parties des pétioles attaqués et contenant des spores de *B. cinerea* ont été récupérées puis acheminées au laboratoire pour faire l'isolement. A l'aide d'un écouvillon stérile trempé dans l'eau physiologique stérile, les spores du pathogène ont été récupérées puis ensemencées à la surface du milieu PDA (Difco Laboratory Detroit, 39 g L⁻¹).

Deux autres méthodes ont été utilisées pour isoler l'agent pathogène ;

- a) Des morceaux de gélose PDA de 1 cm² sont coupés puis mis en contact direct avec les spores trouvant à la surface du pétiole attaqué. Après la mise en contact, les morceaux de gélose sont ensuite déposés à la surface d'une autre gélose PDA (face contenant les spores placée en contact avec la surface de la gélose).
- b) Les chicots de pétioles attaqués sont coupés en petits morceaux puis lavés et désinfectés plusieurs minutes dans une solution de l'eau de Javel à 2,5%. Après avoir séché les morceaux sous une hotte à flux laminaire, une autre désinfection a été réalisée en les trempant dans l'éthanol à 70% pendant 2 minutes. Les morceaux sont ensuite déposés à la surface du milieu de culture PDA coulé dans des boîtes de Pétri stériles.

Les boîtes sont ensuite incubées plusieurs jours à 22°C jusqu'à la formation des mycéliums autour des morceaux végétaux et gélosés. Les mycéliums sont repiqués dans d'autres boîtes de Pétri contenant la gélose PDA. Une autre incubation de 10 à 14 jours (jusqu'à l'apparition des spores) a été effectuée. Des suspensions de spores sont ensuite préparées, agitées puis diluées pour ensemencer la surface de la gélose blanche (15 g d'agar par litre de l'eau distillée, pH=7). Après au moins 18h d'incubation, les spores germées et isolées sont repérées à l'aide d'un microscope optique puis repiquées sur d'autres boîtes de Pétri contenant la gélose PDA (technique monospore).

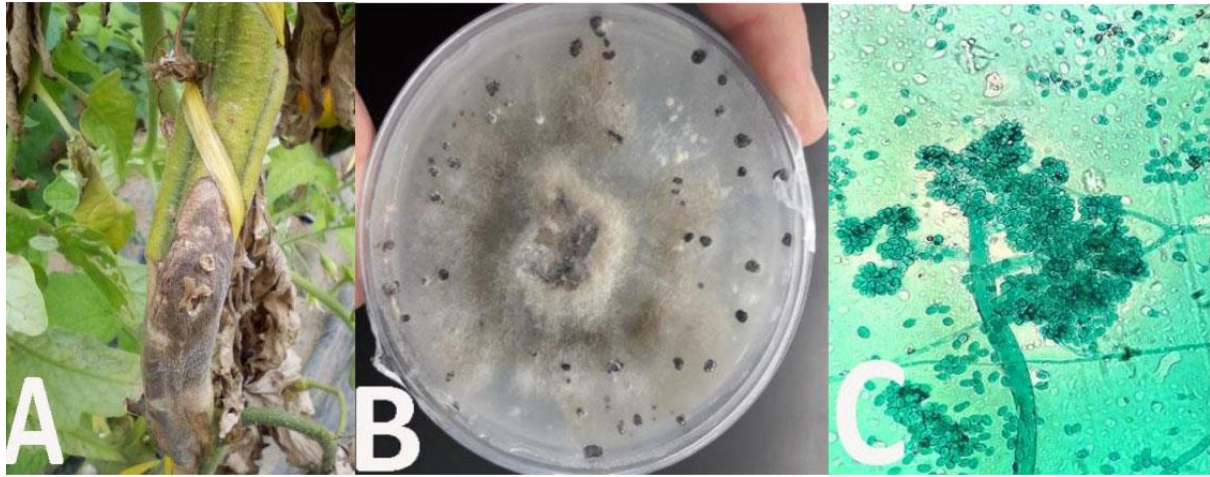


Figure 4 : Pétiole attaqué par *B. cinerea* (A), la souche BCJ2 de *B. cinerea* après l'isolement sur gélose PDA (B), *B. cinerea* souche BCJ2 sous microscope optique (X100) après coloration au bleu de lactophénol (C)

La pathogénicité de la souche isolée a été vérifiée sur fruits et plantes de tomates en suivant les étapes de postulat de Koch (Wang et al., 2011 ; Valenzuela et al., 2015).

Afin de conserver les souches fongiques, des suspensions de spores de chaque souche sont préparées et conservées à -20°C dans un tampon phosphate glycérolé à 20% (Bouaoud et al., 2018).

I.5. Identification moléculaire de la souche BCJ2 de *B. cinerea*

I.5. 1. Préparation de l'échantillon

A partir des cultures jeunes du champignon (4 jours) sur gélose PDA, une quantité suffisante du mycélium (20 mg) est grattée puis déposée dans un tube Eppendorf stérile contenant une bille métallique. Le tube est ensuite plongé dans l'azote liquide pendant quelques minutes jusqu'à l'obtention d'un substrat solide. Un broyage est réalisé dans un broyeur type « TissueLyser » à 30 Hz pendant 4 minutes. L'objectif de cette étape est de casser les parois cellulaires du mycélium et qui peuvent gêner l'étape d'extraction de l'ADN. Le broyat obtenu est utilisé pour commencer l'étape d'extraction.

I.5. 2. Extraction de l'ADN

Le kit Qiagen (DNeasy Plant Mini Kit (250)) est utilisé pour extraire l'ADN du champignon. Pour commencer l'extraction, le broyat obtenu est suspendu dans $400\mu\text{L}$ du tampon AP1 et $4\mu\text{L}$ du RNase A (100 mg/mL). Le mélange est agité pendant quelques secondes puis incubé

60 minutes à 65°C dans un bain marie avec inversion des tubes 2 à 3 fois pendant l'incubation pour aider l'opération de la lyse des cellules.

Après la fin de l'incubation, l'étape de précipitation des détergents, des protéines et des polysaccharides est réalisée en ajoutant 130 µL du tampon AP3. Le mélange est doucement agité pour avoir à la fin une suspension visqueuse. Cette dernière est mise dans la glace pendant 5 minutes puis centrifugée à 13000 rpm pendant 5 minutes. Cette étape a pour but d'éviter le colmatage des colonnes d'extraction. Après la centrifugation, le surnageant est récupéré (≈450 µL) puis déposé dans la colonne violette fournie avec le kit. La colonne est ensuite placée sur un microtube collecteur de 2 mL. Une autre centrifugation est effectuée pendant 2 minutes à 13000 rpm et le filtrat (400 µL sans culot) est récupéré puis déposé dans un autre tube de 2 mL contenant 600 µL du tampon AW1. Le mélange obtenu est bien mélangé à l'aide de l'embout de la pipette.

En utilisant la même pipette, 600 µL du mélange sont prélevés puis déposés dans un nouveau tube blanc (fourni avec le kit). Le tube est centrifugé pendant 1 minute à 8000 rpm. Après la centrifugation, le filtrat est éliminé et le retentât (≈350 µL) est centrifugé une autre fois à 8000 rpm pendant 1 minute. Le filtrat est encore éliminé une autre fois avec les tubes collecteurs et la colonne est placée sur un nouveau tube collecteur de 2 mL (fourni avec le kit). Ensuite, 500 µL du tampon AW2 sont ajoutés à la colonne et le tube est centrifugé une autre fois à 8000 rpm pendant 1 minute (dans le but de sécher les colonnes et d'éliminer les résidus des tampons utilisés).

Dans la même colonne, 500 µL du tampon AW sont additionnés et l'ensemble est centrifugé à 14000 rpm pendant 3 minutes. Le filtrat est éliminé avec les tubes collecteurs et les colonnes sont placées sur des nouveaux tubes collecteurs de 2 mL. 50 µL du tampon AE sont ensuite ajoutés aux colonnes ; ces dernières sont incubées pendant 5 minutes à température ambiante puis centrifugées à 8000 rpm pendant 1 minute. Les deux dernières étapes ont été répétées deux fois en utilisant les mêmes tubes collecteurs. Après la deuxième centrifugation, 150 µL du filtrat contenant l'ADN sont transférés dans un autre tube stérile de 1,5 mL, ce dernier est conservé à -20°C jusqu'au dosage de l'ADN à l'aide d'un NanoDrop™.

I.5. 3. Amplification par PCR

La région ITS (Internal Transcribed Spacer = espaceur interne transcrit) de l'ADN du champignon est ciblée pour faire l'amplification. Deux amorces universelles sont utilisées

pour amplifier cette région de l'ADN ribosomique, il s'agit de l'ITS1 (Forward) (5'-TCCGTAGGTGAACCTGCGG-3') et l'ITS4 (Reverse) (5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3') (White et al., 1990).

20 μ L du Mix PCR (Tableau 2) sont mélangés avec 5 μ L de l'ADN génomique du champignon. L'ensemble est placé dans un thermocycleur (modèle Eppendorf) et le programme d'amplification est lancé. Le programme d'amplification commence par l'étape de dénaturation initiale de l'ADN (1 cycle à 94°C pendant 2 minutes) puis la dénaturation finale (30 cycles de 30 secondes à 94°C). L'hybridation est la deuxième étape, elle est réalisée à 55°C (30 cycles de 30 secondes). L'extension initiale se fait à 72°C (1 cycle de 2 minutes) et l'extension finale à 72°C avec un cycle de 5 minutes. La dernière étape est réalisée à 10°C avec un seul cycle.

I.5. 4. Electrophorèse

Les amplicons issus de la réaction de PCR sont déposés sur un gel d'agarose à 1,5%. Ce dernier est préparé en dissolvant 1,5 g de l'agarose dans 100 mL du tampon Tris acétate EDTA (TAE). L'ensemble est chauffé dans un four microonde et le BET (Bromure d'Ethydium) est ajouté au mélange après refroidissement. En surfusion, l'agarose est versée dans un support (cuve) muni de peignes qui sont enlevés après la solidification de l'agarose en laissant des puits qui seront utilisés pour déposer les amplicons.

Tableau 2 : La composition du Mix PCR pour le séquençage de la région ITS

Produit ou réactif	Volume (μ L)
H ₂ O	11,75
Tampon green (x5)	5
dNTP _s (5mM)	1
MgCl ₂ (25 mM)	1
Amorces	0,5 x 2
Go taq G2 polymérase (5 U/ μ L)	0,25
Volume total	20

La cuve (avec le support contenant l'agarose) est remplie du tampon TAE. Chaque puits est rempli avec un volume de 5 μ L d'amplifiât. Par contre le dernier puits est rempli d'une solution d'un marqueur de poids moléculaire (1 kb). Le générateur est réglé à 100 V pour une

migration de 30 minutes. Après la fin de migration, la révélation des bandes de migration se fait sous UV dans une chambre spéciale.

I.5. 5. Séquençage de l'ADN amplifié et traitement des séquences

Les amplicons donnant des bandes sur le gel sont envoyés au séquençage à la société GenoScreen (Lille – France). Après réception des séquences, ces dernières sont nettoyées en utilisant le logiciel Chromas (Version 2.1.1). Pour identifier le champignon, la séquence nettoyée est comparée avec celles de la base des données NCBI (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) en utilisant l'algorithme BLASTN.

Après l'identification et le dépôt de la séquence, le code GenBank « MW931520 » est attribué à la séquence déposée.

I.6. Evaluation de l'effet antagoniste *in vitro* des isolats contre *B. cinerea*

I.6.1. Test de confrontation directe

Un total de 142 isolats bactériens (69 isolats rhizosphériques et 73 isolats non rhizosphériques) a été utilisé dans cette partie. L'effet antagoniste *in vitro* de ces isolats est évalué contre le champignon *B. cinerea* souche BC1 en utilisant la méthode de confrontation directe décrite par Xu et Kim, (2014).

Dans une boîte de Pétri contenant le milieu PDA, un disque mycélien de *B. cinerea* (souche BC1) de 5 mm de diamètre issu d'une culture jeune est déposé à la surface du milieu au centre de la boîte de Pétri. Trois disques bactériens issus d'une culture jeune de l'antagoniste sont ensuite déposés à la surface du même milieu à une distance de 2,5 cm du disque central du pathogène (Figure 5). Une boîte témoin de gélose PDA ne contenant que le disque du pathogène (sans les antagonistes) est préparée en parallèle avec les autres boîtes. L'ensemble des boîtes est incubé à 22°C pendant 72 heures dans une chambre climatique (photopériode de 14 h et 90% d'humidité). Trois boîtes ont été utilisées pour chaque isolat, et l'ensemble de l'expérience a été répété trois fois indépendamment.

Après l'incubation, l'effet antagoniste des bactéries est évalué en calculant le pourcentage d'inhibition de la croissance mycélienne (PGI) par la méthode décrite par Whipps, (1987) :

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

Où : R_1 : Rayon de la colonie du pathogène en absence des antagonistes (témoin).

R_2 : Rayon de la colonie du pathogène en présence des antagonistes.

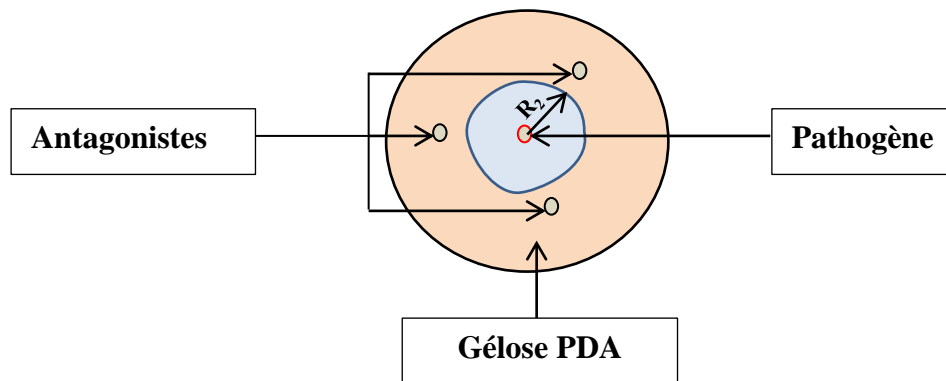


Figure 5 : Test de confrontation directe

Un sous-échantillon aléatoire de 40 des 142 isolats bactériens, dont 20 isolats rhizosphériques et 20 isolats non rhizosphériques a été sélectionné pour effectuer d'autres tests.

I.6.2. Test de confrontation indirecte (production des substances volatiles)

La production des substances volatiles capables d'inhiber la croissance mycélienne de *B. cinerea* (souche BC1) a été évaluée pour les 40 isolats bactériens sélectionnés. Le protocole décrit par Barakat et al, (2014) consiste à confronter l'antagoniste bactérien avec le champignon sans les mettre en contact direct.

Bref, un disque mycélien du champignon est déposé au centre d'une boîte de Pétri contenant la gélose PDA. La bactérie antagoniste est ensuite repiquée par stries sur une autre gélose nutritive ordinaire. Les couvercles des deux boîtes sont jetés et les fonds contenant les milieux de culture (PDA et GN) sont collés (en superposition ou en « Sandwich ») en utilisant le Parafilm (Figure 6). Le pathogène est placé au-dessus de l'antagoniste.

Une boîte témoin contenant le disque mycélien du pathogène déposé à la surface de la gélose PDA est placée en superposition avec le fond d'une boîte de gélose nutritive non ensemencée.

L'ensemble des boîtes est incubé à 22°C pendant 72h dans une chambre climatique (photopériode de 14 h et 90% d'humidité). Trois boîtes ont été utilisées pour chaque modalité (isolats et témoin), et l'ensemble de l'expérience est répété trois fois indépendamment.

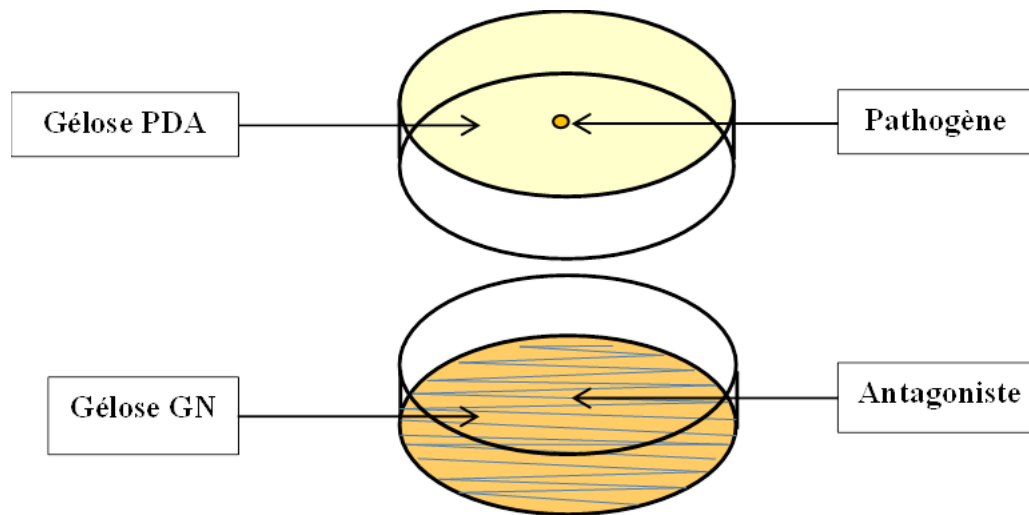


Figure 6 : Test de confrontation indirecte

Le pourcentage d'inhibition de la croissance mycélienne (PGI) du pathogène est calculé comme suit :

$$\text{PGI (\%)} = (C - T / C) \times 100$$

Où :

PGI (%) : Pourcentage d'inhibition de la croissance mycélienne,

C : diamètre moyen des colonies du champignon en l'absence de l'antagoniste (le témoin),

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

I.6.3. Evaluation de l'effet *in vitro* des isolats sur la germination des spores de *B. cinerea*

La capacité des 40 isolats bactériens à inhiber la germination des spores de *B. cinerea* souche BC1 été évaluée en suivant le protocole décrit par Sadfi-Zouaoui et al, (2008) avec quelques modifications.

100 μL d'une suspension bactérienne de l'antagoniste à 10^9 UFC mL^{-1} et 100 μL d'une autre suspension de spores de *B. cinerea* (souche BC1) à 10^6 spore/mL sont additionnés à 800 μL du bouillon PDB stérile (Potato Dextrose Broth, Difco Laboratory Detroit, 24 g L^{-1}) préalablement déposé dans un microtube stérile de 1,5 mL.

Des tubes témoins sont préparés en remplaçant la solution de l'antagoniste par 100 μL de l'eau distillée stérile. L'ensemble des tubes est incubé à 22°C pendant 72h dans une chambre climatique (photopériode de 14 h et 90% d'humidité) avec agitation orbitale de 180 rpm.

Trois tubes pour chaque modalité (antagoniste et témoin) sont préparés et l'ensemble de l'expérimentation est répété trois fois indépendamment.

Après l'incubation, une observation microscopique (X100) du milieu inoculé est réalisée et le pourcentage des spores germées (parmi un total de 100 spores) est calculé en utilisant une cellule de Malassez.

I.7. Propriétés physiologiques et caractérisation moléculaires des isolats bactériens sélectionnés

I.7.1. Croissance bactérienne à différentes températures

Chaque bactérie parmi les 40 sélectionnées est testée pour sa croissance *in vitro* à différentes températures (22, 25, 30 et 37°C). Ce test est réalisé sur gélose PCA (Plat Count Agar ; Biokar diagnostics, France, 20.5 g L⁻¹) (Bouaoud et al., 2018).

I.7.2. Mise en évidence de la production des enzymes hydrolytiques

La production des lipases, protéases, cellulases, pectinases et amylases par les 40 bactéries sélectionnées est évaluée. Pour cela, cinq différents milieux sont préparés ;

(1) : milieu à base de Tween 20 pour l'activité lipase (Composition de 1L : Tween 20 (1% (v/v)) ; peptone (10 g) ; NaCl (5 g) ; CaCl 2H₂O (0,1 g) ; Agar (18 g)) (Carrim et al., 2006).

(2) : milieu à base du lait écrémé pour l'activité protéase (Composition de 1L : Tryptone (0,5 g) ; extrait de levures (3 g) ; lait écrémé (25% (v/v)) et Agar (15 g)) (Guenoun et al., 2019).

(3) : Milieu à base de carboxyméthyle cellulose (CMC) pour l'activité cellulase (Composition de 1L : CMC (2 g) ; NaNO₃ (2 g) ; K₂HPO₄ (1 g) ; MgSO₄ (0,5 g) ; KCl (0,5 g) ; peptone (0,2 g) et Agar (20 g)) (Guenoun et al., 2019).

(4) : Milieu à base de pectine pour l'activité pectinase (Composition de 1L : NaCl (5g) ; extrait de viande (1 g) ; extrait de levures (1 g) ; peptone (2 g) ; pectine (5 g) et Agar (15 g)) (Ben Abdallah et al., 2016).

(5) : Milieu à base de l'amidon soluble pour l'activité amylase (Composition de 1L : Amidon soluble (10 g) ; extrait de levures (2 g) ; peptone (5 g) ; MgSO₄ (0,5 g), NaCl (0,5 g) ; CaCl₂ (0,15 g) et Agar (20 g)) (Guenoun et al., 2019).

Pour mettre en évidence la production des cinq enzymes par les 40 bactéries sélectionnées, des disques bactériens gélosés issus des cultures bactériennes de 48h sur gélose ordinaire ont été déposés à la surface des différents milieux coulés dans des boîtes de Pétri stériles.

La production de l'une des enzymes étudiées se traduit par l'apparition d'une zone claire autour des disques bactériens après 48 h d'incubation à 28°C (jusqu'à 7 jours pour l'activité lipase). Après l'incubation, le diamètre de la zone d'activité est mesuré (en mm).

Pour chaque activité enzymatique, trois boîtes par bactérie sont inoculées et l'ensemble de l'expérimentation est répété trois fois indépendamment. Après l'incubation, le diamètre de la zone de chaque activité enzymatique est mesuré.

I.7.3. Production des sidérophores

Pour évaluer la production des sidérophores par les 40 isolats bactériens, le test de la gélose Chrome Azurol S (CAS) décrit par Loudon et al, (2011) est réalisé.

La préparation du milieu nécessite plusieurs étapes. Avant de commencer la préparation de la gélose, toute la verrerie utilisée doit être soumise à une attaque acide en utilisant l'acide chlorhydrique à 6M pour éliminer toute trace d'éléments minéraux notamment le fer.

Après le coulage du milieu dans des boîtes de Pétri stériles, des disques bactériens issus des cultures de 48h sur gélose ordinaire sont déposés à la surface de la gélose CAS. Après 24 d'incubation à 28°C, la présence d'une coloration jaune autour des disques bactériens indique la production des sidérophores. Le diamètre de cette zone est mesuré après l'incubation. Trois boîtes par bactérie sont préparées et l'ensemble de l'expérimentation est répété trois fois indépendamment.

I.7.4. Identification moléculaire des isolats sélectionnés

Dans le but d'identifier et de caractériser les sept bactéries sélectionnées, leur ADN génomique est extrait en utilisant le kit Qiagen (100/G).

Des suspensions bactériennes sont préparées puis centrifugées à 7500 rpm pendant 10 minutes. Après avoir éliminé le surnageant, le culot est suspendu dans 180 µL d'un mélange du tampon (Tris HCl à 20 mM; EDTA à 2 mM; et Triton à 1,2%; pH = 8) et de lysozyme à une concentration de 20 mg/mL. Le milieu réactionnel est ensuite incubé pendant 30 minutes à 37°C. L'étape de la lyse cellulaire est réalisée en ajoutant 20 µL de protéinase K et 200 µL

du tampon AL. Après homogénéisation, le mélange est incubé dans un premier temps à 56°C pendant 30 minutes puis à 95°C pendant 15 minutes.

Un autre volume de 200 µL du tampon AL est ajouté avec 200 µL d'éthanol au milieu réactionnel homogénéisé. Le mélange obtenu est ensuite agité puis introduit dans la colonne (fournie avec le kit) et centrifugé à 8000 rpm pendant 1 minute à 4°C. L'ensemble a reçu un volume de 500 µL du tampon AW1 avant d'être centrifugé à 6000g. Un deuxième volume (500 µL) du tampon AW2 est additionné et une troisième centrifugation est réalisée à 20000g pendant 3 minutes. Après l'élimination de l'éthanol, la colonne est remplie de la solution d'éluion AE puis centrifugée à 6000g pendant 1 minute. Le filtrat contenant l'ADN est récupéré et la concentration est déterminée en utilisant un NanoDrop. Après le dosage de l'ADN, la solution est conservée à -20°C jusqu'à l'étape de PCR.

I.7.4.1. Etape de PCR

Dans un microtube de 25 µL, un volume de 2µL de l'ADN génomique extrait des bactéries est additionné à un volume de 23 µL du Mix PCR (Tableau 3). L'amplification du gène d'ADNr 16S est assurée par l'utilisation des deux amorces fd1 (Forward) : 5'- AGAGTT TGA TCC TGG CTC AG-3' et S17 (Reverse) : 5'- GTT ACC TTG TTA CGA CTT-3' (Bouaoud et al., 2018).

Tableau 3 : Composition du Mix PCR pour l'amplification du gène de l'ADNr 16S

Produit ou réactif	Volume (µL)
Eau ultra pure	11,17
Tampon green (x5)	5
dNTP _s (25mM)	0,2
MgCl ₂ (25 mM)	1,5
Amorces (2 µM)	2,5 x 2
Go taq G2 polymérase (5 U/µL)	0,13
Volume total	23

Le thermocycleur est réglé comme suit :

1. Dénaturation initiale à 96°C pendant 5 minutes,
2. Dénaturation (30 cycles) à 94°C pendant 30 secondes,
3. Hybridation (30 cycles) à 53°C pendant 30 secondes,
4. Elongation (30 cycles) à 72°C pendant 2 minutes,
5. Extension finale à 72°C pendant 10 minutes,

I.7.4.2. Etape d'électrophorèse (voir I.5. 4)

I.7.4.3. Séquençage des amplicons et traitement des séquences (voir I.5. 5)

Pour la comparaison des séquences nettoyées, deux bases de données ont été utilisées ; NCBI (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) et EzTaxon (<https://www.ezbiocloud.net/>).

I.8. Evaluation de l'effet antagoniste *in vivo* contre *B. cinerea*

Dans le but d'évaluer l'effet antagoniste *in planta* des 40 bactéries contre *B. cinerea* souche BC1, des plantes entières de tomates (variété Clodano, Syngenta, Suisse) de 6 semaines sont utilisées (Figure 7). La solution nutritive utilisée pour l'irrigation quotidienne (100 à 200 mL) contient le NPK (16-10-25) et des micronutriments. Chaque plante est cultivée dans des pots individuels de 10 x 10 cm contenant un mélange d'empotage.

Pour chaque modalité (bactéries et témoin), 5 plantes de tomates sont utilisées. Pour avoir des chicots, la deuxième et la quatrième feuille de chaque plante sont coupées à une distance de 1 cm de la tige en utilisant des ciseaux désinfectés. Chaque chicot est ensuite inoculé successivement avec 10 µL d'une suspension de spores de *B. cinerea* souche BC1 ajustée à 10^6 spore/mL et 10 µL de la suspension bactérienne à 10^9 UFC mL⁻¹. Les plantes témoins n'ont été inoculées qu'avec la suspension de spores de *B. cinerea* (BC1) (Bardin et al., 2008) (Figure 8).



Figure 7 : Plantes de tomate utilisées pour le test d'antagonisme *in planta*

Toutes les plantes sont incubées dans une chambre climatique réglée à une température de 22°C et humidité relative de 90% avec une photopériode de 14 heures (Bouaoud et al., 2018). Les plantes sont déposées d'une manière aléatoire dans la chambre climatique.

Pour suivre le développement de la maladie sur les plantes, la longueur des lésions de la tige causées par *B. cinerea* est mesurée quotidiennement entre le troisième et le septième jour après l'inoculation.

L'AUDPC (l'aire sous la courbe de progression de la maladie) est calculé comme suit :

$$\text{AUDPC} = (Y_1/2 + \sum Y_J + Y_n/2) (I).$$

Où :

Y_1 : longueur de la lésion (mesurée en mm) en premier jour de notation (troisième jour après l'inoculation).

Y_J : longueur de la lésion (mesurée en mm) au jour J ;

n : le nombre total de jours ;

I : l'intervalle de temps entre chaque observation.

L'effet protecteur de chaque antagoniste est évalué en calculant un indice de protection comme suit (Decognet et al., 2009) :

$$\text{Protection (\%)} = 100 \times (\text{AUDPC}_{\text{témoin}} - \text{AUDPC}_{\text{isolat bactérien}}) / \text{AUDPC}_{\text{témoin}}$$

Trois répétitions indépendantes de l'expérience entière ont été réalisées.



Figure 8 : Test d'antagonisme *in planta* sur plantes de tomate entières ; (A) effeuillage des plantes, (B) inoculation des chicots, (C) incubation des plantes dans une chambre climatique, (D) mesure de la longueur des lésions causées par *B. cinerea* (BC1).

Un autre test différent est réalisé pour évaluer l'effet protecteur des 40 isolats bactériens contre deux autres souches supplémentaires de *B. cinerea* (ALG66 et BCJ2).

Pour cela, des tronçons (segments) de tiges de tomates de 7 cm de longueur (comprenant un pétiole d'une feuille) sont utilisés. Ces morceaux sont découpés des plantes âgées de six semaines. Chaque feuille est ensuite coupée au niveau du pétiole, laissant un bout de 1 cm sur la tige. Les segments sont ensuite placés dans des plaques stériles de 24 puits puis déposés dans des boîtes en plexiglass préalablement désinfectées puis tapissées avec du papier buvard imbibé de l'eau distillée stérile (Figure 9).

Les plaies ont été inoculées avec la même méthode que celle décrite ci-dessus et les segments de tige inoculés sont incubés dans les mêmes conditions.

L'évaluation de la maladie a été effectuée de la même manière et l'AUDPC est calculé du troisième au septième jour après l'inoculation.

Pour chacune des deux souches de *B. cinerea*, dix segments de tige ont été utilisés pour chaque isolat bactérien, et trois répétitions indépendantes ont été effectuées.



Figure 9 : Test d'antagonisme *in vivo* en utilisant des segments de tiges de tomate. Les segments de tiges sont découpés de plantes âgées de six semaines et placés dans des plaques de 24 puits (6 segments par plaque). Les plaques sont déposées dans des boîtes en plexiglass avec du papier buvard humidifié (deux plaques par boîte).

I.9. Tests complémentaires réalisés sur une sélection de sept isolats bactériens

Sur la base de leur effet protecteur sur plantes entières et sur les segments de tige dans les tests précédents, sept des quarante isolats bactériens sont retenus pour réaliser des tests supplémentaires.

I.9.1. Evaluation de l'effet de différentes concentrations cellulaires sur le pouvoir protecteur des isolats bactériens sélectionnés contre *B. cinerea*

Le test de segments de tige est utilisé pour évaluer l'effet de la concentration cellulaire sur la protection conférée par ces isolats bactériens. Quatre concentrations (10^8 , 10^7 , 10^6 et 10^5 UFC mL^{-1}) sont préparées pour chaque isolat et testées contre les souches BCJ2 et BC1 de *B. cinerea*. Pour chaque souche de *B. cinerea*, dix segments de tige sont utilisés pour chaque modalité (antagonistes et témoin) et l'ensemble du test est répété trois fois.

I.9.2. Etude de l'effet *in planta* contre l'oïdium de la tomate « *Oïdium neolycopersici* »

L'effet anti-oïdium des sept isolats bactériens sélectionnés est également évalué sur des plantes entières de tomates âgées de 6 semaines (variété Clodano, Syngenta, Suisse).

Les plantes de tomate sont pulvérisées avec une suspension de spores d'*O. neolycopersici* contenant $2 \cdot 10^3$ spores/mL (Figure 10). Un volume de 20 mL de la suspension sporale du pathogène est pulvérisé sur le feuillage de chaque plante. Après séchage des feuilles, les plantes inoculées sont ensuite traitées avec les bactéries en pulvérisant des aliquotes de 20 mL de la suspension bactérienne (10^9 UFC mL⁻¹). Cinq plantes sont utilisées pour chaque isolat bactérien et 5 plantes non traitées (mais inoculées) sont utilisées comme témoins. Les plantes sont ensuite incubées pendant 12 jours dans une chambre climatique (22°C avec une photopériode de 14 heures, humidité relative de 90% et une ventilation maximale). 12 jours après l'inoculation, les tâches de l'oïdium sont comptées sur deux feuilles par plante.

Pour tenir compte d'une éventuelle variabilité de la taille des feuilles, la surface de chacune de ces feuilles est calculée à l'aide du logiciel ImageJ et la sévérité de la maladie est exprimée en nombre de tâches par cm² de la surface foliaire. L'effet protecteur des isolats bactériens est ensuite évalué en calculant l'indice de protection comme suit :

$$\text{Protection (\%)} = 100 \times (\text{nombre de tâches par cm}^2_{\text{témoin}} - \text{nombre de tâches par cm}^2_{\text{isolat}}) / \text{nombre de tâches par cm}^2_{\text{témoin}}$$

L'ensemble de l'expérience est répété trois fois indépendamment.

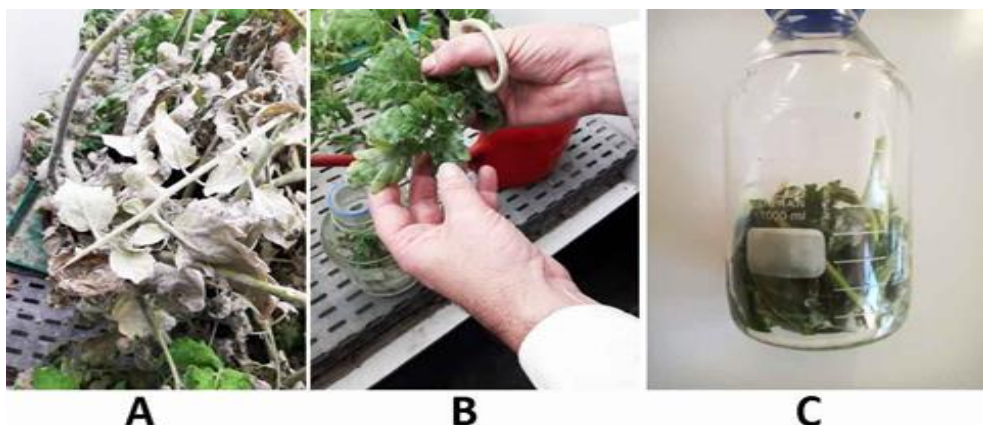


Figure 10 : Préparation de l'inoculum de l'*O. neolycopersici*. (A) : plante atteinte par l'oïdium et utilisée pour la préparation de l'inoculum. (B) : tri des feuilles atteintes pour la préparation de la suspension sporale. (C) : préparation de la suspension sporale.

I.9.3. Effet antagoniste contre autres champignons phytopathogènes

I.9.3.1. Effet *in vitro*

Huit champignons isolés à partir de différents types de plantes ont été utilisés dans cette partie (Tableau 4). L'effet *in vitro* des sept souches bactériennes contre ces champignons phytopathogènes a été évalué en suivant les étapes de la méthode de confrontation directe décrite précédemment.

I.9.3.2. Effet *in vivo*

Dans le but d'évaluer leur effet antagoniste *in vivo*, des suspensions bactériennes des sept bactéries sélectionnées sont préparées puis ajustées à une concentration de 10^9 UFC mL⁻¹. L'effet antagoniste des bactéries retenues est évalué contre cinq champignons phytopathogènes y compris quatre champignons qui causent des maladies poste-récolte des fruits et légumes (Figure 11) ;

Tableau 4 : Les différents champignons testés *in vitro*

Champignon	Souche	Plante hôte	Lieu d'isolement	Date d'isolement	Code Genbank
<i>S. sclerotiorum</i>	SSCJ1	Carottes	Jijel	Avril 2018	MW931517
FORL*	FTJ4	Tomate	Jijel	Juin 2018	MW931518
<i>G. candidum</i>	GC13	Fruits de citron	Jijel	Avril 2018	NA
<i>M. scaetiae</i>	MSDB 02	Spattes de palmier dattier	Biskra	Avril 2021	NA
FOM ⁺	FM01	Melon	Biskra	Mai 2021	NA
<i>A. alternata</i>	AT07	Tomate	Biskra	Janvier 2022	NA
<i>Bipolaris</i> sp-	PM01	Pommes	Biskra	Décembre 2021	NA
<i>P. digitatum</i>	PE03	Mandarines	Biskra	Décembre 2021	NA
* <i>Fusarium oxysporum</i> f. sp. <i>radicis-lycopersici</i>					
⁺ <i>Fusarium oxysporum</i> f.sp. <i>melonis</i>					
~il s'agit de la première détection de ce champignon comme agent responsable de pourriture poste-récolte des pommes					

Les souches fongiques

1. *Geotrichum candidum* souche GC13 ;
2. *Alternaria alternata* souche AT07 ;
3. *Bipolaris sp* souche PM01 ;
4. *Penicillium digitatum* souche PE03 ;
5. *Mauginiella scaettae* souche SDB07 ;

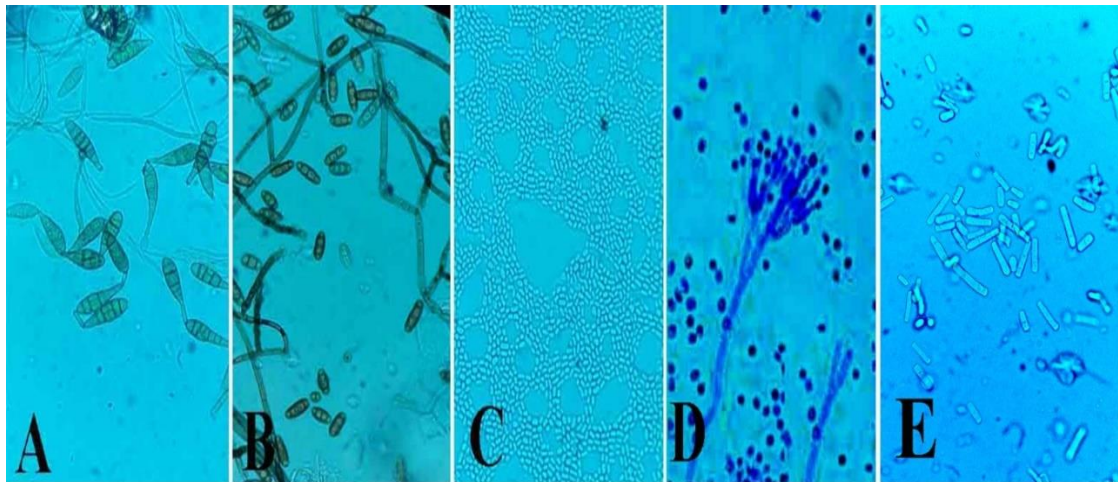


Figure 11 : Les conidiophores et les spores des champignons utilisés pour le test d'antagonisme *in vivo* sous microscope photonique (x100). (A) : *A. alternata*, (B) : *Bipolaris sp*, (C) : *G. candidum*, (D) : *Penicillium digitatum*, *M. scaettae* (E). Une coloration au bleu de lactophénol est effectuée avant l'observation microscopique

Le matériel végétal

Des fruits de mandarines, citrons, tomates, et pommes ainsi que des morceaux d'épillets de palmier dattier ont été utilisés dans cette partie du travail. Les fruits ont été achetés au marché de Biskra. Par contre, les épillets de palmier dattier (variété Degla Baydha) sont issus d'un palmerai de la région de Sidi Okba (Biskra).

Les fruits sont sélectionnés en fonction de leur maturité, leur couleur, leur taille (tailles uniformes) et leur salubrité (sans blessures physiques ni symptômes de maladies). La surface des fruits est désinfectée en utilisant l'hypochlorite de sodium à 2 % pendant 2 min. Un rinçage de 3 min est ensuite effectué en utilisant l'eau distillée stérile. Une autre désinfection avec l'éthanol à 75% (v/v) est réalisée pendant 1 min. Les fruits sont ensuite lavés deux fois dans l'eau distillée stérile puis séchés sous une hotte à flux laminaire (Li et al., 2021).

Concernant les épillets, des morceaux de 12 cm ont été utilisés après avoir enlevé les boutons floraux.

Inoculation artificielle

Des blessures de 3 mm² et 3 mm de profondeur sont provoquées à la surface des fruits désinfectés en utilisant un emporte-pièce en acier stérile. Une suspension de spores de chaque champignon pathogène est préparée puis ajustée à 10⁶ spore/mL et inoculée au niveau des blessures à raison de 10 µL par blessure.

Les fruits ont été inoculés de la façon suivante ;

1. Les mandarines sont inoculées avec *P. digitatum* souche PE03 ;
2. Les citrons sont inoculés avec *G. candidum* souche GC13 ;
3. Les pommes sont inoculées avec *Bipolaris sp* souche PM01 ;
4. Les tomates sont inoculées avec *A. alternata* souche AT07 ;

Quelques minutes après l'inoculation du pathogène, chaque plaie est traitée avec l'une des suspensions bactériennes (10 µL) des sept bactéries sélectionnées. Les fruits (5 fruits) sont ensuite placés dans des boîtes en plastiques désinfectées et tapissées du papier buvard imprégné de l'eau distillée stérile pour assurer un taux élevé d'humidité. Les boîtes sont incubées à 22°C pendant une semaine. Des fruits témoins inoculés uniquement avec le pathogène sont préparés puis incubés dans les mêmes conditions (Vilaplana et al., 2020).

Cinq fruits par boîte par modalité (bactéries et témoin) sont utilisés, et trois répétitions indépendantes sont réalisées (Figure 12).

Le suivi de développement des lésions sur les fruits est réalisé par la mesure quotidienne des surfaces des lésions (en mm²). Le pourcentage de protection est calculé comme suit :

$$\text{Protection (\%)} = 100 \times (\text{surface de lésion}_{\text{témoin}} - \text{surface de lésion}_{\text{isolat bactérien}}) / \text{surface de lésion}_{\text{témoin}}$$

Concernant les épillets du palmier dattier, des morceaux de 12 cm de longueur ont été coupés en utilisant des scalpels stériles. Le bout de chaque segment est ensuite inoculé successivement avec une suspension de spores de *M. scaettae* souche MSDB 02 à une concentration de 10⁶ spores/mL puis avec 10µL de la suspension bactérienne de l'une des sept bactéries sélectionnées. Les épillets témoins ont été inoculés avec une suspension de spores du champignon (sans l'antagoniste).

Les épillets (10 par bactérie et 5 par boîte) sont ensuite incubés dans des boîtes en plastique préalablement désinfectées puis tapissées du papier buvard humidifié. La longueur des lésions causées par le pathogène a été mesurée entre le troisième et le septième jour pour calculer l'AUDPC. Le pourcentage de protection est calculé comme suit :

$$\text{Protection (\%)} = 100 \times (\text{AUDPC}_{\text{témoin}} - \text{AUDPC}_{\text{isolat bactérien}}) / \text{AUDPC}_{\text{témoin}}$$

L'expérience est répétée trois fois indépendamment.

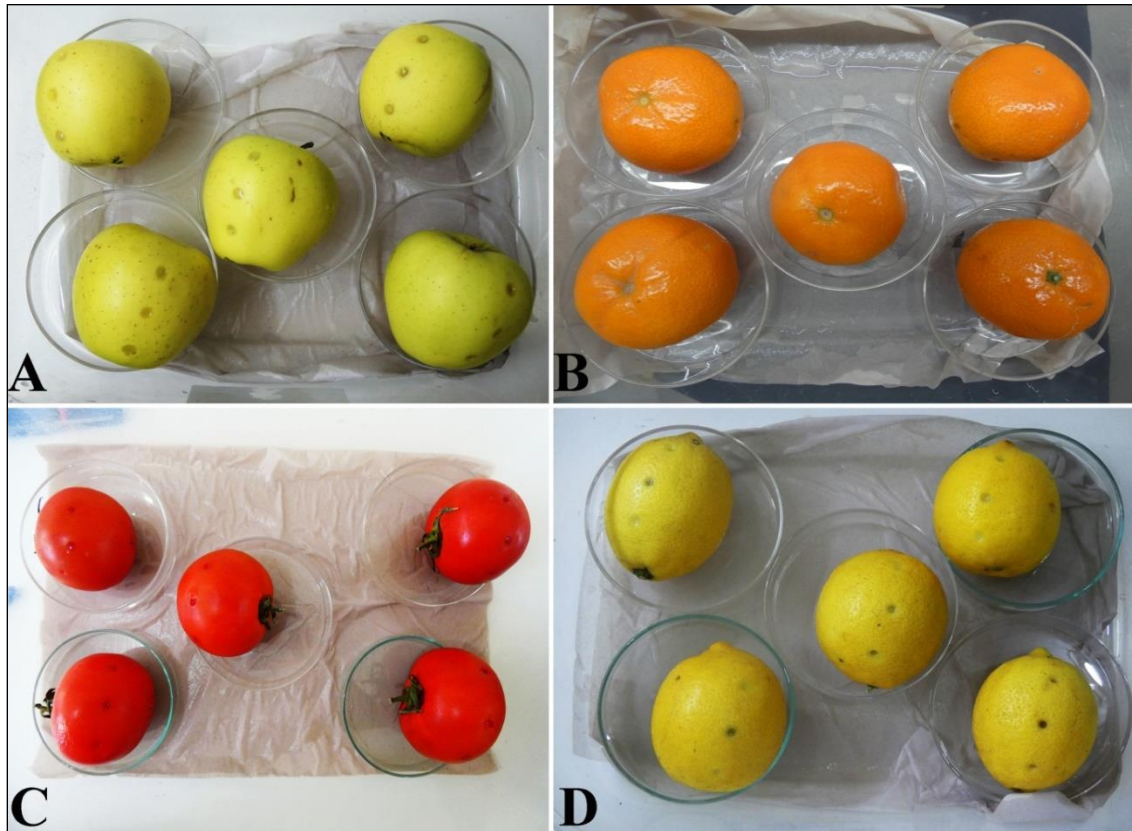


Figure 12 : Test *in vivo* contre des champignons responsables des pourritures poste-récolte. A : mandarines inoculées avec *P. digitatum* souche PE03, B : pommes inoculées avec *Bipolaris* sp souche PM01, C : tomates inoculées avec *A. alternata* AT07, D ; citrons inoculés avec *G. candidum* souche GC13.

I.9.3. Etude de l'effet des isolats sélectionnés sur la promotion de la croissance des tomates

Des graines de tomate (variété, Clodano. Syngenta. Suisse) (Figure 13) sont utilisées pour étudier l'effet promoteur de la croissance des plantes des sept bactéries sélectionnées.

La surface des graines est désinfectée en suivant le protocole décrit par Boukaya et al, (2018). Après séchage sous une hotte à flux laminaire, les graines désinfectées sont divisées en huit groupes de vingt-cinq graines pour chacun. Les graines de chaque groupe sont ensuite trempées pendant 2 heures à température ambiante dans l'une des sept suspensions bactériennes (10^9 UFC/mL) préalablement préparées. Les graines du huitième groupe (graines témoins) ont été trempées dans de l'eau distillée stérile.

Après séchage, les graines sont transférées dans des boîtes de Pétri contenant du papier buvard stérile et humidifié en utilisant l'eau distillée stérile. Les boîtes sont ensuite incubées à 30°C pendant 7 jours. Trois boîtes par modalité (bactéries et témoin) ont été préparées. Trois répétitions indépendantes de l'expérience ont été réalisées.

Après l'incubation, le pourcentage de germination est calculé, puis, la longueur des racines et des parties aériennes des pousses (plantules) de chaque modalité est mesurée pour calculer l'indice de vigueur des graines.

Indice de vigueur = (longueur moyenne des racines) \times (pourcentage de germination) (Syed-Ab-Rahman et al., 2018).

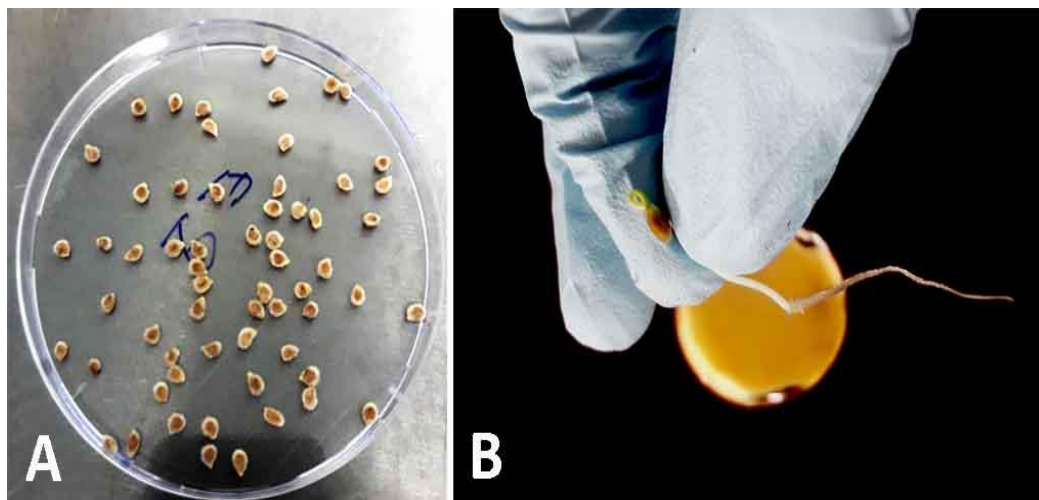


Figure 13 : graines de tomate après traitement (A) et après incubation (B)

I.9.4. Pathogénicité et induction d'hypersensibilité (HR)

Les feuilles de tabac (*Nicotiana tabacum* cv. Xanthi) sont utilisées pour tester la capacité des sept isolats bactériens à provoquer une réponse d'hypersensibilité.

A l'aide d'une seringue sans aiguille, $200 \mu\text{L}$ de la suspension bactérienne de l'antagoniste (10^9 UFC mL^{-1}) sont inoculés délicatement dans les feuilles de tabac (plantes âgées de six

semaines). Après 24h-48h d'incubation dans une chambre climatique, la présence de nécroses autour du point d'injection indiquera le début d'une probable réaction d'hypersensibilité.

L'eau distillée stérile et *Pseudomonas syringae* (souche CC94) sont utilisés comme témoins négatif et positif respectivement (Morris et al., 2010 ; Bouaoud et al., 2018) (Figure 14).

Un autre test supplémentaire est réalisé pour évaluer la pathogénicité des souches bactériennes sélectionnées. Il consiste à inoculer des chicots des plantes entières de tomate avec 10 μL de la suspension bactérienne (10^9 UFC mL^{-1}) (Bouaoud et al., 2018). Les plantes sont ensuite incubées dans une chambre climatique réglée à une température de 22°C et humidité relative de 90% avec une photopériode de 14 heures.

Après l'incubation, les plantes sont examinées pour d'éventuelles nécroses autour du point d'inoculation, c'est le signe d'une réponse d'hypersensibilité.

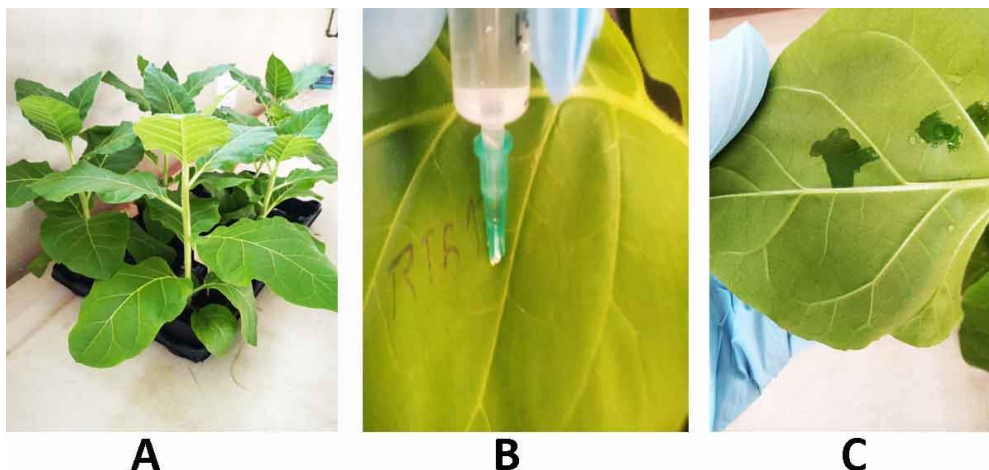


Figure 14 : Mise en évidence de la réaction d'hypersensibilité sur feuilles de tabac ; (A) plantes de tabac de 6 semaines, (B) inoculation des feuilles, (C) feuilles de tabac inoculées.

I.10. Evaluation de l'effet de deux bactéries rhizosphériques (*Acinetobacter calcoaceticus* SJ19 et *Bacillus safensis* SJ4) sur *Botrytis cinerea* et leur pouvoir favorisant la croissance de la tomate

I.10.1. Les isolats bactériens

Les isolats bactériens utilisés dans cette partie (SJ4 et SJ19, Figure 15) ont été isolés en 2018 à partir du sol rhizosphérique des plantes de tomates saines cultivées dans des serres non chauffées près de Jijel. L'isolement, la purification et le stockage ont été effectués selon le protocole décrit par Akter et al, (2015).

SJ4 et SJ19 sont respectivement rattachés à l'espèce *Bacillus safensis* (numéro d'accès GenBank: OK562384) avec 100% de similitude et à *Acinetobacter calcoaceticus* (numéro d'accès GenBank: OK562383) avec 99% de similitude.



Figure 15 : Aspect macroscopique des deux bactéries ; *Bacillus safensis* SJ4 et *Acinetobacter calcoaceticus* SJ19 sur gélose ordinaire

I.10. 2. Les souches de *Botrytis cinerea*

Cinq souches de *B. cinerea* ont été utilisées dans cette partie. Quatre souches (BCJ1, BCJ2, BCJ3 et BCJ4) ont été isolées à Jijel à partir des plantes de tomate cultivées dans des serres non chauffées et présentant des symptômes de la pourriture grise.

La souche BC21 nous a été fournie par le Laboratoire de Mycologie d'INRAE Avignon, France. Toutes les souches ont été conservées à -20°C. Pour la revivification, la culture et la production d'inoculum, le milieu PDA (Difco Laboratory Detroit, USA) a été utilisé tel que décrit par Bouaoud et al, (2018).

I.10.3. Les plantes de tomates

Des plantes de tomates (variété Clodano ; Syngenta, Suisse) ont été cultivées en pots individuels dans une serre chauffée et utilisées 6 semaines après le semis, pour les tests de bio-contrôle *in planta*.

I.10.4. Etude de l'effet antagoniste *in vitro* des deux bactéries contre *Botrytis cinerea*

I.10.4. 1. Confrontation directe

Pour évaluer l'effet antagoniste *in vitro* direct contre les cinq souches de *B. cinerea*, les isolats bactériens ont été mis en contact avec le pathogène fongique à la surface du milieu PDA tel que décrit par Xu et Kim, (2014).

I.10.4. 2. Confrontation indirecte

Les deux bactéries ont été évaluées pour leur capacité de produire des composés volatils antifongiques selon le protocole décrit par Barakat et al, (2014). La souche BC21 de *B. cinerea* a été utilisée dans ces tests. Pour déterminer le pourcentage d'inhibition de la croissance mycélienne, des boîtes témoins sans bactéries ont été préparées et incubées à 22°C pendant 72 heures avec les autres boîtes. Trois boîtes sont utilisées par bactérie et trois répétitions indépendantes de l'ensemble de l'expérience ont été réalisées.

I.10.5. Tests de biocontrôle *in planta*

Pour évaluer l'activité antagoniste *in planta* des deux isolats bactériens contre *B. cinerea*, des plantes de tomates âgées de 6 semaines ont été utilisées.

Deux feuilles ont été découpées de chaque plante et les plaies sont ensuite inoculées en utilisant des aliquotes de 10 µL d'une suspension de spores de *B. cinerea* (souche BC21) à 10^6 spores/mL. Les plaies sont immédiatement traitées soit avec une suspension bactérienne (10 µL par plaie ; 10^9 UFC mL⁻¹) soit laissées non traitées et considérées comme plantes témoins.

Les deux isolats bactériens ont été appliqués soit seuls, soit en combinaison en utilisant un mélange 1:1 (V/V) des suspensions bactériennes. Pour étudier l'éventuel effet du temps d'application des bactéries sur leur efficacité protectrice, des modalités complémentaires consistant en des plantes traitées avec les deux bactéries 1 heure avant ou après l'inoculation avec *B. cinerea*. Ainsi, au total, le test de bio-contrôle a comporté 10 modalités de traitements, et 5 plantes de tomates sont utilisées par modalité. L'ensemble du test est répété trois fois indépendamment. Après l'inoculation, toutes les plantes sont incubées dans une chambre climatique (photopériode de 14 heures ; 22 °C ; 90 % HR) pendant 7 jours (Bouaoud et al., 2018). Le développement de la maladie à partir de chaque plaie inoculée est suivi en mesurant la longueur des lésions de la tige entre le troisième et le septième jour après l'inoculation. Ensuite, une aire sous la courbe de progression de la maladie (AUDPC) a été calculée pour

chaque plaie. Le pourcentage de protection conféré par chaque isolat bactérien a été calculé comme suit :

Protection (%) = $100 \times (\text{moyenne de l'AUDPC}_{\text{témoin}} - \text{moyenne de l'AUDPC}_{\text{traitement bactérien}}) / \text{moyenne de l'AUDPC}_{\text{témoin}}$ (Decognet et al., 2009).

I.10.6. Pathogénicité et induction de la réponse d'hypersensibilité

En conjonction avec les essais de lutte biologique décrits ci-dessus, des lots de plantes de tomates ont été utilisés pour évaluer un éventuel effet délétère des isolats bactériens. Pour cela, les feuilles ont été découpées des plantes comme décrit précédemment, mais les plaies n'ont pas été inoculées avec *B. cinerea*. Au lieu de cela, des aliquotes de 10 µL des suspensions bactériennes sont appliquées sur les plaies et les plantes sont incubées dans une chambre climatique tel que décrit ci-dessus.

Après sept jours d'incubation, les plaies ont été examinées pour d'éventuels symptômes. Cinq plantes sont utilisées pour chaque isolat bactérien, et l'expérience a été réalisée trois fois indépendamment.

Un autre test est utilisé pour évaluer la capacité des deux bactéries à induire une réponse d'hypersensibilité. Des feuilles de tabac (*Nicotiana tabacum*) sont inoculées avec des suspensions des deux isolats bactériens (10^9 UFC mL⁻¹) en suivant le protocole décrit par Morris et al., (2010).

Les plantes témoins ont été inoculées avec une suspension de la souche CC94 de *Pseudomonas syringae* et considérées comme témoins positifs, tandis que les plantes inoculées avec l'eau distillée stérile sont considérées comme témoins négatifs. Les plantes ont ensuite été incubées pendant 48 heures dans une chambre climatique à 22°C avec 14 heures de photopériode. Après l'incubation, les plantes ont été examinées pour d'éventuelles nécroses autour du point d'inoculation, signe d'une réaction d'hypersensibilité.

I.10.7. Evaluation de l'effet des deux bactéries sur la promotion de la croissance des tomates

Pour évaluer le potentiel des deux bactéries à améliorer la croissance des tomates, la surface des graines de tomates (variété Clodano ; Syngenta, Suisse) a été désinfectée en les trempant trois minutes dans l'éthanol à 70 % et quatre minutes dans une solution de l'hypochlorite de sodium à 0,9 % (v/v). Les graines ont ensuite été lavées trois fois avec l'eau distillée stérile (Boukaya et al., 2018).

Des lots de 25 graines sont ensuite trempés pendant deux heures dans une suspension (10^9 cellules mL^{-1}) de SJ4 ou SJ19 à température ambiante. Les lots témoins ont été trempés dans l'eau distillée stérile. Les graines ont ensuite été semées dans un terreau stérile et placées dans une serre chauffée. Sept jours après le semis, la germination des graines a été évaluée pour chaque lot de graines, et les plantules sont soigneusement déracinés et lavées. La croissance des plantules est évaluée et l'indice de vigueur des graines est calculé comme suit :

Longueur moyenne des racines \times pourcentage de germination des graines (Syed-Ab-Rahman et al., 2018).

Cette évaluation a été réalisée sur 20 plantules pour chaque modalité de traitement des semences. Les plantules âgées de sept jours sont ensuite repiquées dans des pots individuels (10 x 15 cm) contenant un terreau stérile et cultivées dans une serre chauffée. Cinq plantules ont été repiquées pour chaque modalité de traitement. Deux jours après le repiquage, chaque semis a reçu un traitement par « drench » avec 5 mL d'une suspension bactérienne de la même bactérie utilisée pour traiter les graines. L'eau distillée stérile est utilisée pour les plantules témoins (Mohamed et al., 2020).

Quatre semaines après ce traitement, les paramètres morphométriques suivants ont été mesurés: longueurs des racines et des parties aériennes (cm), diamètre de la tige au-dessus de la deuxième feuille (mm), nombre de feuilles, poids frais des racines et des parties aériennes (g). La teneur en chlorophylle des feuilles a été mesurée à l'aide d'un chlorophyllomètre portable (Konica Minolta SPAD 502). L'ensemble de l'expérience a été réalisé trois fois indépendamment.

I.11. Analyses statistiques

Toutes les données sont présentées sous forme de moyenne \pm écart type.

Le test t de Student a été utilisé pour comparer entre les bactéries rhizosphériques et les bactéries non rhizosphériques. Le test est appliqué aux valeurs de la croissance mycélienne de *B. cinerea* pour le test d'antagonisme *in vitro* et aux valeurs de l'AUDPC pour les tests *in vivo*.

Le test de X^2 a été utilisé pour étudier la présence de lien entre l'efficacité des 40 isolats sélectionnés et leur origine (rhizosphérique ou non rhizosphérique).

Pour l'étude des différentes corrélations, le test non paramétrique de Spearman est utilisé.

Le test non paramétrique de Mann-Whitney a été utilisé pour vérifier l'effet des deux souches bactériennes SJ4 et SJ19 sur la germination des graines de tomates.

Les données des autres tests sont analysées en utilisant l'analyse de variance (ANOVA) associée au test de comparaison des moyennes (SNK).

Toutes les analyses statistiques sont réalisées à l'aide de logiciel Statistica (Statsoft Inc., Tulsa, USA).

RESULTATS ET DISCUSSION

II. Résultats

II.1. Les isolats bactériens

142 isolats bactériens ont été isolés dans cette étude, 69 isolats (48,59%) ont une origine rhizosphérique et 73 isolats (51,4%) sont d'origine non rhizosphérique.

Parmi les 142 isolats, 84 isolats (59,15%) sont issus du premier site d'échantillonnage « Elkennar Nouchfi » dont 41 isolats rhizosphériques (48,8%) et 43 isolats non rhizosphériques (51,2%). Cependant, 58 isolats (40,85%) ont été isolés à partir du deuxième site « Achouat » dont 28 isolats rhizosphériques (48,28%) et 30 non rhizosphériques (51,72%).

II.2. Effet antagoniste *in vitro* contre *B. cinerea*

II.2.1. Confrontation directe des 142 isolats contre *B. cinerea*

Parmi les 142 isolats bactériens testés *in vitro* par confrontation directe contre la souche BC1 de *B. cinerea*, 120 isolats (84,5%) ont significativement inhibé la croissance mycélienne du pathogène (Figure 10 ; $P < 0,05$; test SNK appliqué aux valeurs de la croissance mycélienne).

Selon le test de X^2 , la fréquence des bactéries capables d'inhiber *B. cinerea* sur boîtes de Pétri n'était pas significativement différente entre les bactéries isolées du sol non rhizosphérique (84,9 %) et celles isolées du sol rhizosphérique (84,1 %) (Test de X^2 , $P = 0,62$). Cependant, l'ampleur de l'inhibition de la croissance mycélienne était significativement plus élevée, en moyenne, pour les isolats non rhizosphériques (53,25 %) par rapport aux isolats rhizosphériques (33,73 %) ; (test t de Student; $P < 0,001$).

D'autre part, les travaux de Bouaoud et al, (2018) sur le screening des nouveaux agents de lutte biologique d'origine microbienne pour lutter contre *B. cinerea* ont prouvé que pour sélectionner un nouvel agent de biocontrôle d'origine microbienne on ne doit pas écarter les agents ayant donné un faible effet sur boîte de Pétri. C'est dans cette optique qu'un sous-échantillon constitué de 20 isolats rhizosphériques et 20 isolats non rhizosphériques est sélectionné au hasard et retenu pour le reste du travail (Figure 16).

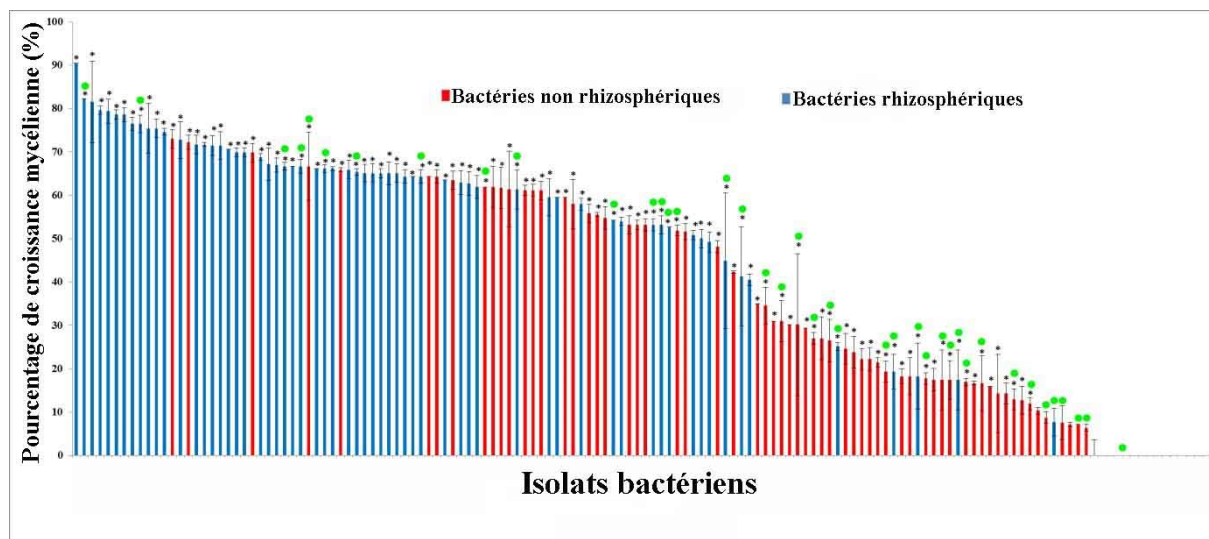


Figure 16 : Effet antagoniste *in vitro* (confrontation directe) sur la croissance mycélienne de *B. cinerea* (souche BC1) de 142 isolats bactériens provenant du sol rhizosphérique (barres bleues) ou non rhizosphérique (barres rouges). Chaque valeur représente la moyenne de trois répétitions effectuées indépendamment (chacune avec trois répétitions par isolat bactérien). Les barres d'erreur représentent l'écart type. Les étoiles indiquent une inhibition statistiquement significative en comparaison avec le témoin (test SNK appliqué aux valeurs de la croissance mycélienne ; $P < 0,05$). Les points verts désignent les 40 isolats sélectionnés au hasard (20 rhizosphériques et 20 non rhizosphériques) pour les tests ultérieurs.

II.2.2. Production des composés volatils anti- *B. cinerea*

Parmi les 40 isolats bactériens sélectionnés et testés, 18 isolats rhizosphériques et 19 non rhizosphériques ont pu inhiber de manière significative la croissance mycélienne de *B. cinerea* (souche BC1) dans les tests de confrontation indirecte (Figure 17 ; $P < 0,05$; test SNK appliqué aux valeurs de la croissance mycélienne).

En moyenne, aucune différence significative n'a été enregistrée entre le pouvoir inhibiteur anti-*B. cinerea* des composés volatils produits par les souches isolées de la rhizosphère (34,4 %) et celui des composés volatils des souches non rhizosphérique (40,7%) ; (test t de Student, $P = 0,079$). Concernant la fréquence des bactéries capables d'inhiber *B. cinerea* par production des composés volatils, le test de χ^2 a également permis de montrer l'absence de toute différence significative ($P = 0,54$) entre les bactéries isolées du sol non rhizosphérique (47,5%) et celles isolées du sol rhizosphérique (45%).

De même, une absence de corrélation significative entre l'effet inhibiteur des composés volatils (test de confrontation indirecte) et celui des composés non volatils ou diffusibles (test de confrontation directe) est enregistrée (corrélation de Spearman : $R = 0,05$; $P = 0,73$).

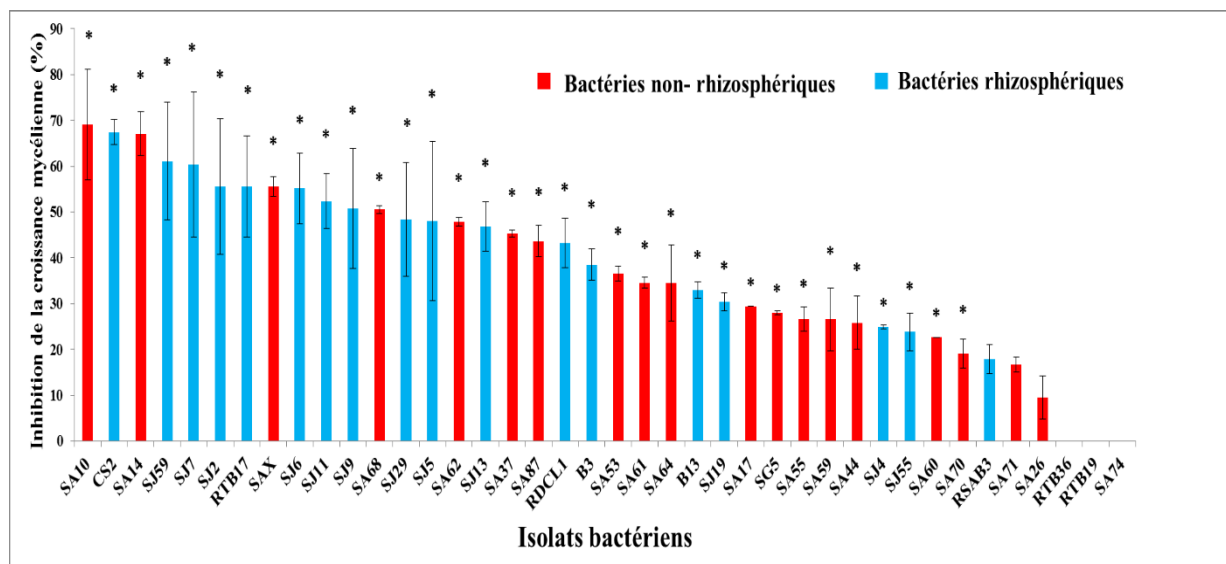


Figure 17 : Inhibition *in vitro* de la croissance mycélienne de *B. cinerea* (souche BC1) par la production des composés volatils. Les 20 isolats rhizosphériques sont présentés en barres bleues, par contre les 20 isolats non rhizosphériques sont présentés en barres rouges. Chaque valeur représente la moyenne de trois tests effectués indépendamment (chacun avec trois répétitions par isolat bactérien). Les barres d'erreur représentent l'écart type. Les étoiles indiquent une inhibition statistiquement significative ($P < 0,05$; test SNK appliqué aux valeurs de la croissance mycélienne).

II.2.3. Inhibition de la germination des spores

Tous les isolats bactériens ont significativement inhibé la germination des spores de *B. cinerea* souche BC1 avec différents degrés d'efficacité (test SNK ; $P < 0,05$). Cependant, seuls deux isolats (SJ11, RSAB3) ont totalement inhibé la germination des spores du pathogène (Figure 18).

Il n'y a pas de différence significative entre l'efficacité des bactéries rhizosphériques et celle des bactéries non rhizosphériques ($P = 0,172$; test t de Student appliqué aux valeurs de pourcentages de germination des spores).

Aucune corrélation n'a été observée entre ces résultats et ceux des autres tests *in vitro* (confrontation directe et production des substances volatiles) (corrélations de Spearman ; $P = 0,27$, $R = 0,178$ pour le test de confrontation directe et $P = 0,51$; $R = 0,105$ pour le test de production des substances volatiles).

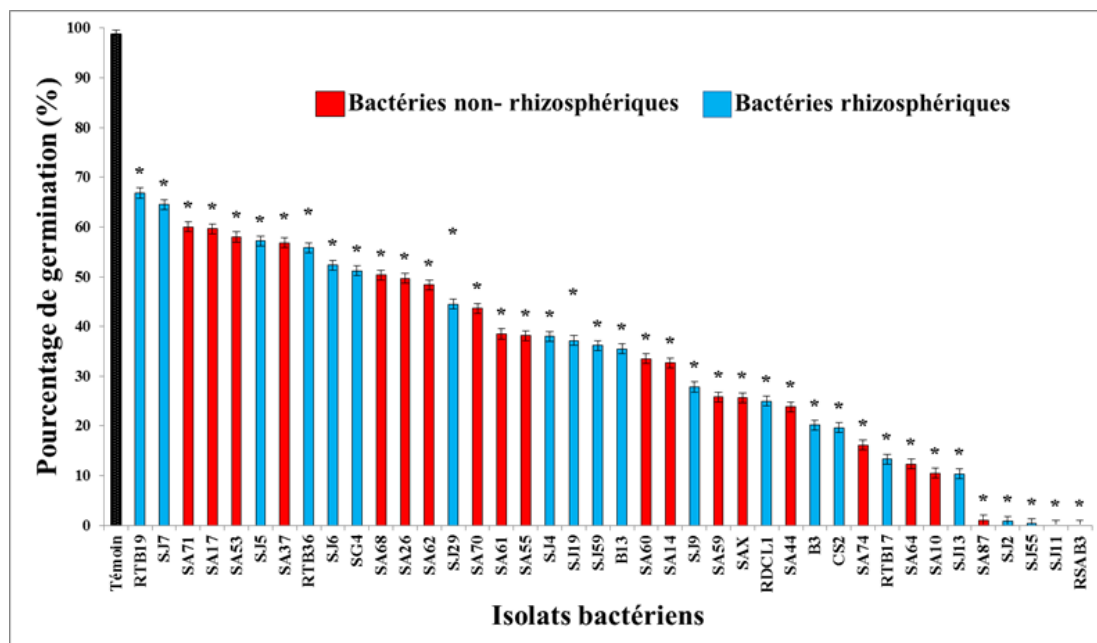


Figure 18 : Inhibition *in vitro* de la germination des spores de *B. cinerea* (souche BC1) par les 40 isolats bactériens retenus (20 isolats rhizosphériques (barres bleues) et 20 isolats non rhizosphériques (barres rouges)). Chaque valeur représente la moyenne des trois répétitions effectuées indépendamment (chacune avec trois répétitions par modalité (bactéries et témoin)). Les barres d'erreur représentent l'écart type. Les étoiles indiquent une inhibition statistiquement significative (test SNK ; $P < 0,05$).

II.3. Propriétés physiologiques et caractérisation moléculaires des isolats bactériens sélectionnés

II.3.1. Croissance à différentes températures

Toutes les bactéries sélectionnées ont montré leur pouvoir de croissance à toutes les températures testées (22°C, 25°C, 30°C, 37°C).

II.3.2. Activités enzymatiques

Parmi tous les isolats bactériens examinés, seul SJ2 était capable de produire la pectinase (Figure 21). En effet, cette enzyme est la seule produite par cet isolat parmi les cinq enzymes étudiées. Cependant, à l'exception de sept souches bactériennes (17,5%) (SA10, SA37, SA59, SA87, SJ9, SJ59 et RTB17), aucun autre isolat n'a pu produire de cellulase.

Concernant l'amylase, 12 isolats (30%) ont pu produire cette enzyme. La lipase et la protéase ont été produites par 17 (42,5 %) et 31 isolats (77,5 %) respectivement. Les isolats les plus importants en termes de nombre d'enzymes produites sont SA87, SA37, SA10 et SJ9. Chacun de ces isolats a produit quatre enzymes avec des quantités différentes (diamètre des zones

d'activité). Les isolats SJ13 et CS2, sont les moins importants, ils ne produisant aucune enzyme.

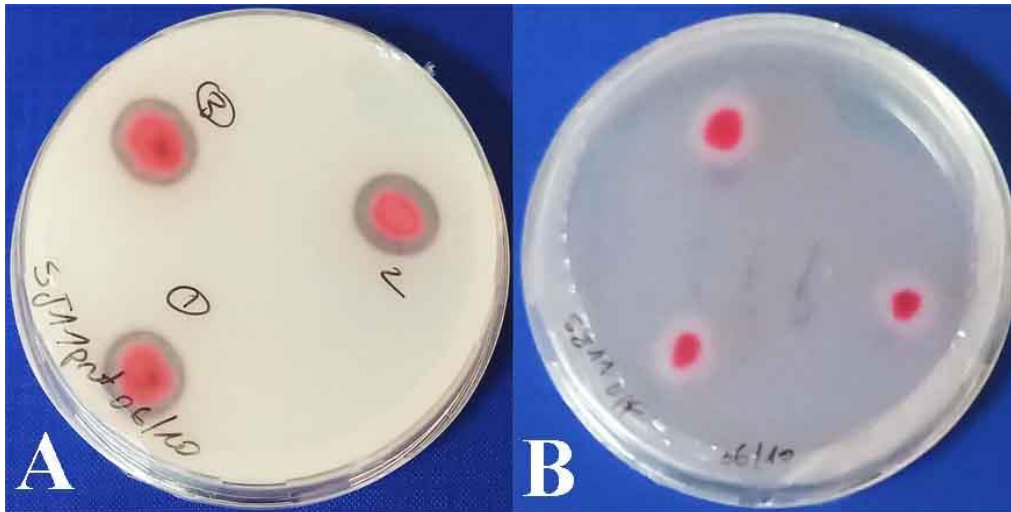


Figure 19 : Activité protéolytique (A) et lipolytique (B) de la souche SJ11

II.3.3. Production des sidérophores

Les sidérophores ont été produits par 29 isolats (72,5% ; 14 isolats rhizosphériques et 15 isolats non rhizosphériques) (Figure 21). SJ55 est l'isolat le plus important avec un diamètre d'activité égal à 36,66 mm suivi de RSAB3 (34 mm), SJ59 (33,66 mm) et SA14 (31,33 mm).

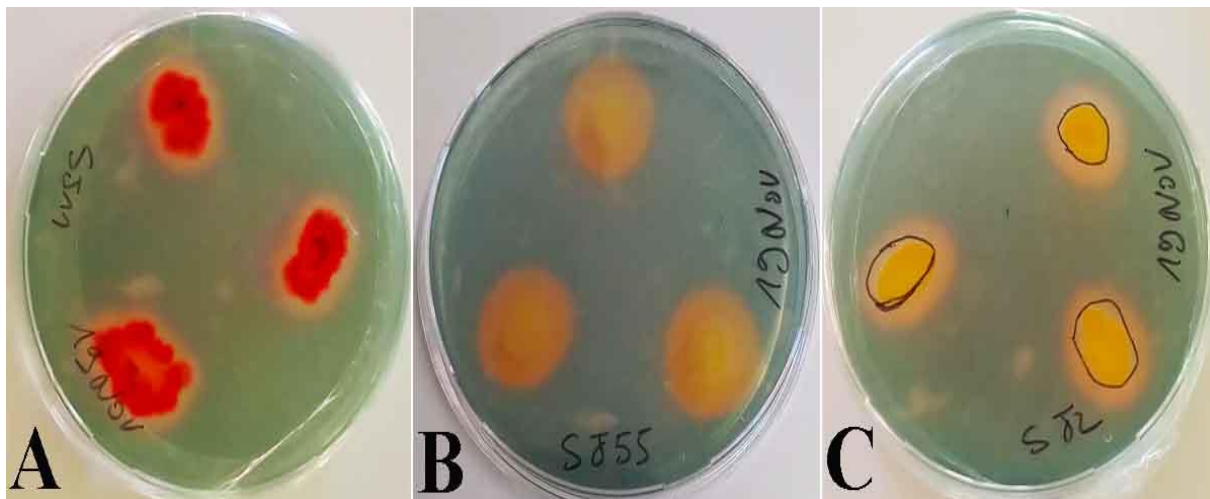


Figure 20 : Production des sidérophores par les isolats : SJ11 (A), SJ55 (B) et SJ2 (C)

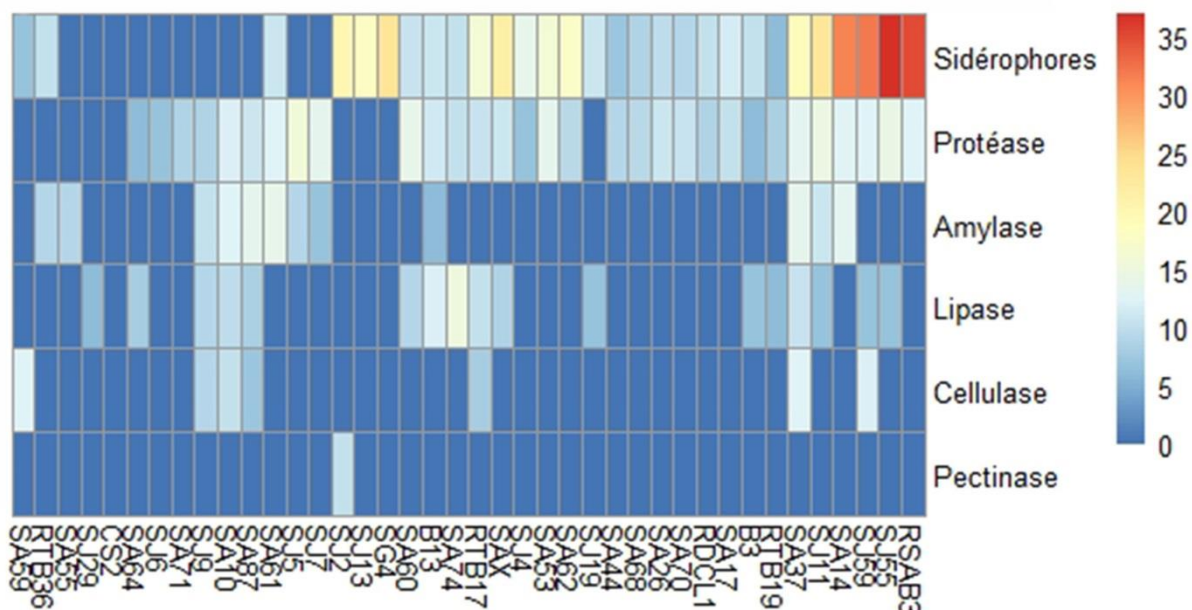


Figure 21 : Carte thermique de la production des enzymes et des sidérophores par les quarante bactéries sélectionnées

II.3.4. Identification moléculaire des bactéries

Le séquençage de l'ADN amplifié a permis d'identifier les 40 isolats bactériens en comparant leurs séquences avec les deux bases des données ; NCBI et EzTaxon (Tableau 5, Figure 22).

Les isolats identifiés se sont répartis en 30 espèces différentes appartenant aux 14 genres.

Parmi les 40 isolats sectionnés, 17 isolats (42,5%) appartiennent au genre *Bacillus* (dont 3 isolats sont d'origine rhizosphérique et 14 isolats sont d'origine non rhizosphérique), 4 isolats (10%) sont rattachés au genre *Pseudomonas* et 3 isolats (7,5%) sont affiliés au genre *Priestia*.

Concernant les genres ; *Shewanella*, *Lysinibacillus*, *Exiguobacterium* deux isolats ont été identifiés pour chaque genre.

D'autre part, *Bacillus thuringiensis* est l'espèce la plus présente avec 4 isolats identifiés, suivie de *Bacillus subtilis* (3 isolats), *Priestia megaterium* (3 isolats), *Bacillus amyloliquefaciens* (2 isolats) et *Bacillus velezensis* (2 isolats).

Les isolats issus du sol rhizosphérique appartiennent à 11 genres dont 18 espèces, Le genre *Pseudomonas* est le plus présent avec 4 isolats suivi du genre *Bacillus* avec 3 isolats. Cependant, les isolats du sol non rhizosphérique ont été affiliés à 5 genres dont 11 espèces différentes. 14 isolats parmi les 20 isolats issus du sol non rhizosphériques sont des *Bacillus*.

Tableau 5 : Identification des 40 bactéries sélectionnées

Isolat	Origine	Espèces	Pourcentage de similarité (%)	Code GenBank
SJ2	Sol rhizosphérique	<i>Pseudomonas argentinensis</i>	99,87	MZ540007
SJ4	Sol rhizosphérique	<i>Bacillus safensis</i>	100	OK562384
SJ5	Sol rhizosphérique	<i>Exiguobacterium acetylicum</i>	99,82	ON340539
SJ6	Sol rhizosphérique	<i>Priestia megaterium</i>	99,01	ON340540
SJ7	Sol rhizosphérique	<i>Exiguobacterium indicum</i>	99,34	ON340541
SJ9	Sol rhizosphérique	<i>Bacillus cereus</i>	99,57	ON340542
SJ11	Sol rhizosphérique	<i>Serratia marcescens</i>	99,32	ON340543
SJ13	Sol rhizosphérique	<i>Enterobacter hormaechei</i>	99,85	ON340544
SJ19	Sol rhizosphérique	<i>Acinetobacter calcoaceticus</i>	99	OK562383
SJ29	Sol rhizosphérique	<i>Pseudomonas paralactis</i>	99,34	ON340545
SJ55	Sol rhizosphérique	<i>Pseudomonas lactis</i>	100	MZ540008
SJ59	Sol rhizosphérique	<i>Bacillus thuringiensis</i>	100	ON340546
RTB17	Sol rhizosphérique	<i>Stenotrophomonas maltophilia</i>	99,74	MZ540009
RTB19	Sol rhizosphérique	<i>Shewanella hafniensis</i>	99,85	ON340547
RTB36	Sol rhizosphérique	<i>Domibacillus robiginosus</i>	96,62	ON340548
B3	Sol rhizosphérique	<i>Shewanella putrefaciens</i>	99,83	ON340549
B13	Sol rhizosphérique	<i>Aeromonas salmonicida</i>	99,9	ON340550
RDCL1	Sol rhizosphérique	<i>Priestia megaterium</i>	100	ON340551
RSAB3	Sol rhizosphérique	<i>Pseudomonas veronii</i>	99,72	MZ540010
CS2	Sol rhizosphérique	NI	/	/
SA10	Sol non rhizosphérique	<i>Bacillus thuringiensis</i>	99,91	ON340552
SA14	Sol non rhizosphérique	<i>Bacillus subtilis</i>	98,15	MZ540011
SA17	Sol non rhizosphérique	<i>Bacillus subtilis</i>	100	ON340553
SA26	Sol non rhizosphérique	<i>Priestia aryabhatai</i>	99,33	ON340554
SA37	Sol non rhizosphérique	<i>Bacillus thuringiensis</i>	99	OK562380
SA44	Sol non rhizosphérique	<i>Priestia megaterium</i>	100	ON340555
SA53	Sol non rhizosphérique	<i>Bacillus velezensis</i>	99,29	ON340556
SA55	Sol non rhizosphérique	<i>Lysinibacillus fusiformis</i>	99,7	ON340557
SA59	Sol non rhizosphérique	<i>Cellulosimicrobium cellulans</i>	100	ON340558
SA60	Sol non rhizosphérique	<i>Bacillus amyloliquefaciens</i>	100	ON340559
SA61	Sol non rhizosphérique	<i>Bacillus atrophaeus</i>	99,79	ON340560
SA62	Sol non rhizosphérique	<i>Bacillus siamensis</i>	100	OK562381
SA64	Sol non rhizosphérique	<i>Bacillus subtilis</i>	99,19	ON340561
SA68	Sol non rhizosphérique	<i>Bacillus marisflavi</i>	99,76	ON340562
SA70	Sol non rhizosphérique	<i>Lysinibacillus mangiferihumi</i>	99,37	ON340563
SA71	Sol non rhizosphérique	<i>Micrococcus luteus</i>	99,9	ON340564
SA74	Sol non rhizosphérique	<i>Bacillus velezensis</i>	99,8	ON340565
SG4	Sol non rhizosphérique	<i>Bacillus thuringiensis</i>	99,27	ON340566
SA87	Sol non rhizosphérique	<i>Bacillus toyonensis</i>	98,56	MZ540012
SAX	Sol non rhizosphérique	<i>Bacillus amyloliquefaciens</i>	99	OK562382

NI : espèce non identifiée

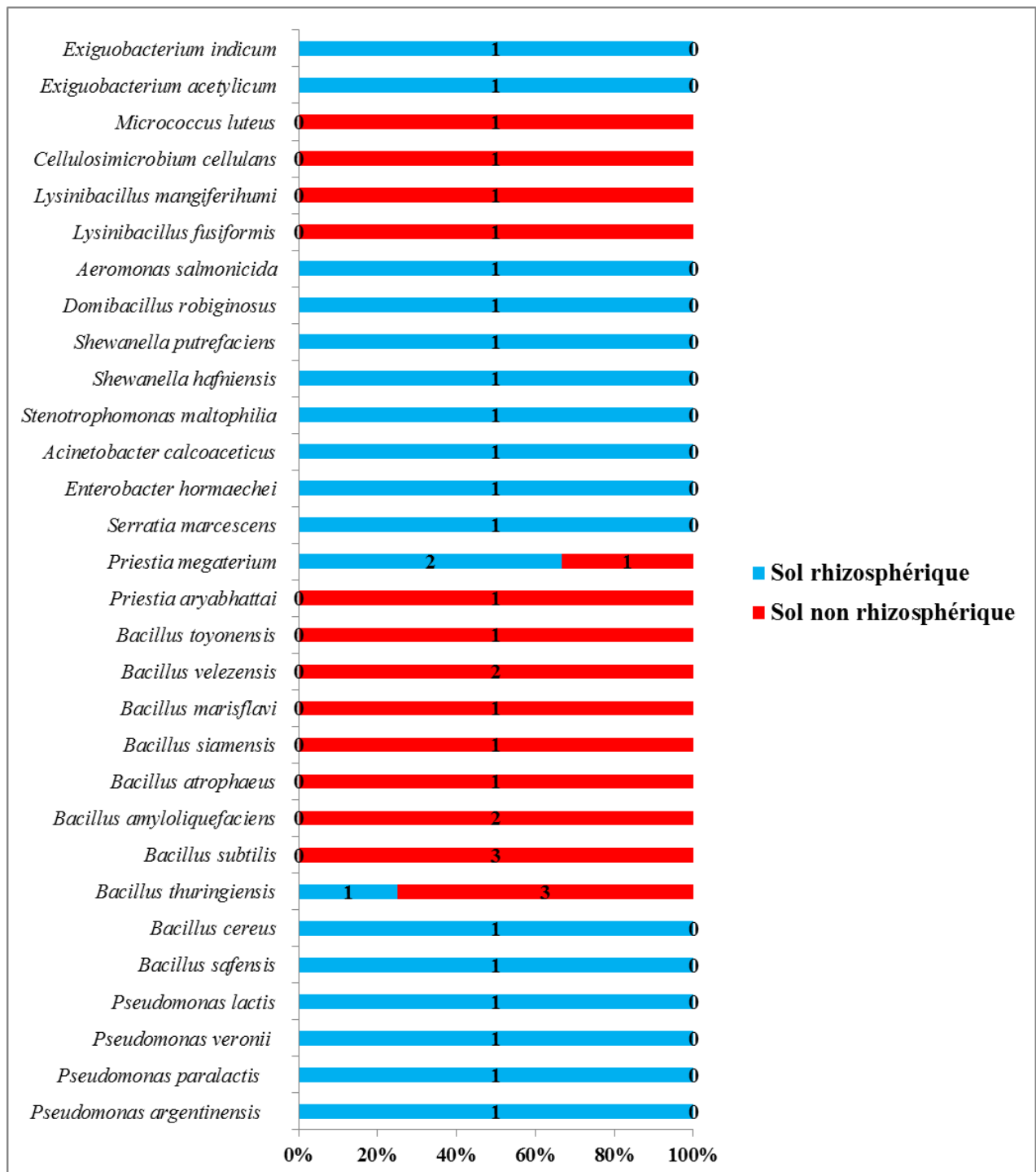


Figure 22 : Répartition des espèces identifiées

II.4. Effet *in vivo* contre *B. cinerea*

Les résultats de l'effet protecteur des isolats testés contre *B. cinerea* souche BC1 ont montré un haut degré de variabilité (Figure 23 A) ; (ANOVA appliqué aux valeurs de l'AUDPC : $P <$

0,0001 ; $F= 129,22$). Il en va de même pour les deux autres souches de *B. cinerea* (BCJ2 et ALG66) (ANOVA : $P < 0,0001$; $F= 82,85$ pour BCJ2 et $P < 0,0001$; $F= 17,95$ pour ALG66).

Comparés aux isolats non rhizosphériques, les isolats du sol rhizosphérique sont montrés plus efficaces contre les trois souches de *B. cinerea* (Figure 24) ; (test t de Student, $P < 0,05$ pour les trois souches de *B. cinerea*).

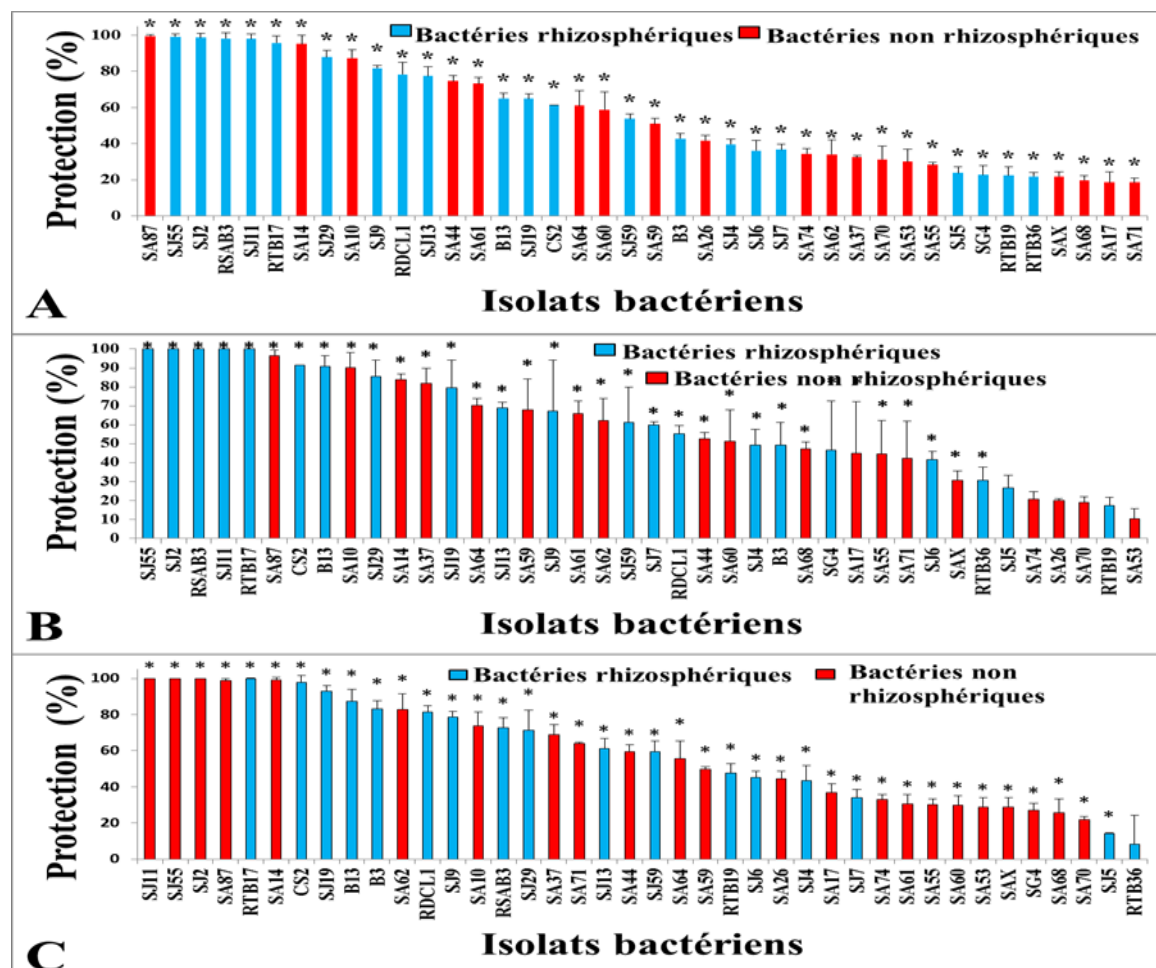


Figure 23 : Effet protecteur des 40 isolats sélectionnés (20 isolats rhizosphériques (barres bleues) et 20 isolats non-rhizosphériques (barres rouges)) sur plantes et sur segments de tiges de tomate contre trois souches de *B. cinerea* ; A : souche BC1 (test réalisé sur plantes entières de tomate); B: souche ALG66 (test réalisé sur segments de tiges de tomate); C: souche BCJ2 (test réalisé sur segments de tiges de tomate). Chaque valeur représente la moyenne de trois répétitions effectuées indépendamment (chacun avec cinq répétitions par isolat bactérien et par souche de *B. cinerea*). Les barres d'erreur représentent l'écart type. Les étoiles indiquent une protection statistiquement significative ($P < 0,05$; test SNK appliqué aux valeurs de l'AUDPC).

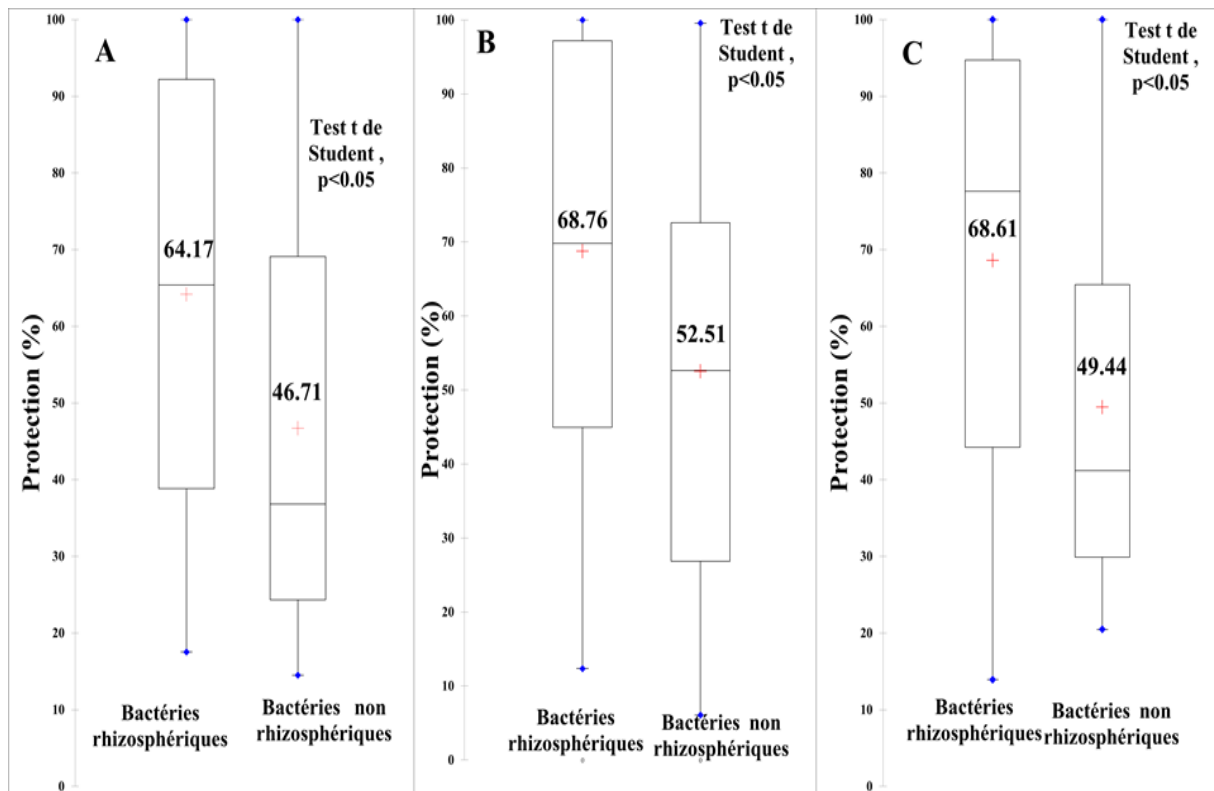


Figure 24 : Comparaison entre l'effet *in vivo* des bactéries rhizosphériques et celui des bactéries non rhizosphériques contre trois souches de *B. cinerea* ; (A) : la souche BC1, (B) : la souche ALG66 et (C) : la souche BCJ2. Les lignes noires horizontales dans le centre des boîtes à moustache représentent la médiane. Les croix rouges représentent la moyenne. Les points bleus représentent les valeurs maximales et minimales.

Concernant la sensibilité des trois souches de *B. cinerea* vis-à-vis les 40 isolats sélectionnés, aucune différence significative n'a été enregistrée entre les trois souches (ANOVA : $P= 0,34$; $F= 1,07$).

Une corrélation positive entre l'effet protecteur *in planta* des isolats testés contre la souche BC1 et l'inhibition *in vitro* de la germination des spores de la même souche de *B. cinerea* (BC1) a été enregistrée (corrélation de Spearman : $P < 0,0001$, $R^2=0,627$) (Figure 25).

La maladie a été presque totalement réduite en présence de sept isolats, à savoir SJ2, SJ11, SJ55, RTB17, RSAB3, SA14 et SA87. Ces isolats ont été capables de protéger les plantes et les segments de tiges de tomates détachés avec un pourcentage moyen de protection supérieur à 90 % contre les trois souches de *B. cinerea*.

Sur la base de ces résultats, les sept isolats ont été sélectionnés pour les prochaines expériences (Figure 26).

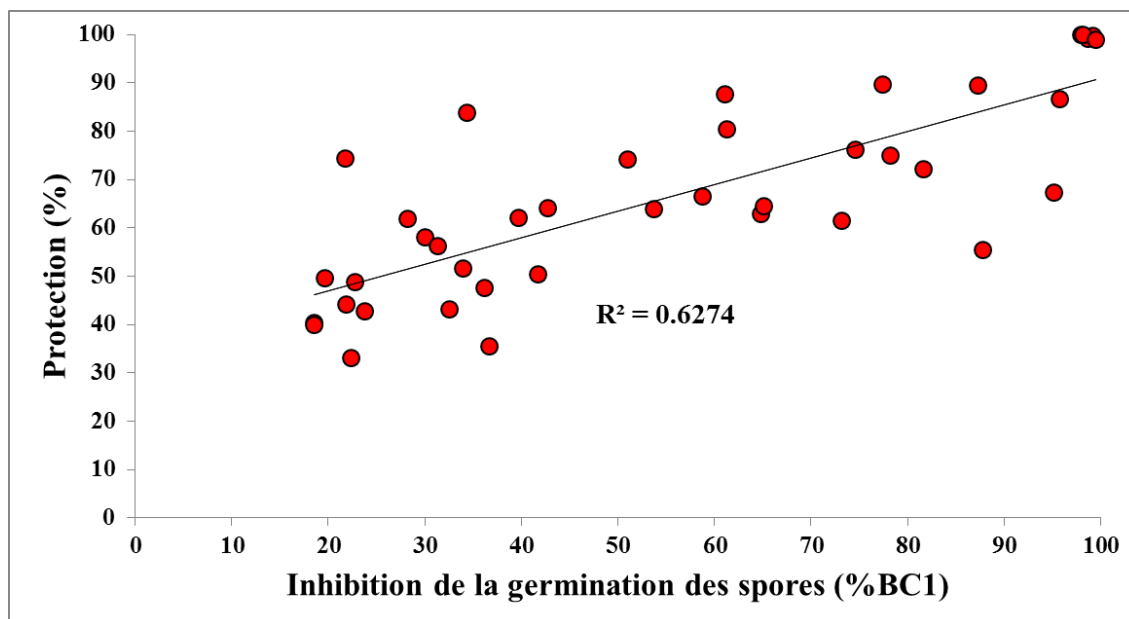


Figure 25 : Relation entre l'effet *in vitro* sur la germination des spores de BC1 et l'effet *in vivo* des quarante souches bactériennes sélectionnées (corrélations de Spearman : $P < 0,0001$, $R^2 = 0,627$).

II.5. Tests complémentaires réalisés sur la sélection des sept isolats bactériens

Les sept bactéries sélectionnées dans cette partie ont été identifiées comme; *Pseudomonas argentinensis* (SJ2), *Pseudomonas lactis* (SJ55), *Pseudomonas veronii* (RSAB3), *Bacillus subtilis* (SA14), *Bacillus toyonensis* (SA87), *Stenotrophomonas maltophilia* (RTB17) et *Serratia marsecens* (SJ11).

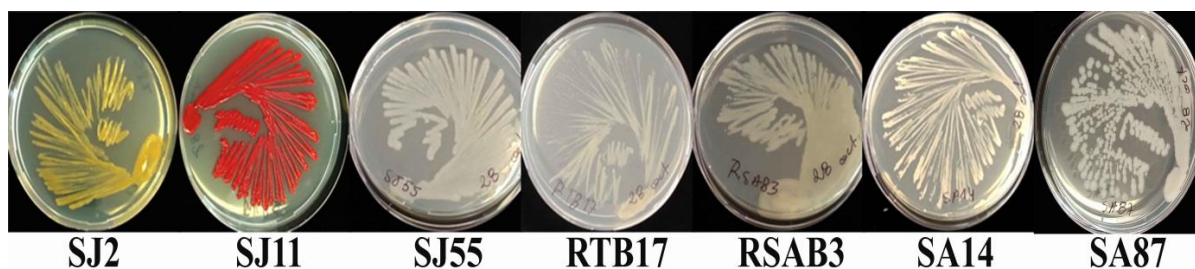


Figure 26 : Aspect macroscopique des sept bactéries sélectionnées sur gélose ordinaire

II.5.1. Effet *in vivo* de différentes concentrations des isolats sélectionnés contre *B. cinerea*

Quatre doses (10^8 UFC mL⁻¹, 10^7 UFC mL⁻¹, 10^6 UFC mL⁻¹ et 10^5 UFC mL⁻¹) pour chacune des bactéries sélectionnées sont préparées dans le but d'évaluer leur capacité à protéger les segments de tiges de tomates contre *B. cinerea* (souches BC1 et BCJ2).

En fait, à l'exception des isolats SA14 et RSAB3, l'application des autres isolats aux concentrations de 10^8 UFC mL⁻¹ et de 10^7 UFC mL⁻¹ a permis de protéger les tiges de tomates détachées contre les deux souches de *B. cinerea* avec plus de 60 % d'efficacité (Figures 27 et 28).

Par ailleurs ; pour les deux autres doses (10^6 UFC mL⁻¹ et 10^5 UFC mL⁻¹), le pourcentage de protection des segments de tiges contre les deux souches pathogènes variait entre -23% et 91%.

Dans le cas de la souche BC1, toutes les concentrations testées des isolats SJ2 et RSAB3 ont été capables de protéger les segments de tiges de tomate contre cette souche de pathogène (>35%).

Cependant, pour la souche BCJ2, les isolats SJ2 et SJ11 ont eu l'effet le plus important avec un taux de protection supérieur à 30% à toutes les doses testées.

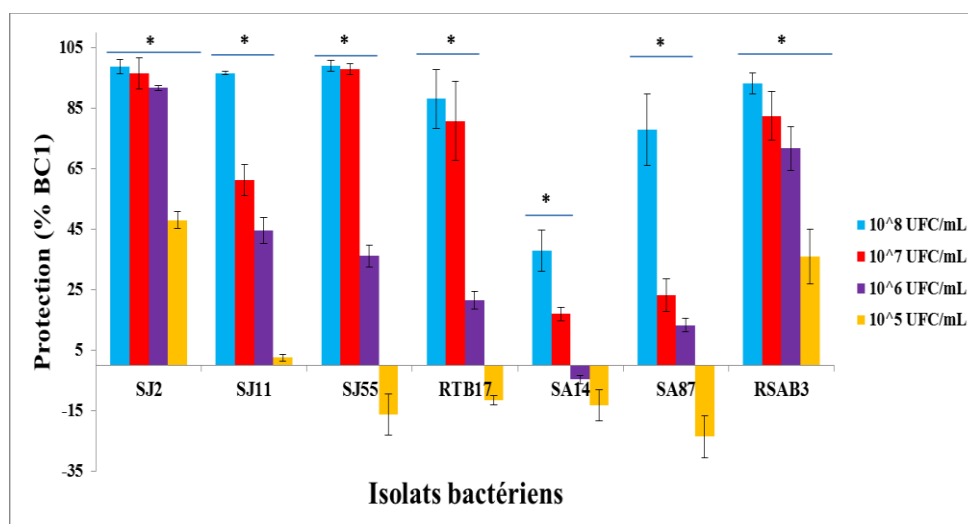


Figure 27 : Effet de différentes doses des bactéries sélectionnées contre la souche BC1 de *B. cinerea*. Le test a été réalisé en utilisant des segments de tiges de tomate détachés. Les valeurs du pourcentage de protection représentent la moyenne des trois répétitions \pm écart type (barres verticales au-dessus des histogrammes). Les étoiles au-dessus des histogrammes montrent une différence significative dans le pourcentage de protection par rapport au témoin non traité (test SNK appliqué aux valeurs de l'AUDPC ($P < 0,05$)).

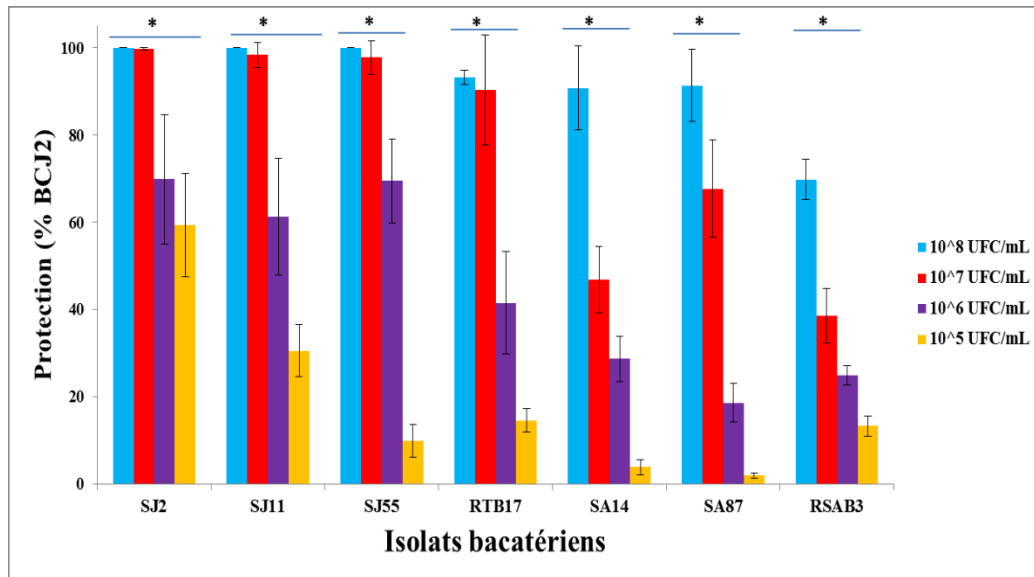


Figure 28 : Effet de différentes doses des bactéries sélectionnées contre la souche BCJ2 de *B. cinerea*. Le test a été réalisé en utilisant des segments de tiges de tomate détachés. Les valeurs du pourcentage de protection représentent la moyenne des trois répétitions \pm écart type (barres verticales au-dessus des histogrammes). Les étoiles au-dessus des histogrammes montrent une différence significative dans le pourcentage de protection par rapport au témoin non traité (test SNK appliqué aux valeurs de l'AUDPC ($P < 0,05$)).

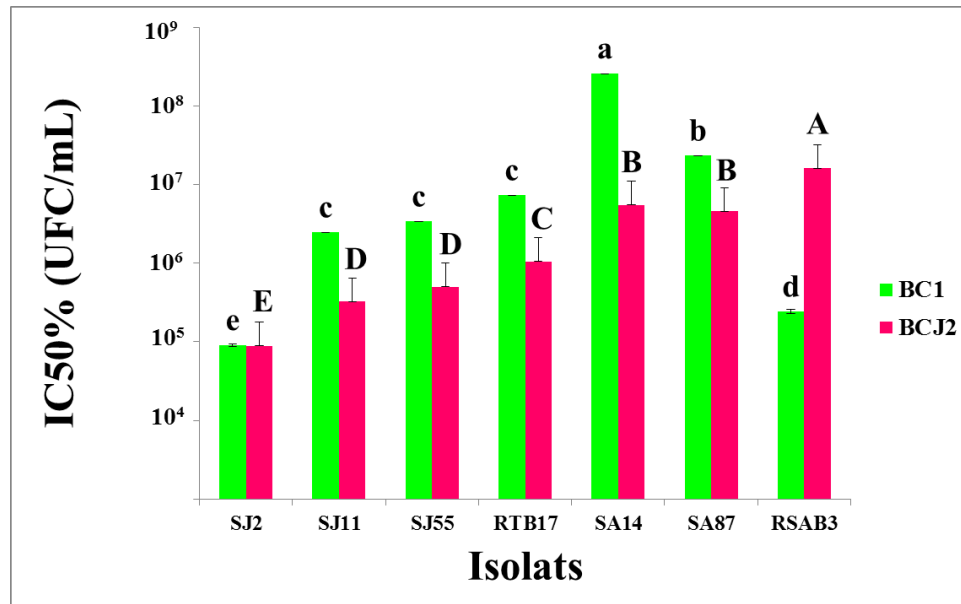


Figure 29 : Les concentrations inhibitrices médianes ($IC_{50\%}$) des différentes souches bactériennes sélectionnées contre deux souches de *B. cinerea* (BC1 et BCJ2). Les valeurs de l' IC_{50} représentent la moyenne des trois répétitions \pm écart type (barres verticales au-dessus des histogrammes). Les lettres différentes (minuscule pour la souche BC1 et majuscule pour la souche BCJ2 de *B. cinerea*) au-dessus des histogrammes montrent une différence significative dans les $IC_{50\%}$ des différentes bactéries (test SNK, $P < 0,05$)).

II.5.2. Effet *in planta* sur l'oïdium de la tomate

Les résultats obtenus concernant le test d'antagonisme *in planta* contre l'oïdium de la tomate ont révélé que tous les isolats bactériens sélectionnés ont été capables de protéger d'une manière significative les plantes de tomate contre l'oïdium avec un pourcentage de protection allant de 33 % à 75 % (test SNK appliqué aux valeurs de nombre de taches par la surface foliaire (cm²) ; $P < 0,05$) (Figure 30).

SJ11 et RSAB3 sont les isolats les plus efficaces avec respectivement 75,72% et 76,15% de protection (ANOVA; $F= 15,12$; $P < 0,0001$).

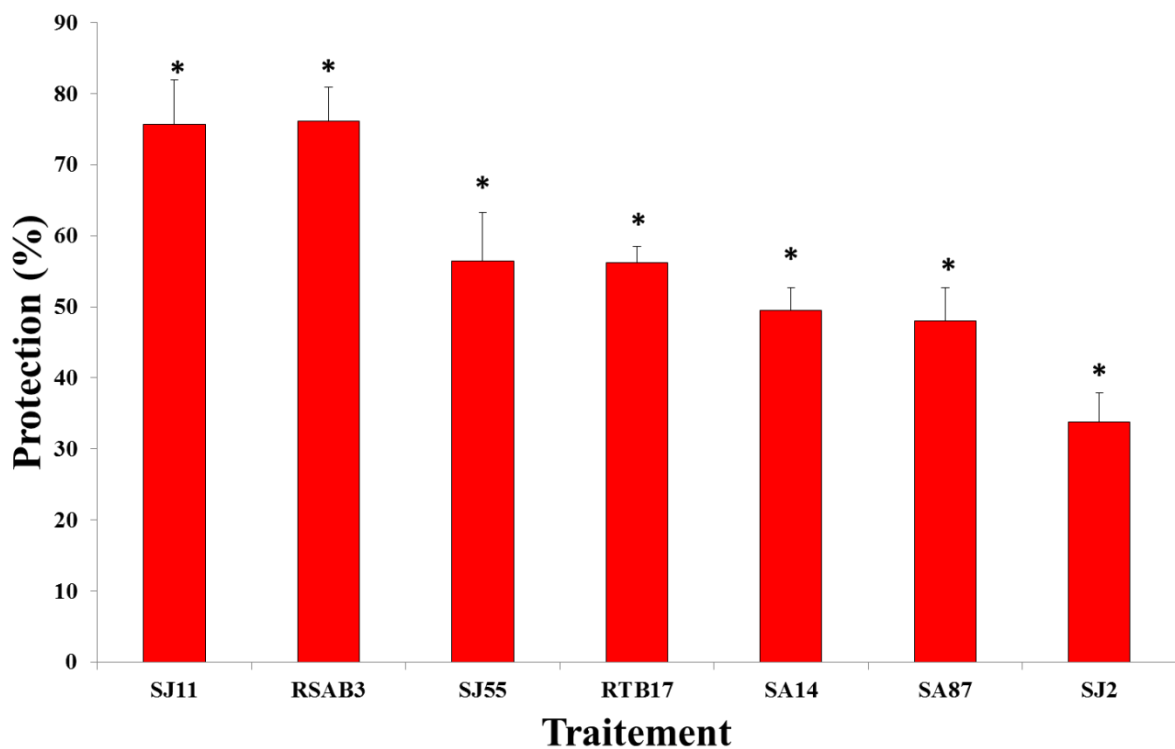


Figure 30 : Effet antagoniste *in planta* des sept isolats bactériens sélectionnés contre l'*O. neolycopersici*. Des plantes de tomate entières ont été utilisées pour réaliser ce test. Les valeurs du pourcentage de protection représentent la moyenne des trois répétitions \pm écart type (barres verticales au-dessus des histogrammes). Les étoiles au-dessus des histogrammes montrent une différence significative dans le pourcentage de protection par rapport au témoin non traité (test SNK appliqué aux valeurs de nombres de taches par cm² de feuilles ($P < 0,05$)).

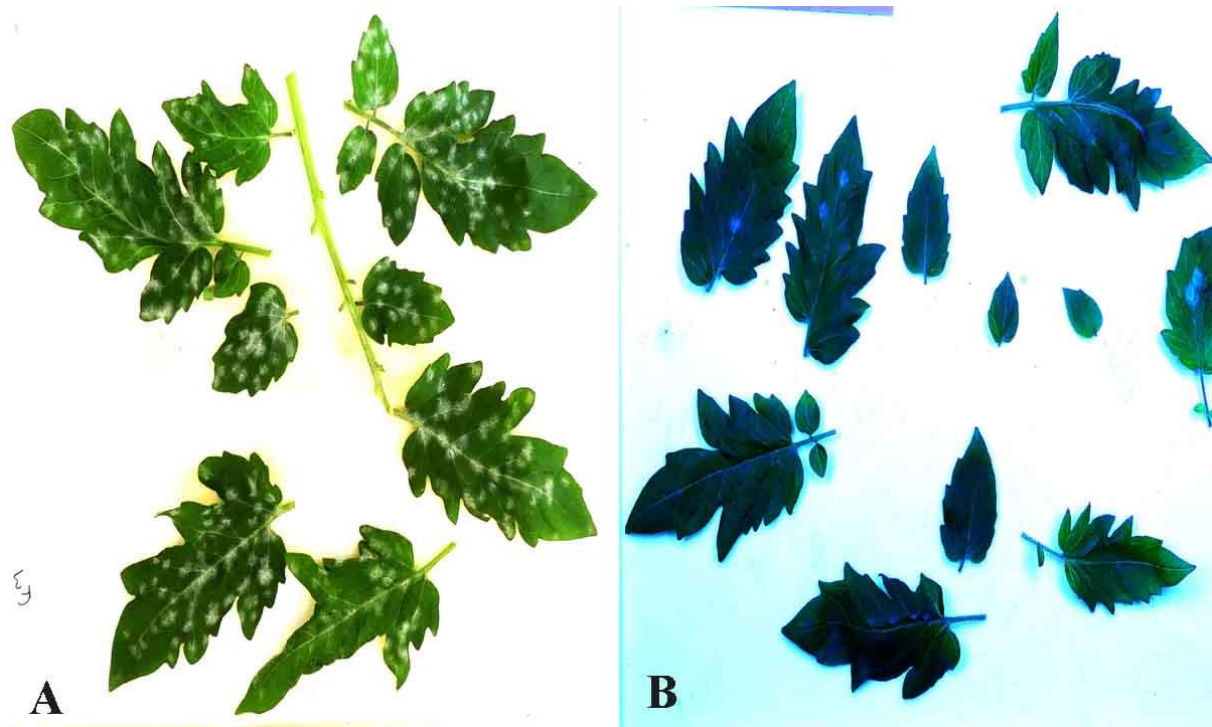


Figure 31 : Effet antagoniste de l'isolat bactérien SJ11 contre l'oïdium de la tomate. (A) : folioles non traités (témoins), (B) : folioles traités avec l'isolat SJ11.

II.5.3. Effet antagoniste contre autres champignons phytopathogènes

II.5.3.1. Effet *in vitro* par confrontation directe

A l'exception de *Fusarium oxysporum* f. sp. *radicis-lycopersici* (FORL), les autres champignons semblent sensibles aux souches bactériennes testées (Tableau 6). Un effet antagoniste significatif ($P < 0,05$, test SNK appliqué aux valeurs de la croissance mycélienne des champignons) a été enregistré en présence de toutes les bactéries. Concernant FORL, seules SA87 et SA14 ont été capables d'inhiber significativement sa croissance mycélienne ($P < 0,05$ pour les deux antagonistes).

S. sclerotiorum est le champignon le plus sensible avec une moyenne de pourcentage d'inhibition de croissance mycélienne supérieure à 50%.

Par ailleurs, SA14 est la souche antagoniste la plus efficace (moyenne de PGI > 59%) suivie de SA87 (PGI > 49%). Ces deux bactéries ont montré leur efficacité contre tous les champignons étudiés. Cependant, RSAB3 et SJ55 sont les bactéries les moins efficaces avec des moyennes des pourcentages d'inhibition de la croissance mycélienne ne dépassant pas 17%.

Tableau 6 : Effet antagoniste *in vitro* (confrontation directe) des sept bactéries sélectionnées contre huit champignons phytopathogènes

Antagonistes	Pathogènes							
	<i>Bipolaris sp</i>	FOM	FORL	<i>G. candidum</i>	<i>M. scaetiae</i>	<i>S. sclerotiorum</i>	<i>A. alternata</i>	<i>P. digitatum</i>
SJ2	14,57 ±2,17 d	15,07±3,14 c	0 c	5,43±2,8 f	36,44±9,7 cd	50,71±1,83 c	66,4±8,7 b	25,72±5,42 b
SJ11	13,45 ±5,77 d	23,8±3,57 b	0 c	38,2 c	51,97±2,11 b	66,85±2,25 a	28,57±9,44 c	14,05±4,01 c
SJ55	15,13 ±2,74 d	7,93±3,14 d	0 c	4,49±3,44 f	19,49±15,99 e	52,69±2,27 c	26,19±3,76 c	10,37±8,06 c
RSAB3	16,52 ±3,27 d	24,6±5,95 b	0 c	10,11±4,21 e	27,96±12,71 de	22,53±2,28 e	14,02±1,86 d	10,06±6,92 c
RTB17	21,83±3,42 c	24,6±5,95 b	0 c	17,6±2,8 d	37,85±11,21 cd	34,22±3,06 d	28,83±1,86 c	16,2±4,14 c
SA14	49,74±1,77 b	64,28±2,06 a	65,87±3,14 a	67,22±6,12 a	74,57±3,66 a	58,79±2,79 b	68,25±2,91 ab	30,32±2,68 b
SA87	55,33±2,44 a	23,01±5,18 b	43,12±16,38 b	46,62±4,86 b	44,91±3,66 bc	65,29±1,37 a	72,75±2,69 a	42,29±2,91 a

Les valeurs représentent la moyenne de trois expériences répétées indépendamment (chacune avec 3 répétitions élémentaires) ± écartype.

Dans une colonne, les lettres différentes indiquent une différence significative entre les valeurs de chaque modalité et le témoin, selon les tests SNK appliqués aux valeurs de la croissance mycélienne des champignons ($P < 0,05$).

II.5.3.2. Effet *in vivo*

La figure 32 montre que toutes les bactéries sélectionnées ont eu la capacité d'inhiber significativement la croissance des champignons cibles ($P < 0,05$; test SNK appliqué aux valeurs de l'AUDPC pour *M. scaetiae* et aux valeurs des surfaces des lésions pour les autres champignons).

Avec une moyenne d'efficacité supérieure à 84%, la souche SJ55 s'est révélée la plus efficace parmi les sept souches bactériennes testées (Figure 33) suivie de SJ11 (plus de 75%) et SJ2 (plus de 69%).

Par ailleurs, *M. scaetiae* est le pathogène le plus résistant avec une moyenne de pourcentage de protection supérieure à 60%, suivi de *G. candidum* (plus de 63%) et *P. digitatum* (plus de 62%). Cependant *A. alternata* est le pathogène le plus sensible (plus de 70%).

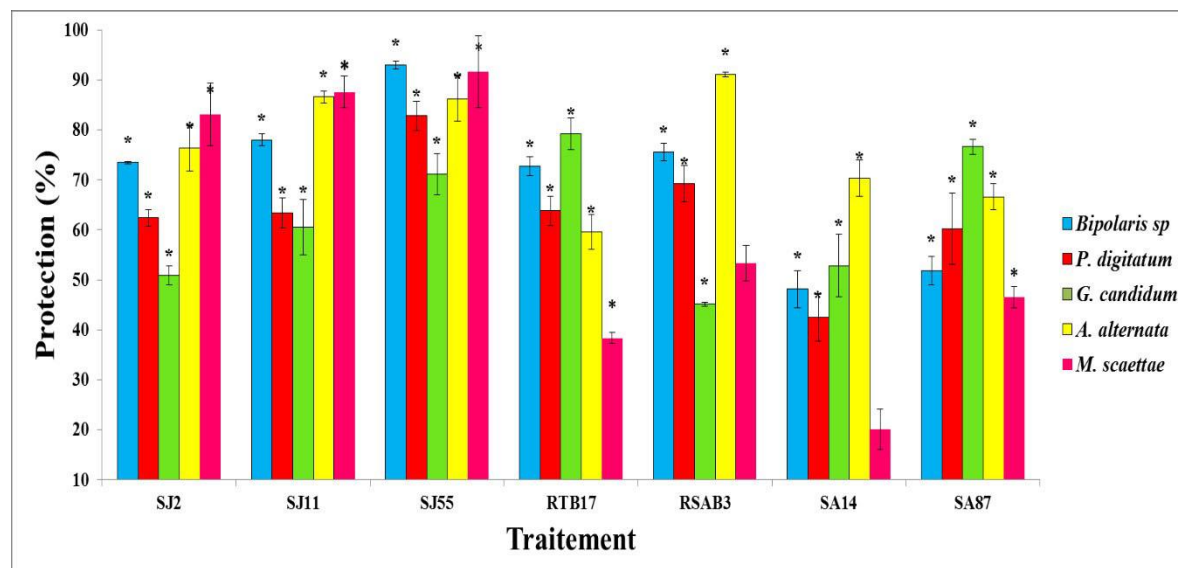


Figure 32 : Effet antagoniste *in vivo* des sept bactéries sélectionnées sur cinq champignons phytopathogènes. Le test a été réalisé sur fruits de citron (pour *G. candidum*), pommes (pour *Bipolaris sp*), mandarine (pour *P. digitatum*), tomates (pour *A. alternata*) et sur segments d'épillettes de palmier dattier (pour *M. scaetiae*). Les valeurs du pourcentage de protection représentent la moyenne des trois répétitions \pm écart type (barres verticales au-dessus des histogrammes). Les étoiles au-dessus des histogrammes montrent une différence significative dans le pourcentage de protection par rapport au témoin non traité ($P < 0,05$; test SNK appliqué aux valeurs de l'AUDPC pour *M. scaetiae* et aux valeurs des surfaces des lésions pour les autres champignons)

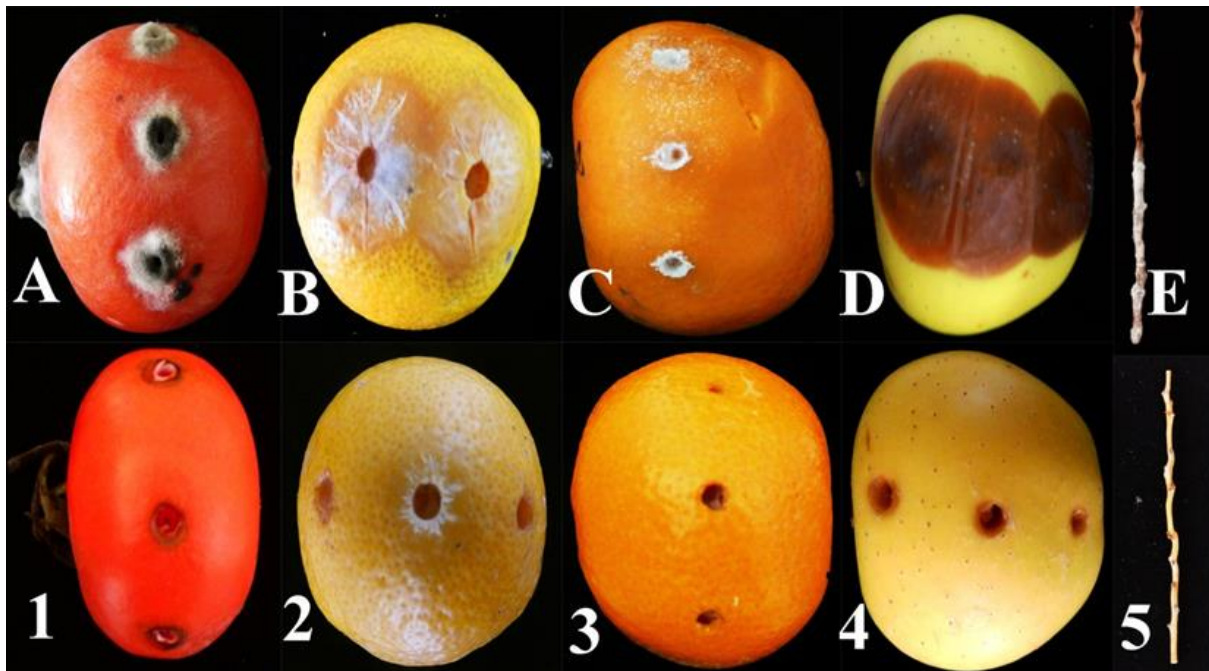


Figure 33 : Effet antagoniste *in vivo* de la souche SJ55 (la plus efficace) sur 5 champignons phytopathogènes. Les témoins sont désignés par les lettres A-E, cependant les chiffres 1-5 désignent les résultats obtenus après le traitement avec la souche SJ55.

II.5.4. Promotion de la croissance de la tomate

II.5.4.1. Germination des graines et paramètres morphométriques

Après le traitement des graines de tomate avec les sept bactéries sélectionnées, le pourcentage de germination a augmenté de manière non significative de 85% à 90% en comparaison avec les graines témoins (Test SNK, $P > 0,05$) (Figure 34). Le pourcentage de germination des graines le plus élevé (90,66 %) a été enregistré en présence de l'isolat RSAB3. L'ANOVA à un facteur a révélé l'absence de toute différence significative entre les valeurs de pourcentage de germination (ANOVA, $F = 1,51$; $P = 0,23$).

En comparaison avec le témoin non traité, le traitement des graines de tomate avec les isolats SJ2 et RSAB3, a significativement stimulé la croissance de la partie racinaire des plantules avec 40,22 % et 23,31 % respectivement (test SNK ; $P < 0,05$ pour SJ2 et RSAB3) (Figure 35).

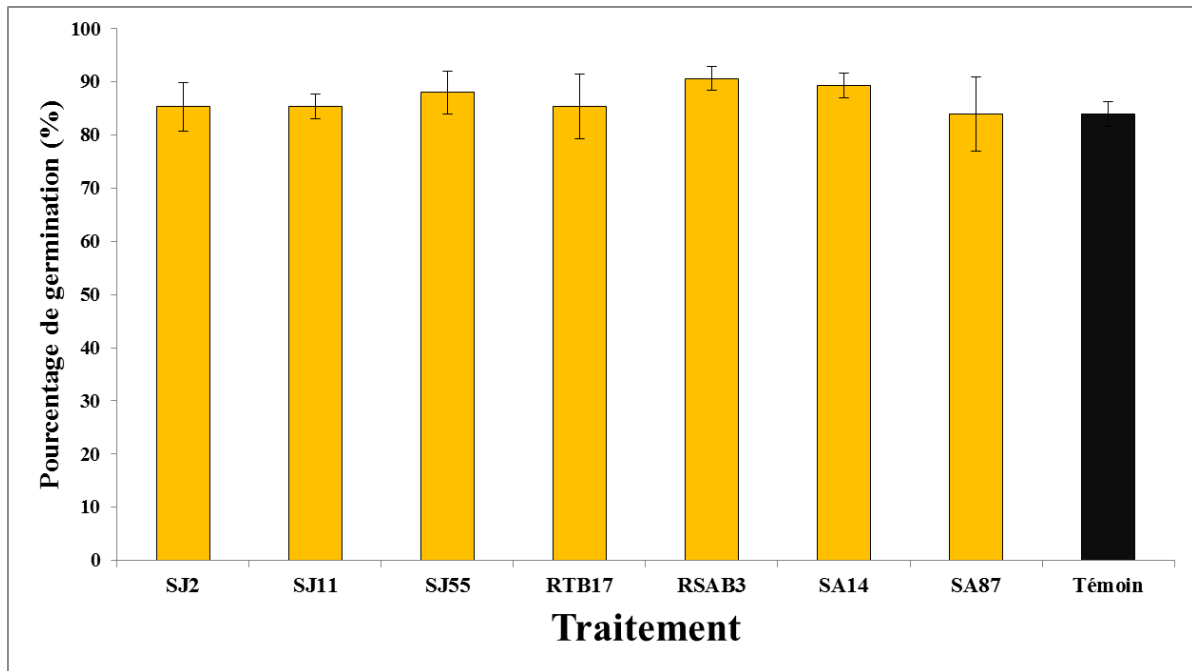


Figure 34 : Effet des bactéries sélectionnées sur la germination des graines de tomate. Les valeurs du pourcentage de germination représentent la moyenne des trois répétitions indépendantes \pm écart type (barres verticales au-dessus des histogrammes).

Par ailleurs, à l'exception des isolats SA14 et RTB17, tous les autres isolats sélectionnés ont été capables de stimuler d'une manière significative la croissance de la partie aérienne des plantules de tomate (test SNK ; $P < 0,05$ pour toutes les souches sélectionnées sauf pour la souche SA14 et RTB17).

SJ55, RSAB3, et SA87 sont les isolats les plus efficaces ; ils ont stimulé la croissance de la partie aérienne des plantules avec plus de 65, 36 et 54% respectivement (Figure 35).

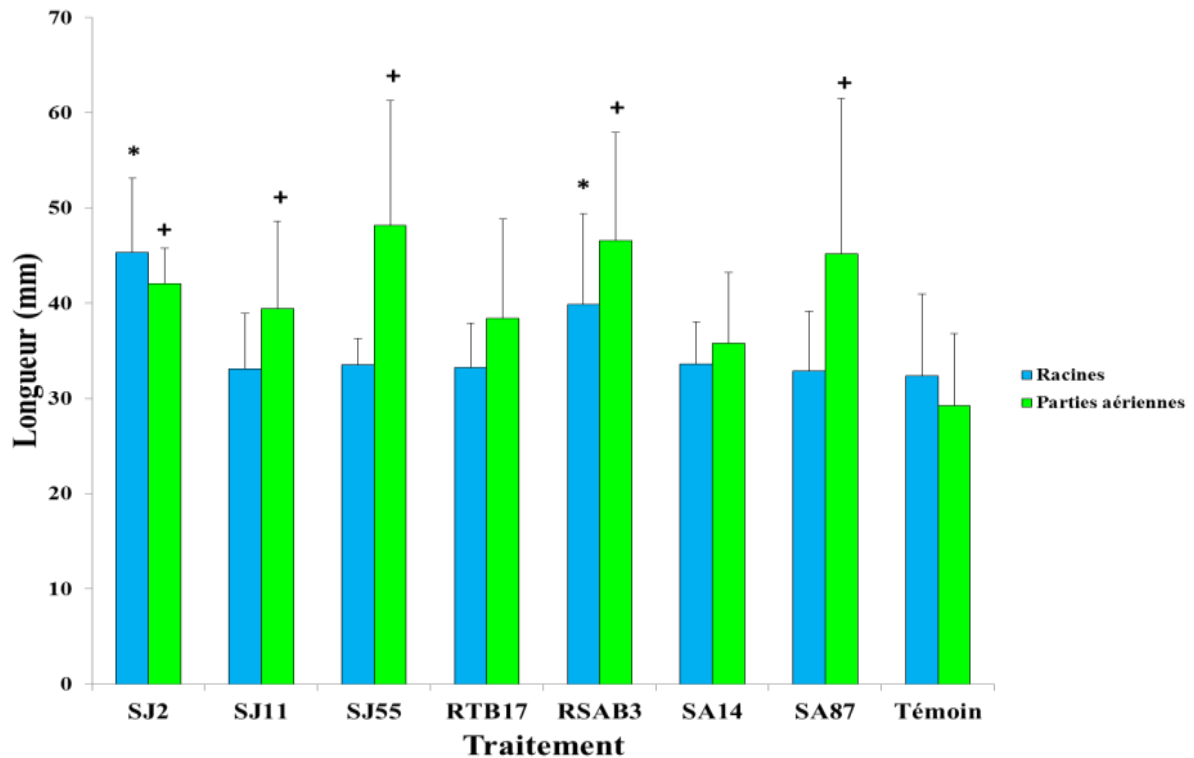


Figure 35 : Effet des bactéries sélectionnées sur la promotion de la croissance des tomates. Les valeurs de la longueur des racines et des parties aériennes représentent la moyenne de trois répétitions indépendantes \pm écart type (barres verticales au-dessus des histogrammes). Les symboles suivants : (*) et (+) signifient la présence d'une différence significative tel indiqué par le test SNK appliqué respectivement aux valeurs de la longueur des racines et des parties aériennes ($P < 0,05$)

Concernant l'indice de vigueur, seuls les traitements avec les isolats ; RSAB3, SJ2, SA87 et RTB17 ont pu significativement augmenter l'indice de vigueur (test SNK, $P < 0,05$).

La figure 36 révèle que RSAB3 est l'isolat le plus efficace avec une valeur d'indice de vigueur égale à 4218,71. Il a pu stimuler la croissance des plantules de tomate avec plus de 72 %, suivi de SJ2, SA87 et RTB17 avec une augmentation significative de l'indice de vigueur égale à : 57,76 %, 54,84 % et 33,58% respectivement.

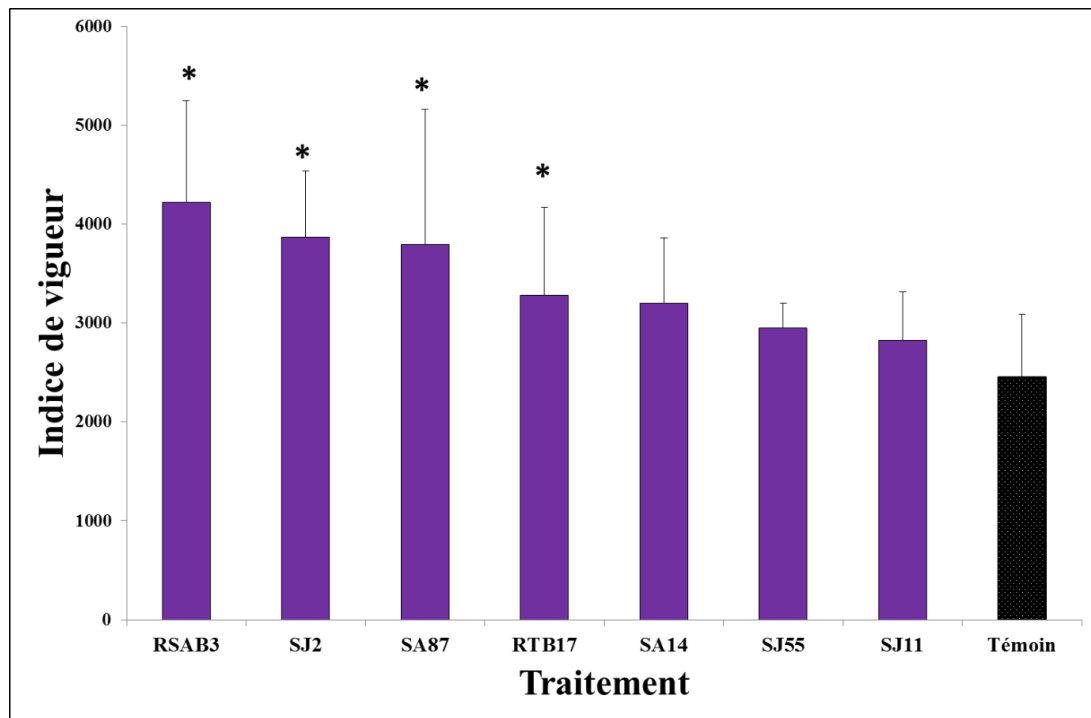


Figure 36 : Indice de vigueur des plantules de tomates traitées avec les sept bactéries sélectionnées. Les valeurs de l'indice de vigueur représentent la moyenne des trois répétitions indépendantes \pm écart type (barres verticales au-dessus des histogrammes). Les étoiles au-dessus des histogrammes montrent une différence significative dans les valeurs de l'indice de vigueur par rapport au témoin non traité (test SNK ; $P < 0,05$).

II.5.5. Pathogénicité et induction d'hypersensibilité (HR)

Aucune présence de nécroses autour des points d'inoculation des feuilles de tabac avec les sept bactéries sélectionnées n'a été enregistrée (Figure 37). De même pour les plantes entières de tomates, les chicots inoculés avec les suspensions bactériennes des bactéries n'ont présenté aucune nécrose.

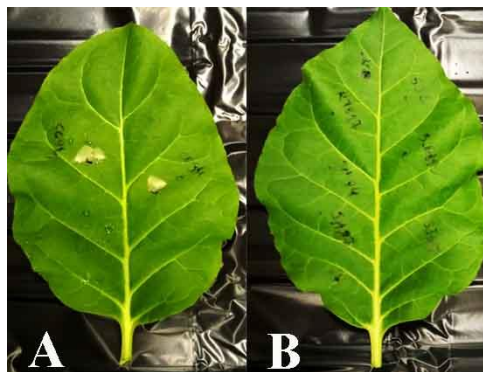


Figure 37 : Feuilles de tabac (après incubation) inoculées avec la souche CC94 de *P. syringae* (A) et les bactéries sélectionnées (B)

II.6. Effet d'*Acinetobacter calcoaceticus* SJ19 et *Bacillus safensis* SJ4 sur *Botrytis cinerea*

II.6.1. Effet *in vitro*

II.6.1.1. Confrontation directe

Pour le test de confrontation directe, les deux isolats bactériens ont significativement inhibé la croissance mycélienne des 5 souches de *B. cinerea* (Tableau 7 et Figure 38 ; $P < 0,05$; les tests SNK sont appliqués aux valeurs de la croissance mycélienne des colonies fongiques).

Avec des taux d'inhibition moyens de 43,7 à 69,0 %, l'isolat SJ4 a montré un niveau d'inhibition plus élevé contre les souches de *B. cinerea* que l'isolat SJ19 (inhibition de 11,9 à 38,6 %).

II.6.1.2. Confrontation indirecte

Les deux isolats bactériens ont inhibé de manière significative la croissance mycélienne de *B. cinerea* (souche BC21) par la production des composés volatils antifongiques (test SNK ; $P < 0,05$ pour SJ4 et SJ19) ; (Tableau 7 et Figure 38).

L'isolat SJ4 a révélé une inhibition significativement plus élevée que SJ19.

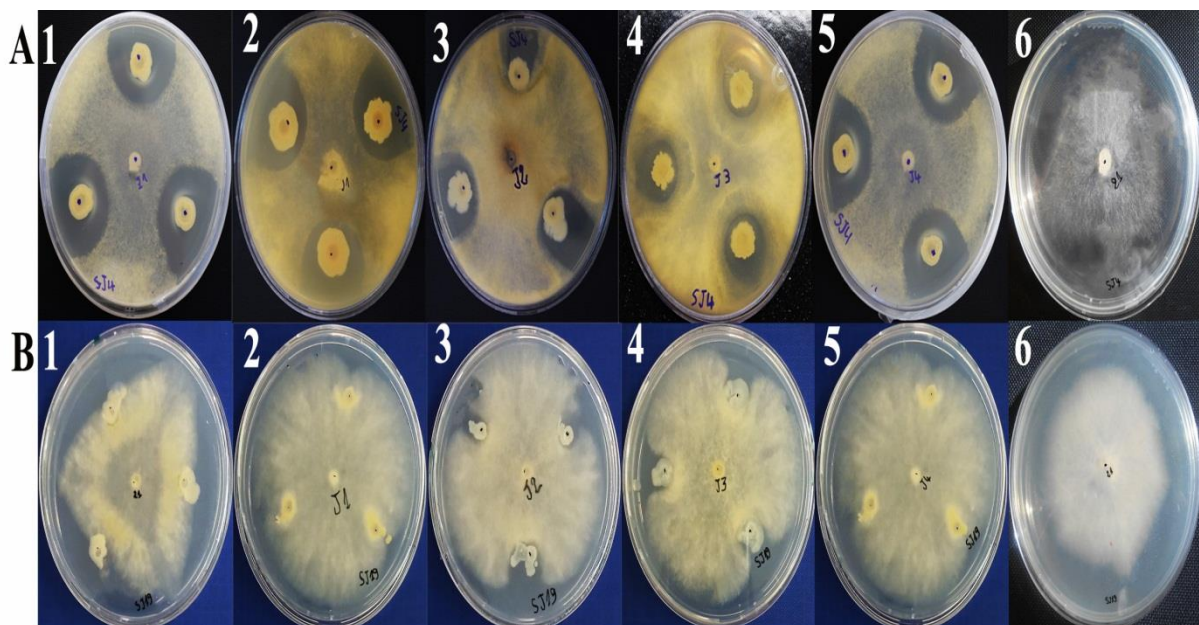


Figure 38 : Effet *in vitro* des deux isolats bactériens (SJ19 et SJ4) contre 5 souches de *B. cinerea*. Les tests ont été effectués à 22°C en utilisant le milieu PDA. Les résultats de l'effet direct *in vitro* sont désignés par les lettres numérotées A1-A5 pour SJ4 et B1-B5 pour SJ19. Les effets indirects de SJ4 et SJ19 sont respectivement notés ; A6 et B6. Les nombres 1 à 5 représentent respectivement les souches fongiques BC21, BCJ1, BCJ2, BCJ3 et BCJ4.

II.6.2. Effet *in planta*

Sur plantes entières de tomates, le traitement immédiat des plaies après l'inoculation du pathogène a entraîné un effet protecteur significatif contre *B. cinerea* (test SNK appliqué aux valeurs de l'AUDPC; $P < 0,05$) (Figure 39).

Avec un indice de protection de 72,1%, l'isolat SJ19 est significativement plus efficace que SJ4 (52,3%) (test SNK; $P < 0,05$).

La combinaison (1:1) des deux bactéries a eu le plus grand effet protecteur (87,8%), suggérant que ces antagonistes peuvent fonctionner ensemble pour protéger les plantes de tomate contre *B. cinerea*.

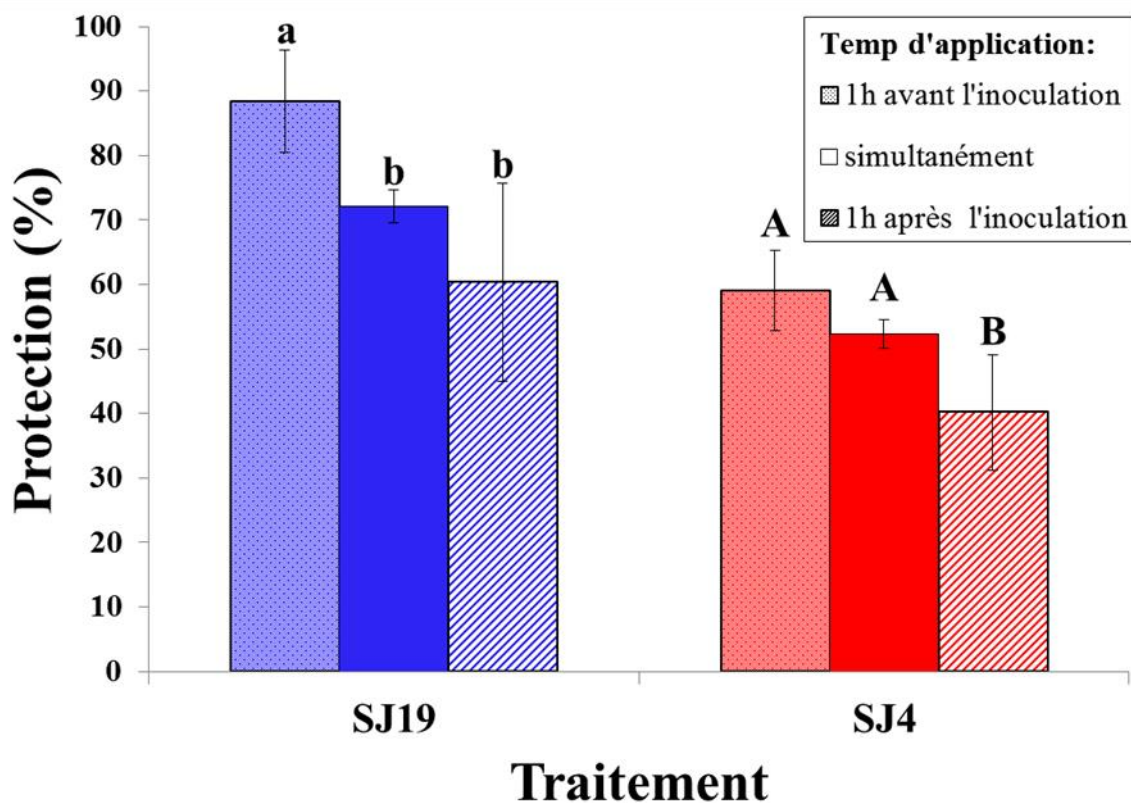


Figure 39 : Effet protecteur des deux isolats bactériens (SJ19 et SJ4) contre *B. cinerea* souche BC21 sur plantes de tomate. Les bactéries ont été appliquées 1 h avant (▨), simultanément (□), ou 1h après (▩) l'inoculation du pathogène (souche BC21). Des plantes de tomates de six semaines (variété Clodano; Syngenta, Suisse) ont été utilisées (cinq plantes par modalité). Tous les traitements ont conféré une protection significative contre l'agent pathogène, par rapport aux plantes témoins non traitées (test SNK ; $P < 0,05$). Pour une souche bactérienne donnée, les différentes lettres au-dessus des barres d'erreur indiquent des différences significatives (test SNK ($P < 0,05$) appliqué aux valeurs de l'AUDPC)). Chaque valeur représente la moyenne de trois répétitions indépendantes \pm écart type.

Tableau 7 : Effet *in vitro* des deux isolats bactériens SJ14 et SJ19 contre plusieurs souches de *B. cinerea*

Isolats	Espèces bactériennes	Numéro d'accès GenBank	Inhibition de la croissance mycélienne (%) ¹					
			Confrontation directe					Composés volatils
			BC21	BCJ1	BCJ2	BCJ3	BCJ4	BC21
SJ4	<i>Bacillus safensis</i>	OK562384	69.02 ± 5.35 Δ	59.52 ± 1.59 Δ	43.65 ± 6.88 Δ	57.94 ± 1.06 Δ	66.67 ± 1.59 Δ	46.22 ± 2.92 Δ
SJ19	<i>Acinetobacter calcoaceticus</i>	OK562383	38.67 ± 0.5 Δ	19.84 ± 2.12 Δ	23.02 ± 1.06 Δ	22.22 ± 1.06 Δ	11.90 ± 2.51 Δ	36.02 ± 1 Δ
<p>Les valeurs représentent la moyenne de trois expériences répétées indépendamment (chacune avec 3 répétitions élémentaires) ± écartype.</p> <p>¹ Dans une colonne, les symboles Δ indiquent une différence significative entre les valeurs de chaque modalité et le témoin, selon les tests SNK appliqués aux valeurs des croissances mycéliennes des souches fongiques (P < 0, 05).</p>								

L'application des isolats bactériens sur les plaies, 1h avant ou après l'inoculation du *B. cinerea* souche BC21 a également protégé les plaies de tomates contre le pathogène (test SNK; $P < 0,05$; Figure 39). Le niveau de protection le plus élevé a été observé, pour les deux isolats bactériens, lorsque le traitement a été appliqué une heure avant l'inoculation (Figure 39).

Pour le prétraitement avec SJ4 et SJ19 (1h avant l'inoculation de *B. cinerea*), les symptômes ne sont apparus qu'après quatre et cinq jours respectivement. Après cette phase de latence la maladie a augmenté sur les plants de tomates avec 1,9 mm par jour pour SJ4 et 0,49 mm par jour pour SJ19.

II.6.3. Effet des deux bactéries sur la croissance des tomates

Aucune augmentation significative du taux de germination des graines n'a été enregistrée après le trempage dans les suspensions des deux bactéries (test de Mann-Whitney, $P=0,3$ pour SJ4 et $P= 0,072$ pour SJ19), cependant, l'indice de vigueur des plantules a été augmenté de 52 et de 23%, respectivement, chez les graines trempées dans la suspension bactérienne de SJ19 (test SNK, $P < 0,0001$) et de SJ4 (test SNK, $P= 0,006$); (Figure 40).

Un mois après le traitement par « drench » des plantules dont leurs graines ont été trempées dans la suspension de la même bactérie (avant un mois), les indicateurs de croissance des plantes ont également montré un effet significatif des bactéries, par rapport aux témoins non traités.

En comparaison avec les témoins non traités, les traitements avec l'isolat SJ19 ont significativement amélioré la longueur des racines et des parties aériennes de 99 et de 43 %, respectivement (test SNK, $P < 0,05$). Cependant, le traitement avec l'isolat SJ4 a amélioré d'une façon significative ces deux paramètres de 88 et de 45%, respectivement, (test SNK, $P < 0,05$) (Figure 41).

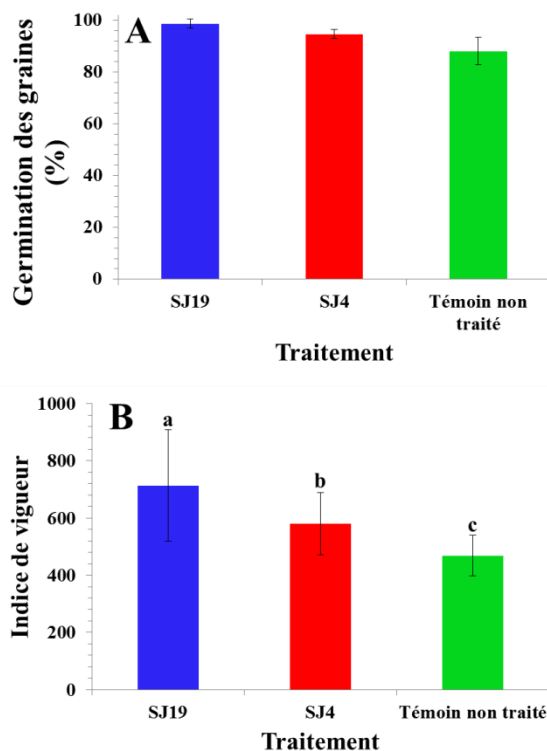


Figure 40 : Effet des traitements des graines de tomates avec les deux isolats bactériens sur la germination et l'indice de vigueur. Les graines traitées ont été trempées pendant deux heures dans des suspensions contenant 10^9 UFC mL^{-1} , tandis que les graines témoins ont été trempées dans l'eau distillée stérile. Chaque valeur représente la moyenne de trois expériences répétées indépendamment \pm écart type. Il n'y avait pas de différence significative entre les traitements pour la germination des graines (test SNK ; $P > 0,05$). Pour l'indice de vigueur des graines, les différentes lettres au-dessus des barres indiquent des différences significatives entre les traitements selon le test SNK ($P < 0,05$).

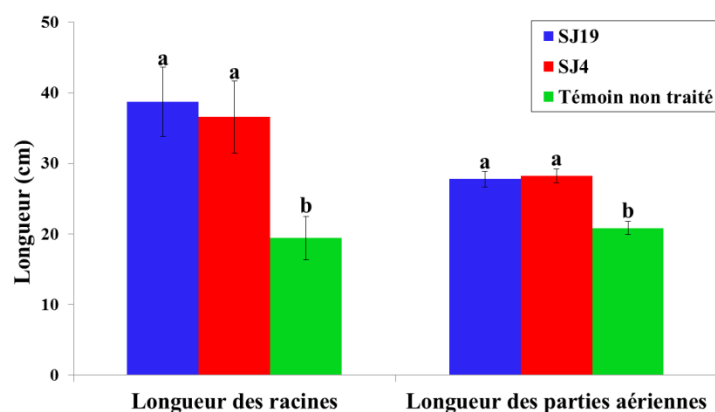


Figure 41 : Effet des deux bactéries (SJ19 et SJ4) sur la longueur des racines et des parties aériennes des tomates quatre semaines après le deuxième traitement. Chaque valeur représente la moyenne de trois répétitions effectuées indépendamment \pm écart type. Pour un type d'organe de tomate donné, les différents nombres au-dessus des barres indiquent des différences significatives entre les traitements selon le test SNK ($P < 0,05$).

De même, les traitements avec les deux bactéries ont considérablement augmenté le poids frais des parties aériennes des plantules (test SNK, $P < 0,05$; Figure 42). Par rapport aux plantes témoins, le poids frais des parties aériennes a été augmenté de 102 et de 83 % et celui des racines de 69 et 58 %, respectivement, en présence de SJ19 et SJ4.

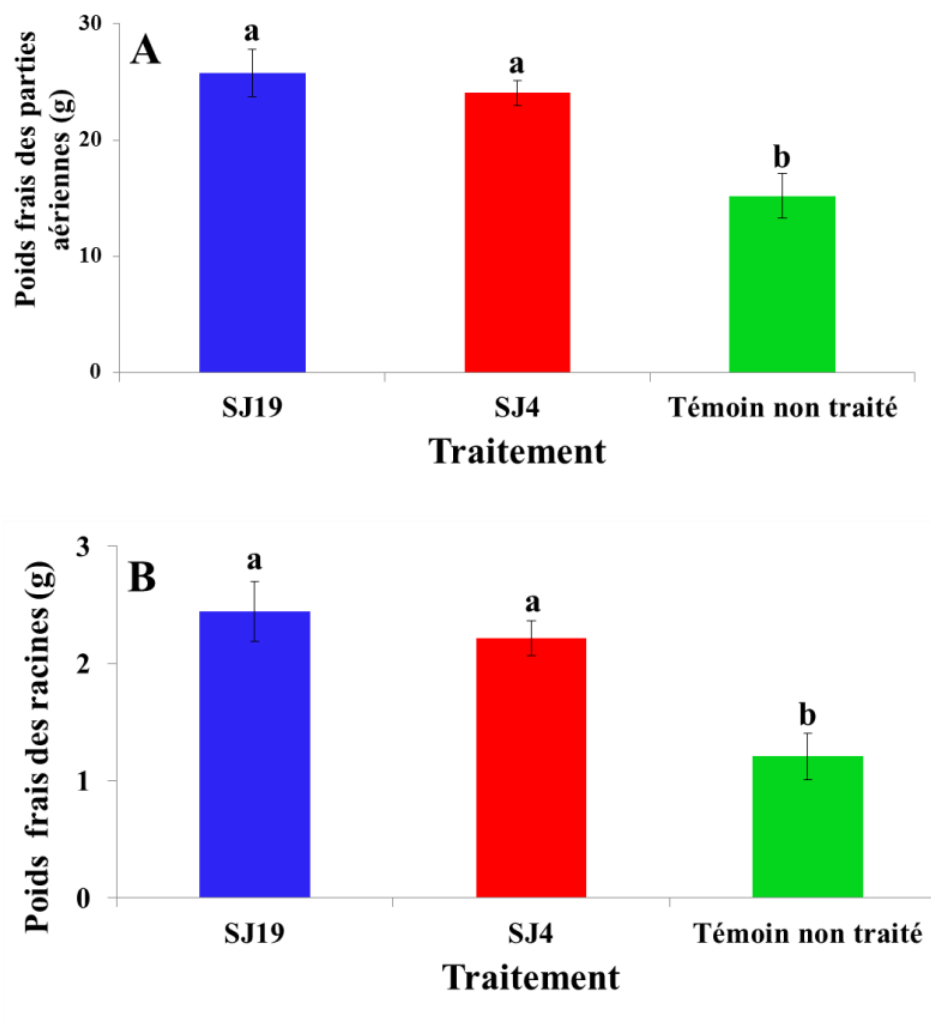


Figure 42 : Effet des différents traitements sur le poids frais des parties aériennes (A) et des racines (B) des plantules de tomate. Chaque valeur représente la moyenne de trois répétitions effectuées indépendamment \pm écart type. Pour un type d'organe végétal donné, les différents chiffres au-dessus des barres indiquent des différences significatives entre les traitements selon le test SNK ($P < 0,05$).

Le traitement des plantules de tomates avec les deux bactéries a également eu un effet positif sur le diamètre de la tige, le nombre de feuilles et la teneur en chlorophylle (Tableau 8).

Tableau 8 : Effet des traitements avec les deux bactéries rhizosphériques sur le diamètre de la tige, la teneur en chlorophylle et le nombre de feuilles des plants de tomates

Traitements	Diamètre de la tige (mm)	Teneur en chlorophylle (SPAD)	Nombre de feuilles
Témoin	6.8 ± 0.24 b	38.09 ± 2.46 b	5.6 ± 0.48 b
SJ4	7.6 ± 0.56 b	43.71 ± 1.27 a	7.2 ± 0.32 a
SJ19	8.3 ± 0.24 a	44.97 ± 1.60 a	7.2 ± 0.32 a

Les valeurs représentent les moyennes de 15 répétitions ± écart type. Dans une colonne, les mêmes lettres à côté de chaque valeur indiquent qu'il n'y a pas de différence significative comme indiqué par le test SNK (P<0,05).

II.6.4. Pathogénicité et induction de la réponse d'hypersensibilité

Suite à l'application des deux isolats bactériens sur les plaies des plantes de tomate, aucun symptôme de la maladie n'a été observé.

De même, aucune nécrose ou autre symptôme n'a été observé suite à l'inoculation des feuilles de tabac avec les deux bactéries.

III. Discussion

Le principal succès de la première partie de la présente thèse, est l'identification et la sélection de sept isolats bactériens avec un potentiel de biocontrôle très important sur la tomate contre l'un de ses principaux pathogènes fongiques ; *B. cinerea*. Le séquençage de l'ADNr 16S a permis d'identifier les sept isolats. Ces derniers appartiennent à quatre genres différents : SJ2 (*P. argentinensis*), SJ55 (*P. lactis*) et RSAB3 (*P. veronii*) sont rattachés au genre *Pseudomonas*, tandis que SA14 (*B. subtilis*) et SA87 (*B. toyonensis*) font partie du genre *Bacillus*. Les isolats : SJ11 (*S. marcescens*) et RTB17 (*S. maltophilia*) sont respectivement affiliés aux genres *Serratia* et *Stenotrophomonas*.

A notre connaissance, il s'agit du premier rapport d'un effet protecteur sur tomate contre *B. cinerea* par des isolats de *Pseudomonas lactis* et *Pseudomonas argentinensis*, alors que les cinq autres espèces examinées et sélectionnées dans notre étude ont été décrites auparavant comme agents de lutte biologique contre *B. cinerea* y compris en Algérie.

Il s'agit également du premier signalement de la présence dans les sols algériens de *P. argentinensis*, une espèce qui a été décrite pour la première fois en Argentine en 2005 (Peix et

al., 2005). Cette bactérie peut présenter un intérêt particulier pour la production végétale car il a été démontré qu'elle résiste à de fortes concentrations de NaCl et qu'elle stimule la croissance de la moutarde (*Brassica juncea* L.) par la production de plusieurs métabolites secondaires (Phour et Sindhu, 2020).

La première étape de ce travail consiste à isoler des antagonistes bactériens efficaces contre *B. cinerea*. 142 isolats (69 isolat rhizosphériques et 73 isolat non rhizosphériques). En termes de nombre de bactéries isolées, il n'y a pas une grande différence entre les deux types de sol. Cela, ne reflète pas forcément la richesse des sols examinés. En fait, plusieurs travaux ont prouvé la différence entre le sol non-rhizosphérique (dit sol en vrac) et le sol rhizosphérique, que se soit en termes de diversité ou en termes d'abondance de microorganismes (Reinhold-Hurek et al., 2015). En général, dans un sol rhizosphérique, le nombre des bactéries par gramme du sol peut être 10 à 1000 fois supérieur à celui des bactéries du sol non rhizosphérique (Köhl et al., 2019).

En outre, le sol comme plusieurs autres matrices environnementales peut contenir des bactéries dites viables mais non cultivables, ce genre de bactéries ne peut ni croître ni se développer sur les milieux ordinaires couramment utilisés en microbiologie (Giagnoni et al., 2017). De même, selon Ling et al, (2022) plusieurs facteurs, comme le type du sol, le taux d'humidité, la température, le pH, le couvert végétal, et les exsudats des plantes peuvent influencer la composition du microbiote du sol.

Les tests d'activité *in vitro* des 142 isolats bactériens contre *B. cinerea* et qui sont menés au début de ce travail ont permis de constater qu'en plus de la différence d'efficacité entre les bactéries du sol rhizosphérique et celles du sol non rhizosphérique (pour le test de confrontation directe), une grande variabilité a été enregistrée en ce qui concerne la capacité inhibitrice des 142 bactéries. Cette différence peut être expliquée par le fait que les sols examinés hébergent des bactéries appartenant à différents genres ou espèces bactériennes. Ces dernières sont très diversifiées dans le sol et peuvent agir par différents modes d'action y compris la production des composés diffusibles capables d'inhiber *B. cinerea* sur boîte de Pétri.

Pareil pour la production des composés volatils évaluée dans la deuxième étape de ce travail, une différence du pouvoir inhibiteur de ces substances produites par 37 bactéries parmi les 40 bactéries testées a été enregistrée, suggérant que les bactéries produisent des substances volatiles différentes avec un pouvoir anti-*B. cinerea* variable d'un isolat à l'autre. Selon

Audrain et al, (2015), plus de 1000 composés volatiles d'origine bactérienne sont identifiés, et la composition de ce volatilome bactérien est influencée par plusieurs facteurs tels que ; la chimie et la structure du sol de provenance, le pH, la disponibilité de l'eau et de l'oxygène dans le sol, la présence d'exsudats végétaux ou autres composés organiques...etc (Cellini et al., 2021).

En général, les genres bactériens auxquels appartiennent les sept isolats sélectionnés à la fin de la première partie de la thèse sont connus dans le domaine de la lutte biologique. Par exemple, les espèces du genre *Pseudomonas* (une centaine d'espèces) peuvent produire des métabolites secondaires diffusibles ou volatils et qui ont un effet antifongique important contre une large gamme de champignons phytopathogènes (Blanco, 2015 ; Sherwani et Khan, 2015). La pyrrolnitrine et le 2,4-diacétylphloroglucinol sont des métabolites secondaires à pouvoir antifongique produits par *P. fluorescens* et qui jouent un rôle très important dans la lutte biologique contre plusieurs champignons phytopathogènes (Mikani et al., 2008).

De même, les *Bacillus* agissent souvent par production des antibiotiques comme principal mode d'action (Fiddaman et Rossall, 1993), ils produisent des métabolites secondaires antifongiques (diffusibles ou volatils) comme les lipopeptides et autres différents types de molécules antibiotiques telles que la bacillomycine, la kanosamine, la surfactine fengycine, la zwittermicine A et l'iturine (Hang et al., 2005 ; You et al., 2021 ; Kamali et al., 2022 ; Vignesh et al., 2022).

S. marcescens est connue par son fameux pigment rouge non diffusible, ce dernier est un métabolite secondaire connu sous le nom de « prodigiosine » qui agit comme composé antibactérien et antifongique contre les agents pathogènes des plantes (Someya et al., 2001; Alijani et al., 2022).

En outre, les espèces du genre *Stenotrophomonas* produisent plusieurs composés antifongiques tels que les xanthobaccines A, B et C. Ces derniers sont isolés à partir du filtrat de culture de la souche SB-K88 de *Stenotrophomonas* qui a pu supprimer la maladie de fonte des semis de betterave causée par *Pythium* spp. (Nakayama et al., 1999).

D'autre part, nos résultats corroborent ceux d'autres chercheurs algériens qui ont montré l'effet *in vitro* et/ou *in vivo* de certaines espèces de *Pseudomonas* (Rai et al., 2016., Bensidhom et al., 2018), *Bacillus* (Ait Kaki et al., 2017 ; Bouaoud et al., 2018 ; Oukala et al., 2021) et *Serratia* (Tabli et al., 2018) contre *B. cinerea*,

L'étude de l'effet antagoniste des bactéries sur la germination de spores de *B. cinerea* a permis de constater que toutes les souches sélectionnées ont exercé un fort pouvoir inhibiteur sur la germination des spores de *B. cinerea* (souche BC1). En fait, Inhiber la germination des spores d'un champignon pathogène par un agent de lutte biologique nécessite tout un arsenal de métabolites secondaires qui interviennent directement (dénaturation directe de la spore) ou indirectement (utilisation des nutriments du milieu avant la spore). Par exemple, Someya et al, (2001) ont montré le pouvoir inhibiteur de la souche B2 de *Serratia marcescens* sur la germination des spores de *B. cinerea*. Cette bactérie semblait capable de produire des chitinases (endochitinase et chitobiase) qui inhibent d'une façon significative la germination des spores de *B. cinerea*.

Il convient de rappeler que dans le cycle évolutif d'un champignon, le stade de la spore constitue une étape cruciale dans sa persistance dans l'environnement. Cette forme de résistance permet au champignon de se conserver dans les conditions les plus hostiles. Une fois les conditions deviennent favorables (généralement disponibilité de l'eau et de l'oxygène), la spore émet un tube germinatif qui sera par la suite à l'origine du mycélium du champignon ; c'est la germination, ce mécanisme permet au champignon de passer de l'étape de dormance à l'étape d'activité (Lepoivre, 2003 ; Sephton-Clark et Voelz, 2018).

Les 40 bactéries sélectionnées au début de ce travail ont eu la capacité de croître à toutes les températures testées. Cette caractéristique pourrait jouer un rôle très important dans la stabilité des souches dans les différentes conditions de terrain. En fait, un des facteurs pouvant influencer l'efficacité d'un agent de lutte biologique d'origine microbienne est la capacité de croître à différentes températures. Dans certains cas sur terrain, l'application de l'agent de biocontrôle peut être effectuée dans des températures élevées ou basses ce qui rend important d'avoir un agent de biocontrôle capable d'être stable et efficace dans ces conditions.

Concernant la production des enzymes, toutes les bactéries sélectionnées ont pu produire au moins un des cinq enzymes testées. En général, la production des enzymes hydrolytiques par un agent de lutte biologique joue un rôle primordial dans son pouvoir de biocontrôle. *Pseudomonas chlororaphis* souche PA23 est une bactérie capable de produire plusieurs enzymes hydrolytiques. Elle a un fort effet antagoniste contre le champignon phytopathogène *Sclerotinia sclerotiorum*. Cependant, le désarmement (élimination du gène GacS responsable de la production de la majorité de ses enzymes) de l'ADN de cette souche a significativement diminué son pouvoir inhibiteur envers *S. sclerotiorum* (Poritsanos et al., 2006).

Il est connu que les lipases produites par les agents de biocontrôle peuvent dégrader et inhiber la synthèse de quelques constituants membranaires des champignons tels que les stérols et les glycérophospholipides (Poritsanos et al., 2006). Par ailleurs, les protéases permettent à un agent de lutte biologique de dénaturer les enzymes hydrolytiques (comme les cutinases) utilisées par le champignon phytopathogène lors de l'infection de la plante hôte (Mansour et al., 1994 ; Elad et Kapat, 1999). De même, selon Mansour et al, (1994) et Elad et Kapat (1999), les protéases produites par les agents de lutte biologique stimulent la synthèse des auxines qui ont un rôle dans l'induction de la résistance de la plante.

D'autre part, 29 isolats parmi les 40 isolats sélectionnés au début de la première étape de travail (dont six isolats parmi les sept sélectionnées dans la fin de la première partie de travail), ont été capables de produire des sidérophores qui sont des piègeurs de fer de faible poids moléculaire et qui sont généralement produits par les PGPRs (avec autres organismes) pour piéger le fer extracellulaire. Ce dernier se trouve dans le sol principalement dans son état oxydé (Fer ferrique ou Fe^{3+}) qui est insoluble à pH neutre et basique et pour l'obtenir de l'environnement les microorganismes ont développé des mécanismes spécifiques d'acquisition du fer tels que la production des sidérophores (Roskova et al., 2022). Ce mécanisme se déclenche lorsque le milieu contient des petites quantités de fer (en traces) ce qui donne la chance aux bactéries pour l'utiliser au détriment et avant d'autres organismes tels que les pathogènes.

Généralement, les espèces de *Pseudomonas*, *Bacillus*, *Serratia* et *Stenotrophomonas* peuvent produire des sidérophores (Myo et al., 2019; Torres et al., 2020), des phytohormones et d'autres métabolites secondaires (Indiragandhi et al., 2008 ; Kang et al., 2009; Montes et al., 2016 ; Dhouib et al., 2019 ; Bharwad et Rajkumar, 2020 ; Sherpa et al., 2021).

Par ailleurs et contrairement aux tests sur plantes entières et sur segments de tiges de tomates détachés dont l'efficacité des bactéries sélectionnées était supérieure à 95 %, les tests *in vitro* de confrontation directe ont révélé que les sept souches sélectionnées ont inhibé de manière significative la croissance mycélienne de *B. cinerea*, mais avec divers degrés d'efficacité allant de 26 % à 65 %. RSAB3, SJ2 et SJ11 ont montré un faible effet sur les boîtes de Pétri contre *B. cinerea*, cependant, leur efficacité *in planta* sur plantes entières de tomate est supérieur à 98 % contre la même souche du pathogène.

Néanmoins, nos résultats ont également montré la présence d'une corrélation positive entre l'effet protecteur *in planta* des 40 bactéries contre la souche BC1 et l'effet inhibiteur de la

germination des spores de la même souche de *B. cinerea* (BC1). En revanche, à l'exception de cette corrélation, les résultats obtenus montrent que l'efficacité *in planta* ne reflète pas automatiquement l'efficacité *in vitro*. En fait, selon Bouaoud et al, (2018); pour un agent de lutte biologique, les tests *in vitro* ne sont pas un prédicteur fiable de l'efficacité *in planta*.

De même, nos résultats viennent confirmer que certains mécanismes d'action ne peuvent pas s'exprimer *in vitro* alors qu'ils peuvent jouer un rôle important sur les plantes. Selon Lepoivre (2003), un mécanisme d'action identifié *in vitro*, peut généralement orienter les recherches mais ne démontre pas l'efficacité sur plantes.

L'un des mécanismes d'action qui ne peuvent pas s'exprimer *in vitro* est la stimulation de la résistance de la plante par activation des mécanismes de défense tels que l'épaississement de la paroi cellulaire des tissus végétaux. Ce phénomène peut se produire sans contact direct entre l'agent pathogène et l'agent de biocontrôle (Elnahal et al., 2022).

Par exemple, pour éviter la plasmolyse et l'effondrement cellulaire après infection par *Fusarium graminearum*, une souche de *Bacillus velezensis* a pu induire l'épaississement de la paroi cellulaire végétale chez plusieurs types de plantes autour du site d'infection (Cantoro et al., 2021). Cette bactérie joue également un rôle primordial dans l'immunité des plantes en déclenchant l'expression des gènes de défense des plantes et en stimulant l'accumulation de H₂O₂ dans les feuilles (Jiang et al., 2018).

Quant aux autres champignons phytopathogènes, les sept bactéries retenues ont également exercé un effet inhibiteur *in vitro* contre huit autres champignons phytopathogènes (*S. sclerotiorum*, FORL, *G. candidum*, *M. scaetiae*, FOM, *A. alternata*, *Bipolaris* sp et *P. digitatum*).

Ces résultats viennent confirmer ceux de plusieurs chercheurs qui ont pu inhiber la croissance mycélienne de plusieurs champignons phytopathogènes y compris *B. cinerea* et cela en utilisant différentes espèces de : *Pseudomonas* (Mikani et al., 2008 ; Qessaoui et al., 2022), *Bacillus* (Hong et al., 2014 ; Mohammadi et al., 2017 ; Tian et al., 2020 ; Gorai et al., 2021 ; Kamali et al., 2022 ; Vignesh et al., 2022), *Stenotrophomonas* (Messiha et al., 2007 ; Schmidt et al., 2011) et *Serratia* (Tabli et al., 2019 ; Alijani et al., 2022).

Les sept isolats bactériens sélectionnés dans la présente étude ont également fourni une protection significative des plants de tomates contre l'oïdium. Avec des exceptions notables telles que des études menées par David et al, (2007) et Jacob et al, (2007) et des études axées

sur des formulations commerciales de la souche QST713 de *Bacillus subtilis* (désormais réaffectée à *Bacillus amyloliquefaciens*), le potentiel des bactéries en tant qu'agents de lutte biologique contre *O. neolycopersici* a reçu une attention limitée. À notre connaissance, il s'agit du premier rapport d'un effet de lutte biologique contre ce pathogène par les sept espèces bactériennes examinées dans la présente étude (à l'exception de *B. subtilis*).

Les bactéries retenues ont également eu un effet antagoniste contre *P. digitatum*, *A. alternata*, *G. candidum* et *Bipolaris* sp.

En effet, les genres bactériens des bactéries sélectionnées et leurs espèces sont également connus pour leur pouvoir de biocontrôle contre *B. cinerea* (Myo et al., 2019; Calvo et al., 2020 ; Hernández-Pacheco et al., 2021), *A. alternata* (Gorai et al., 2021), *P. digitatum* (Qessaoui et al., 2022) et contre autres champignons phytopathogènes (Zhang et Yuen, 2000 ; Azabou et al., 2020; Balderas-Ruiz et al., 2020; Guo et al., 2020; Torres et al., 2020).

Un autre résultat important obtenu dans cette étude, est la capacité des sept bactéries sélectionnées à protéger des épillets de palmier dattier contre *M. scaettae* l'agent causal de la pourriture des inflorescences du palmier dattier. Ce pathogène a été rapporté pour la première fois en Libye par Cavara (1925), cependant, jusqu'aujourd'hui, cette maladie reste encore peu étudiée et le seul moyen de lutte disponible consiste à utiliser des fongicides chimiques, brûler les spathes attaquées et suivre les méthodes prophylactiques (Djerbi, 1998).

De même, à notre connaissance, l'effet anti- *M. scaettae* de toutes les souches sélectionnées n'a été jamais enregistré auparavant.

Il convient de rappeler que parmi les sept bactéries sélectionnées, cinq souches (SJ2, SJ11, SJ55, RSAB3 et RTB17) ont été isolées à partir du sol rhizosphérique des plantes de tomate saines cultivées dans des serres hautement attaquées par *B. cinerea*. En comparaison avec les bactéries non rhizosphériques, les bactéries rhizosphériques ont montré une meilleure efficacité *in vivo* pour protéger les plantes de tomates, les épillets de palmier dattier et les différents fruits contre respectivement *B. cinerea* et *O. neolycopersici*, *M. scaettae* et les autres pathogènes responsables de pourriture poste-récolte.

En fait, au sein de la rhizosphère, des interactions intenses peuvent se produire entre les plantes, le sol et la microfaune en raison de la forte teneur en carbone et de l'énergie. Les racines des plantes libèrent dans la rhizosphère des exsudats qui attirent les différentes bactéries (Elnahal et al., 2022). Dans cet environnement très diversifié et riche, des bactéries

aux activités biotechnologiques intéressantes peuvent être isolées (Booth et al., 2022). Ces micro-organismes bénéfiques peuvent être sélectivement recrutées par les plantes pour les aider à faire face aux maladies et les rendre plus résistantes aux facteurs de stress environnementaux (Lahlali et al., 2022).

Par ailleurs, le sol rhizosphérique de la tomate est une source importante d'agents potentiels de lutte biologique d'origine microbienne efficaces contre un large éventail de pathogènes fongiques de la tomate et d'autres plantes (Hammami et al., 2013; Jangir et al., 2018; Zheng et al., 2019).

La présente étude a également révélé que quatre parmi les sept souches bactériennes sélectionnées sont capables d'améliorer de manière significative l'indice de vigueur des plantules de tomates. Elles ont également un effet stimulant la croissance des plantules de tomate en augmentant la longueur de leurs racines et de leurs parties aériennes.

Nos résultats concordent avec ceux des autres études qui ont montré l'effet PGPR des espèces bactériennes appartenant aux genres *Pseudomonas*, *Bacillus*, *Serratia* et *Stenotrophomonas*. Ces espèces favorisent la croissance d'un large spectre de plantes y compris la tomate (Dhouib et al., 2019 ; Myo et al., 2019; Torres et al., 2020), le sésame (Ali et al., 2018), le piment (Jiang et al., 2018 ; Torres et al., 2020), le concombre (Torres et al., 2020), le maïs (Balderas-Ruíz et al., 2020), les citrouilles (Torres et al., 2020) et *Arabidopsis thaliana* (Balderas-Ruíz et al., 2020).

A titre d'exemple, le séquençage du génome total de *P. veronii* a montré qu'il contient des groupes de gènes responsables de l'activité PGPR (Montes et al., 2016). Cette activité est généralement assurée par la synthèse de certaines phytohormones et métabolites secondaires.

Dans ça deuxième partie, le présent travail nous a également fourni des preuves de l'effet promoteur de la croissance des plantes de tomate et du potentiel de lutte biologique de deux bactéries isolées à partir du sol rhizosphérique dans le nord de l'Algérie (Jijel), qui sont identifiées comme *Acinetobacter calcoaceticus* (isolat SJ19) et *Bacillus safensis* (isolat SJ4).

La combinaison des tests *in vitro* et *in planta* réalisés dans cette partie de l'étude a permis de proposer des hypothèses sur le mode d'action possible impliqué dans la protection de la tomate contre l'un de ses principaux agents pathogènes, *B. cinerea*.

Des tests *in vitro* ont montré que la croissance mycélienne de *B. cinerea* est significativement inhibée par les deux isolats SJ4 et SJ19 avec plus ou moins d'efficacité. En concordance avec ces résultats, plusieurs études ont rapporté l'effet antagoniste *in vitro* des espèces de *Bacillus* (You et al., 2021) et d'*Acinetobacter* (Faria et al., 2021) contre plusieurs champignons phytopathogènes.

De même, les espèces appartenant à ces deux genres sont connues pour produire des composés antifongiques diffusibles et volatils (You et al., 2021).

En effet, dans cette partie d'étude, SJ4 et SJ19 ont réduit le développement de la maladie sur les plantes de tomates. Malgré cela, l'isolat SJ19 n'a pas été très efficace contre l'agent pathogène dans les boîtes de Pétri. A la lumière de nos résultats, l'efficacité de l'isolat SJ19 sur les plantes suggère qu'il peut intervenir par induction de la résistance des plantes. Ce mécanisme d'action a été mis en évidence par Trotel-Aziz et al, (2008) qui ont révélé la capacité de deux souches d'*Acinetobacter lwoffii* à induire les réactions de défense de la vigne contre *B. cinerea*.

Les espèces de *Bacillus* stimulent également les défenses des plantes contre un large éventail de maladies cryptogamiques. Alamri et al, (2019) ont montré que *B. subtilis* HQ656002 est capable d'induire des mécanismes de défense de la laitue contre la pourriture des racines causée par *Exserohilum rostratum* et *Fusarium oxysporum*. La protéine activatrice de la GTPase, qui joue un rôle important dans la défense des plantes contre les champignons pathogènes, est identifiée et les gènes de « défensine » sont exprimés en présence de cette bactérie.

Cette étude a également fourni des résultats qui pourraient soutenir l'hypothèse selon laquelle les isolats testés peuvent induire des mécanismes de défense sur les plants de tomates. L'application des deux bactéries, une heure avant l'inoculation de l'agent pathogène, a amélioré leur capacité à protéger les plantes de tomate contre *B. cinerea*, suggérant que ces isolats peuvent induire une réaction de défense des plantes de tomate contre l'agent pathogène et que ce mécanisme d'action n'a pas pu s'exprimer lui-même *in vitro* (au moins pour SJ19).

Selon Pascholati et Leite, (1995), la différence entre le temps de l'application de l'antagoniste et le temps de l'inoculation du pathogène joue un rôle important dans la protection conférée par un agent de lutte biologique. Par exemple, par rapport au traitement curatif (24 h après l'inoculation du pathogène), le traitement préventif (24 h avant l'inoculation du pathogène)

avec la souche QST713 de *Bacillus amyloliquefaciens* a mieux protégé les plantes d'haricot contre quatre mutants (parmi les 6 mutants testés) de *B. cinerea* (Samaras et al., 2021).

Par ailleurs, un effet synergique des deux bactéries SJ4 et SJ19 a été enregistré. Le mélange des deux antagonistes a renforcé l'effet protecteur contre *B. cinerea* sur plantes de tomate.

Ces résultats corroborent ceux d'autres recherches montrant que la combinaison de plusieurs PGPRs peut améliorer leur potentiel de lutte biologique (Sharma et al., 2018). Wu et al., (2018), ont trouvé que l'utilisation d'un mélange de *Trichoderma asperellum* souche GDFS1009 et de *Bacillus amyloliquefaciens* souche ACCC1111060 peut avoir un effet synergique dans le contrôle de *B. cinerea* (Mbachu et al., 2022).

De manière générale, les consortiums de PGPRs utilisés comme agents de biocontrôle ont l'avantage de pouvoir combiner leurs multiples caractères, notamment ceux qui sont difficiles à trouver dans une seule bactérie. Cette caractéristique joue un rôle essentiel dans l'amélioration de l'efficacité et de la fiabilité du contrôle des maladies des plantes (Wang et al., 2021 ; Mbachu et al., 2022).

En outre, les isolats SJ19 et SJ4 ont considérablement stimulé la croissance des plantes de tomate en augmentant l'indice de vigueur des graines, le nombre de feuilles, le diamètre de la tige, la teneur en chlorophylle, la longueur des racines et des parties aériennes et le poids frais des plantes. D'autres études ont trouvé des résultats similaires (Alamri et al., 2019). En effet, les espèces des genres *Acinetobacter* et *Bacillus* sont connues pour être des puissants promoteurs de croissance des plantes notamment les tomates (Indiragandhi et al., 2008; Xue et al., 2009; Kang et al., 2012; Syed-Ab-Rahman et al., 2019 ; Mohamed et al., 2020).

De même, l'effet PGPR dépend de la méthode d'inoculation ; Xue et al, (2009) ont montré que l'inoculation de la souche Xa6 d'*Acinetobacter sp.* par la méthode de « drench » a stimulé la croissance des tomates mieux que la méthode de trempage.

D'autre part, la capacité des espèces d'*Acinetobacter* à favoriser la croissance des plantes est souvent assurée par la synthèse de certains métabolites secondaires. Les espèces d'*Acinetobacter* peuvent synthétiser plusieurs types de métabolites secondaires impliqués dans la promotion de la croissance des plantes ; la gibberelline (Kang et al., 2009), l'ammoniac (Rashid et al., 2012; Kumari et al., 2018), l'IAA (Rashid et al., 2012; Arruda et al., 2013; Zhao et al., 2018), les sidérophores (Gulati et al., 2008; Farokh et al., 2011; Zhao et

al., 2018), HCN (Bharwad et Rajkumar, 2020) et l'ACC-deaminase (Indiragandhi et al., 2008).

Conclusion générale et perspectives

Conclusion générale et perspectives

Conclusion générale et perspectives

Le but principal de ce travail était de rechercher puis sélectionner des nouveaux agents de lutte biologique d'origine microbienne contre des champignons phytopathogènes. L'étude a été initiée par la réalisation d'un isolement, puis la sélection et la caractérisation des agents de lutte biologique efficaces contre le champignon phytopathogène *B. cinerea*. Une étude de quelques modes d'action impliqués dans le pouvoir de lutte biologiques des isolats sélectionnés est également réalisée. La deuxième étape était, la sélection de sept agents potentiels de lutte biologique pour étudier leur efficacité à différentes doses contre *B. cinerea* puis les tester contre un autre pathogène de la tomate, *Oidium neolycopersici*. Les isolats sélectionnés sont ensuite testés contre *M. scaetiae* agent de la pourriture des inflorescences du palmier dattier et contre quatre autres champignons pathogènes qui provoquent des maladies poste-récolte, il s'agit de : *Geotrichum candidum* , *Alternaria alternata*, *Bipolaris sp* et *Penicillium digitatum*. Le pouvoir favorisant la croissance des plantes a également été évalué en utilisant des graines et des plantes de tomate.

Dans la deuxième partie de cette thèse, les bactéries rhizosphériques *A. calcoaceticus* SJ19 et *B. safensis* SJ4 ont été testés *in vitro* contre plusieurs souches de *B. cinerea* et *in planta* contre la souche BC21. L'effet synergique et le meilleur temps d'application des deux antagonistes ont été étudiés. L'effet promoteur de croissance des plantes de ces deux bactéries a également été évalué.

Pour réaliser la première partie de ce travail, des serres non chauffées de tomate hautement attaquées par *B. cinerea* sont ciblées pour effectuer l'isolement. A l'intérieur des serres nous avons choisi des plantes de tomates saines ne présentant pas des symptômes de la pourriture grise. L'hypothèse suivante pourrait expliquer l'absence des symptômes chez ces plantes :

« la rhizosphère des plantes de tomate saines héberge des microorganismes qui leur confèrent cette résistance contre *B. cinerea* ».

Pour vérifier cette hypothèse, un isolement a été effectué soit à partir de la rhizosphère des plantes saines soit à partir du sol non rhizosphérique.

A la fin de cette partie d'isolement, 142 isolats dont 69 isolats rhizosphériques et 73 isolats non rhizosphériques ont été isolés et testés *in vitro* (confrontation directe) contre *B. cinerea* souche BC1. Cette première étape a permis de sélectionner au hasard 40 isolats répartis en

Conclusion générale et perspectives

deux groupes de 20 isolats pour chacun. Un premier groupe de 20 isolats d'origine rhizosphérique et un deuxième groupe de 20 isolats isolés à partir du sol non rhizosphérique. Les candidats des deux groupes sont ensuite évalués pour leur effet antagoniste *in vitro* indirect (production des composés volatils) et sur la germination des spores du pathogène (*B. cinerea* souche BC1).

L'effet *in vivo* des 40 isolats sélectionnés est encore évalué contre trois souches de *B. cinerea* (deux souches algériennes et une souche française). Ce test a été réalisé sur plantes entières de tomate (pour la souche BC1) et sur segments de tiges détachés (pour les souches BCJ2 et ALG66). La capacité des bactéries sélectionnées de pousser à différentes températures et de produire différentes enzymes hydrolytiques ainsi que les sidérophores a également été évaluée.

Les résultats obtenus à la fin de cette partie d'étude ont confirmé l'absence totale de toute corrélation entre les différents tests réalisés (*in vivo* et *in vitro*). En revanche, une seule corrélation a été enregistrée entre le test *in vitro* de l'inhibition de la germination des spores de *B. cinerea* (souche BC1) et le test d'antagonisme *in planta* sur plantes entières de tomate (corrélations de Spearman: $P < 0.0001$, $R^2 = 0,627$). Ce résultat important pourrait aider les chercheurs dans le screening des agents de lutte biologique. Cependant, l'absence de toute corrélation entre les tests *in vitro* et les tests *in vivo* nous incite à étudier la possibilité d'exclure ou remplacer ces tests dans le screening préliminaire des agents de lutte biologique d'origine microbienne.

Pour le test d'antagonisme *in vivo*, les résultats obtenus nous ont permis de sélectionner sept isolats bactériens dont la moyenne de leur efficacité contre les trois souches de *B. cinerea* dépasse 90%. Par ailleurs, une comparaison entre l'efficacité des deux groupes d'isolats (rizosphériques et non rhizosphériques) a été effectuée. Ce qui nous a permis de conclure les isolats d'origine rhizosphériques ont mieux protégé les plantes de tomate et les segments de tiges contre *B. cinerea*. Cette conclusion, renforcera l'hypothèse formulée dans cette partie.

Pour évaluer l'effet anti-*B. cinerea* des sept bactéries sélectionnées à différentes concentrations, quatre doses de suspensions bactériennes sont préparées (10^8 UFC mL⁻¹, 10^7 UFC mL⁻¹, 10^6 UFC mL⁻¹ et 10^5 UFC mL⁻¹). Chaque dose est ensuite testée contre deux souches *B. cinerea* (BC1 et BCJ2). Des segments de tiges détachés sont utilisés pour ce test.

Conclusion générale et perspectives

Dans le but de vérifier l'hypothèse suivante : « les sept bactéries sélectionnées à la fin de cette première partie pourront avoir un effet antagoniste sur autres champignons phytopathogènes », les sept meilleurs isolats montrant une efficacité contre *B. cinerea* ont été retenus pour évaluer leur pouvoir antagoniste *in vitro* contre huit champignons phytopathogènes. L'effet antagoniste *in vivo* des sept bactéries sélectionnées a également été évalué contre un autre champignon pathogène de la tomate ; *O neolycopersici*, contre *M. scaetiae* et quatre autres champignons responsables de pourritures poste-récolte ; il s'agit de *G. candidum*, *A. alternata*, *Bipolaris sp* et *P. digitatum*. L'effet antagoniste *in vivo* de ces bactéries est évalué sur : fruits de citron (pour *G. candidum*), tomate (pour *A. alternata*), mandarine (pour *P. digitatum*) et pommes (pour *Bipolaris sp*).

Les sept isolats retenus sont également évalués pour leur capacité à stimuler la germination et la croissance des plantules de tomates.

L'application à différentes doses des sept bactéries sélectionnées contre les deux souches de *B. cinerea* nous a permis de déterminer leurs IC₅₀. La souche *Pseudomonas argentinensis* SJ2 est montrée la plus efficace contre les deux souches de pathogènes avec une IC₅₀ inférieures à 10⁵ UFC mL⁻¹. Ces résultats viennent confirmer l'hypothèse suivante ; « au moins un des agents sélectionnés est efficace contre *B. cinerea* à faibles doses ». En effet, être efficace à petites concentration rend important l'agent de lutte biologique et lui donne une bonne chance pour être homologué puis commercialisé.

Par ailleurs, les tests effectués pour évaluer l'effet des bactéries sélectionnées contre les autres pathogènes, ont révélé que ces antagonistes ont un effet antagoniste sur tous les autres champignons phytopathogènes ce qui renforce l'hypothèse précédente.

Concernant l'effet promoteur de croissance des tomates, quatre bactéries parmi les sept bactéries sélectionnées sont montrées capables de stimuler la croissance des plantules de tomate.

La caractérisation moléculaire des sept bactéries sélectionnées a permis de les rattacher aux genres suivants : *Bacillus* (*Bacillus subtilis* SA14 et *Bacillus toyonensis* SA87), *Pseudomonas* (*Pseudomonas argentinensis* SJ2, *Pseudomonas lactis* SJ55 et *Pseudomonas veronii* RSAB3), *Stenotrophomonas* (*Stenotrophomonas maltophilia* RTB17) et *Serratia* (*Serratia marcescens* SJ11). A notre connaissance, *P. lactis* et *P. argentinensis* n'ont été jamais rapportés comme bactéries efficaces contre *B. cinerea*. De même, l'efficacité de toutes les

Conclusion générale et perspectives

espèces sélectionnées n'a été jamais enregistrée contre *O. neolycopersici* (à l'exception de *B. subtilis*) et *M. scaettae*.

Dans la deuxième partie, deux bactéries rhizosphériques ont été sélectionnées pour évaluer leur effet anti-*B. cinerea* et répondre aux hypothèses suivantes :

1. Le temps de l'application des agents de lutte biologique joue un rôle dans leur efficacité.
2. La combinaison de deux agents de lutte biologique entraîne un effet synergique contre le pathogène.

L'effet promoteur de croissance des plantes est également évalué en utilisant des graines et de plantules de tomate.

Pour vérifier la première hypothèse, les deux bactéries sont appliquées à trois temps différents ; en même temps avec l'inoculation du pathogène, 1h avant l'inoculation du pathogène et 1h après l'inoculation du pathogène.

Les deux bactéries sont mélangées (mélange de 1:1 V/V) puis inoculées en même temps avec le pathogène pour vérifier la deuxième hypothèse.

Pour la détermination du meilleur temps d'application des bactéries, les résultats obtenus ont montré que les tomates traitées 1h avant l'inoculation du pathogène ont donné les meilleurs taux de protection contre *B. cinerea*. En revanche, un traitement après l'inoculation du pathogène a réduit le pourcentage de protection des plantes. Ces résultats renforcent la première hypothèse formulée dans la deuxième partie et révèlent que pour avoir une meilleure protection contre le pathogène, un traitement en préventif s'est avéré nécessaire.

La deuxième hypothèse est renforcée par le fait que la préparation d'un mélange des deux bactéries a eu un effet synergique sur le pathogène.

Concernant l'effet promoteur de croissance des plantes, les deux bactéries ont été capables de stimuler la croissance des plantes de tomates. La germination des graines, l'indice de vigueur, la longueur des racines et des parties aériennes, le diamètre de la tige au-dessus de la deuxième feuille, le nombre des feuilles, le poids frais des racines et des parties aériennes ainsi que la teneur en chlorophylle ont été augmentés après traitement des graines de tomate avec les deux bactéries rhizosphériques. Ces résultats importants remplissent l'une des

Conclusion générale et perspectives

conditions importantes pour l'acceptation, l'homologation et la commercialisation d'un agent de lutte biologique d'origine microbienne.

Les résultats obtenus de cette thèse, peuvent constituer un premier pas vers l'éventuelle utilisation des souches sélectionnées comme biofertilisants ou comme agents de lutte biologique contre des maladies cryptogamiques souvent présentes en Algérie. Une telle utilisation nous oblige de passer d'abord par l'étape de l'homologation. Cette étape impose aux demandeurs de répondre aux différentes exigences fixées par le gouvernement algérien et résumées dans un cahier de charge élaboré par les autorités étatiques. En général, la législation algérienne reste sévère en matière d'homologation des nouveaux agents de lutte biologique notamment ceux d'origine bactérienne.

En effet, pour essayer de répondre aux exigences fixées par les autorités algériennes pour une prochaine homologation de nos agents de lutte biologique, plusieurs études approfondies semblent nécessaires dont leurs objectifs sont :

1. Essayer d'appliquer les isolats sélectionnés dans les conditions sous serre contre des champignons attaquant les cultures maraîchères.
2. Etudier les différents modes d'action impliqués dans le pouvoir de lutte biologique.
3. Identifier par GCMS (chromatographie à phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse) et LCMS (chromatographie à phase liquide couplée à la spectrométrie de masse) les différents métabolites secondaires non volatils produits par les bactéries sélectionnées et éventuellement responsables de leur activité antagoniste.
4. Identifier par la technique SPME-GCMS les différents métabolites secondaires volatils produits par les bactéries sélectionnées.
5. Purifier les métabolites secondaires intéressants et responsables de la protection biologique par chromatographie préparatoire non destructive dans le but d'étudier la possibilité de les utiliser comme agents antifongiques.
6. Réaliser un séquençage du génome total pour confirmer l'identification et mettre en évidence les différents gènes impliqués dans la protection biologique et l'effet PGPR.
7. Etudier l'effet synergique des isolats contre plusieurs champignons phytopathogènes connus en Algérie (ex ; *Fusarium oxysporum* f.sp. *albedinis* responsable de la maladie d'Elbayoud chez le palmier dattier).
8. Procéder à une formulation adéquate à l'utilisation sur terrain.

Conclusion générale et perspectives

9. Etudier la durabilité et la stabilité des bactéries sélectionnées dans les conditions de terrain.
10. Effectuer des tests de toxicité sur la santé humaine et sur l'environnement.

Références bibliographiques

Références bibliographiques

A

Abdallah, R. A. B., Mokni-Tlili, S., Nefzi, A., Jabnoun-Khiareddine, H., & Daami-Remadi, M. (2016). Biocontrol of Fusarium wilt and growth promotion of tomato plants using endophytic bacteria isolated from *Nicotiana glauca* organs. *Biological control*, 97, 80-88.

Agrios, G. (2005). *Plant pathology* fifth edition. Ed Elsevier Academia Press. San Diego Calif. USA.

Ainsworth, G. C. (1981). *Introduction to the history of plant pathology*: Cambridge University Press.

Aissat, K., Nicot, P. C., Guechi, A., Bardin, M., & Chibane, M. (2008). Grey mould development in greenhouse tomatoes under drip and furrow irrigation. *Agronomy for sustainable development*, 28(3), 403-409.

Ait Kaki, A., Kacem Chaouche, N., Dehimat, L., Milet, A., Youcef-Ali, M., Ongena, M., & Thonart, P. (2013). Biocontrol and plant growth promotion characterization of *Bacillus* species isolated from *Calendula officinalis* rhizosphere. *Indian journal of microbiology*, 53(4), 447-452.

Akter, S., Jo, H., Du, J., Won, K., Yin, C. S., Kook, M. Yi, & T.-H. (2015). *Pseudoxanthomonas humi* sp. nov., a bacterium isolated from rhizospheric soil of *Fraxinus chinensis* in Gyeonggi Province, South Korea. *Archives of microbiology*, 197(10), 1165-1172.

Alamri, S. A., Hashem, M., Mostafa, Y. S., Nafady, N. A., & Abo-Elyousr, K. A. (2019). Biological control of root rot in lettuce caused by *Exserohilum rostratum* and *Fusarium oxysporum* via induction of the defense mechanism. *Biological Control*, 128, 76-84.

Ali, S., Khan, M. A., & Kim, W. C. (2018). *Pseudomonas veronii* KJ mitigates flood stress-associated damage in *Sesamum indicum* L. *Applied Biological Chemistry*, 61(5), 575-585.

Alijani, Z., Amini, J., Ashengroph, M., & Bahramnejad, B. (2022). Antifungal Activity of *Serratia rubidaea* Mar61-01 Purified Prodigiosin Against *Colletotrichum nymphaeae*, the Causal Agent of Strawberry Anthracnose. *Journal of Plant Growth Regulation*, 1-11.

Al-Sadi, A. M. (2016). Epidemiology and management of fungal diseases in dry environments *Innovations in Dryland Agriculture* (pp. 187-209): Springer.

Alzohairy, S., Gillett, J., Saito, S., Naegele, R., Xiao, C.-L., & Miles, T. (2021). Fungicide resistance profiles of *Botrytis cinerea* isolates from Michigan vineyards and development of a TaqMan assay for detection of fenhexamid resistance. *Plant Disease*, 105(2), 285-294.

Anonyme (2017) Index des produits phytosanitaires à usage agricole. Ministère de l'Agriculture, du Développement rural et de la Pêche. Direction de la protection des végétaux et des contrôles techniques. République Algérienne Démocratique et Populaire, pp 1-216.

Arruda, L., Beneduzi, A., Martins, A., Lisboa, B., Lopes, C., Bertolo, F., ... & Vargas, L. K. (2013). Screening of rhizobacteria isolated from maize (*Zea mays* L.) in Rio Grande do Sul State (South Brazil) and analysis of their potential to improve plant growth. *Applied soil ecology*, 63, 15-22.

Audrain, B., Farag, M. A., Ryu, C. M., & Ghigo, J. M. (2015). Role of bacterial volatile compounds in bacterial biology. *FEMS Microbiology reviews*, 39(2), 222-233.

Azabou, M. C., Gharbi, Y., Medhioub, I., Ennouri, K., Barham, H., Tounsi, S., & Triki, M. A. (2020). The endophytic strain *Bacillus velezensis* OEE1: An efficient biocontrol agent against *Verticillium* wilt of olive and a potential plant growth promoting bacteria. *Biological control*, 142, 104168.

B

Balderas-Ruíz, K. A., Bustos, P., Santamaria, R. I., González, V., Cristiano-Fajardo, S. A., Barrera-Ortíz, S., Galindo, E. (2020). *Bacillus velezensis* 83 a bacterial strain from mango phyllosphere, useful for biological control and plant growth promotion. *AMB Express*, 10(1), 1-19.

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

Bardin, M., & Pugliese, M. (2020). Biocontrol agents against diseases. In *Integrated Pest and Disease Management in Greenhouse Crops* (pp. 385-407). Springer, Cham.

Bardin, M., Fargues, J., & Nicot, P. C. (2008). Compatibility between biopesticides used to control grey mould, powdery mildew and whitefly on tomato. *Biological control*, 46(3), 476-483.

Barret, M., Buée, M., Mougel, C., & Vacher, C. (2020). *Le microbiote des plantes: diversité, transmission et fonction*: Editions Quae.

Bautista-Baños, S. (Ed.). (2014). *Postharvest decay: Control strategies*. Elsevier.

Benhamou, N., & Picard, K. (1999). La résistance induite: une nouvelle stratégie de défense des plantes contre les agents pathogènes. *Phytoprotection*, 80(3), 137-168.

Bensidhoum, L., Nabti, E., Tabli, N., Kupferschmied, P., Weiss, A., Rothballer, M., Hartmann, A. (2016). Heavy metal tolerant *Pseudomonas protegens* isolates from agricultural well water in northeastern Algeria with plant growth promoting, insecticidal and antifungal activities. *European Journal of Soil Biology*, 75, 38-46.

Blaalid, R., & Khomich, M. (2021). Current knowledge of Chytridiomycota diversity in Northern Europe and future research needs. *Fungal Biology Reviews*, 36, 42-51.

Blancard, D., Laterrot, H., Marchoux, G., & Candresse, T., T. (2009). *Les maladies de la tomate. Identifier, connaître, maîtriser*. Versailles (France): Editions Quae.

Mercado-Blanco, J. (2015). *Pseudomonas* strains that exert biocontrol of plant pathogens. In *Pseudomonas* (pp. 121-172). Springer, Dordrecht.

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

Booth, J., Schenk, P. M., & Mirzaee, H. (2022). Microbial Biopesticides against Bacterial, Fungal and Oomycete Pathogens of Tomato, Cabbage and Chickpea. *Applied Microbiology*, 2(1), 288-301.

Bouaoud, Y., Troulet, C., Foughalia, A., Berge, O., Aissat, K., & 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.

Boukaya, N., Goudjal, Y., Zamoum, M., Chaabane Chaouch, F., Sabaou, N., Mathieu, F., & Zitouni, A. (2018). Biocontrol and plant-growth-promoting capacities of actinobacterial strains from the Algerian Sahara and characterisation of *Streptosporangium becharensense* SG1 as a promising biocontrol agent. *Biocontrol Science and Technology*, 28(9), 858-873.

C

Calvo, H., Mendiara, I., Arias, E., Gracia, A. P., Blanco, D., & Venturini, M. E. (2020). Antifungal activity of the volatile organic compounds produced by *Bacillus velezensis* strains against postharvest fungal pathogens. *Postharvest Biology and Technology*, 166, 111208.

Cantoro, R., Palazzini, J. M., Yerkovich, N., Miralles, D. J., & Chulze, S. N. (2021). *Bacillus velezensis* RC 218 as a biocontrol agent against *Fusarium graminearum*: effect on penetration, growth and TRI5 expression in wheat spikes. *BioControl*, 66(2), 259-270.

Carrim, A. J. I., Barbosa, E. C., & Vieira, J. D. G. (2006). Enzymatic activity of endophytic bacterial isolates of *Jacaranda decurrens* Cham.(Carobinha-do-campo). *Brazilian Archives of Biology and Technology*, 49(3), 353-359.

Cavara, F. (1925). *Mauginiella scaettae* Cav., nuovo ifomicete parassita della palma da datteri in Cirenacia. *Boletín Orto. Botanico Napoli*, 8, 207-211.

Cellini, A., Spinelli, F., Donati, I., Ryu, C. M., & Kloepper, J. W. (2021). Bacterial volatile compound-based tools for crop management and quality. *Trends in Plant Science*, 26(9), 968-983.

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

D

David, D. R., Mendelsohn, O., Dubeshko, S., Bierman, R., Jacob, D., Levi, N. O., Elad, Y. (2007). Development of biocontrol of powdery mildew diseases. IOBC WPRS BULLETIN, 30(6/2), 11.

Dean, R., Van Kan, J. A., Pretorius, Z. A., Hammond-Kosack, K. E., Di Pietro, A., Spanu, P. D., ... & Foster, G. D. (2012). The Top 10 fungal pathogens in molecular plant pathology. Molecular plant pathology, 13(4), 414-430.

Decognet, V., Bardin, M., Trottin-Caudal, Y., & Nicot, P. C. (2009). Rapid change in the genetic diversity of *Botrytis cinerea* populations after the introduction of strains in a tomato glasshouse. Phytopathology, 99(2), 185-193.

Dhouib, H., Zouari, I., Abdallah, D. B., Belbahri, L., Taktak, W., Triki, M. A., & Tounsi, S. (2019). Potential of a novel endophytic *Bacillus velezensis* in tomato growth promotion and protection against Verticillium wilt disease. Biological control, 139, 104092.

Djerbi, M. (1998). Diseases of the date palm: present status and future prospects. Journal of Agricultural and Marine Sciences [JAMS], 3(1), 103-114.

Dickinson, M. (2003). Molecular plant pathology: Garland Science.

Dix, N., & Webster, J. (Ed.) (1994). Fungal ecology. Springer Science & Business Media..

E

Elad, Y., Kapat, A. (1999). The role of *Trichoderma harzianum* protease in the biocontrol of *Botrytis cinerea*. European Journal of plant pathology, 105(2), 177-189.

Elad, Y., & Stewart, A. (2007). Microbial control of *Botrytis* spp. *Botrytis*: biology, pathology and control, 223-241.

Elad, Y., Vivier, M., & Fillinger, S. (2016). *Botrytis*, the good, the bad and the ugly. In *Botrytis*—The fungus, the pathogen and its management in agricultural systems (pp. 1-15). Springer, Cham.

Elnahal, A. S., El-Saadony, M. T., Saad, A. M., Desoky, E. S. M., El-Tahan, A. M., Rady, M. M., ... & El-Tarabily, K. A. (2022). The use of microbial inoculants for biological control, plant growth promotion, and sustainable agriculture: A review. European Journal of Plant Pathology, 1-34.

El Oirdi, M. (2010). Facteurs qui contrôlent le pouvoir pathogène chez *Botrytis cinerea*. Library and Archives Canada= Bibliothèque et Archives Canada, Ottawa.

F

Faria, P. S. A., de Oliveira Marques, V., Selari, P. J. R. G., Martins, P. F., Silva, F. G., & de Fátima Sales, J. (2021). Multifunctional potential of endophytic bacteria from *Anacardium othonianum* Rizzini in promoting in vitro and ex vitro plant growth. *Microbiological Research*, 242, 126600.

Fiddaman, P. J., & Rossall, S. (1993). The production of antifungal volatiles by *Bacillus subtilis*. *Journal of Applied Bacteriology*, 74(2), 119-126.

G

Giagnoni, L., Arenella, M., Galardi, E., Nannipieri, P., & Renella, G. (2018). Bacterial culturability and the viable but non-culturable (VBNC) state studied by a proteomic approach using an artificial soil. *Soil Biology and Biochemistry*, 118, 51-58.

Gorai, P. S., Ghosh, R., Konra, S., & Mandal, N. C. (2021). Biological control of early blight disease of potato caused by *Alternaria alternata* EBP3 by an endophytic bacterial strain *Bacillus velezensis* SEB1. *Biological control*, 156, 104551.

Gregory, P. (1966). The fungus spore: what it is and what it does. *The fungus spore*, 1-14.

Guenoun, K., Chattaoui, M., Bouri, M., Rhouma, A., Naghmouchi, K., & Raies, A. (2019). Biological control of growth promoting rhizobacteria against *verticillium wilt* of pepper plant. *Biologia*, 74(3), 237-250.

Guo, Z., Zhang, X., Wu, J., Yu, J., Xu, M., Chen, D., . . . Wan, S. (2020). *In vitro* inhibitory effect of the bacterium *Serratia marcescens* on *Fusarium proliferatum* growth and fumonisins production. *Biological control*, 143, 104188.

H

Hammami, I., Ben Hsouna, A., Hamdi, N., Gdoura, R., & Triki, M.A. (2013). Isolation and characterization of rhizosphere bacteria for the biocontrol of the damping-off disease of tomatoes in Tunisia. *C. R. Biologies* 336:557–564.

Hang, N. T. T., Oh, S. O., Kim, G. H., Hur, J. S., & Koh, Y. J. (2005). *Bacillus subtilis* S1-0210 as a biocontrol agent against *Botrytis cinerea* in strawberries. *The Plant Pathology Journal*, 21(1), 59-63.

Hawksworth, D. L., & Lücking, R. (2017). Fungal diversity revisited: 2.2 to 3.8 million species. *Microbiology spectrum*, 5(4), 5.4. 10.

Hernández-Pacheco, C. E., del Carmen Orozco-Mosqueda, M., Flores, A., Valencia-Cantero, E., & Santoyo, G. (2021). Tissue-specific diversity of bacterial endophytes in Mexican husk tomato plants (*Physalis ixocarpa* Brot. ex Horm.), and screening for their multiple plant growth-promoting activities. *Current Research in Microbial Sciences*, 2, 100028.

Hong, P., Hao, W., Luo, J., Chen, S., Hu, M., & Zhong, G. (2014). Combination of hot water, *Bacillus amyloliquefaciens* HF-01 and sodium bicarbonate treatments to control postharvest decay of mandarin fruit. *Postharvest Biology and Technology*, 88, 96-102.

Horst, R. K. (2013). *Westcott's plant disease handbook*: Springer Science & Business Media.

I

Indiragandhi, P., Anandham, R., Madhaiyan, M., & Sa, T. M. (2008). Characterization of plant growth-promoting traits of bacteria isolated from larval guts of diamondback moth *Plutella xylostella* (Lepidoptera: Plutellidae). *Current microbiology*, 56(4), 327-333.

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

J

Jacob, D., David, D. R., & Elad, Y. (2007). Biology and biological control of tomato powdery mildew (*Oidium neolycopersici*). *IOBC WPRS BULLETIN*, 30(6/2), 329.

Jangir, M., Pathaka ,R., Sharmaa, S., & Sharma, S. (2018). Biocontrol mechanisms of *Bacillus* sp., isolated from tomato rhizosphere, against *Fusarium oxysporum* f. sp. *Lycopersici*. *Biological Control* 123:60–70.

Jiang, C.-H., Liao, M.-J., Wang, H.-K., Zheng, M.-Z., Xu, J.-J., & Guo, J.-H. (2018). *Bacillus velezensis*, a potential and efficient biocontrol agent in control of pepper gray mold caused by *Botrytis cinerea*. *Biological control*, 126, 147-157.

K

Kamali, M., Guo, D., Naeimi, S., & Ahmadi, J. (2022). Perception of Biocontrol Potential of *Bacillus inaquosorum* KR2-7 against Tomato Fusarium Wilt through Merging Genome Mining with Chemical Analysis. *Biology*, 11(1), 137.

Kang, S.M., Joo G.J., Hamayun, M., Na, C.I., Shin, D.H., Kim, Y.K., Hong, J.K. & Lee, I.J. (2009). Gibberellin production and phosphate solubilization by newly isolated strain of *Acinetobacter calcoaceticus* and its effect on plant growth. *Biotechnol. Lett.*, 31: 277-281.

Köhl, J., Booij, K., Kolnaar, R., & Ravensberg, W. J. (2019). Ecological arguments to reconsider data requirements regarding the environmental fate of microbial biocontrol agents in the registration procedure in the European Union. *BioControl*, 64(5), 469-487.

Koike, S. T., Gladders, P., & Paulus, A. O. (2007). *Vegetable diseases: a color handbook*. Gulf Professional Publishing.

Kumari, P., Meena, M., & Upadhyay, R. S. (2018). Characterization of plant growth promoting rhizobacteria (PGPR) isolated from the rhizosphere of *Vigna radiata* (mung bean). *Biocatalysis and agricultural biotechnology*, 16, 155-162.

L

- Lahlali, R., Ezrari, S., Radouane, N., Kenfaoui, J., Esmael, Q., El Hamss, H., ... & Barka, E. A. (2022). Biological Control of Plant Pathogens: A Global Perspective. *Microorganisms*, 10(3), 596.
- Lazcano, C., Boyd, E., Holmes, G., Hewavitharana, S., Pasulka, A., & Ivors, K. (2021). The rhizosphere microbiome plays a role in the resistance to soil-borne pathogens and nutrient uptake of strawberry cultivars under field conditions. *Scientific reports*, 11(1), 1-17.
- Lepoivre, P. (2003). *Phytopathologie: Bases moléculaires et biologiques des pathosystèmes et fondements des stratégies de lutte*. Ed. De Boeck Supérieur. Bruxelles, Belgique. 427p.
- Leroux, P. (2007). Chemical control of *Botrytis* and its resistance to chemical fungicides. In *Botrytis: Biology, pathology and control* (pp. 195-222). Springer, Dordrecht.
- Li, X., Jing, T., Zhou, D., Zhang, M., Qi, D., Zang, X., Chen, Y. (2021). Biocontrol efficacy and possible mechanism of *Streptomyces* sp. H4 against postharvest anthracnose caused by *Colletotrichum fragariae* on strawberry fruit. *Postharvest Biology and Technology*, 175, 111401.
- Ling, N., Wang, T. & Kuzyakov, Y. (2022). Rhizosphere bacteriome structure and functions. *Nat Commun* 13, 836. <https://doi.org/10.1038/s41467-022-28448-9>
- Liu, S., Fu, L., Tan, H., Jiang, J., Che, Z., Tian, Y., & Chen, G. (2021). Resistance to boscalid in *Botrytis cinerea* from greenhouse-grown tomato. *Plant Disease*, 105(3), 628-635.
- Louden, B. C., Haarmann, D., & Lynne, A. M. (2011). Use of blue agar CAS assay for siderophore detection. *Journal of microbiology & biology education*, 12(1), 51-53.

M

- Maia, J. N., Beger, G., Pereira, W. V., De Mio, L. L. M., & Duarte, H. d. S. S. (2021). Gray mold in strawberries in the Paraná state of Brazil is caused by *Botrytis cinerea* and its isolates exhibit multiple-fungicide resistance. *Crop Protection*, 140, 105415.
- Mansour, F. A., Aldesuquy, H. S., & Hamedo, H. A. (1994). Studies on plant growth regulators and enzymes production by some bacteria. *Qatar University Science Journal*. 14 (2): 281-288.
- Mbachu, A. E., Obianom, A. O., Ogbonna, U. S., Mbachu, N. A., & Okoli, F. A. (2022). Mode of Attack of Microbiological Control Agents against Plant Pathogens for Sustainable Agriculture and Food Security. *Asian Journal of Agricultural and Horticultural Research*. 9(1): 1-16.
- Melanie G.R. (2014). Mise au point d'une méthode par pyroséquençage de détection et de quantification des mutations liées à la résistance au boscalide chez *Botrytis cinerea*. Mémoire

présenté en vue de l'obtention du grade de maitre en sciences. Université de Sherbrook. Qubec. Canada. 70p.

Mercier, A., Carpentier, F., Duplaix, C., Auger, A., Pradier, J. M., Viaud, M., ... & Walker, A. S. (2019). The polyphagous plant pathogenic fungus *Botrytis cinerea* encompasses host-specialized and generalist populations. *Environmental microbiology*, 21(12), 4808-4821.

Messiha, N. A. S., Van Diepeningen, A. D., Farag, N. S., Abdallah, S. A., Janse, J. D., & Van Bruggen, A. H. C. (2007). *Stenotrophomonas maltophilia*: a new potential biocontrol agent of *Ralstonia solanacearum*, causal agent of potato brown rot. *European journal of plant pathology*, 118(3), 211-225.

Mikani, A., Etebarian, H. R., Sholberg, P. L., O'Gorman, D. T., Stokes, S., & Alizadeh, A. (2008). Biological control of apple gray mold caused by *Botrytis mali* with *Pseudomonas fluorescens* strains. *Postharvest Biology and Technology*, 48(1), 107-112.

Mohamed, B. F., Sallam, N., Alamri, S. A., Abo-Elyousr, K. A., Mostafa, Y. S., & Hashem, M. (2020). Approving the biocontrol method of potato wilt caused by *Ralstonia solanacearum* (Smith) using *Enterobacter cloacae* PS14 and *Trichoderma asperellum* T34. *Egyptian Journal of Biological Pest Control*, 30(1), 1-13.

Mohammadi, P., E. Tozlu, R. Kotan, and M. S. Kotan. (2017). Potential of some bacteria for biological control of postharvest citrus green mould caused by *Penicillium digitatum*. *Plant Protection Science* 53 (3):134–43

Montes, C., Altimira, F., Canchignia, H., Castro, Á., Sánchez, E., Miccono, M., ... & Prieto, H. (2016). A draft genome sequence of *Pseudomonas veronii* R4: a grapevine (*Vitis vinifera* L.) root-associated strain with high biocontrol potential. *Standards in genomic sciences*, 11(1), 1-10.

Morris, C. E., Sands, D., Vanneste, J., Montarry, J., Oakley, B., Guilbaud, C., & Glaux, C. (2010). Inferring the evolutionary history of the plant pathogen *Pseudomonas syringae* from its biogeography in headwaters of rivers in North America, Europe, and New Zealand. *MBio*, 1(3), e00107-00110.

Myo, E. M., Liu, B., Ma, J., Shi, L., Jiang, M., Zhang, K., & Ge, B. (2019). Evaluation of *Bacillus velezensis* NKG-2 for bio-control activities against fungal diseases and potential plant growth promotion. *Biological control*, 134, 23-31.

N

Nakayama, T., Homma, Y., Hashidoko, Y., Mizutani, J., & Tahara, S. (1999). Possible role of xanthobaccins produced by *Stenotrophomonas sp.* strain SB-K88 in suppression of sugar beet damping-off disease. *Applied and Environmental Microbiology*, 65(10), 4334-4339.

Nakkeeran, S., Renukadevi, P., & Marimuthu, T. (2005). Antagonistic potentiality of *Trichoderma viride* and assessment of its efficacy for the management of cotton root rot. *Archives of Phytopathology and Plant Protection*, 38(3), 209-225.

Narayanasamy, P. (2013). *Biological management of diseases of crops* (pp. 295-429). Dordrecht, The Netherlands:: Springer.

Nicot P. C., Pressecq T., Bardin M. (2021) Advances in bioprotectants for plant disease control in horticulture. In Collier R. *Improving integrated pest management (IPM) in horticulture*. Taylor and Francis.

Nicot, P. C., Stewart, A., Bardin, M., & Elad, Y. (2016). Biological control and biopesticide suppression of *Botrytis*-incited diseases. In *Botrytis—the fungus, the pathogen and its management in agricultural systems* (pp. 165-187). Springer, Cham.

Nollet, L. M., & Rathore, H. S. (2015). *Biopesticides handbook*: CRC Press.

O

Oukala, N., Pastor-Fernández, J., Sanmartín, N., Aissat, K., & Pastor, V. (2021). Endophytic Bacteria from the Sahara Desert Protect Tomato Plants Against *Botrytis cinerea* Under Different Experimental Conditions. *Current Microbiology*, 78(6), 2367-2379.

P

Pal, K. K., & Gardener, B. M. (2006). *Biological control of plant pathogens*.

Panno, S., Davino, S., Caruso, A. G., Bertacca, S., Crnogorac, A., Mandić, A., ... & Matic, S. (2021). A Review of the Most Common and Economically Important Diseases That Undermine the Cultivation of Tomato Crop in the Mediterranean Basin. *Agronomy*, 11(11), 2188.

Pascholati SF., & Leite, B. (1995). Hospedeiro: mecanismo de resistência. In: Bergamin FA, Kimati H, Amorim VJ, Szilagyi-Zecchin et al. (ed) *Manual de ftopatologia princípios e conceitos*. 1st edn. Agronômica Ceres, São Paulo

Paul, B., Girard, I., Bhatnagar, T., & Bouchet, P. (1997). Supression of *Botrytis cinerea* causing grey mould disease of grape vine (*Vitis vinifera*) and its pectinolytic activities by a soil bacterium. *Microbiological research*, 152(4), 413-420.

Peix, A., Berge, O., Rivas, R., Abril, A., & Velázquez, E. (2005). *Pseudomonas argentinensis* sp. nov., a novel yellow pigment-producing bacterial species, isolated from rhizospheric soil in Cordoba, Argentina. *International journal of systematic and evolutionary microbiology*, 55(3), 1107-1112.

Phour M., & Sindhu, S.S. (2020). Amelioration of salinity stress and growth stimulation of mustard (*Brassica juncea* L.) by salt-tolerant *Pseudomonas* species. *Applied Soil Ecology* 149 :103518. <https://doi.org/10.1016/j.apsoil.2020.103518>.

Poritsanos, N., Nakkeeran, S., Fernando, W., & de Kievit, T. (2006). Biocontrol activity of *Pseudomonas chlororaphis* strain PA23, and GacS-mediated regulation of metabolite production. *canadian journal of plant pathology-revue canadienne de phytopathologie*.

Prins, T. W., Tudzynski, P., Tiedemann, A. V., Tudzynski, B., Have, A. T., Hansen, M. E., ... & van Kan, J. A. (2000). Infection strategies of *Botrytis cinerea* and related necrotrophic pathogens. In *Fungal pathology* (pp. 33-64). Springer, Dordrecht.

Q

Qessaoui, R., Zanzan, M., Ajerrar, A., Lahmyed, H., Boumair, A., Tahzima, R., ... & Bouharroud, R. (2022). *Pseudomonas* Isolates as Potential Biofungicides of Green Mold (*Penicillium Digitatum*) on Orange Fruit. *International Journal of Fruit Science*, 22(1), 142-150.

R

Rai, A., Bensidhoum, L., Tabli N., Bouaoud Y., Naili F., Cruz, C., & Nabti, E.(2016). A *Pseudomonas Protegens* with High Antifungal Activity Protects Apple Fruits Against *Botrytis cinerea* Gray Mold. *IJSRST162612*. 2(6): 227-237.

Rashid, S., Charles, T. C., & Glick, B. R. (2012). Isolation and characterization of new plant growth-promoting bacterial endophytes. *Applied soil ecology*, 61, 217-224.

Reinhold-Hurek, B., Bunger, W., Burbano, C. S., Sabale, M., & Hurek, T. (2015). Roots shaping their microbiome: global hotspots for microbial activity. *Annual review of phytopathology*, 53, 403-424.

Richardson, M. D., & Warnock, D. W. (2012). *Fungal infection: diagnosis and management*: John Wiley & Sons.

Romanazzi, G., & Feliziani, E. (2014). *Botrytis cinerea* (gray mold). In *Postharvest decay* (pp. 131-146). Academic Press.

Romero, F. M., Marina, M., & Pieckenstain, F. L. (2016). Novel components of leaf bacterial communities of field-grown tomato plants and their potential for plant growth promotion and biocontrol of tomato diseases. *Research in microbiology*, 167(3), 222-233.

Roskova, Z., Skarohlid, R., & McGachy, L. (2022). Siderophores: an alternative bioremediation strategy?. *Science of The Total Environment*, 153144.

Rettinassababady, C., & Jeyalakshmi, C. (2014). Bio-fungicides: the best alternative for sustainable food security and ecosystem. In *Microbial Diversity and Biotechnology in Food Security* (pp. 401-411). Springer, New Delhi.

S

Staats, M., van Baarlen, P., & van Kan, J. A. (2005). Molecular phylogeny of the plant pathogenic genus *Botrytis* and the evolution of host specificity. *Molecular biology and Evolution*, 22(2), 333-346.

Sadfi-Zouaoui, N., Hannachi, I., Andurand, D., Essghaier, B., Boudabous, A., & Nicot, P. (2008). Biological control of *Botrytis cinerea* on stem wounds with moderately halophilic bacteria. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 24(12), 2871-2877.

Samaras, A., Hadjipetrou, C., & Karaoglanidis, G. (2021). *Bacillus amyloliquefaciens* strain QST713 may contribute to the management of SDHI resistance in *Botrytis cinerea*. *Pest Management Science*, 77(3), 1316-1327.

Sephton-Clark, P. C., & Voelz, K. (2018). Spore germination of pathogenic filamentous fungi. In *Advances in applied microbiology* (Vol. 102, pp. 117-157). Academic Press.

Shahriar, S. A., Islam, M. N., Chun, C. N. W., Kaur, P., Rahim, M. A., Islam, M. M., ... & Siddiquee, S. (2022). Microbial Metabolomics Interaction and Ecological Challenges of Trichoderma Species as Biocontrol Inoculant in Crop Rhizosphere. *Agronomy*, 12(4), 900.

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

Sharma, R., Singh, D., & Singh, R. (2009). Biological control of postharvest diseases of fruits and vegetables by microbial antagonists: A review. *Biological control*, 50(3), 205-221.

Sharma, C. K., Vishnoi, V. K., Dubey, R. C., & Maheshwari, D. K. (2018). A twin rhizospheric bacterial consortium induces systemic resistance to a phytopathogen *Macrophomina phaseolina* in mung bean. *Rhizosphere*, 5, 71-75.

Sherpa, M. T., Das, S., Najar, I. N., & Thakur, N. (2021). Draft genome sequence of *Stenotrophomonas maltophilia* strain P13 gives insight into its protease production and assessment of sulfur and nitrogen metabolism. *Current research in microbial sciences*, 2, 100012.

Schmidt, C. S., Cardinale, M., Zachow, C., Müller, H., & Berg, G. (2011). *Stenotrophomonas rhizophila*—a novel biocontrol agent for saline soils. *IOBC/WPRS Bulletin*, 63, 59-64.

Someya, N., Nakajima, M., Hirayae, K., Hibi, T., & Akutsu, K. (2001). Synergistic antifungal activity of chitinolytic enzymes and prodigiosin produced by biocontrol bacterium, *Serratia marcescens* strain B2 against gray mold pathogen, *Botrytis cinerea*. *Journal of General Plant Pathology*, 67(4), 312-317.

Syed-Ab-Rahman, S. F., Carvalhais, L. C., Chua, E., Xiao, Y., Wass, T. J., & Schenk, P. M. (2018). Identification of soil bacterial isolates suppressing different *Phytophthora* spp. and promoting plant growth. *Frontiers in plant science*, 9, 1502.

T

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.

Tian, Z., Chen, C., Chen, K., Liu, P., Fan, Q., Zhao, J., & Long, C. A. (2020). Biocontrol and the mechanisms of *Bacillus* sp. w176 against postharvest green mold in citrus. *Postharvest Biology and Technology*, 159, 111022.

Torres, M., Llamas, I., Torres, B., Toral, L., Sampedro, I., & Bejar, V. (2020). Growth promotion on horticultural crops and antifungal activity of *Bacillus velezensis* XT1. *Applied Soil Ecology*, 150, 103453.

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(1), 21-32.

V

Valenzuela, N. L., Angel, D. N., Ortiz, D. T., Rosas, R. A., García, C. F. O., & Santos, M. O. (2015). Biological control of anthracnose by postharvest application of *Trichoderma* spp. on maradol papaya fruit. *Biological control*, 91, 88-93.

Van Driesche, R. G. V., & Bellows, T. S. (1996). *Biological Control Agents for Plant Pathogens*. In *Biological Control* (pp. 93-101). Springer, Boston, MA.

Vignesh, M., Shankar, S. R. M., MubarakAli, D., & Hari, B. N. V. (2022). A Novel Rhizospheric Bacterium: *Bacillus velezensis* NKMV-3 as a Biocontrol Agent Against *Alternaria* Leaf Blight in Tomato. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 194(1), 1-17.

Vilaplana, R., Cifuentes, C., Vaca, L., Cevallos-Cevallos, J. M., & Valencia-Chamorro, S. (2020). Curative activity of possible biocontrol agents in the postharvest of yellow pitahaya and organic banana. *Postharvest Biology and Technology*, 159, 111030.

W

Walia, A., Putatunda, C., Sharma, R., Sharma, S., & Thakur, A. (2021). *Biocontrol: A Sustainable Agricultural Solution for Management of Plant Diseases Microbial Biotechnology in Crop Protection* (pp. 1-54): Springer.

Wang, H. C., Li, W. H., Wang, M. S., Chen, Q. Y., Feng, Y. G., & Shi, J. X. (2011). First report of *Botrytis cinerea* causing gray mold of tobacco in Guizhou Province of China. *Plant Disease*, 95(5), 612-612.

Wang, H., Liu, R., You, M. P., Barbetti, M. J., & Chen, Y. (2021). Pathogen Biocontrol Using Plant Growth-Promoting Bacteria (PGPR): Role of Bacterial Diversity. *Microorganisms*, 9(9), 1988.

Webster, J., & Weber, R. (2007). *Introduction to fungi*: Cambridge university press.

White, T. J., Bruns, T., Lee, S., & Taylor, J. (1990). Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. *PCR protocols: a guide to methods and applications*, 18(1), 315-322.

Whipps, J. M. (1987). Effect of media on growth and interactions between a range of soil-borne glasshouse pathogens and antagonistic fungi. *New Phytologist*, 107(1), 127-142.

Williamson, B., Tudzynski, B., Tudzynski, P., & Van Kan, J. A. (2007). *Botrytis cinerea*: the cause of grey mould disease. *Molecular plant pathology*, 8(5), 561-580.

Wilson, C. L., & Wisniewski, M. E. (1989). Biological control of postharvest diseases of fruits and vegetables: an emerging technology. *Annual review of phytopathology*, 27(1), 425-441.

Wu, Q., Ni, M., Dou, K., Tang, J., Ren, J., Yu, C., & Chen, J. (2018). Co-culture of *Bacillus amyloliquefaciens* ACCC11060 and *Trichoderma asperellum* GDFS1009 enhanced pathogen-inhibition and amino acid yield. *Microbial Cell Factories*, 17(1), 1-12.

X

Xu, S. J., & Kim, B. S. (2014). Biocontrol of *Fusarium* crown and root rot and promotion of growth of tomato by *Paenibacillus* strains isolated from soil. *Mycobiology*, 42(2), 158-166.

Xue, Q. Y., Chen, Y., Li, S. M., Chen, L. F., Ding, G. C., Guo, D. W., & Guo, J. H. (2009). Evaluation of the strains of *Acinetobacter* and *Enterobacter* as potential biocontrol agents against *Ralstonia* wilt of tomato. *Biological Control*, 48(3), 252-258.

Y

You, W., Ge, C., Jiang, Z., Chen, M., Li, W., & Shao, Y. (2021). Screening of a broad-spectrum antagonist-*Bacillus siamensis*, and its possible mechanisms to control postharvest disease in tropical fruits. *Biological Control*, 157, 104584.

Z

Zhang, Z., & Yuen, G. (2000). Effects of culture fluids and preinduction of chitinase production on biocontrol of *Bipolaris* leaf spot by *Stenotrophomonas maltophilia* C3. *Biological control*, 18(3), 277-286.

Zhao, L., Xu, Y., & Lai, X. (2018). Antagonistic endophytic bacteria associated with nodules of soybean (*Glycine max* L.) and plant growth-promoting properties. *brazilian journal of microbiology*, 49, 269-278.

Zheng, X., Wang, J., Chen, Z., Zhang, H., Wang, Z., Zhu, Y., & Liu, B. (2019). A *Streptomyces* sp. strain: isolation, identification, and potential as a biocontrol agent against soilborne diseases of tomato plants. *Biological Control*, 136, 104004.

Sites internet

<http://www.fao.org/faostat/fr/#home> consulté en Octobre 2021.

<https://www.inpv.edu.dz/>. Consulté en Octobre 2021

<https://www.ezbiocloud.net/> . Consulté en juin 2021

<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/> Consulté en juin 2021

Annexes

Liste des publications et communications

- **Publication dans une revue scientifique à comité de lecture :**

A Foughalia, Y Bouaoud, C Chandeysson, M Djedidi, Tahirine M, K Aissat, P Nicot (2022) *Acinetobacter calcoaceticus* SJ19 and *Bacillus safensis* SJ4, two Algerian rhizobacteria protecting tomato plants against *Botrytis cinerea* and promoting their growth. Egyptian Journal of Biological Pest Control (2022) 32:12.

- **Manuscrit en cours de préparation à soumettre dans une revue scientifique à comité de lecture**

A Foughalia, C Chandeysson, J-F Bourgeay, M Duffaud, M Bardin, P Nicot, K Aissat. Rhizosphere bacteria protect tomato plants against gray mold and powdery mildew better than soil bacteria.

A. Foughalia, S. Hammadi, M. Djedidi, P Nicot, K Aissat. New post-harvest disease of apples.

- **Communications à des séminaires**

Foughalia A, Bouaoud Y, P Nicot Aissat K (2021) Bio-contrôle de la pourriture grise de la tomate par trois souches bactériennes. Poster. The International ‘Microbes For Life’ first webinar. Alger (Algérie).

Foughalia A, Bouaoud Y, P Nicot Aissat K (2019) Effet antagoniste *in vitro* et *in planta* des bactéries du sol sur *Botrytis cinerea* agent de la pourriture grise de la tomate. Poster. Premier colloque international sur la lutte biologique et intégrée en Algérie. « CILBIA ». Batna. Algérie

Foughalia A, Bouaoud Y, Oukala N, Adjebli A, Aissat K, Ati FZ (2017) Protection de la tomate contre la pourriture grise en utilisant des microorganismes du sol. Poster. Séminaire national. Bejaia (Algérie).

Bouaoud Y, **Foughalia A**, Troulet C, Berge O, Aissat K, Bardin M (2017) Multiple screening approach for selection of an effective biological control against *B. cinerea* on tomato. Poster. 12th EFPP-10th SFP Conference. Dunkirk (France).

Bouaoud Y, **Foughalia A**, Troulet C, Berge O, Aissat K, Bardin M (2017) Selection of efficient biological control agent against *B. cinerea* on tomato. Poster. Premier Congrès International sur les biotechnologies au service du développement durable. Boumerdes (Algeria).

Bouaoud Y, Foughalia A, Laouar S, Aissat K, Oukala Nadira (2015) Recherche d’agents de lutte biologique contre *B. cinerea* sur tomate. Poster. Séminaire national sur les substances bioactives (SNSB). Bejaia (Algérie)

Résumé : Les champignons phytopathogènes constituent la principale cause des maladies des plantes. Que ce soit en pré ou en post-récolte, ils sont à l'origine de plusieurs pertes annuelles à travers le monde. Les méthodes de lutte adoptées par les producteurs et les agriculteurs se basent en général sur le traitement chimique. Toutefois, à cause de leur effet sur l'environnement, la santé humaine et la biodiversité, une importance particulière a été apportée aux nouvelles méthodes de lutte alternatives dont la lutte biologique. Cette méthode de lutte commence à trouver sa place dans le domaine de la lutte contre les agents phytopathogènes. En effet, plusieurs agents de lutte biologique y compris ceux d'origine microbienne sont commercialisés et homologués à travers le monde. En revanche, en Algérie, la lutte biologique n'a pas encore trouvé sa place parmi les autres méthodes de lutte classiques (notamment la lutte chimique). C'est dans cette optique que s'inscrit notre travail qui a pour but de développer de nouveaux agents de lutte biologique d'origine microbienne contre des champignons phytopathogènes. Comme première partie de ce travail, 142 isolats bactériens ont été isolés (69 d'origine rhizosphérique (rhizosphère des tomates saines) et 73 non rhizosphériques). Après un premier test *in vitro* contre *B. cinerea* (BC1), 40 isolats (20 isolats rhizosphériques et 20 isolats non rhizosphériques) ont été sélectionnés pour évaluer leur effet contre trois souches de *B. cinerea* sur plantes et sur segments de tiges. Les résultats obtenus ont permis de sélectionner sept souches avec une efficacité significative (moyenne de protection >90%). Ces souches sélectionnées ont également montré un fort effet même à faibles concentrations, notamment pour *P. argentinensis* SJ2 (IC₅₀ égal à 9.10⁴ UFC mL⁻¹ et 8.8.10⁴ UFC mL⁻¹ pour BC1 et BCJ2 respectivement). Contre *O. neolycopersici* les sept souches sélectionnées ont pu protéger les plantes de tomate avec un pourcentage d'efficacité compris entre 33 % à 75 %. Pour l'effet contre *M. scaetiae* et les autres champignons responsables de pourritures post-récolte, toutes les bactéries sélectionnées ont eu la capacité d'inhiber significativement la croissance des champignons cibles (*M. scaetiae*, *A. alternata*, *Bipolaris sp*, *G. candidum* et *P. digitatum*). De même, parmi les sept bactéries retenues, cinq bactéries ont pu stimuler la croissance des parties aériennes des plantules de tomate. L'indice de vigueur est significativement augmenté en présence de quatre bactéries parmi les sept testées. Pour la deuxième partie de ce travail, deux bactéries rhizosphériques (*Acinetobacter calcoaceticus* SJ19 et *Bacillus safensis* SJ4) ont été testées contre *B. cinerea* (souche BC21). Les résultats obtenus ont révélé l'efficacité *in planta* de ces bactéries. L'application des deux bactéries 1 h avant l'inoculation du pathogène a mieux protégé les tomates par rapport aux autres traitements (simultané et 1h après l'inoculation du pathogène) suggérant que ces deux bactéries agissent par induction de mécanisme de résistance de la plante. Un effet synergique de SJ4 et SJ19 est également enregistré. Le potentiel de lutte biologique conféré par les souches sélectionnées (les sept souches de la première partie avec les deux souches de la deuxième partie de travail) semble important pour développer des biofongicides d'origine microbienne.

Mots clés : lutte biologique, champignons phytopathogènes, rhizobactéries. PGPR. *Acinetobacter calcoaceticus* SJ19, *Bacillus safensis* SJ4. *Pseudomonas veronii* RSAB3, *Pseudomonas argentinensis* SJ2.

Abstract. Phytopathogenic fungi are the main cause of plant diseases. They are the cause of several annual losses around the world, whether pre-harvest or post-harvest. The control methods adopted by producers and farmers are generally based on chemical treatment. However, because of their effect on the environment, human health and biodiversity, a particular importance has been given to new alternative control methods, including biological control. This method of control is starting to gain traction in the field of the control against phytopathogenic fungi. Indeed, several biocontrol agents, including those of microbial origin, are marketed and approved throughout the world. On the other hand, in Algeria, biological control has not yet found its place among the other traditional control methods (in particular chemical control). Our work aims to develop new biocontrol microbe-based agents against phytopathogenic fungi. As a first part of this work, 142 bacterial isolates were isolated (69 of rhizospheric origin (rhizosphere of healthy tomatoes) and 73 non-rhizospheric). After a first *in vitro* test against *B. cinerea* (BC1), 40 isolates (20 rhizospheric isolates and 20 non-rhizospheric isolates) were selected to evaluate their effect against three strains of *B. cinerea* on plants and on stem segments. As a result of the findings, seven strains with high efficacy were selected (mean protection >90%). These selected strains also showed a strong effect even at low concentrations, in particular for *P. argentinensis* SJ2 (IC₅₀ equal to 9.10⁴ UFC mL⁻¹ and 8.8.10⁴ UFC mL⁻¹ for BC1 and BCJ2 respectively). Against *O. neolycopersici* the seven selected strains were able to protect tomato plants with an efficiency ranging from 33% to 75%. For the antagonistic effect against *M. scaetiae* the post-harvest decays, all the selected bacteria had the ability to significantly inhibit the growth of the target fungi (*M. scaetiae*, *A. alternata*, *Bipolaris sp*, *G. candidum* and *P. digitatum*). Similarly, among the seven bacteria retained, five bacteria were able to stimulate the growth of tomato shoots. The vigor index is significantly increased in the presence of four bacteria among the seven tested. For the second part of this work, two rhizospheric bacteria (*Acinetobacter calcoaceticus* SJ19 and *Bacillus safensis* SJ4) were tested against *B. cinerea* (strain BC21). The results obtained revealed the *in planta* efficacy of these bacteria. The application of the two bacteria 1 hour before the inoculation of the pathogen better protected tomatoes compared to the other treatments (simultaneous and 1 hour after the inoculation of the pathogen) suggesting that these two bacteria act by induction of the plant mechanism of resistance. A synergistic effect of SJ4 and SJ19 is also recorded. The biological control potential presented by the selected strains (the seven strains of the first part with the two strains of the second part of the work) seems important for developing microbe-based biofungicides.

Keywords: Biological control, phytopathogenic fungi, rhizobacteria. PGPR. *Acinetobacter calcoaceticus* SJ19, *Bacillus safensis* SJ4. *Pseudomonas veronii* RSAB3, *Pseudomonas argentinensis* SJ2.

الفطريات الممرضة للنبات تعتبر السبب الرئيسي لأمراض النبات. سواء قبل أو بعد الحصاد، فهي سبب العديد من الخسائر السنوية في جميع أنحاء العالم. تعتمد طرق مكافحة المبيدات من طرف المنتجين والمزارعين بشكل عام على المعالجة الكيميائية. ومع ذلك، و نظرًا لتأثيرها على البيئة وصحة الإنسان والتنوع البيولوجي، فقد تم إيلاء أهمية خاصة لطرق مكافحة البديلة الجديدة، بما في ذلك مكافحة البيولوجية. بدأت طريقة مكافحة هذه في العثور على مكانها في مجال مكافحة مسببات الأمراض النباتية. في الواقع، يتم تسويق واعتماد العديد من عوامل مكافحة البيولوجية، بما في ذلك تلك ذات الأصل الجرثومي، في جميع أنحاء العالم. من ناحية أخرى، في الجزائر، لم تجد مكافحة البيولوجية مكانها بعد بين طرق مكافحة التقليدية الأخرى (لا سيما مكافحة الكيميائية). يهدف عملنا إلى تطوير عوامل جديدة للمكافحة البيولوجية ذات أصل جرثومي و فعالة ضد الفطريات الممرضة للنبات. وكجزء أول من هذا العمل، تم عزل 142 عزلة بكتيرية (69 عزلة من الغلاف الجذري للطماطم (طماطم سليمة غير مصابة) و 73 عزلة من غير الغلاف الجذري). بعد أول اختبار في المختبر ضد *B. cinerea* (BC1)، تم اختيار 40 عزلة (20 عزلة من الغلاف الجذري و 20 عزلة من غير الغلاف الجذري) لتقييم تأثيرها ضد ثلاث سلالات من *B. cinerea* على النباتات وعلى قطع من الساق. أتاحت النتائج التي تم الحصول عليها اختيار سبع سلالات ذات فعالية كبيرة (متوسط الحماية >90%). أظهرت هذه السلالات المختارة أيضًا تأثيرًا قويًا حتى عند التركيزات المنخفضة، خاصة بالنسبة لـ *P. argentinensis* (SJ2) (IC₅₀ يساوي 9.10⁴ UFC mL⁻¹ و 8.8.10⁴ UFC mL⁻¹ لـ BC1 و BCJ2 على التوالي). ضد *O. neolycopersici*، كانت السلالات السبع المختارة قادرة على حماية نباتات الطماطم بنسبة كفاءة تتراوح بين 33% و 75%. بالنسبة للتأثير ضد *M. scaetiae* وأنواع أخرى من فطريات التعفن المختلفة بعد الحصاد، فإن جميع البكتيريا المختارة لديها القدرة على تثبيط نمو الفطريات المستهدفة (*A. alternata*, *Bipolaris sp*, *G. candidum*, *P. digitatum*). وبالمثل، من بين البكتيريا السبعة المنتقاة، تمكنت خمس بكتيريا من تحفيز نمو الأجزاء الهوائية لشتلات الطماطم. ازداد مؤشر القوة بشكل ملحوظ في وجود أربع بكتيريا من بين السبعة التي تم اختبارها. بالنسبة للجزء الثاني من هذا العمل، تم اختبار نوعين من البكتيريا الجذرية (*Acinetobacter calcoaceticus* SJ19 و *Bacillus safensis* SJ4) ضد *B. cinerea* (BC21). أظهرت النتائج التي تم الحصول عليها كفاءة النبات في حطوره هذه البكتيريا. أدى تطبيق البكتيريا قبل ساعة واحدة من تطبيق العامل الممرض إلى حماية الطماطم بشكل أفضل مقارنة بالعلاجات الأخرى (المترافعة وبعد ساعة واحدة من تطبيق العامل الممرض) مما يشير إلى أن هاتين البكتيريا تعملان عن طريق تحريض آلية مقاومة النبات. تم أيضًا تسجيل تأثير تآزري لـ SJ4 و SJ19. يبدو أن إمكانات مكافحة البيولوجية التي تقدمها البكتيريا المختارة (البكتيريا السبع من الجزء الأول مع البكتيريا الأثنين من الجزء الثاني من العمل) مهمة لتطوير مبيدات فطريات حيوية ذات الأصل الميكروبي.

الكلمات المفتاحية: مكافحة البيولوجية، الفطريات الممرضة للنبات، البكتيريا الجذرية. PGPR. *Acinetobacter calcoaceticus* SJ19، *Bacillus safensis* SJ4. *Pseudomonas veronii* RSAB3، *Pseudomonas argentinensis* SJ2.