

REPUBLIQUE ALGERIENNE DEMOCRATIQUE ET POPULAIRE
MINISTRE DE L'ENSEIGNEMENT SUPERIEUR
ET DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE

Université des Frères Mentouri –Constantine1
Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie
Département de Microbiologie



N° d'ordre : 158/DS/2017

N° de série : 01/Mic BIO/2017

Thèse

Présentée en vue de l'obtention du diplôme de Doctorat troisième cycle
en Biotechnologies, Biologie et Environnement/Option: Bioprocédés et
Biotechnologies, Applications Mycologiques

Par: MILET Asma

Thème

**Isolement de microorganismes à partir du sol des régions
arides et sélection d'isolats à effet antagoniste sur l'agent de
l'Alternariose**

Jury d'évaluation :

Président de jury: Mr. DEHIMAT L. Prof. Univ. Frères Mentouri –Constantine1.

Directeur de thèse: Mr. KACEM CHAOUCHE N. Prof. Univ. Frères Mentouri
Constantine1.

Examineurs: Mr. HAMIDECHI M A. Prof. Univ. Frères Mentouri –Constantine1.

Mr. RIBA A. Prof. Univ. M'Hamed Bougara-Boumerdès.

Mm. BARKAT M. Prof. INATAA Univ. Frères Mentouri–
Constantine1.

Année universitaire : 2016/2017

Remerciements

Mes remerciements, avant tout, à DIEU tout puissant pour la volonté, la santé et la patience qu'il m'a données durant toutes ces longues années d'études afin que je puisse arriver à ce stade.

Mes remerciements particuliers à mon promoteur, le Professeur Noredine Kacem Chaouche. Monsieur le Professeur, je n'arrive pas à trouver de mots suffisamment forts pour exprimer la reconnaissance que j'ai à votre égard.

Je vous remercie de m'avoir fait partager votre expérience, vos compétences et votre passion pour la recherche pendant ces années passées. Merci pour votre aide, patience, compréhension, soutien et précieux conseils qui m'ont permis d'évoluer dans la réalisation de cette thèse...

Je remercie profondément Monsieur THONART Philippe, Professeur à l'Université de Liège et à l'Université de Gembloux et Directeur du CWBI de m'avoir accueillie dans les laboratoires qu'il dirige et de mettre à ma disposition tout le matériel nécessaire à la réalisation de ce travail. Qu'il trouve ici ma profonde reconnaissance.

Des remerciements particuliers s'adressent à JAOUANI Atef, Maître de conférences à l'institut Supérieur des Sciences Biologiques (I.S.S.B.A.T) de Tunis et son équipe du laboratoire LMBA pour avoir accepté de m'accueillir aussi chaleureusement et de suivre de très près la partie de biologie moléculaire de ma thèse.

Je voudrais adresser de Sincères remerciements au Professeur BOUDABOUS Abdelatif responsable du laboratoire de LMBA Tunis.

Un grand merci aussi au Professeur DAHIMAT L., Doyen de la Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie, pour ses encouragements, ses Conseils. Je le remercie pour m'avoir fait l'honneur de présider ce jury et d'avoir donné toute l'importance et la considération à mon travail.

Je tiens à exprimer ma profonde gratitude envers Monsieur, Hamidechi M.A, Professeurs à l'Université Constantine 1, pour avoir accepté de juger ce travail.

J'exprime ma profonde reconnaissance à Monsieur, Mr. RIBA A, Professeur à l'Université M'Hamed Bougara-Boumerdès pour l'honneur qu'il m'a fait d'accepter de juger ce travail.

Je remercie Madame Malika BARKAT, Professeur à l'INATAA, Université Frères Mentouri Constantine, Qu'elle trouve ici l'expression de mes plus vifs remerciements pour avoir accepté de participer au jury de soutenance et pour l'intérêt qu'ils ont bien voulu porter à ce travail.

Un grand merci à toute l'équipe du laboratoire de Mycologie, Biotechnologie et de l'Activité microbienne (LaMyBAM) : Mounira, Asma, Mounia, Insaf, Sana, Hamida, Kamelia, Fathia Wafa, Anissa, Afef, Sara, Hajer, Amina, Radia et Imen Pour leur collaboration et serviabilité qu'elles m'ont témoignées durant ces dernières années.

*Merci pour tous ce que vous avez fait pour moi
mes très chères amies...*

*Radia et Imen, je vous remercie énormément pour votre collaboration dans le travail au
champ, merci pour m'avoir aidé à l'arroser régulièrement lors de mes absences.*

Merci beaucoup mes très chères amies...

*Un remerciement spécial, profond et reconnaissant de tous les efforts fournis par mes chères
amies Asma, Mounira et Mounia pendant toute la période de préparation de ma thèse. Je
n'oublierai jamais tous ce que vous avez fait pour moi.*

*Un remerciement particulier au Dr Moula Nassim, pour son soutien permanent, ses aides
précieuses et sa disponibilité permanente à chaque fois j'avais besoin de lui.
Grand merci Monsieur.*

*Un Grand merci également à toute l'équipe du Centre Wallon de Biologie Industrielle
(CWBI) qui m'a appris et initié à la réalisation des manipulations de laboratoire.*

*Merci Marina, Margueritte, Danielle, Martine,
Anick, Samuel, Benoit, firmin.....*

DEDICACES

Je dédie ce modeste travail à :

Mes chers parents

Mes frères et ma sœur

Mes amis

Toute ma famille

Table des matières

1- Introduction.....	1
2- Revue bibliographique.....	3
2.1- La tomate.....	3
2.1.1- Historique	3
2.1.2- Nomenclature et classification	3
2.1.3- Principales exigences écologiques et climatiques de la plante	4
2.1.4- Description botanique du plant de la tomate	5
2.1.5- Culture de la tomate et modes de production	7
2.1.6- Types de croissance et variétés de tomate.....	8
2.1.7- Production et importance.....	11
2.1.8- Les maladies de la tomate	14
2.2- Alternariose de la tomate.....	15
2.2.1- <i>Alternaria sp</i>	15
2.2.1.1- <i>Alternaria alternata</i>	16
2.2.2- Alternariose (brûlure précoce).....	16
2.2.3- Dégâts de la maladie	17
2.2.4- Symptômes.....	19
2.3- La lutte biologique.....	20
2.3.1- Antibiose	20
2.3.2- Compétition.....	21
2.3.3- Parasitisme.....	21
2.3.4- Induction de la résistance de la plante hôte.....	22
2.4- Agents de biocontrôle : genres <i>Bacillus</i> et <i>Providencia</i>	22
2.4.1- <i>Bacillus</i>	23
2.4.2- <i>Providencia</i>	24
2.5- Les lipopeptides.....	24
2.5.1- Rôles des lipopeptides liés au bio-contrôle.....	26
2.5.1.1- Colonisation des racines des plantes.....	27
2.5.1.2- Antagonisme.....	27
2.5.1.3- Induction du système de défense des plantes.....	28
2.6- Analyse par cryométrie en flux.....	29
2.6.1- Principe.....	31
3- Matériel et méthodes	33

3.1- Isolement de l'agent phytopathogène (<i>Aleternaria alternata</i>).....	33
3.2– Identification de l'agent phytopathogène	33
3.2.1- Étude des aspects macroscopiques et microscopiques	33
3.2.2- Étude moléculaire	33
3.2.2.1- <i>Extraction de l'ADN fongique</i>	34
3.2.2.2- <i>Amplification de l'ADN (réaction PCR)</i>	34
3.2.2.3- <i>Visualisation des gènes amplifiés par électrophorèse</i>	35
3.2.2.4- <i>Séquençage des produits d'amplification</i>	35
3.2.2.5- <i>Analyse des résultats de séquençage</i>	35
3.3- Test de pathogénicité de l'isolat fongique.....	36
3.2.1- Calcul de la sévérité de la maladie.....	36
3.2.2- Ré-isolement de l'agent pathogène.....	36
3.4- Recherche de Bactéries antagonistes.....	36
3.4.1- Echantillonnage.....	36
3.4.2- Isolement des bactéries	37
3.4.3- Sélection des souches ayant une activité antagoniste	37
3.5- Identification des isolats bactériens sélectionnés.....	38
3.5.1- Observation macroscopique et microscopique.....	38
3.5.2- Identification moléculaire	38
3.5.2.1- <i>Extraction d'ADN</i>	38
3.5.2.2- <i>Amplification des gens étudiés par PCR</i>	39
3.5.2.3- <i>Purification de l'ADN</i>	39
3.5.2.4- <i>Séquençage des gènes amplifiés et traitement des séquences</i>	40
3.6-Etude <i>in vivo</i> de l'activité antagoniste	40
3.6.1- Dans des conditions de pots.....	40
3.6.2- Dans des conditions du champ	41
3.6.3- Etude statistique	41
3.7- Production de substances antifongiques	41
3.7.1- Détection des enzymes de dégradation de la paroi fongique.....	41
3.7.1.1- <i>Activité chitinasique</i>	41
3.7.1.2- <i>Activité protéasique</i>	42
3.7.1.3- <i>Activité lipasique</i>	42
3.7.2- Production et analyse des lipopeptides (LPs) par spectrométrie de masse	42
3.8- Evaluation de l'effet antagoniste par Cytomètre à flux (FCM) de l'isolat bactérien le plus performant	43
3.8.1- Microscope à fluorescence	44
4-Résultats	45
4.1- Isolement de l'agent phytopathogène.....	45
4.2- Identification de l'agent phytopathogène.....	45
4.2.1- Etude des caractères macroscopiques et microscopique.....	45
4.2.2- Identification moléculaire	47
4.2.2.1- <i>Extraction de l'ADN fongique</i>	47

4.2.2.2- Amplification de l'ADN (réaction PCR).....	47
4.2.2.3- Séquençage.....	48
4.3- Test de pathogénicité.....	48
4.4-Isolement de microorganismes antagonistes d' <i>A. alternata</i>	50
4.4.1- Sélection des isolats à effet anti- <i>Alternaria alternata</i>	51
4.4.2- Taux d'inhibition de la croissance fongique développé par les isolats bactériens.....	52
4.4- Identification des isolats bactériens à activité antagoniste.....	53
4.4.1- Etude des caractères macroscopiques et microscopiques.....	53
4.4.2- Etude moléculaire	55
4.4.2.1- Extraction d'ADN	55
4.4.2.2- Amplification de séquences d'ADN-16S.....	56
4.4.2.3- Séquençage.....	56
4.5- Etude <i>in vivo</i> de l'effet des souches sélectionnées sur la tomate	58
4.5.1- Dans les conditions de pots.....	58
4.5.2- En plein champ.....	61
4.6-Production des substances antifongiques.....	63
4.6.1-Enzymes dégradant la paroi des cellules fongiques.....	63
4.6.2- Les lipopeptides (LPs).....	64
4.7- Evaluation de l'effet antagoniste par Cytomètre à flux (FCM) de la souche la plus performante	65
5- Discussion	71
6- Conclusion et perspectives.....	79
7- Abstract.....	81
8- الملخص	82
9- Références bibliographiques.....	83
10- Annexe.....	99

Liste des figures

Figure 1 Branche de tomate: (a) tige, (b) stipule, (c) feuille composée, (d) fleurs, (e) tomate (baie).....	6
Figure 2 Morphotypes de fruits de tomate.....	7
Figure 3 Évolution du secteur et la production de la tomate en Algérie, 2000-2013.....	12
Figure 4 (A) Conidiophores et (B) Conidies d' <i>A. alternata</i> (Rao, 1964).....	16
Figure 5 Développement et symptômes de maladies causées par <i>Alternaria spp.</i> (Agrios, 2005).....	18
Figure 6 Symptômes d'Alternariose sur feuilles (A), tiges (B), et fruits(C, D) de tomate.....	20
Figure 7 La résistance systémique induite chez les plantes par des rhizobactéries- <i>Rhizobacteria-induced systemic resistance in plants.</i>	22
Figure 8 Structure de différentes variétés des trois familles de lipopeptides (a) iturines, (b) fengycines (C14-C18) et (c) surfactines (C12-C16).....	25
Figure 9 Rôle des trois familles de lipopeptides dans (A): colonisation des racines et formation de biofilms; (B) Antibiose directe par inhibition de croissances des phytopathogènes; (C) Induction du système immunitaire de la plante (ISR) (Ongena <i>et al.</i> , 2007).....	27
Figure 10 Chemical structures of 5(6)-Carboxyfluorescein diacetate (cFDA) and 5(6)-carboxyfluorescein (cF).....	29
Figure 11 Principe du cFDA, détection de l'activité enzymatique estérase.....	30
Figure 12 Principe de la cytométrie en flux.....	32
Figure 13 Sols et sites d'échantillonnages: (A), Palmeraie de la région de TOLGA; (B), rhizosphère d'une plante « AGA » situé à Touggourt; (C), rhizosphère de palmeraie de la région de RANO.	37
Figure 14 Aspect de la colonie de la souche <i>Alternaria sp.</i> A: après 2j; B : 3j; C: 5j et D : 7 jours d'incubation sur milieu PDA.	46
Figure 15 Aspect microscopique d' <i>Alternaria sp.</i> , A: <i>G X10</i> ; B: <i>GX 40</i>	46
Figure 16 Migration des bandes d'ADN- <i>ITS</i> de l'isolat d' <i>Alternaria sp.</i> sur gel d'agarose; MM Marqueurs moléculaires.	47
Figure 17 Séquences du gène <i>ITS</i> après correction par le programme « Bioedit ».....	48
Figure 18 Test de pathogénicité d'isolat d' <i>A. alternata</i> sur des plantules de tomate inoculées par suspension sporale après 20 jours d'incubation à 25°C.....	49
Figure 19 Ré-isolement de l'agent pathogène <i>A. alternata</i> : A, Aspect des colonies d' <i>A. alternata</i> ; B, Aspect microscopique <i>A. alternata</i> (<i>GX 40</i>)......	50

Figure 20 Inhibition <i>in vitro</i> de développement de l'agent phytopathogène <i>A. alternata</i> par les isolats antagonistes (E1B3, S5, S1.1 et E2X1).....	52
Figure 21 Aspect macroscopique des isolats bactériens E1B3, S5, E2X1, S1.1.....	54
Figure 22 Observation microscopique des isolats bactériens E1B3, S5, E2X1, S1.1 par l'utilisation de coloration de Gram X40.....	55
Figure 23 Migration des bandes d'ADN des isolats bactériens E1B3, S5, E2X1, S1.1 sur gel d'agarose : ADN-16S, MM Marqueurs moléculaires.	56
Figure 24 Séquences du gène <i>16S</i> de l'isolat E1B3 après avoir été corrigé à l'aide du programme « Bioedit ».....	56
Figure 25 Séquences du gène ARN <i>16S</i> de l'isolat S5 après avoir été corrigé à l'aide du programme « Bioedit »	57
Figure 26 Séquences du gène ARN <i>16S</i> de l'isolat E2X1 après avoir été corrigé à l'aide du programme « Bioedit »	57
Figure 27 Séquences finales du gène ARN <i>16S</i> de l'isolat S1.1 après avoir été corrigé à l'aide du programme « Bioedit »	57
Figure 28 Effet du traitement des souches : <i>B. mojavensis</i> (E1B3), <i>B. amyloliquefaciens</i> (S5), <i>B. subtilis</i> (E2X1), <i>P. vermicola</i> (S1.1), Témoin (T) sur la plante de tomate après deux mois et 20 jours d'inoculation par <i>A. alternata</i>	58
Figure 29 A) Détection de l'activité de protéase développée par <i>B. mojavensis</i> ; B) Détection de l'activité de lipase développée par <i>B. mojavensis</i>	63
Figure 30 Analyse par LC.MS des lipopeptides produits par la souche <i>B. mojavensis</i> : Profil chromatographique de production des lipopeptides, iturines (4min, 5min et 7min), fengycines (8min à 13min), surfactines (23min à 26 min).	64
Figure 31 Effet de <i>B. mojavensis</i> sur la croissance d' <i>A. alternata</i> après le 3 ^{ème} , le 5 ^{ème} et le 7 ^{ème} jours sur PDA inoculé centralement : (a) <i>B. mojavensis</i> , (b) <i>A. alternata</i> et <i>B. mojavensis</i> , (c) <i>A. alternata</i>	66
Figure 32 Profil de CMF des boîtes témoins de <i>B. mojavensis</i> lors du 3 ^{ème} jour d'incubation. (A) des cellules bactériennes vivantes avant traitement thermique (90°C pendant 12 min), (B) des cellules mortes bactériennes non colorées avec cFDA, après traitement thermique, (C) des cellules mortes bactériennes colorées avec cFDA, après traitement thermique.....	67
Figure 33 Profil de CMF des boîtes témoins d' <i>A. alternata</i> lors du 3 ^{ème} jour d'incubation. (A) cellules fongiques vivantes avant traitement thermique (90°C pendant 12 min), (B) cellules fongiques mortes non colorées avec cFDA, après traitement thermique, (C) cellules mortes fongiques colorées avec cFDA, après traitement thermique.....	67
Figure 34 Profils expérimentaux de CMF de <i>B. mojavensis</i> (A), <i>A. alternata</i> (B), interaction entre <i>B. mojavensis</i> et <i>A. Alternata</i> (C) après le troisième, le cinquième et le septième jour d'incubation.	69
Figure 35 Analyse d'interaction entre <i>A. alternata</i> et <i>B. mojavensis</i> par microscope à fluorescence. Les cellules ont été traitées comme décrit en Matériel et Méthodes. Les cellules ont été colorées par cFDA avec une observation microscopique (fluorescence verte) après 7 jours d'interaction (GX 40).	70
Figure 36 Analyse d'interaction entre <i>A. alternata</i> et <i>B. mojavensis</i> par microscope à fluorescence. après 7 jours d'interaction (GX 40).	70

Liste des tableaux

Tableau 1 Classification taxonomique de la tomate (Benton, 2007).....	3
Tableau 2 Températures requises pour les différentes phases de développement d'un pied de tomate.	4
Tableau 3 culture de la tomate sous serre et en plein champ.	9
Tableau 4 Principaux producteurs de tomate (FAO, 2007).....	11
Tableau 5 Evolution de la tomate maraichère en Algérie entre 2001-2009 (Snoussi, 2010).	12
Tableau 6 Production mondiale de tomate en 2012 (http://faostat.fao.org/).....	13
Tableau 7 Les principales maladies de la tomate.....	14
Tableau 8 Classification du genre <i>Bacillus</i>	23
Tableau 9 Mélange réactionnel utilisé pour le séquençage du gène <i>ITS</i>	35
Tableau 10 Isolats microbiens obtenus à partir du sol des différents sites prospectés.....	51
Tableau 11 Taux d'inhibition de la croissance de moisissure phytopathogène <i>A. alternata</i> développés par isolats bactériens testés.....	52
Tableau 12 Etude macroscopique des colonies bactériennes sur milieu gélosé GN.....	53
Tableau 13 Caractères microscopiques des bactéries E1B3, S5, E2X1, S1.1.....	54
Tableau 14 Identification des souches bactériennes sélectionnées par analyses d'ADN et les numéros d'accèsion fournis par Genbank.....	57
Tableau 15 Effet du traitement sur des plantules de tomate (variété: <i>Bobcat</i>) par les différentes souches de <i>Bacillus</i> (<i>B. mojavensis</i> , <i>B. subtilis</i> , <i>B. amyloliquefaciens</i>) et la souche <i>P. vermicola</i> dans des conditions de pots après 20jours d'inoculation par l'agent pytopathogène	60
Tableau 16 Effet du traitement sur des plantules de tomate (variété: <i>Blacmine</i>) par les différentes souches de <i>Bacillus</i> (<i>B. mojavensis</i> , <i>B. subtilis</i> , <i>B. amyloliquefaciens</i>) et la souche <i>P. vermicola</i> , après 4 semaines, 8 semaines, en plein champ	62

Liste des abréviations

ACN :	acétonitrile
ADN :	Acide désoxyribonucléique
ARN :	Acide ribonucléique
ARNr :	Acide ribonucléique ribosomique
BET:	Bromure d'éthidium
CFDA	diacétate de carboxyfluorescein
C-LPs:	Cyclic lipopeptides
dNTP :	désoxyribonucléoside (A, C,G,T) triphosphate
EDTA:	Ethylene Diamine Tetra-acetic Acid
FACS :	Fluorescence-activated cell sorting
FAO :	Food and Agriculture Organization
FCM	Cytomètre à flux
FL1 :	Détecteur de fluorescence (533±15nm)
GN :	Gélose Nutritive
h :	Heure
HPLC/MS :	Chromatographie liquide à haute performance couplé à un spectromètre de masse à une dimension
ITS:	espaceur interne transcrit des gènes d'ADNr (Internal Transcribed Spacer)
LPs :	Lipopeptides
M :	mole/L
MADR :	Ministère de l'Agriculture et du Développement rural
ml :	Millilitre
mM :	millimole/L
pb	paire de bases
PCR :	Réaction de polymérisation en chaîne
PDA :	Potato Dextrose Agar
rpm :	tour par minute
SDS	sodium dodécyl sulfate

SM :	Spectromètre de masse
SQD:	Single Quadrupole Mass Detection
TE :	Tampon d'extraction
UV:	Ultraviolet
μl :	microlitre

Introduction

1- Introduction

La tomate est considérée parmi les plantes les plus importantes, sur le plan nutritive et économique, à travers le monde (Shankara *et al.*, 2005; Ajilogba *et al.*, 2013; AbdAlla *et al.*, 2014). En effet, elle possède des propriétés phytochimiques bénéfiques a la santé humaine telles que la diminution de la valeur calorique et l'absence totale du cholestérol (Ajilogba *et al.*, 2013). En outre, la tomate est riche en lycopène, en phosphore, en potassium, en vitamines (A, B, C et E) et également en fibres alimentaire (Jones, 1999 ; Rajkumar *et al.*, 2007; Chawla, 2008; Mennouche *et al.*, 2013; Ajilogba *et al.*, 2013). La tomate possède d'autres vertus, entre autres, son efficacité dans la prévention des cancers du sein et de la prostate (Chawla, 2008; Mennouche *et al.*, 2013; Ajilogba *et al.*, 2013).

En 2012, la production mondiale de la tomate s'est élevée à environ 133 millions de tonnes. Les principaux pays producteurs sont la Chine, les USA, l'Inde, la Turquie, l'Egypte, l'Italie, l'Iran, le Brésil et l'Espagne. Selon Boubidi, (2015), la production mondiale de tomates progresse régulièrement passant de 64 millions de tonnes en 1988 à plus de 100 millions.

En Algérie, la tomate occupe la seconde place des légumes après la pomme de terre, et elle est disponible durant toutes les saisons, grâce à la culture en serre et principalement dans le Sahara (Bouayad, 2015). Environ 12173 hectares de la tomate sont cultivés, ce qui représente environ 57.36% de la surface agricole globale en Algérie (Snoussi, 2009).

Malgré son importance nutritive et économique, il y'a un manque accru dans la production de la tomate. Ceci est dû, essentiellement, aux agents phytopathogènes, qui causent des maladies plus ou moins graves sur cette plante (Balanchard, 1992). L'Alternariose figure parmi les maladies fongiques les plus importantes de la tomate, provoquant, en effet, des pertes économiques considérables en rendement (Fontem *et al.*, 2008; Alhussaen, 2012). *Alternaria alternata* est un des agents causaux de l'Alternariose, une maladie dangereuse de la tomate ainsi que de la pomme de terre (Agrios, 1997; Abbo *et al.*, 2012; AbdAlla *et al.*, 2014).

La lutte chimique utilisée actuellement est certes efficace sur un grand nombre de ce phytopathogène mais son utilisation répétitive et massive a induit notamment une pollution environnementale et un risque sur la santé humaine, en plus de l'apparition de souches

pathogènes résistantes (Berg, 2009; Oliveira *et al.*, 2010; Gilbert et Haber, 2013; Rocha *et al.*, 2014). De ce fait, il a été constaté que l'utilisation de méthodes alternatives respectueuses de l'environnement devient une nécessité. En effet, l'utilisation des antagonistes bactériens tels que les *Bacillus*, les *Pseudomonas* et les *Streptomyces* comme des agents de biocontrôle est considérée une des plus raisonnables pratiques planifiée dans la gestion intégrée des cultures agricoles (Chérif *et al.*, 2002; Palazzini *et al.*, 2007; Etcheverry *et al.*, 2007; Baysal *et al.*, 2013; Rocha *et al.*, 2014), ce qui a réduit l'utilisations de pesticide, dans l'environnement (Chérif *et al.*, 2002; Xue *et al.*, 2002; Rocha *et al.*, 2014).

De ce fait, l'objectif de cette thèse est la caractérisation de souches bactériennes du genre *Bacillus* et *Providencia* développant un effet anti-*Alternaria alternata*, isolées de divers environnements de sud Algérien, en l'occurrence ; sol de la rhizosphère d'une plante «AGA» de la région de Touggourt (RANO); sol agricole de palmeraie de la région de Biskra (TOLGA) et le sol de la rhizosphère de palmeraie de la région de Touggourt (RANO). Pour ce faire, la thèse comporte les parties suivantes : Une synthèse bibliographique approfondie contenant des informations relatives à la tomate, à *A. alternata* et aux bactéries antagonistes précédemment citées. Une étude expérimentale scindée en quatre parties ; la première partie repose sur l'isolement, la purification et l'identification moléculaire de l'agent phytopathogène de l'Alternariose, en l'occurrence, *A. alternata* ; la deuxième partie vise à étudier la caractérisation morphologique et moléculaire des souches antagonistes de l'agent pathogène d'un coté et l'étude, *in vivo*, de l'effet des souches antagonistes sur des plantules de la tomate d'un autre coté ; la troisième partie de l'étude expérimentale est concentrée sur la caractérisation de la souche la plus performante et sa capacité à produire des enzymes hydrolytiques (protéase, lipase et chitinase), et des lipopeptides (iturine, fingsine et surfactine) ; alors que la quatrième partie porte sur l'évaluation de l'effet antagoniste par Cytomètre à flux (FCM) de la souche la plus performante.

La thèse se termine par des résultats qui ont fait l'objet d'une discussion approfondie et enfin, une conclusion qui ouvre des perspectives de recherche sur le thème étudié.

Revue
Bibliographique

2- Revue bibliographique

2.1- La tomate

2.1.1- Historique

La tomate est originaire du nord-ouest de l'Amérique du sud (Colombie, Equateur, Pérou, nord du Chili); introduite en Europe, Italie, Espagne au XVI siècle comme plante ornementale. Elle est cultivée depuis le XVIII siècle pour son fruit, consommé comme légume. La plante étant de la même famille que la belladone, ses fruits n'étaient pas considérées comme comestible, mais utiles en médecine (Jean-Claude *et al.*, 2003). Longtemps appelée (pomodoro), son nom de tomate n'a été accepté par l'Académie française qu'en 1835. Le nom signifie littérairement, pêche de loup, et fait référence au caractère toxique attribué initialement à ce fruit.

2.1.2- Nomenclature et classification

En 1753, le botaniste suédois Linnaeus l'a nommée *Solanum lycopersicum*, mais 15 ans plus tard Philippe Miller a remplacé ce nom par *Lycopersicon esculentum* (Taylor, 1986). Bien que les taxonomistes aient récemment réintroduits son nom original *Solanum lycopersicum*, (Heiser et Anderson, 1999). La classification scientifique de la tomate proposée en 2007 par Benton est mentionnée dans le tableau 1.

Tableau 1 Classification taxonomique de la tomate (Benton, 2007).

Règne	<i>Plantae</i>
Embranchement	<i>Tracheophyta</i>
Classe	<i>Mangoliopsida</i>
Ordre	<i>Solanales</i>
Famille	<i>Solanaceae</i>
Genre	<i>Solanum</i>
Espèce	<i>Solanum lycopersicum</i>

2.1.3- Principales exigences écologiques et climatiques de la plante

2.1.3.1- La température

La température optimale pour la plupart des variétés se situe entre 21 et 24 °C. Les plantes peuvent surmonter un certain intervalle de température, mais en-dessous de 10 °C et au-dessus de 38 °C, les tissus des plantes seront endommagés (Shankara, 2005).

La tomate peut réagir aux variations de température ayant lieu pendant le cycle de croissance (tableau 2). Ceci se manifeste par la vulnérabilité enregistrée sur la germination des graines, la croissance des semis, la floraison, la mise à fruits ainsi que la qualité des fruits. Lorsque des périodes de froid ou de chaleur perdurent pendant la floraison, la production de pollen sera réduite et celle de la formation des fruits par conséquent. Il est indispensable de semer la tomate avant la saison de l'hiver pour éviter que le gel tue ses tiges

Tableau 2 Températures requises pour les différentes phases de développement d'un pied de tomate.

Phases	Température
Optimum pour la germination	26°C (17 et 20°C)
Minimum pour la germination	10°C
Maximum pour la germination	35°C
Optimum pour la croissance	21-24°C 22°C
Minimum pour la croissance	12°C
Maximum pour la croissance	30°C
Les racines ne poussent pas	<16°C
Minimum pour le développement des fruits	16°C
Maximum pour le développement des fruits	30°C
Fruits rugueux	<16°C
Optimum pour la fructification le jour	23°C
Optimum pour la fructification la nuit	17°C
Aucune fécondation	<13°C

La tomate est peu sensible au photopériodisme, mais est exigeante en énergie lumineuse. Un faible rayonnement lumineux réduit le nombre de fleurs par bouquet et affecte la fécondation (Cirad et Gret, 2002). En outre, l'intensité de la lumière affecte la couleur des feuilles, la mise à fruits et couleur des fruits.

2.1.3.2- Les éléments minéraux

Véhiculés dans l'eau absorbée, l'absorption varie tout au long de la plante. Il existe deux périodes d'absorption accélérée l'une suite à l'apparition des boutons floraux, l'autre se situe au moment de l'anthèse, par ailleurs l'absorption est fortement influencée par un certain nombre de facteur du sol et du milieu (Hachemi, 1999).

2.1.3.3- Eau et humidité

La plante ne tolère pas les taux d'humidité élevés (de plus de 80%). Ce sont les deux facteurs qui la rendent plus vulnérable aux maladies. La prévention d'un apport en eau suffisant est essentielle pendant la fructification (Munro et Small, 1998). Le stress causé par une carence en eau et les longues périodes arides fait tomber les bourgeons et les fleurs et provoque le fendillement des fruits.

2.1.3.4- pH

La tomate tolère modérément un large intervalle de valeurs du pH (niveau d'acidité, mais pousse le mieux dans des sols ou la valeur du pH varie entre 5,5 et 6,8 et où l'approvisionnement stimule une bonne croissance (Shankara, 2005).

2.1.3.5- Sol

La tomate pousse bien sur la plupart des sols minéraux qui ont une bonne capacité de rétention de l'eau, une bonne aération et qui sont libres de sels. Elle préfère les terres limoneuses profondes et bien drainées (Chibane, 1999).

2.1.4- Description botanique du plant de la tomate

La tomate est une plante herbacée annuelle, appartenant au groupe des légumes-fruits (Aissa, 1999) (figure 1), est caractérisée par:

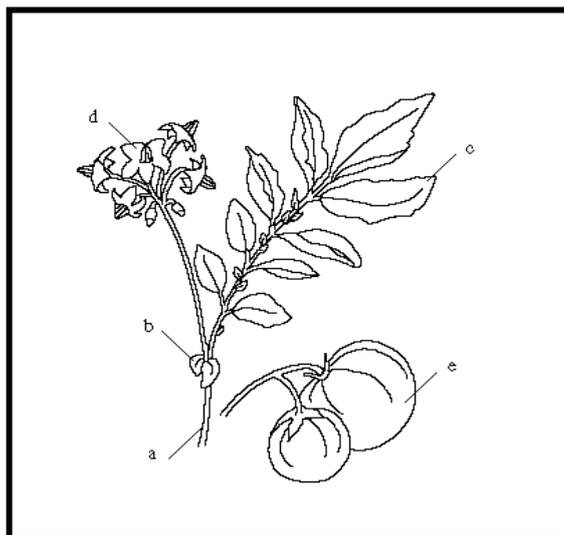


Figure 1 Branche de tomate: (a) tige, (b) stipule, (c) feuille composée, (d) fleurs, (e) tomate (baie).

2.1.4.1- Racine

Forte racine pivotante qui pousse jusqu'à une profondeur de 50 cm ou plus. La racine principale produit une haute densité de racines latérales et adventices (Shankara, 2005).

2.1.4.2- Tige

Le port de croissance varie entre érigé et prostré. La tige pousse jusqu'à une longueur de 2 à 4 m. La tige est pleine, fortement poilue et glandulaire.

2.1.4.3- Feuillage

Feuilles disposées en spirale, 15 à 50 cm de long et 10 à 30 cm de large. Les folioles sont ovées à oblongues, couvertes de poils glandulaires. Les grandes folioles sont parfois pennatifides à la base. L'inflorescence est une cyme formée de 6 à 12 fleurs. Le pétiole mesure entre 3 et 6 cm.

2.1.4.4- Fleurs

Bisexuées, régulières et entre 1,5 et 2 cm de diamètre. Elles poussent opposées aux - ou entre les feuilles. Le tube du calice est court et velu, les sépales sont persistants. En général il y a 6 pétales qui peuvent atteindre une longueur de 1 cm, qui sont jaunes et courbées lorsqu'elles sont mûres. Il y a 6 étamines et les anthères ont une couleur jaune vif et entourent le style qui a une extrémité stérile allongée. L'ovaire est supère avec entre 2 et 9 carpelles. En général la plante est autogame, mais la fécondation croisée peut avoir lieu. Les abeilles et les bourdons sont les principaux pollinisateurs (Shankara, 2005).

2.1.4.5- Fruit

Baie charnue, de forme globulaire ou aplatie avec un diamètre de 2 à 15 cm. Lorsqu'il n'est pas encore mûr, le fruit est vert et poilu. La couleur des fruits mûrs varie du jaune au rouge en passant par l'orange. En général les fruits sont ronds et réguliers ou côtelés.

2.1.4.6- Graines

Nombreuses, en forme de rein ou de poire. Elles sont poilues, beiges, 3 à 5 mm de long et 2 à 4 mm de large. L'embryon est enroulé dans l'albumen. 1000 graines pèsent approximativement 2,5 à 3,5 g (Gallais et Bannerot, 1992).

2.1.5- Culture de la tomate et modes de production

La culture de la tomate a été importée en Algérie par des immigrants espagnols. On cultive diverses variétés classées d'après la forme des fruits, les plates, les côtelées et les rondes lisses (figure 2).

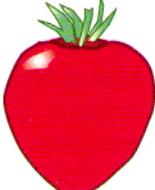
				
Aplati	légèrement aplati	arrondi	rectangulaire	cylindrique
				
Elliptique	Cordiforme	obovale	Ovale	forme de poire

Figure 2 Morphotypes de fruits de tomate.

Cette culture présente deux périodes de production et d'exportation en mai -juin et novembre-décembre. Elle demande beaucoup de pratique, une présence continue, une surveillance attentive (Bedrani *et al.*, 1993). En ce qui concerne le mode de production, nous avons :

- la culture sous serre Tunnel (primeur);
- la culture sous serre multi chapelle (primeur);
- la culture de plein champ (saison);
- la culture de plein champ (arrière saison).

2.1.5.1- Calendrier cultural

Grace à ses différents modes de production, la tomate est disponible toute l'année (tableau 3) (Snoussi, 2010).

Tableau 3 culture de la tomate sous serre et en plein champ.

sous serre dite de primeur		En plein champ	
a / cas du littoral et sublittoral : date de semis : Novembre	b / cas des plaines inférieures : date de semis : Fin décembre – Janvier	c/culture d'automne: A BISKRA uniquement :	a / cas de la culture de saison : date de semis : Mars-Avril
Date de plantation : Décembre.	Date de plantation : Février.	Date de semis : Août.	Date de plantation : Fin Juillet –Août.
Date de récolte : à partir d'Avril.	Date de récolte : à partir de Mai.	Date de plantation : Septembre.	Date de récolte : d'Octobre à Décembre.
Distances de plantation : 1m x 0,40m.	Distances de plantation : 1m x 0,40m.	Date de récolte : Décembre à Avril.	Distances de plantation : 1,10m x 0,50m.
Densité : 25000 plants/Ha.	Densité : 25000	Distances de plantation : 1m x	Densité : 18181,81 soit 20000 plants/Ha.
			0,50m.

2.1.6- Types de croissance et variétés de tomate

Les variétés de tomate sont très nombreuses. Ceci est dû au type de croissance développé, en l'occurrence, indéterminé ou déterminé.

Les variétés de tomate utilisées pour la production en frais sont principalement de type indéterminé. La plante ne cesse de croître en hauteur jusqu'à épuisement de toutes les réserves. Ici l'agronome doit nécessairement intervenir pour limiter le nombre de bouquets floraux et ce dans le but d'obtenir des fruits de gros calibres. Il est recommandé de laisser deux feuilles au-dessus du bouquet choisi et de pratiquer un étêtage afin de limiter la croissance des plantes. Parmi ce type de croissance, il existe :

- Les variétés fixées dont les caractéristiques génotypiques et phénotypiques se transmettent pour les générations descendantes où on peut citer les variétés les plus utilisées en Algérie telles que la Marmande et la Saint Pierre.
- Les Hybrides qui du fait de l'effet hétérosis, présentent la faculté de réunir plusieurs caractères d'intérêt (bonne précocité, bonne qualité de résistance aux maladies et aux attaques parasitaires et donc bon rendement). Ces hybrides ne peuvent être multipliés vu qu'ils perdent leurs caractéristiques dans les descendances. On peut citer 23 hybrides homologués qui sont :

ACTANA, AGORA, AKRAM, ASSALA, BERBARINA, BOND, BOUCHRA, BOUDOUR, CARMELLO, CHOUROUK, DONJOSE, DOUCEN, KHALIDA, MONDIAL, MORDJANE, NEDJMA, NISSMA, TAFNA, TAVIRA, TOUFAN, TYERNO, VERNON, ZAHRA.

Mais il est à noter que les hybrides suivants sont les plus utilisés en Algérie ACTANA, AGORA, BOND, NEDJMA, TAFNA, TAVIRA, TOUFAN, TYERNO et ZAHRA.

Dans le cas des variétés déterminées, il n'y a que deux feuilles entre les inflorescences. La croissance de la tige s'arrête avec l'apparition de l'inflorescence terminale et ce après avoir formé un certain nombre de bouquets variable selon les variétés (04 à 06 bouquets) (Snoussi, 2010). Pour ce type de croissance l'intervention de l'agronome reste sans intérêt puisque la croissance des plantes s'arrête toute seule après avoir formé une inflorescence au sommet de la tige. Pour ce type de croissance également, on retrouve des variétés fixées et des Hybrides. Nous avons comme variété fixée : la variété AICHA. Tandis que les hybrides homologués, ils se résument comme suit :

AMELY, ASSILA, BAHEYIA, CHENOVA, DOUKKALIA, EL KHAMAR, FAROUNA, GS12, HECTOR, HYMAR (SAHARA), JOKER, KARIMA, LAMANTINE, LUXOR, NOEMY, OUENZA, RED PRINCESS, SANTIAGO, SUPER RED, TOMALAND, TOP 48, TOVER, SUZANA, ZIGANA ZERALDA (Snoussi, 2010).

2.1.7- Production et importance

La tomate est, après la pomme de terre, le légume le plus consommé dans le monde, soit frais soit après transformation. Elle est cultivée sous toutes les latitudes dans des conditions très variées (climats, modes de production...), ce qui démontre une grande plasticité originelle et témoigne de l'efficacité du travail des sélectionneurs. La production mondiale de tomates a progressé régulièrement au cours du XXe siècle et s'est accrue considérablement durant les trois dernières décennies. Elle est passée de 48 millions de tonnes en 1978, à 74 millions en 1992, 89 millions en 1998, et a atteint 124 millions en 2006. Parmi les 16 pays qui ont produit 1 million de tonnes ou plus, 6 produisent au-dessus de 5 millions de tonnes (tableau 4 ci-dessous, source FAO, 2007). On estime que 30 % des tomates produites sont transformées. Ce pourcentage est très différent d'un pays à l'autre.

Tableau 4 principaux producteurs de la tomate (FAO, 2007).

	Zone	Production (tonne)
1	Chine	41879684
2	USA	12902000
3	Inde	11979700
4	Egypte	8544990
5	Turquie	10052000
6	Italie	6024800
7	Iran	5256110

La culture de la tomate occupe une place prépondérante dans l'économie agricole algérienne. Près de 33 000 ha sont consacrés annuellement à la culture de tomate (maraîchère et industrielle), donnant une production moyenne de 11 millions de quintaux et des rendements moyens d'environ 311 Qx/ha (tableau 5). Ces derniers demeurent faibles et assez éloignés de ceux enregistrés dans d'autres pays du bassin méditerranéen (Tunisie, Maroc, Espagne, France, Italie) producteurs de tomate, où les rendements varient entre 350 Qx/ha à 1500 Qx/ha (FAO, 2008).

Tableau 5 Evolution de la tomate maraichère en Algérie entre 2001-2009 (Snoussi, 2010).

	2001	2002	2003	2004	2005	2006	2007	2008	2009
Superficies Ha	16760	17820	18650	19432	21089	20436	20079	19655	20789
Productions Qx	3735340	4013640	4569330	5121950	5137280,4	5489336	5673134	5592491	6410343
Rendements Qx/Ha	222,87	225,20	245,00	263,60	243,60	268,60	282,50	284,50	308,40

En 2012, Les principaux pays producteurs sont la Chine, les USA, l'Inde, la Turquie, l'Egypte, l'Italie, l'Iran, le Brésil et l'Espagne (tableau 6).

En 2013, La tomate représente 8,2% de la surface totale assignée pour l'agriculture et les récoltes industrielles (MADR, 2013), la production représente 8,8% de la production totale des récoltes végétales et 8,3% de toute la production de l'agriculture et des récoltes industrielles.

Globalement, l'évolution des rendements de tomate est estimée à 18,16%, plus importante que celle des récoltes d'agriculture, estimée à 14,1%.

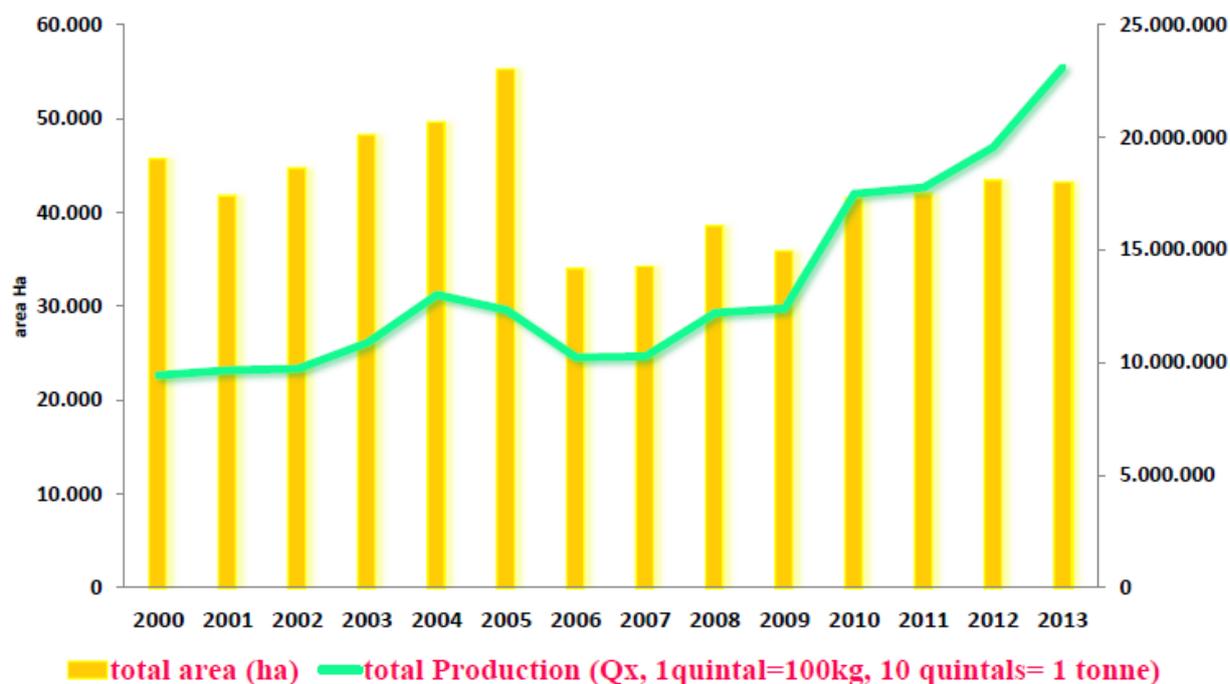


Figure 3 Évolution du secteur et la production de la tomate en Algérie, 2000-2013.

Tableau 6 Production mondiale de tomate en 2012 (<http://faostat.fao.org/>).

Position	Région	Production (T)
1	Chine, continentale	50000000
2	Inde	17500000
3	États-Unis d'Amérique	13206950
4	Turquie	11350000
5	Égypte	8625219
6	Iran (République islamique)	6000000
7	Italie	5131977
8	Brésil	3873985
9	Espagne	40070000
10	Mexique	3433567
11	Ouzbékistan	2650000
12	Fédération de Russie	2456100
13	Ukraine	2274100
14	Nigéria	1560000
15	Portugal	1392700
16	Maroc	1219071
17	Iraq	1100000
18	Tunisie	1100000

2.1.8- Les maladies de la tomate

En dépit de son importance, la culture de la tomate souffre de plusieurs problèmes aussi bien sur le plan agronomique que commercial. De point de vue agronomique, les problèmes phytosanitaires sont primordiaux. En fait, environ 200 maladies infectieuses, à diverses étiologies, peuvent affecter le fruit de la tomate (Jones *et al.*, 1991). Ces pathologies sont principalement dues à des champignons, bactéries et virus (tableau 7).

Tableau 7 Les principales maladies de la tomate.

Les maladies fongiques	Les maladies bactériennes	Les viroses
L'alternariose: causée par <i>alternaria alternata</i> f. sp. <i>lycopersici</i>	Le chancre bactérien : causé par <i>Clavibacter michiganensis</i> subsp. <i>michiganensis</i>	La mosaïque de la tomate causée par le virus de la
L'oidium: causé par <i>leveillula taurica</i>	La moucheture des feuilles : causée par <i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>syringae</i>	mosaïque de la tomate (ToMV) et par d'autres virus non spécifiques
La pourriture grise: causée par <i>Botrytis cinerea</i>	La tache bactérienne : causée par <i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>Tomato</i>	qui attaquent la tomate
Les fusarioses: causées par <i>Fusarium oxysporum</i> f. sp. <i>lycopersici</i> et <i>F.oxysporum</i> f.sp. <i>radici-lycopersici</i>	La moucheture bactérienne : causée par <i>Xanthomonas campestris</i> pv. <i>vesicatoria</i>	La maladie bronzée de la tomate : Virus de la maladie bronzée de la tomate (TSWV)
La verticilliose: causée par <i>Verticillium dahlia</i>	Le flétrissement bactérien : causé par <i>Ralstonia solanacearum</i>	Maladie des feuilles jaunes en cuillère de la tomate (Tylc) :
La cladosporiose: causée par <i>Fulvia fulva</i> = <i>Cladosporium fulvum</i>	La moelle noire : causée par <i>Pseudomonas corrugata</i>	Virus des feuilles jaunes en cuillère de la tomate (TYLCV)
	La pourriture molle bactérienne : causée par <i>Erwinia carotovora</i> subsp. <i>carotovora</i>	La jaunisse apicale de la tomate : Virus de la jaunisse apicale de la tomate

Il faut noter que la culture de la tomate est également soumise à l'action néfaste de plusieurs ravageurs tels que les insectes (mouche blanche, thrips, mineuse...), les nématodes (notamment les nématodes à galles) et les mollusques (surtout la limace grise). Et comme les maladies précitées, ces ravageurs causent aussi des pertes importantes au niveau de cette culture.

De nombreuses études écologiques ont permis d'identifier les diverses populations bactériennes présentes sur la tomate. Les études concernant les moisissures sont moins nombreuses, plus récentes, et se focalisent plus spécifiquement sur les moisissures responsables d'altération. De ce fait, on s'est intéressés dans le présent travail à l'étude de l'Alternariose de la tomate.

2.2- Alternariose de la tomate

2.2.1- *Alternaria* sp.

En 1816, Nees décrit pour la première fois un champignon qu'il a nommé *Alternaria tenuis*. Le genre *Alternaria* a par la suite été décrit par Neergaard, (1945); Joly, (1964) et Simmon, (1992). Il est classé parmi les *Deuteromycetes* (syn. *Adélomycètes, fungi imperfecti*). Cette classe renferme tous les champignons à mycélium cloisonné dont la forme de production et généralement inconnue mais possède un mode de multiplication asexuée, par conidies. Certaines espèces d'*Alternaria* ont une reproduction sexuée et leur forme parfaite appartient aux *Loculoascomycètes* (genre *Pleospora* ou *Lewia*) (Ellis, 1971; Simmons, 1986; Erikson et Hawksworth, 1991).

Le genre *Alternaria* comprend plus de 100 espèces ubiquitaires largement répandues dans les sols, la végétation, l'air ou les aliments (Simmons, 1993). Si certaines espèces vivent à l'état saprophyte pouvant occasionnellement être des agents pathogènes opportunistes, d'autres sont responsables de maladies atteignant les plantes et les insectes. Cependant, la majorité des espèces du genre *Alternaria* sont des champignons phytopathogènes inféodés à une famille de plantes ou à une plante spécifiquement.

Ils sont généralement présents sur les semences provoquant des manques à la levée ou des fontes de semis. Les jeunes pousses atteintes constituent une source importante d'inoculum primaire pour les plantes matures où tous les organes aériens peuvent être affectés (Champion, 1997).

La gamme de plantes hôtes concernées par les attaques d'*Alternaria* est très variée, regroupant les céréales (*A. triticina*) ; les cultures maraichères (*A. dauci* et *A. radicina*), comme la carotte, (*A. solani* et *A.alternata*), la tomate et pomme de terre, (*A. porri*), le poireau, (*A. brassicae* et *A. brassicicola*), le radis et chou ; et les cultures fruitières, (*A. mali*) sur pommier, (*A. citri*) sur citron et orange ou encore le tabac (*A. longipes*), le coton (*A. macrospora*) ou le lin (*A. linicola*) (Rotem, 1994 ; Guillemette, 2003).

2.2.1.1- *Alternaria alternata*

Alternaria alternata est un champignon filamenteux cosmopolite ubiquiste. Communément isolé à partir des plantes, des sols, de nourriture pourrie ainsi que de l'air ambiant des habitations (figure 4) (Criquet *et al.*, 2008).

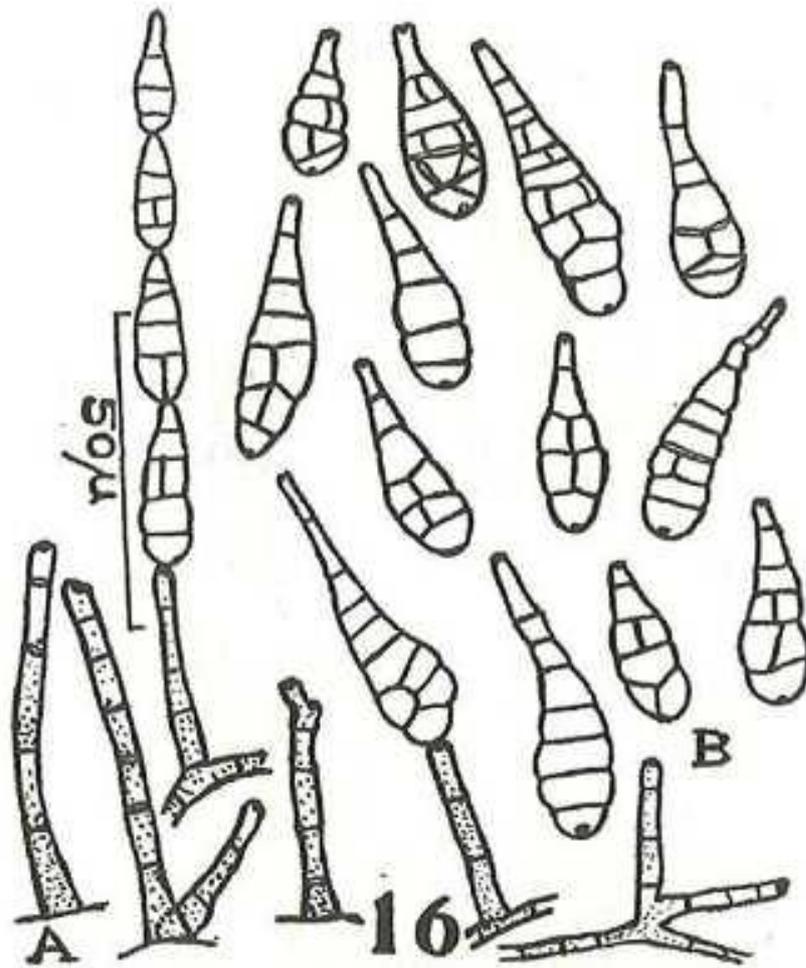


Figure 4 (A) Conidiophores et (B) Conidies d'*A. alternata* (Rao, 1964).

2.2.2- Alternariose (brulure précoce)

L'*Alternariose* de la tomate est une maladie importante et largement distribuée dans le monde entier causant des pertes économiques de rendement. Cette maladie est provoquée par *Alternaria solani* et *Alternaria alternata* (Agrios, 1997; Abbo *et al.*, 2012; AbdAlla *et al.*, 2014). Le terme précoce dans la brulure précoce a été utilisé pour distinguer la brulure tardive causée par *Phytophthora infestans* (Sherf et MacNab, 1986). La brûlure précoce est une maladie bien connue chez la tomate et la pomme de terre, elle a apparue plus tôt que la brulure tardive aux Etats-Unis d'où le nom de la brulure précoce. Toutefois, le nom induit en erreur, car la maladie attaque rarement les jeunes plantes en croissance et affecte souvent les plantes mures et âgées montrant une perte de vigueur. La brulure précoce peut affecter le feuillage, les tiges et dans des cas plus sévères, les fruits (figure 5). C'est une maladie fongique qui affecte les cultures des *Solanacées* dans le monde entier (Batista *et al.*, 2006).

2.2.3- Dégâts de la maladie

Les espèces d'*Alternaria* ont été signalées à causer des maladies dans près de 400 espèces de plantes; *A. alternata* seul peut infecter plus de 100 espèces de plantes (Simmons, 1992 ; Rotem, 1994). Ce phytopathogène peut entraîner une défoliation complète et des pertes de récolte dans de courtes périodes de temps (Chaerani *et al.*, 2006). Au Canda, Inde, Etas-Unis et au Nigeria, on a annoncé des pertes de rendement en hausse de 79% en raison des dégâts de la brulure précoce (Basu, 1974; Datar et Mayee, 1981; Sherf et MacNab, 1986 ; Gwary et Nahunnaro, 1998). Dans le cas d'épidémies sévères, l'*Alternariose* peut causer une défoliation prématurée, qui affaiblit les plantes et expose le fruit à une blessure d'insolation (Sherf et MacNab, 1986). Une fois le fruit infecté est tombé au sol, des pertes de 30-50% de la récolte ont lieu (Jones *et al.*, 1997). La brûlure précoce réduit les régions photosynthétiques, et qui dans des cas servers peut défolier les plantes. Cette maladie débute sur les feuilles de la base et suivant les conditions de l'été, progresse rapidement vers le sommet (Bovey, 1972). Le rendement est réduit lorsque les plantes ne parviennent pas à fructifier.

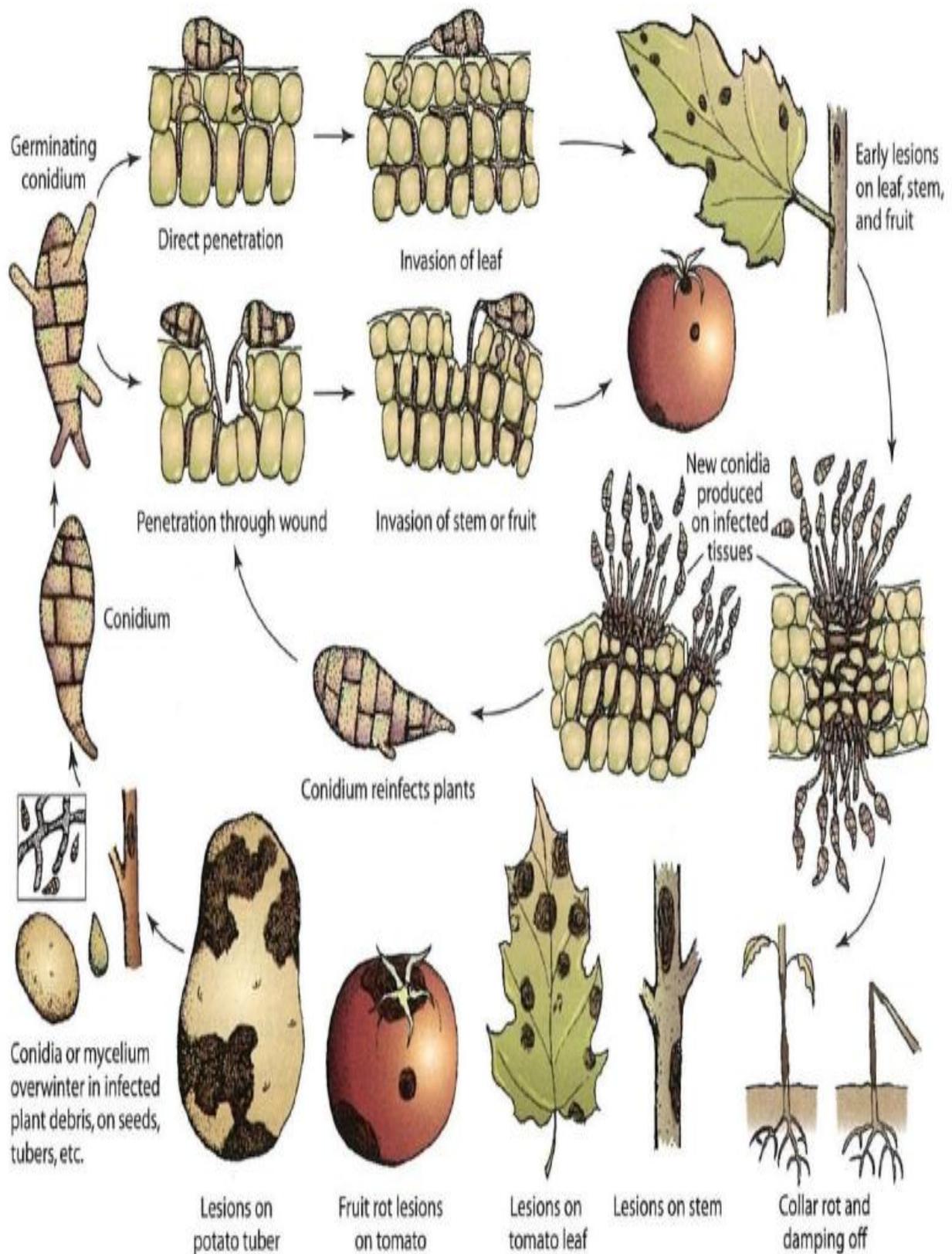


Figure 5 Développement et symptômes de maladies causées par *Alternaria* spp. (Agris, 2005).

2.2.4- Symptômes

Les premiers symptômes de la brûlure précoce apparaissent généralement sur les feuilles les plus âgées et étendent vers le haut, et par conséquent les plantes deviennent vieilles. Il s'agit des lésions nécrotiques sombres et petites (Sherf et MacNab, 1986). Les feuilles sur les plantes infectées développent des taches marron foncé avec des anneaux concentriques (figures 6A).

Les taches nécrotiques marron foncé ont des anneaux concentriques dans lesquels de nouvelles spores sont produites et ces anneaux sont entourés d'un halo chlorotique causé par les toxines secrétées. Généralement, l'infection commence par les feuilles inférieures, qui deviennent jaunes ou brunes et penchent ensuite ou tombent. Si le climat est favorable, la maladie se développe rapidement, les taches se diffusent sur les feuilles et la plante devient défoliée (Watterson, 1986). Sur la tige principale et les branches latérales des plantes adultes, le champignon cause de petites zones, sombres, qui agrandissent pour former des taches allongées marron foncé, qui parfois, montrent des anneaux concentriques comme ceux sur les feuilles. Ces taches sont dispersées le long de la tige et les branches (figures 6 B).

Sur les fruits, des taches concaves, bien délimitées, apparaissent à proximité de la cicatrice pédonculaire et des sépales (figures 6 C, D). Ces derniers, colonisés dans un premier temps, sont souvent altérés. La surface des zones altérées des fruits se plisse, elle peut se couvrir d'une moisissure noire, veloutée, assez caractéristique, et on y retrouve des motifs concentriques, comme sur les feuilles (Blancard *et al.*, 2009). L'infection du fruit se produit lorsque le fruit est vert ou mur (Jones *et al.*, 1997) .



Figure 6 Symptômes d'Alternariose sur feuilles (A), tiges (B), et fruits(C, D) de tomate.

2.3- La lutte biologique

La lutte biologique a été proposée comme une alternative à la lutte chimique. Elle est basée sur l'utilisation d'organismes vivants ou de produits issus de ces organismes pour limiter ou réduire les pertes ou les dommages causés par les organismes nuisibles (OILB, Organisation Internationale de Lutte Biologique). L'utilisation de microorganismes fait partie des alternatives prometteuses à l'emploi des fongicides chimiques, parmi les avantages que représentent ces derniers c'est leur ubiquité ; grande diversité ; et dissémination dans les sols rhizosphériques (Benhamou *et al.*, 1996). Dans l'agriculture biologique la biodiversité et les ennemis naturels des espèces nuisibles sont exploités (Fernandes, 2005).

Les chercheurs ont attribué la capacité de lutte des microorganismes à divers mécanismes qu'ils développent, à savoir : la compétition ; le parasitisme ; l'antibiose ; et l'induction de la résistance de la plante hôte.

2.3.1- Antibiose

L'antibiose est un phénomène d'inhibition directe de la croissance du pathogène via la production de métabolites ayant des propriétés antifongiques et/ou antibiotiques. Les genres *Bacillus*, *Streptomyces* ou des *Stenotrophomonas* sont capables de produire l'oligomycine A, la kanosamine, la zwittermicin A ou la xanthobacine (Milner *et al.*, 1995; Hashidoko *et al.*, 1999; Kim *et al.*, 1999; Nakayama *et al.*, 1999). Ces composés, de haut poids moléculaire, sont capables à faible dose d'être efficace contre la sporulation et la croissance mycélienne d'un large spectre de champignons (Ligon *et al.*, 2000; Raaijmakers *et al.*, 2002).

2.3.2- Compétition

La compétition pour les éléments nutritifs (sucre, éléments minéraux...) est un mécanisme fortement impliqué dans la suppression de nombreux pathogènes. Les PGPR (rhizobactéries promotrices de la croissance des plantes) doivent être présents sur les racines en nombre suffisant pour avoir un effet bénéfique sur les plantes et pour être capable d'instaurer une compétition pour les nutriments dans la rhizosphère (Haas et Defago, 2005).

2.3.3- Parasitisme

Certains microorganismes, agents de la lutte biologique, sont capables de produire des enzymes hydrolytiques (chitinases, β -1,3-glucanases ou cellulases) qui dégradent les constituants pariétaux des cellules fongiques. la lyse des cellules est provoqué par conséquent et le développement du champignon est interrompu (Davet, 1996; Whipps, 2001). Une corrélation

positive a été montrée entre la production d'enzymes chitinolytiques par des bactéries du genre *Bacillus sp.*, *Lysobacter sp.*, *Paenobacillus sp.*, *Pantoea sp.*, *Pseudomonas sp.*, *Streptomyces sp.* et la capacité de ces souches à inhiber la croissance de champignons du sol, tels que *Fusarium oxysporum*, *Fusarium solani*, *Rhizoctonia solani*, *Pythium ultimum* et *Bipolaris sorokiniana* (Lim *et al.*, 1991; Chernin *et al.*, 1995; Pleban *et al.*, 1997; Singh *et al.*, 1999; Palumbo *et al.*, 2005).

2.3.4- Induction de la résistance de la plante hôte

C'est la stimulation des mécanismes de défense inductibles chez l'hôte (plante), rendant celle-ci moins susceptible vis-à-vis d'une infection ultérieure par un agent pathogène. Ce phénomène est appelé ISR pour résistance systémique induite qui a été mis en évidence chez plusieurs plantes pour lutter contre une gamme relativement large de pathogènes fongiques, bactériens ou viraux. Cependant, les bases moléculaires des mécanismes de défense proprement dits stimulés lors de l'ISR restent assez méconnues malgré les nombreux travaux réalisés cette dernière décennie. L'ISR se fait en trois étapes principales, à savoir : la perception des molécules actives produites par le PGPR ou élicitation ; la transmission d'un signal systémique dans la plante; et l'expression des mécanismes de défense de l'hôte (Ongena *et al.*, 2006) (figure 7).

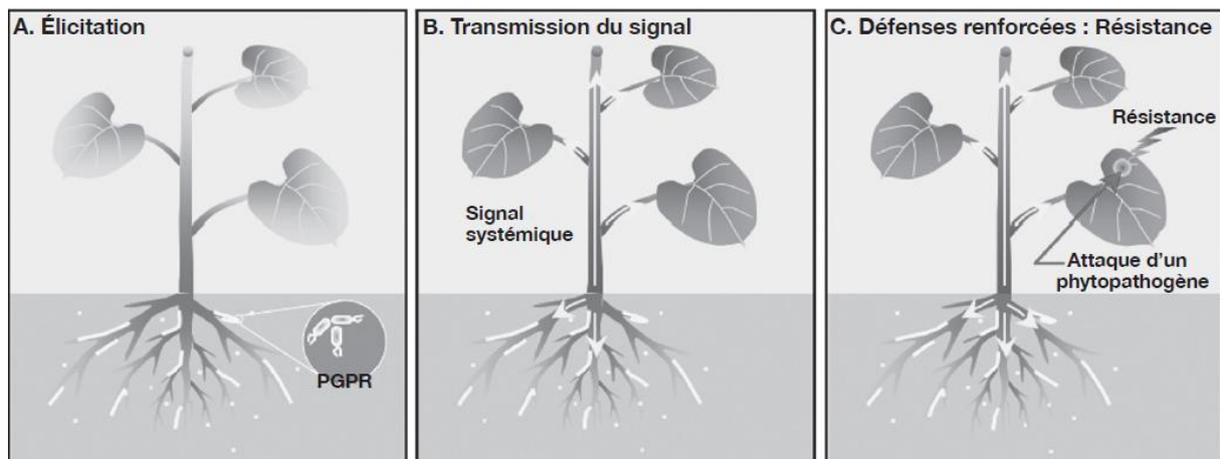


Figure 7 La résistance systémique induite chez les plantes par des rhizobactéries — *Rhizobacteria-induced systemic resistance in plants*. A: L'élicitation : les rhizobactéries ou PGPR (*Plant Growth Promoting Rhizobacteria*) interagissent avec les racines de l'hôte et produisent des éliciteurs qui sont perçus par la plante ; B: Après la reconnaissance des déterminants, un signal est véhiculé dans l'ensemble de la plante afin de l'alerter ; C: Enfin, lors d'une éventuelle attaque par un agent phytopathogène, la plante sera en mesure de répondre plus efficacement à l'agression, lui conférant ainsi une résistance.

2.4- Agents de biocontrôle : genres *Bacillus* et *Providencia*

2.4.1- *Bacillus*

Le genre *Bacillus* est très hétérogène, comprend au moins 36 espèces. Ce sont en générale des bacilles unicellulaire à GRAM +, oxydase négatif, catalase positif, mobiles sauf *Bacillus anthracis*. Elles sont aérobie strictes ou anaérobies, facultatifs suivant les espèces et tirent leur énergie de la respiration ou la fermentation. Lorsque les conditions deviennent défavorables, les *Bacillus* sporulent et donnent des spores souvent très résistantes dans le milieu extérieur. Elles peuvent être conservées longtemps dans un endroit frais et sec. Les *Bacillus* sont chimio-hétérotrophes, saprophyte et ubiquitaires, il existe des espèces thermophiles et acidophile (Madigan et Martink, 2007). Toutes les espèces du groupe *Bacillus subtilis* sont non pathogène à l'homme, selon le US Food and Drug Administration (USFDA). Chose qui explique leur large utilisation dans le domaine de la recherche ainsi qu'en agriculture organique. Important de signaler que le genre *Bacillus* possède la possibilité de se sporuler dans des conditions défavorables ce qui facilite sa production industrielle et sa formulation en un produit stable (Harwood et Wipat, 1996; Lolloo *et al.*, 2010). Le genre *Bacillus* appartient à la tribu !! des *Bacillini*, sous-famille des *Bacillinae*, famille des *Bacillidae* et enfin sous-ordre des *Areolatae* (Bradley et Galil, 1977). Dans la région Méditerranéenne il existe aux moins 10 espèces de *Bacillus* (Bullini *et al.*, 1983; Mantovani et Scali, 1990, 1991). Selon la classification de Bergey, le genre *Bacillus* est classé comme suit (Tableau 8).

Tableau 8 Classification du genre *Bacillus*.

Régne	<i>Bacteria</i>
Phylum	<i>Firmicutes</i>
Classe	<i>Bacilli</i>
Ordre	<i>Bacillales</i>
Famille	<i>Bacillaceae</i>
Genre	<i>Bacillus</i>

2.4.2- *Providencia*

Le genre *Providencia* comprend des bacilles à Gram-négative, appartenant à la famille des Enterobacteriaceae, se compose de 9 espèces, à savoir ; *Providencia alcalifaciens*, *Providencia stuartii*, *Providencia rettgeri*, *Providencia rustigianii*, *Providencia heimbachae*, *Providencia vermicola*, *Providencia sneebia*, *Providencia burhodogranariae* et *Providencia thailandensis* (Janda et Abbott, 2006; Somvanshi *et al.*, 2006; Juneja et Lazzaro, 2009; Khunthongpan *et al.*, 2013). *P. vermicola* sp. a été rapporté pour la première fois par Somvanshi *et al.*, (2006), en se basant principalement sur les résultats de séquençage du gène ARNr *16S*. Cette souche a été isolée par Hussain *et al.*, (2015) à partir de la rhizosphère de la graine de colza. En effet, deux souches de *Providencia vermicola* KP-21 et KR-29 ont été identifiées par l'analyse d'ADN-*16S*. Les souches KP-21 et KR-29 ont été à l'origine isolées de la rhizosphère de la graine de colza développée à Peshawar et Rawalakot, respectivement. Morphologiquement, les deux souches étaient semblables, représentant des colonies crémeuses rondes (Hussain *et al.*, 2015). Par ailleurs, Aish *et al.*, (2015) ont isolé *P. vermicola* à partir de plantes saines de poivre, où leur effet a été montré contre l'agent pathogène de nématode *M. javanica* a été étudié.

2.5- Les lipopeptides

Les lipopeptide (LPs), sont des antibiotiques dont la structure moléculaire renfermant un cycle, composé de 7 ou 10 résidus d'acides α -aminés L ou D, relié à un acide gras β -hydroxylé ou β -aminé à longue chaîne carbonée (Bonmatin, 2003). Les LPs sont classés en trois familles selon la composition de la chaîne peptidique en acides aminés ; pour chacune, on distingue plusieurs homologues, variant selon la nature (saturé ou insaturé) et la longueur de l'acide gras (de 13 à 18 atomes de C) ; ainsi que l'isomérisation (linéaire, iso ou antéiso) de la chaîne lipidique. La figure 8 présente la structure des différents lipopeptides: surfactines, iturines et fengycines (Ongena et Jacques, 2008; Adam, 2008).

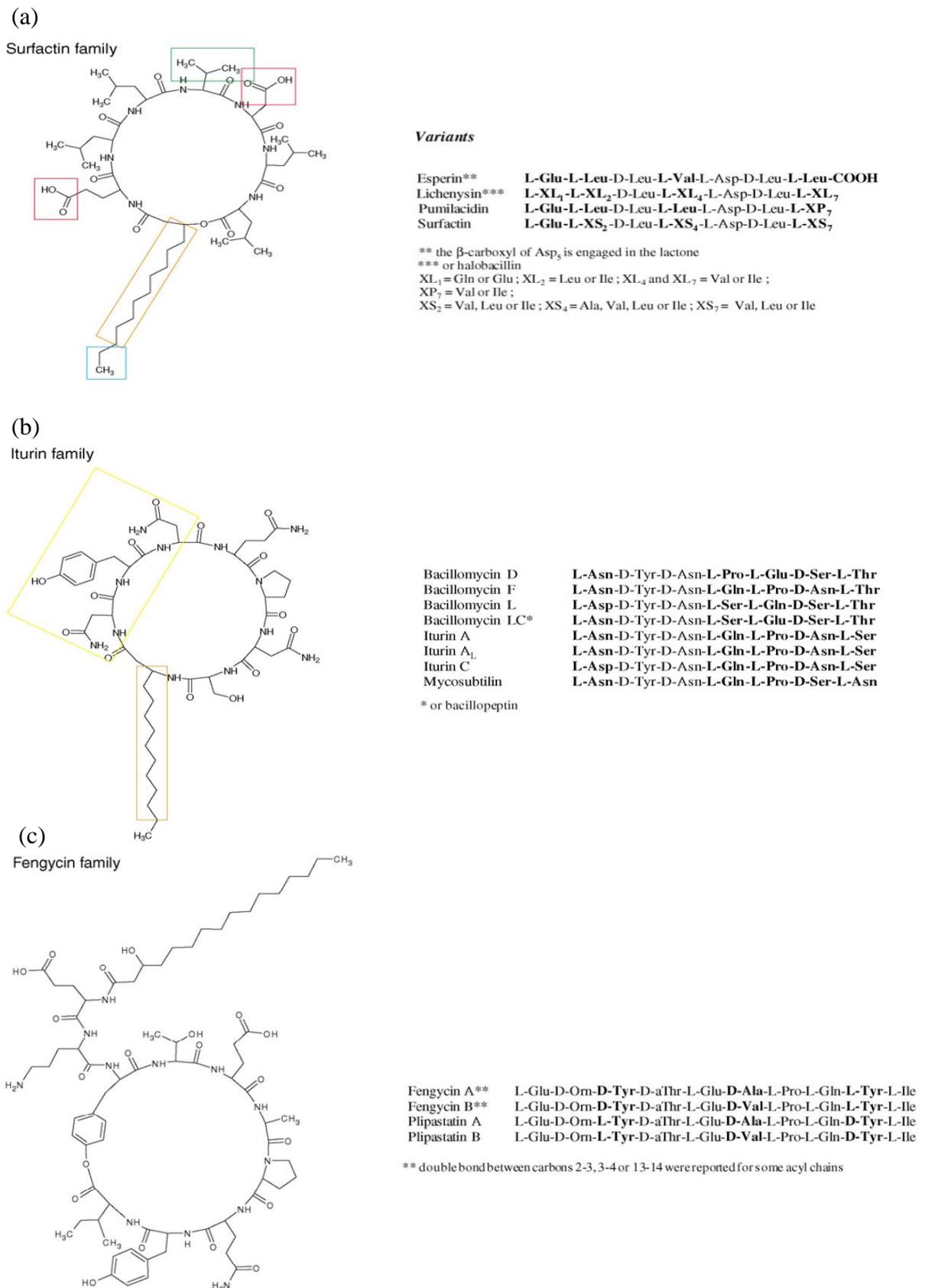


Figure 8 Structure de différentes variétés des trois familles de lipopeptides (a) surfactines (C12-C16), (b) iturines et (c) fengycines (C14-C18) (Ongena et Jacques, 2007).

La famille des surfactines englobe les variantes héptapeptidiques d'esperine, lichenysine, pumilacidine et de surfactine. Le cycle héptapeptidique est directement lié à une longue chaîne hydrocarbonée (C12-C16), par une liaison ester. L'iturine A et C, bacillomycine D, F et L, et la mycosubtiline sont les six principales variantes de la famille des iturines. Dans le cas des iturines, l'héptapeptide est lié à l'acide gras (C14–C17) par une liaison amide.

La troisième famille comprend les fengycine A et B, ou plipastatine, si le Tyr₉ est de configuration D. Il s'agit d'un acyldécapeptide cyclique formant une structure lactonique constituée d'une chaîne d'acide gras 3-hydroxylée ayant 14 à 19 atomes de carbone liée à l'acide α-aminé (L-Glu).

Dans ce cas, la connexion de l'acide α-aminé C-terminal de la fengycine se fait avec le résidu Tyr₃ de la séquence d'acides aminés, contrairement à la surfactine où la liaison ester est formée entre l'acide α-aminé C-terminal et le groupement hydroxyl de l'acide gras, (Ait kaki, 2013). La biosynthèse des LPs se fait par le biais des peptides non ribosomiaux synthétases (NRPSs) par le processus de «thiotemplate» (Ongena et Jacques, 2008). Il est à noter que les polyketides synthétase (PKS) et les acides gras synthétases interviennent aussi dans la synthèse de la famille des iturines par le processus de «PKS/NRPS template» (Hansen *et al.*, 2007). La production des surfactines se fait durant la phase exponentielle de croissance et celle des iturines et des fungycines durant la phase stationnaire (Jacques *et al.*, 1999). Les iturines et les fungycines sont connues par leur activité antifongique tandis que les surfactines sont essentiellement des molécules tensioactives (Carrillo *et al.*, 2003). La grande diversité des lipopeptides s'exprime par l'incorporation dans leur structure primaire de différents acides aminés et acides gras (Moynes *et al.*, 2004).

2.5.1- Rôles des lipopeptides

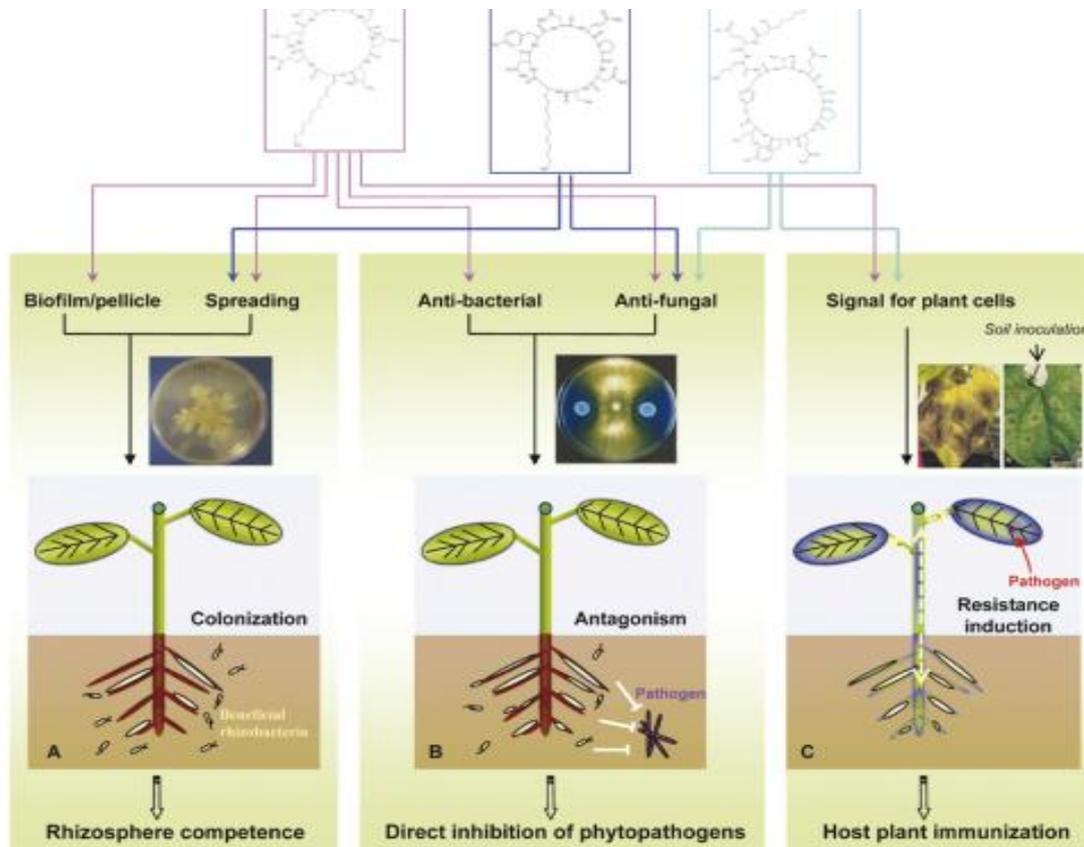
Les lipopeptides sont des molécules amphiphiles, ayant des affinités avec l'eau et les lipides. En fait, leur partie peptidique est plutôt soluble dans l'eau (hydrophile) et leur partie lipidique est plutôt soluble dans l'huile (partie hydrophobe ou lipophile). Cette particularité a engendré des propriétés physico-chimiques qui y sont spécifiques, leur permettant ainsi d'assurer des activités biologiques diverses (Leclère *et al.*, 2006).

Certaines molécules, telle la surfactine, sont ainsi de puissants surfactants (agent moussant ou émulsifiant).

Ongena et Jacques (2008) ont montré que les lipopeptides jouent plusieurs rôles dans le bio contrôle se balançant entre la favorisation de la croissance invasive de la souche qui les produit donc potentiellement la colonisation des racines et des feuilles (essentiellement les

surfactines); l'inhibition de la croissance et/ou la germination d'un grand nombre de champignons phytopathogènes (fengycines et iturine); et la stimulation des défenses naturelles des plantes (surfactines et fengycines) (figure 9)

Figure 9 Rôle des trois familles de lipopeptides dans (A): colonisation des racines et formation de biofilms; (B) Antibiose directe par inhibition de croissances des phytopathogènes; (C) Induction du système immunitaire de la plante (ISR) (Ongena *et al.*, 2007).



2.5.1.1-Colonisation des racines des plantes

Les lipopeptides, peuvent intervenir de différentes manières pour mettre en place le phénomène de colonisation des racines par les bactéries du genre *Bacillus*. L'attachement et l'agrégation des microcolonies sous forme de biofilme est à la base de ce phénomène (Ramey *et al.*, 2004). Un deuxième processus déterminant qui est « le swarming » se manifestant par le déplacement des colonies bactériennes sur la racine pour atteindre la niche la plus riche en nutriments. Ce mouvement dépend principalement de la production des biosurfactants (Daniels *et al.*, 2004).

Dans ce contexte, les études ont montré le rôle des surfactines et non pas des fengycines ou des iturines, interviennent dans la formation des pellicules dans l'interface eau-air (Kinsinger

et al., 2003). Par ailleurs, la stabilité des biofilms formés est assurée grâce aux molécules de surfactines, comme établi par Bais et ses collaborateurs qui ont étudié la colonisation des racines d'*Arabidopsis thaliana* par la souche *B. subtilis* 6051 sur les racines d'*Arabidopsis* (Bais *et al.*, 2004). Il est important de signaler que la suppression de l'expression des surfactines dans cette souche diminue le taux de colonisation et le biocontrôle de la maladie causée par *Pseudomonas syringae* (Ahimou *et al.*, 2000). Enfin, il a été récemment démontré que les surfactines et les mycosubtilines fonctionnent comme des agents mouillants, en réduisant la tension de surface (Leclere *et al.*, 2006).

2.5.1.2- Antagonisme

C'est le phénomène d'inhibition de la croissance des champignons in situ ça veut dire dans les différentes parties de la plante y compris la rhizosphère et la phyllosphère.

En fait, l'iturine A produite par le *B. subtilis* RB14 augmente le taux de germination des plantes de tomates et les protègeait contre le pathogène racinaire *Rhizoctonia solani*, selon une étude réalisée par Asaka et Shoda. (1996). En outre, la contribution des iturines et des fengycines dans le contrôle de la phyllosphère du melon infecté par *Podosphaera fusca* a été mise en évidence par la récupération de ces LPs des feuilles traitées et en utilisant la technique «LP déficient transformant». En plus, Preecha *et al.* (2010) ont démontré que la réduction de la sévérité de la maladie des plantes de soja causée par les *Xanthomonas axonopodis* pv. *glycines* (KU-K-46012) est due aux surfactines produites par le *B. amyloliquefaciens* (KPS46). Enfin, le *Bacillus subtilis* GA1 qui produit de quantités importantes de lipopeptides et plusieurs homologues de fengycines protège les fruits de pomme contre *Botrytis cinerea*. Le rôle des fengycines a été démontré par traitement des fruits par des extraits enrichis et par récupération de ce lipopeptide, des zones d'inhibitions sur les fruits traités.

2.5.1.3- Induction du système de défense des plantes

Le phénomène d'induction du système de défense des plantes de tomates et de soja est fortement lié à la surexpression des gènes de fengycines et de surfactines par le *B. subtilis* 168 (Ongena *et al.*, 2007). Par ailleurs, le traitement des suspensions de cellules de tabac avec la surfactine seule, induit aussi des réactions immunitaires comme la phosphorylation, l'alcalinisation extracellulaire Ca^{2+} dépendante, sans provoquer la mort des cellules (Jourdan *et al.*, 2009).

2.6- Analyse par Cytometrie en Flux

La cytométrie en flux (FCM) devient de plus en plus importante pour l'évaluation microbienne de populations et de communautés (Müller et Caron, 2010), dans les diverses analyses médicales (Walberg *et al.*, 1996; Gauthier *et al.*, 2002); la commande d'industrie laitière (Rault *et al.*, 2007); la production de boisson alcoolique (Boyd *et al.*, 2003); environnement; et système de contrôle de l'eau (Czechowska *et al.*, 2008). La cytométrie en flux peut être combinée avec des marqueurs cellulaires comme le diacétate de carboxyfluorescein (cFDA), un marqueur déterminant l'activité intracellulaire d'estérase (Nguefack *et al.*, 2004; Flint *et al.*, 2006).

CFDA est un colorant lipophile, non fluorescent, utilisé principalement pour l'évaluation de l'activité enzymatique cellulaire. En fait, il diffuse à travers les membranes des cellules, puis, il se convertit par les estérases non spécifiques en composé fluorescent de membrane imperméable (figure 10), le carboxyfluorescein (cF), qui est maintenu en cellules viables avec les membranes cytoplasmiques intactes (figure 11) (Petit *et al.*, 1993).

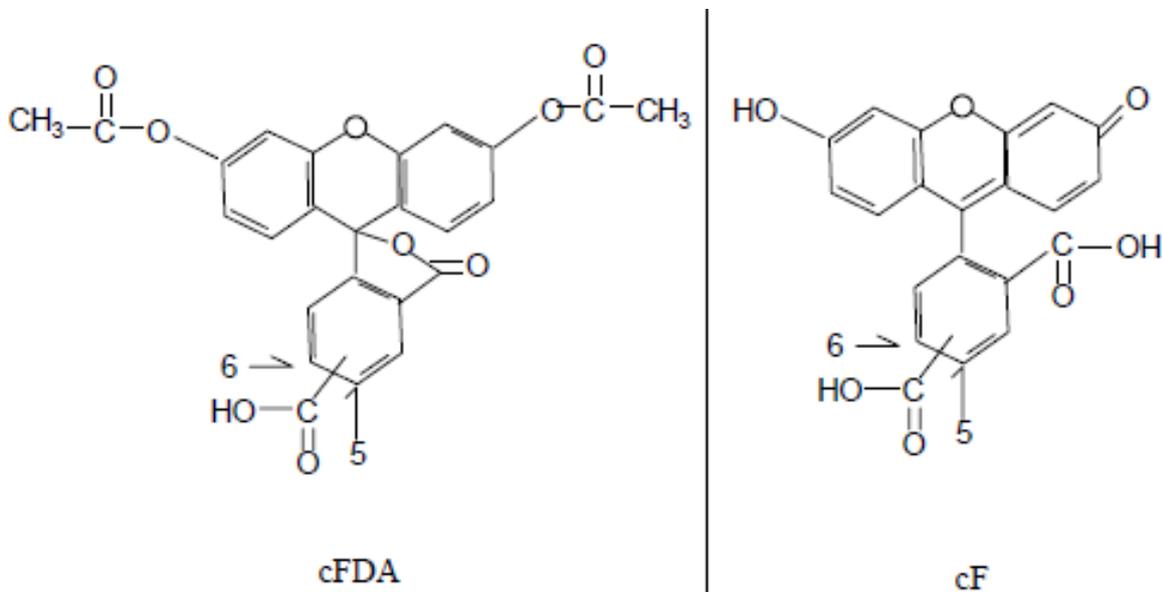


Figure 10 Structures chimiques de 5(6)-Carboxyfluorescein diacétate (cFDA) et 5(6)- Carboxyfluorescein (cF).

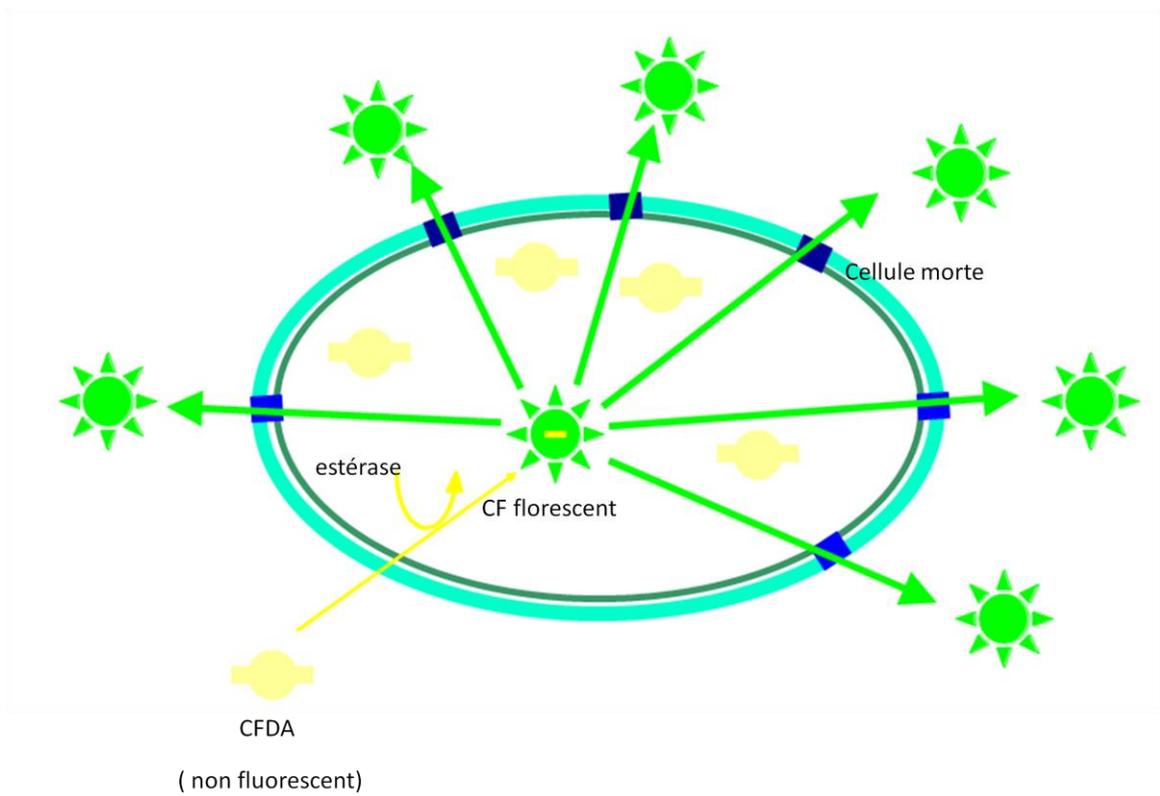
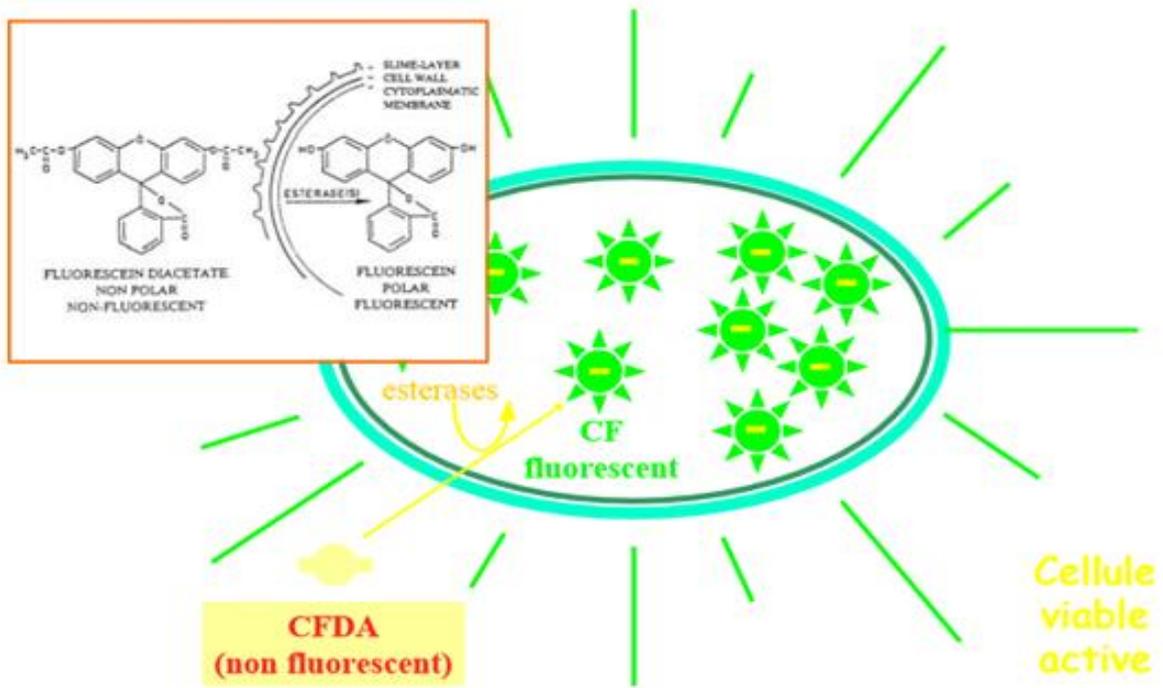


Figure 11 Principe du cFDA, détection de l'activité enzymatique estérase.

Celon Villas, (1998) la Cytométrie en Flux (CMF) est une technique de comptage et d'étude de particules microscopiques, telles que les cellules et les chromosomes. Ces derniers sont suspendus dans un flux de liquide et passés devant un appareil de détection optique ou électronique.

Elle permet simultanément une analyse multiparamétrique des caractéristiques physiques ou chimiques de quelques milliers de particules par seconde. En effet, cette technique permet de déterminer énormément de propriétés d'une suspension de cellules : son état d'activation ou de mort en utilisant des colorants par exemple : Pi, cFDA.....etc; Elle permet également de distinguer des informations concernant des cellules différentes, présentes dans la même suspension; voir même de trier ces cellules physiquement, pour pouvoir obtenir des populations pures à partir d'un mélange.

L'utilisation de la cytométrie en flux en combinaison avec des colorants fluorescents comme une technique permettant de différencier et d'énumérer rapidement les bactéries et les levures est bien établie (Bell *et al.*, 1998; Bleve *et al.*, 2003; Mayoral *et al.*, 2006; Melacrino *et al.*, 2001). De plus, cette technique est exploitée pour mesurer les cellules mortes des champignons filamenteux ainsi que la quantification des conidies (Michaliszyn *et al.*, 19951 ; Jahn *et al.*, 1998).

2.6.1- Principes

Il s'agit d'analyser les signaux optiques ou physiques émis par une particule coupant le faisceau lumineux d'un laser ou d'une lampe à arc. Les signaux mesurés sont essentiellement relatifs aux propriétés optiques intrinsèques des particules qui correspondent aux phénomènes de diffusion lumineuse liés aux dimensions de la particule, à leur structure interne ou à l'auto-fluorescence de certaines cellules comme les végétaux, le phytoplancton, etc . Ils sont relatifs aussi aux propriétés optiques induites de fluorescence obtenues par des marquages spécifiques de structures ou de fonctions cellulaires (Ormerod, 2000). Le procédé d'analyse individuelle (cellule par cellule) et multiparamétrique peut s'effectuer à la vitesse de plusieurs milliers d'événements par seconde (Chen, 2012).

Le cytomètre en flux comprend trois parties :

- un réseau fluide constitué d'une veine liquide s'écoulant à vitesse constante qui entraîne et focalise un deuxième flux liquide contenant l'échantillon;
- un banc optique avec une ou plusieurs sources lumineuses et ses détecteurs de type photodiode (pour la diffusion de la lumière) et des photomultiplicateurs et filtres optiques qui permettent de quantifier les diverses fluorescences émises par chaque objet;

- un microprocesseur qui convertit les signaux électriques en signaux numériques, coordonne les données, réalise les représentations graphiques et les analyses statistiques.
Le principe de FCM est illustré dans la figure 12.

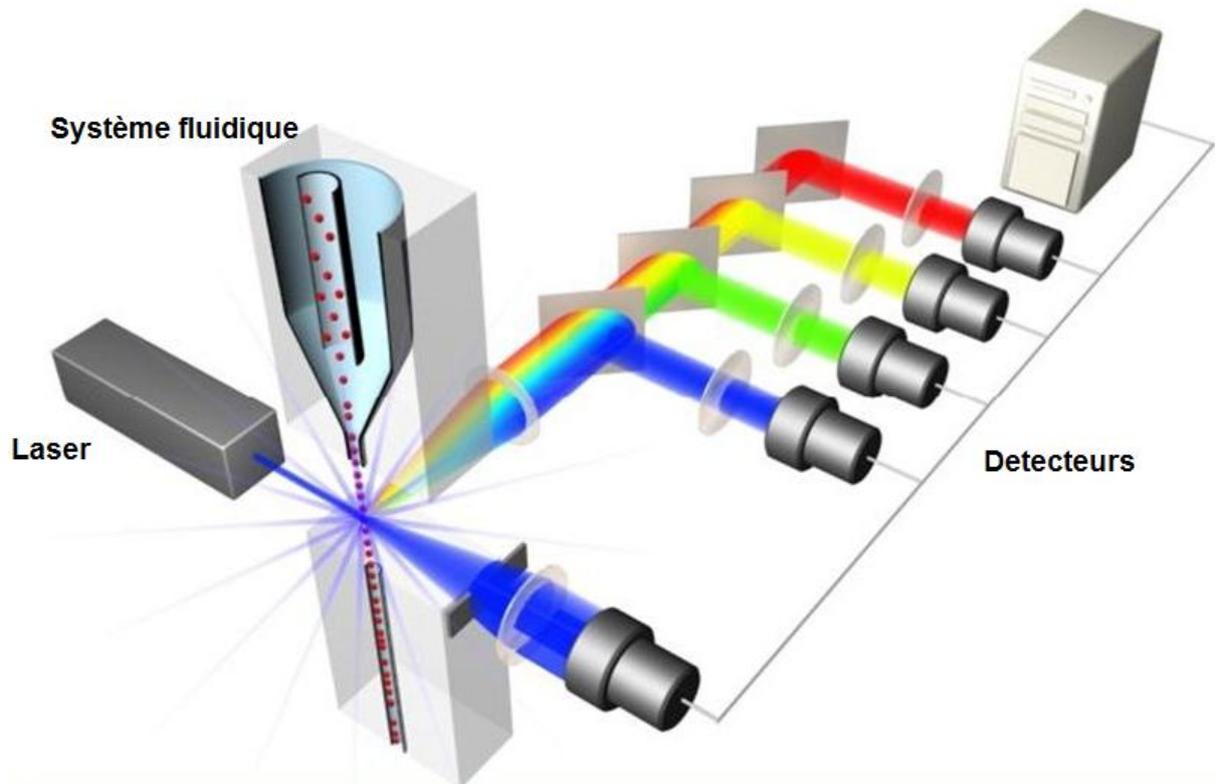


Figure 12 Principe de la cytométrie en flux.

Matériel et Méthodes

3- Matériel et méthodes

En Algérie, les maladies fongiques des cultures agricoles sont principalement traitées par des fongicides chimiques connus pour leurs effets néfastes et toxiques sur l'environnement et la santé humaine. La recherche de l'alternative respectueuse de l'environnement se focalise de plus en plus sur des produits biologiques à activité durable sur les agents phytopathogènes. Aussi, l'objectif du présent travail consiste à rechercher des bactéries de différents écosystèmes algériens développant une activité antagoniste vis-à-vis de l'agent de l'Alternariose de la tomate. Pour ce faire, plusieurs techniques, méthodes et matériel ont été utilisés.

3.1- Isolement de l'agent phytopathogène (*Alternaria alternata*)

Les échantillons de plantes et de fruits de tomate présentant des symptômes d'Alternariose ont été prélevés à partir des serres de la région d'Ain Ben SBAA (Hamma Bouzienne-Constantine), au cours de la période allant de 2011 à 2012.

Les échantillons ont été mis dans des sachets stériles en plastique, étiquetés puis ramenés au laboratoire.

Les différentes parties de la tomate récupérées ont été découpées et désinfectées en trempant les parties concernées pendant 2 min dans une solution de 0.1% de l'hypochlorite de sodium. Ensuite, les fragments ont été déposés sur milieu Potatos dextrose Agar (PDA) (Annexe1) coulé en boîtes de Pétri stériles. Les boîtes ont été incubées à l'obscurité à une température de 25°C pendant 7 jours. La purification des cultures a été obtenue après plusieurs repiquages successifs (Attrassi *et al.*, 2007).

3.2– Identification de l'agent phytopathogène

3.2.1- Étude des aspects macroscopiques et microscopiques

L'identification préliminaire de la souche fongique isolée et purifiée a été réalisée par l'observation de l'aspect macroscopique (texture du mycélium, couleur du thalle et le revers de la colonie), et microscopique (nature du thalle taille et la forme des spores) des cultures obtenues (Botton *et al.*, 1990).

3.2.2- Étude moléculaire

L'identification par voie moléculaire a été réalisée par des analyses des séquences d'ADN-ITS en utilisant le protocole proposé au niveau du Laboratoire des Microorganismes et Biomolécules Actives (LMBA), Tunisie qui se développe comme suit :

3.2.2.1- Extraction de l'ADN fongique

Le mycélium des cultures obtenues a été écrasé dans des eppendorfs additionnés de 500 µL de TES (10 mM Tris-HCl, pH 8, 0.1 mM EDTA, 2% SDS) et le mélange a été mis pendant 1h à température ambiante. 150 µL de la solution tampon d'acétate de potassium ont été ajoutés et homogénéisé par le vortex, et centrifugé à 12.000 rpm/min pendant 8 minutes. Le surnageant a été mis dans un nouvel eppendorf additionné de 600µL d'isopropanol avec agitation par inversion (approximativement 10 fois). Le mélange a été, de nouveau, centrifugé à 12.000 rpm/min pendant 5 minutes (répétées deux fois). L'ADN récupéré a été lavée avec 300µL de l'éthanol (70%). La suspension d'ADN a été, de nouveau, centrifugée à 12.000 rpm/min pendant 5 minutes (répétées deux fois). L'éthanol a été jeté et les eppendorfs contenant l'ADN ont été séchés sous speed vac à 40 °C pendant 30 min. L'ADN récupéré a été dissout dans 50µL de TE (10 mM Tris-HCl, pH 8, 0.1 mM EDTA). Après 1 h d'incubation à 37 °C, l'ADN a été stocké à -20 °C.

Pour vérifier le bon déroulement de l'extraction d'ADN de l'isolat fongique, les concentrations d'ADN ont été estimées en utilisant l'appareil de *Nanodrop* 2000. L'ADN absorbe à 260 nm alors que les protéines (témoins de contamination) absorbent à 280 nm. Par mesure spectrophotométrique de la densité optique (DO) de l'ADN et par le moyen du rapport DO 260 nm/DO 280 nm, la pureté de l'ADN a été déterminée en indiquant la contamination de l'ADN par les protéines ou par les ARN. De ce fait, la bande de l'ADN est apparue plus claire si le rapport $R = DO_{260}/DO_{280}$ est compris entre 1,8 et 2 ($1,8 < R \leq 2$).

3.2.2.2- Amplification de l'ADN (réaction PCR)

Pour amplifier l'ADN, deux amorces de la région Internal Transcribed Spacer (ITS) de l'ADN nucléaire ont été visées. L'amplification de cette région a été réalisée par PCR à l'aide des amorces de paire ITS1 (TCCGTAGGTGAACCTGCGG) et ITS4 (TCCTCCGCTTATTG ATATGC). La réaction d'amplification a été faite dans un volume final de 24 µl du mélange réactionnel suivant: (1X Tampon de la réaction 2.5 µl, Tampon MgCl₂ 1.5 µl, une solution des différents désoxyribonucléotides triphosphates notée: dNTPs 0.3 µl (10 mM), 0.5 µl ITS1, 0.5 µl ITS4, H₂O ultra pure 17.5 µl, Taq polymérase 0.2 µl, ADN 1 µl). Le mélange réactionnel ou mix réactionnel a été réalisé pour un nombre n de tubes, puis réparti à raison de 23 µl/tube, ensuite 1 µl de l'ADN est ajouté en dernier au mélange réactionnel. La réaction d'amplification a été réalisée dans le thermocycler (T3000 thermocycler) selon le programme suivant : 95°C pendant 5 min (un cycle de dénaturation) ; 95°C pendant 30 secondes (30 cycles de dénaturation) ; 55°C pendant 30 secondes (un cycle Hybridation des amorces) ; 72°C

pendant 1 minute (un cycle d'extension ou polymérisation) ; 72°C pendant 15 minutes (un dernier cycle pour achever la polymérisation).

3.2.2.3- Visualisation des gènes amplifiés par électrophorèse

Les produits d'amplification ont été séparés par électrophorèse sur un gel d'agarose à 1,5 % additionné de 3µl de bromure d'éthidium. Cette électrophorèse a été réalisée dans un tampon TBE (80 mM Tris-HCl, pH 8, 2.5 mM EDTA, 89 mM acide borique), pendant 2h 30 min à 3h sous une différence de potentiel de 120 volts. Les bandes amplifiées ont été visualisées dans une étuve à lampe UV (312 nm). La taille des différents fragments a été déterminée à l'aide des marqueurs de poids moléculaire 10000 pb.

3.2.2.4- Séquençage des produits d'amplification

Le séquençage du gène *ITS* nécessite la préparation d'un mélange réactionnel (tableau 9), additionné par la suite à l'ADN amplifié, ce séquençage a été effectué par le programme ITS gradient qui comprend: une dénaturation d'ADN à 96°C pendant 1min, 25 cycles formés d'une hybridation à 53°C pendant 5 sec, d'une élongation à 60°C pendant 4 min et d'une dénaturation à 96°C pendant 10 sec, l'ADN est refroidi à 16°C.

Tableau 9 Mélange réactionnel utilisé pour le séquençage du gène *ITS*.

Réactifs	Quantités
Ready mix reaction	1µl
Big Dye sequencing buffer	2.5µl
Amorce ITS4	1.5µl
ADN	1µl
Eau PCR	3µl
Volume final	9µl

3.2.2.5- Analyse des résultats de séquençage

Les séquences obtenues ont été corrigées par le programme Chromas Pro (version 174) et déposées au niveau de la banque de donnée «Genbank». L'identification finale de la moisissure a été déterminée après avoir comparé les séquences de gènes étudiés aux séquences précédemment publiées dans Genbank, en utilisant le programme *Blast N*.

3.3- Test de pathogénicité de l'isolat fongique

Des plantules saines de tomate ont été plantées dans dix pots en plastique contenant le terreau (quatre plantules par pot) dont, le 10^{ème} pot correspond au témoin. Ces pots ont été ensuite, placés dans une serre à essai et arrosés chaque deux jours avec de l'eau brute jusqu'au stade requis pour l'inoculation.

Le champignon phytopathogène ensemencé sur le milieu PDA pendant 10 jours a été utilisé pour préparer l'inoculum. Une quantité de 20 mL d'eau distillée stérile a été versée sur chaque boîte de PDA (Hariprasard et Niranjana, 2008). Ensuite, la surface de chaque culture chargée de conidies a été raclée stérilement à l'aide d'une spatule métallique. La solution sporale obtenue a été agitée vigoureusement pendant une minute à l'aide d'un vortex et ajustée jusqu'à l'obtention d'une concentration de 5×10^6 spores/mL, puis pulvérisée sur les parties aériennes de la plante en utilisant un pulvérisateur (Bahous *et al.*, 2008), les pots ont été couverts par des sacs en polyéthylène. Après 48 h, les sacs ont été enlevés et les pots ont été, ensuite, placés dans la serre. Après un séjour de 20 jours la maladie a été constaté (Sallam *et al.*, 2012).

3.3.1- Calcul de la sévérité de la maladie

La sévérité de la maladie a été notée et enregistrée dans chaque traitement suivant l'échelle de notation proposée par Latha *et al.* (2009), en l'occurrence : 0 = saine; 1 = 1-5%; 2 = 6-10 %; 3 = 11-25 %; 5 =26-50 %; 7 = 51-75% et 9 =76% de la surface foliaire infectée.

3.3.2- Ré-isolement de l'agent pathogène

Afin de confirmer que les symptômes observés après inoculation de l'agent pathogène s'agissent bel et bien de ceux provoqués par cet agent, un ré-isolement a été réalisé sur milieu PDA, puis comparé avec la culture initiale.

3.4- Recherche de Bactéries antagonistes

3.4.1- Echantillonnage

De nombreuses sorties de prospection ont été réalisées dans la région du Sahara et de l'Est Algérien au cours des années 2011, 2012 et 2013. Les échantillons explorés dans cette étude, ont été prélevés stérilement, à partir de trois sites, à savoir:

- Sols agricole de palmeraie de la région de TOLGA, située au Sud-Ouest de la wilaya de Biskra (Figure 13 A);
- Sols de la zone rhizosphérique de la plante « AGA » de la région de Touggourt (RANO) (Figure 13 B).

- Sols de la zone de la rhizosphère de palmeraie de la région de RANO, située à la wilaya de Touggourt (Figure 13 C).

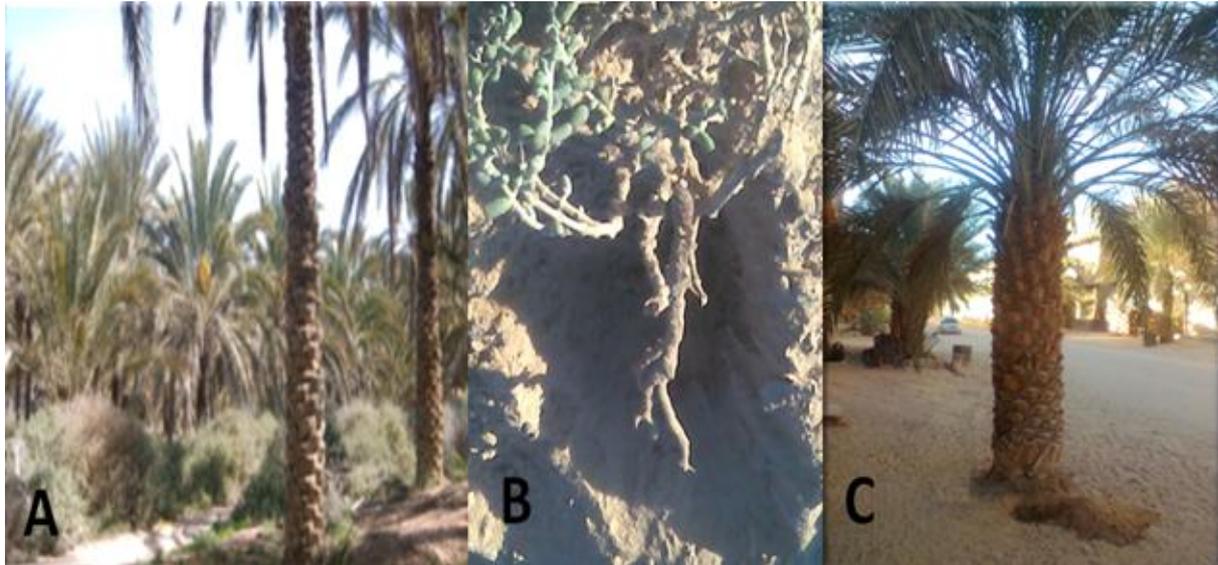


Figure 13 Sols et sites d'échantillonnages: (A), Palmeraie de la région de TOLGA; (B), rhizosphère d'une plante « AGA » situé à Touggourt; (C), rhizosphère de palmeraie de la région de RANO.

3.4.2- Isolement des bactéries

L'isolement a été basé sur la technique décrite par Aneja (2003). Un gramme de chaque échantillon du sol prélevé, a été dilué dans 9 mL d'eau physiologique stérile, puis des dilutions décimales jusqu'à 10^{-6} ont été préparées. 0.1 mL des dilutions décimales ont étéensemencés à la surface du milieu gélose nutritive (GN) (Annexe 1) et les boîtes ont été, ensuite, incubées à 30 °C pendant 24h. Enfin, les isolats bactériens ont été purifiés et ultérieurement, conservés à -80 °C pour un usage subséquent.

3.4.3- Sélection des souches ayant une activité antagoniste

La capacité des bactéries isolées à inhiber le développement de l'isolat fongique a été testée, sur milieu PDA. Un disque de chaque isolat bactérien a été déposé sur la gélose et un autre disque de PDA contenant la moisissure préalablement développée (7 jours), coupé par un perforateur stérile a été déposé sur emplacement opposé à 3.5 cm de distance par rapport à l'isolat testé. Une boîte inoculée seulement avec l'isolat fongique a servi de témoin. Ensuite, toutes les boîtes ont été incubées à 28°C pendant 3 à 7 jours. L'antagonisme développé a été estimé par le calcul du Pourcentage d'Inhibition (PI) de la croissance de l'isolat fongique selon la formule: $PI=100*(R_1-R_2)/R_1$, où, R_1 représente le diamètre de la colonie de l'isolat

fongique dans le sens d'absence de colonie bactérienne et R_2 représente le diamètre de la colonie fongique dans la direction de présence de la colonie bactérienne. Les isolats bactériens qui ont révélé un effet antagoniste ont été sélectionnés et conservés comme décrit ci-dessus.

3.5- Identification des isolats bactériens sélectionnés

L'identification des isolats sélectionnés a été réalisée tout d'abord par des tests préliminaires, en l'occurrence: l'aspect macroscopique et microscopique, la coloration de Gram, le test oxydase et le test catalase (Madigan et Martinko, 2007). Ensuite, pour une identification plus précise, les analyses moléculaire d'*ADN-16S* et du gène de la *gyrase A* (*gyr-A*: topoisomérase type II) des isolats sélectionnés ont été effectuées.

3.5.1- Observation macroscopique et microscopique

L'identification présomptive des isolats bactériens E1B3, S5, E2X1, S1.1 a été réalisée par l'observation macroscopique qui repose sur la détermination de l'aspect de la colonie, sa couleur et son revers, et une observation microscopique en considérant la taille, la forme et l'arrangement des cellules.

3.5.2- Identification moléculaire

L'identification moléculaire des isolats bactériens sélectionnés a été réalisée par analyse de d'*ADN-16S* et *gyrase A*. Cette analyse est effectuée au centre wallon de Biologie Industrielle (CWBI), université de Liège-Belgique. La détermination de l'identité d'un microorganisme nécessite la réalisation de plusieurs étapes, à savoir: L'extraction d'ADN; l'amplification du gène désiré par PCR; purification du produit de la PCR; le séquençage du gène étudié et le traitement des séquences.

3.5.2.1- Extraction d'ADN

L'ADN génomique a été extrait à partir des cultures liquides des isolats bactériens, par le kit «Wizard Genomic DNA Purification Kit (Promega)», selon le protocole suivant: un millilitre de chaque culture bactérienne a été centrifugé à 13.000-16.000 g pendant 2 minutes et le surnageant obtenu a été éliminé. Ensuite, le culot cellulaire récupéré a été suspendu dans 480 μ L d'acide éthylène diamine tétra-acétique (EDTA 50mM). Après, 120 μ l de l'enzyme lytique (lysozyme) ont été rajoutés et le mélange obtenu a été incubé à 37°C pendant 30 à 60 minutes. De plus, 600 μ L de «nuclei lysis solution» ont été rajoutés et mélangés par pipetage et la préparation est incubée à 80°C pendant 5minutes, puis refroidi à température ambiante.

Les protéines ont été éliminées par précipitation en rajoutant 200 µL de «protein precipitation solution», le mélange obtenu a été incubé dans la glace pendant 5 minutes puis centrifugé à 15.000g pendant 2 minutes et le surnageant obtenu a été récupéré. Par ailleurs, la précipitation et la réhydratation de l'ADN ont été effectuées par le transfert de ce surnageant dans des tubes propres contenant 600µL d'isopropanol et les mélanger par inversion jusqu'à l'apparition des filaments d'ADN. Le mélange obtenu a été centrifugé à 15.000 g pendant 2 minutes et le surnageant a été éliminé. Ensuite, 600 µL d'éthanol 70% ont été rajoutés et la préparation a été centrifugée à 15.000 x g pendant 2 minutes et le surnageant a été éliminé. Après, l'éthanol a été aspiré et le culot séché (tube ouvert). Enfin, l'ADN extrait a été réhydraté dans 100 µL de «DNA rehydratation solution», pendant une heure, à 65°C ou à 4°C pendant toute la nuit.

3.5.2.2- Amplification des gènes étudiés par PCR

L'amplification des gènes étudiés a été réalisée par utilisation des amorces *16SP0* (GAA GAG TTT GAT CCT GGC TCAG) et *16SP6* (CTA CGG CTA CCT TGTTAC GA) pour amplifier l'*ADN-16S* (Ventura *et al.*, 2001), et *gyr-A.f* (CAG TCA GGA AAT GCG TAC GTC CTT) et *gyr-A.r* (CAA GGT AAT GCT CCA GGC ATT GCT), pour amplifier la *gyrase A* (Roberts *et al.*, 1994). Le mélange réactionnel de PCR utilisé pour amplifier les deux gènes étudiés contenant: 10X taq buffer (2.5µl), 25M-MgCl₂ (1.5µl), 10M-DNTP (0.4µl), amorce-f (1.25µl), amorce-r (1.25µl), taq polymérase (0.25µl) et l'eau (42.85µl). Le programme PCR, utilisé pour l'amplification de l'*ADN-16S* est le suivant: 94°C pendant 10 min, puis 32 cycles de «94°C pendant 1 min, 53°C pendant 1 min, 72°C pendant 2 min» et enfin 72°C pendant 10 min. Par ailleurs, le programme d'amplification de la *gyrase A* est le suivant : 94°C pendant 4min, puis 36 cycles de « 94°C pendant 1 min, 55°C pendant 1 min, 72°C pendant 2min », et enfin 72°C pendant 10 min.

3.5.2.3- Purification de l'ADN

Les produits de PCR ont été purifiés par le kit «GFX PCR DNA and Gel Band Purification», suivant les instructions mentionnés. D'abord, 500 µl de «capture buffer type 2» ont été rajoutés à 100 µl d'ADN extrait et mixer soigneusement. Ensuite, ce mélange a été mis dans la petite colonne du kit, puis toute la préparation dans les grands épendorfs du kit, centrifugée à 16.000 g pendant 30s et le surnageant obtenu a été éliminé. 500 µl de «wash buffer type 1» ont été rajoutés à la colonne, centrifugés à 16.000 g pendant 30s et le liquide obtenu a été jeté. Enfin, 50 µl de «elution buffer» ont été rajoutés à la colonne, centrifugés à 16.000 g pendant 30s et le surnageant contenant l'ADN purifié a été récupéré dans des petits épendorfs.

3.5.2.4- Séquençage des gènes amplifiés et traitement des séquences

Le bon déroulement de l'extraction d'ADN et de l'amplification des deux gènes étudiés a été vérifié par électrophorèse sur gel d'agarose (1%). Le séquençage des gènes étudiés a été réalisé en utilisant les mêmes amorces décrites ci-dessus. Les séquences obtenues ont été corrigées par le programme Bioedit (version 7.0.8.0) puis déposées dans la banque de donnée «Genbank» et les numéros d'accèsion fournis sont obtenus. L'identité de chaque souche bactérienne a été déterminée par comparaison des séquences de gènes étudiés aux séquences précédemment publiées dans Genbank, en utilisant le programme *Blast N*.

3.6- Etude *in vivo* de l'effet des souches sélectionnées sur la tomate

3.6.1- Dans des conditions de pots

Des semences de tomate appartenant à la variété *Bobcat* ont été désinfectées à l'hypochlorite de sodium dilué à 1% pendant 10 min, puis rincées abondamment sous un courant d'eau stérile. Après séchage, les graines ont été mises à pré-germer dans des plateaux alvéolés à 20 trous remplis du terreau, à raison d'une graine par alvéole. Les plateaux ont été couverts d'un film plastique pendant 2 jours pour assurer une bonne germination (Woo *et al.*, 1996).

Des solutions des isolats bactériens ont été préparées (10^8 cell/ mL), en utilisant la cellule de Thoma. Ces traitements biologiques ont été appliqués sur les racines des plantules de tomate âgées de 4 semaines, en plongeant ces dernières dans 10 mL de chaque suspension bactérienne. Dans chaque pot (24 cm x 20 cm), trois plantules ont été repiquées et trois répétitions ont été établies pour chaque traitement. L'arrosage a été effectué tous les 2 jours en utilisant de l'eau du robinet. Cette expérience a été effectuée selon la méthode de Mouria *et al.* (2012), avec quelques modifications. Après un mois les feuilles des plantules ont été pulvérisées par une suspension sporale (10^5 spores/mL) de l'agent phytopathogène. La sévérité de la maladie et la taille des plantes ont évaluée après 20 jours d'inoculation par l'agent phytopathogène.

3.6.2- Dans des conditions du champ

Les tests de plein champ ont été réalisés dans le terrain expérimental de Chaab-Elrissas, à Constantine (Algérie), dans la période de Mai- Août 2015. Le champ a été divisé en parcelles dont, la surface de chacune des parcelles est de 1 m² séparé par un espace de 0.8 m. Le compost naturel est rajouté dans chaque parcelle et des puis sont formés (10 puis/parcelle)

pour repiquer les plantules de tomate. Les racines des plantules de tomate de la variété (*Blacmine*) âgées de 5 semaines ont été plongées dans 10 mL de concentrations bactériennes 10^8 cellules/ ml. Dans cette expérience, les isolats bactériens ont été testés. L'arrosage a été effectué tous les 2 jours en utilisant de l'eau du robinet (Mouria *et al.* 2012). L'estimation des paramètres de croissances a été effectuée après 4 semaines et 8 semaines de repiquage des plantes.

3.6.3- Etude statistique

Une étude statistique a été réalisée en utilisant le logiciel (SAS, 2001), et ce dans le but d'évaluer l'effet des bactéries sur la stimulation des plantules de la tomate et la protection contre la maladie de l'Alternariose *in vivo*.

3.7- Production de substances antifongiques

3.7.1- Détection des enzymes de dégradation de la paroi fongique

Les activités enzymatiques ont été évaluées qualitativement sur des milieux solides, contenant le substrat à dégrader, en l'occurrence: la chitine colloïdale, le lait lyophilisé et le tributyrine, pour détecter la présence ou l'absence de la chitinase, la protéase et la lipase, respectivement. La présence de l'activité enzymatique se vérifie par la formation de halo claire autour de colonie bactérienne de l'isolat sélectionné (Ariffin *et al.*, 2006).

3.7.1.1- Activité chitinasique

L'activité chitinolytique de la souche antagoniste (E1B3) a été évaluée sur milieu chitine-agar, contenant les minéraux suivants (K_2HPO_4 , KH_2PO_4 , $(NH_4)_2SO_4$, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$, $FeSO_4$, $ZnSO_4$, $CaCl_2$ (0.8 g, 0.3 g, 0.3 g, 0.5 g, 0.1 g, 0.001g et 0.1 g respectivement), en plus, il contient; 3g chitine colloïdale, 8g extrait de levure, 20 g agar tamponné à pH 6,5. Le milieu précédent a été ensemencé, en boîtes de Pétri, par des cultures jeunes des isolats sélectionnés et incubé à 28°C pendant 3 à 4 jours (Nihorimbere *et al.*, 2013).

3.7.1.2- Activité protéasique

L'activité de protéase a été évaluée en utilisant le lait écrémé de caséine comme source de carbone (Larpen et Larpen, 1985). Le milieu de culture se compose de 9 g/l de peptone de caséine, 9 g/l d'extraits de levure, 9 g/l de lait écrémé et 14 g/l d'agar. Une colonie jeune a été déposée au centre de la boîte de Pétri et incubée à 28 °C pendant une semaine (Nihorimbere *et al.*, 2013).

3.7.1.3- Activité lipasique

La capacité de la souche antagoniste de produire la lipase a été déterminée en testant l'hydrolyse de tributyrine. Cet essai a été réalisé par la méthode décrite par (Larpent et Larpent, 1985) avec légères modifications. Une colonie jeune a été déposée au centre de la boîte de Pétri et incubée à 28 °C pour une semaine (Nihorimbere *et al.*, 2013).

3.7.2- Production et analyse des lipopeptides (LPs) par spectrométrie de masse

La production des lipopeptides (LPs) a été réalisée par ensemencement de l'isolat bactérien le plus performant dans des fioles de 250 mL contenant 50 mL de milieu opt (annexe1). Les fioles ont été incubées à 30°C sous agitation de 180 rpm pendant 72h. Les cultures ont été, ensuite, centrifugées à 15.000 g pendant 20 min. Les surnageants ont été filtrés avec des micro-filtres de 0.45µm. Les extraits obtenus ont été analysés par spectromètre de masse (MS). Le gradient d'élution utilisé dans ce travail permet la détection des trois familles de LPs. L'eau acidifiée par de l'acide formique 0.1% et l'acétonitrile (ACN) acidifié avec ce même acide (0.1%) ont été utilisés comme phase mobile. Le débit d'élution a été maintenu à 0.5 mL.min⁻¹ et la température de la colonne à 40°C, avec un gradient de 35 min selon le programme suivant: (43%–80%), vol/vol ACN pendant 18 min; 100 %, vol/vol ACN pendant 9 min et 43 %, vol/vol ACN pendant 8 min. En premier temps, les composés ont été déterminés selon les temps de rétention des standards purifiés. Ensuite, l'identité de chaque homologue de LPs a été confirmée sur la base de la masse dans le «Single Quadrupole Mass Detection (SQD)», par des conditions d'électrospray ionisation, comme source de température (130°C); température de désolvation (250°C); flux de nitrogène (500 l/h) et voltage de cône (70 V). Le mode d'ion positif a été utilisé pour l'analyse des trois familles parce qu'un signal élevé a été obtenu par rapport au mode d'ion négatif (Ait-Kaki *et al.*, 2013).

3.8- Evaluation de l'effet antagoniste par Cytomètre à flux (CMF) de l'isolat bactérien le plus performant

Ce test sert à confirmer l'effet antagoniste de l'isolat bactérien E1B3 le plus performant contre l'agent phytopathogène. Des cultures de l'agent ont été effectuées dans des boîtes de Pétri, contenant le milieu PDA et incubées à 30 °C pendant 7 jours. Par ailleurs, des cultures de la bactérie ont été effectuées dans des fioles, contenant du milieu optimum liquide et incubées à 30 °C pendant 48 h.

La suspension de l'isolat fongique a été préparée à 10⁶ spores/mL et celle de l'isolat bactérien est ajustée à 10⁷ cell/mL. 50 µL de la suspension de la bactérie ont été centralement inoculés

sur milieu PDA à l'aide d'une micropipette. Après l'adsorption de la goutte bactérienne, 50 µL de la suspension sporale de l'agent phytopathogène a étéensemencée en dessus de l'ensemencement précédent. Par ailleurs, des boîtes inoculées séparément par la suspension sporale de l'agent phytopathogène et de la concentration bactérienne ont servi comme témoin. Après incubation, les cultures ont été transférées dans des ependorfs contenant 1 mL d'eau distillée et de Tween stériles 80 (2 gouttes/100 mL), puis centrifugées à 10000 rpm pendant 15 minutes. Les cellules ont été rincées par la solution de Tween 80 deux fois et resuspendues dans 1 mL du tampon phosphate salin PBS (Annexe 2).

Chaque suspension microbienne a été marquée avec 10 µL de cFDA (Annexe2). Le mélange a été incubé dans l'obscurité à 30 °C pendant 15 minutes avant l'analyse par FCM. Les échantillons ont été centrifugés à 10000 rpm pendant 15 minutes et suspendus dans 1 mL de PBS stérile. Après une deuxième centrifugation, les culots ont été mises dans 1 mL de PBS stérile et stockées dans la glace jusqu'à l'analyse par FCM.

Pour estimer la viabilité des cellules microbiennes, la coloration des cellules vivantes et mortes des boîtes témoins des deux souches microbiennes *B. mojavensis* et *A. alternata*, a été réalisée par cFDA (colorant utilisé pour détecter la viabilité des cellules) et ce, avant et après un traitement thermique à 90°C pendant 12 min (afin de tuer les cellules de la bactérie *B.mojavensis* et les spores d'*A. alternata*).

Les échantillons ont été analysés sur un FACS avec un laser d'argon fonctionnant à 488 nm. La fluorescence verte des cellules marquées avec cFDA a été rassemblée dans le canal FL1 (533 ± 15 nm). 40.000 événements ont été rassemblés par échantillon. L'expérience a été répétée deux fois. Les échantillons ont été analysés après 3, 5, et 7 jours d'incubation à 30 °C par FCM (Rocha *et al.*, 2014).

3.8.1- Microscope à fluorescence

Les mêmes cultures microbiennes préparées pour les analyses par FCM ont été utilisées pour étudier l'effet de *B. mojavensis* sur la croissance d'*A. alternata* par microscopie à fluorescence (GX 40) Gembloux (Zeiss, AXIOSCOP 2MOT).

Résultats

4-Résultats

Ce travail porte sur l'étude de l'effet anti-*Alternaria alternata*, agent de l'Alternariose, des bactéries isolées de divers environnements, en l'occurrence: la rhizosphère d'une plante «AGA» situé à Touggourt (RANO); la palmeraie de la région de TOLGA, située au Sud-ouest de la wilaya de Biskra; et le sol de palmeraie de la région de Touggourt (RANO). Pour rappel, l'Alternariose visée dans ce travail est celle développée chez la tomate.

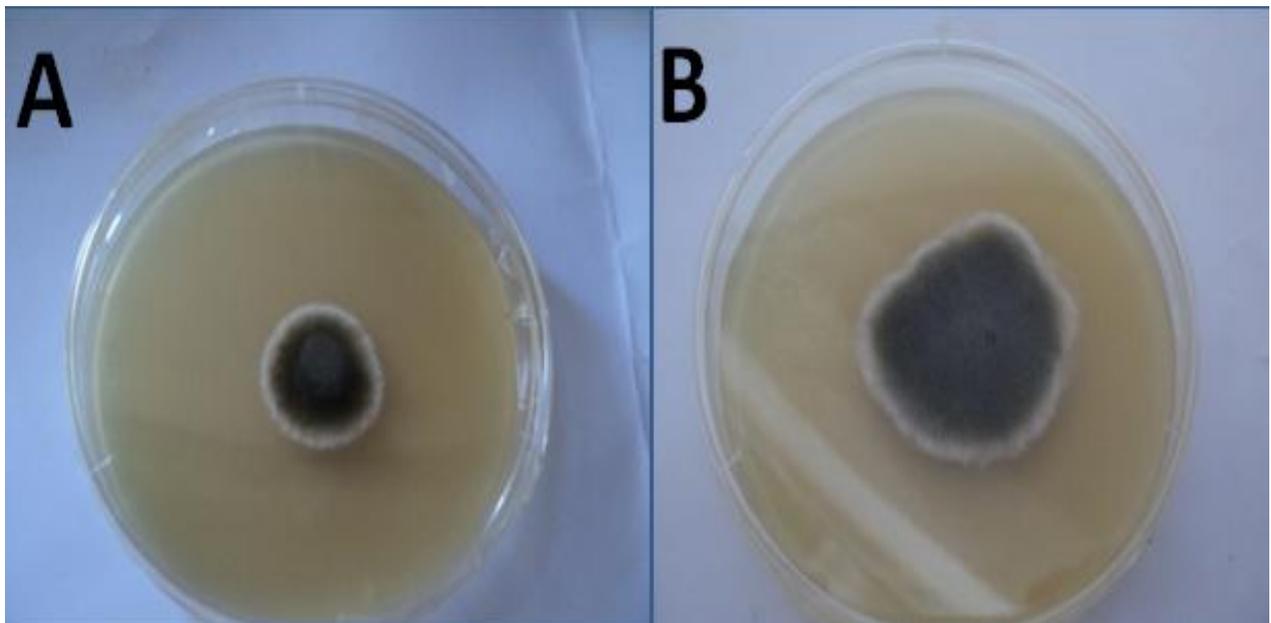
4.1- Isolement de l'agent phytopathogène

L'isolement de l'agent phytopathogène à partir des échantillons de plantes de tomates présentant des symptômes d'alternariose a permis l'obtention d'un seul isolat fongique présentant une structure mycélien ce qui laisse prédire qu'il s'agit d'un mycète filamenteux, auquel, le code (Alt1) a été attribué.

4.2- Identification de l'agent phytopathogène

4.2.1- Etude des caractères macroscopiques et microscopique

L'étude morphologique de l'isolat Alt1 après 2, 3, 5 et 7 jours de développement sur gélose (figure 14) a permis de révéler les caractères macroscopiques suivants: une colonie de couleur claire, olivâtre verdâtre; avec un aspect duveteux; et une face inférieure de couleur grise; enfin des bordures mycéliennes régulières.



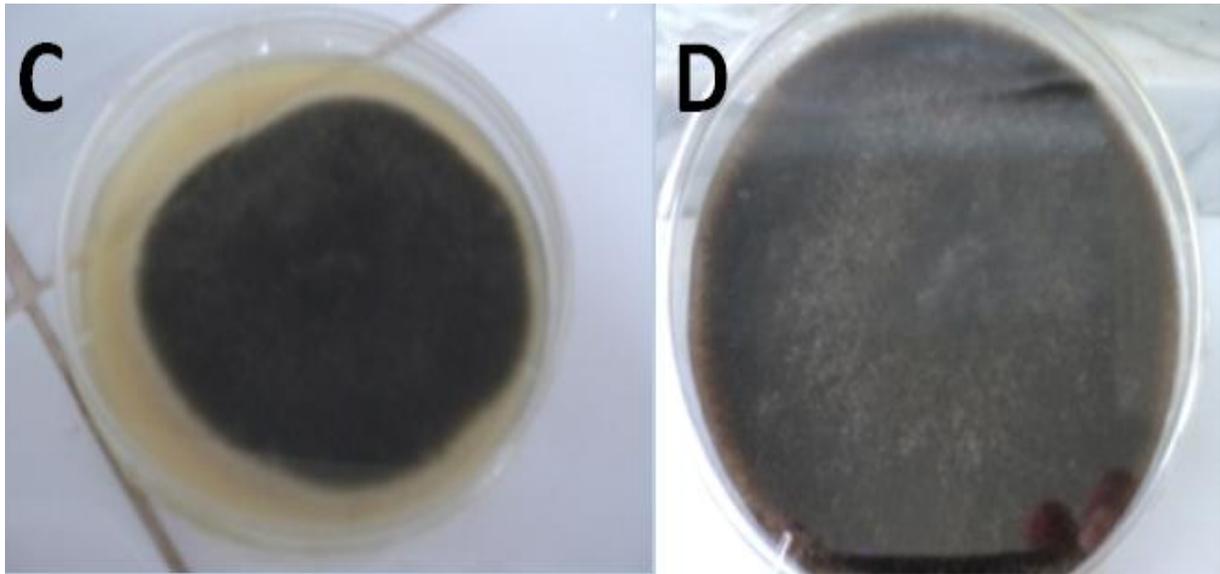


Figure 14 Aspect de la colonie de la souche *Alternaria sp.* A: après 2j; B : 3j; C: 5j et D : 7 jours d'incubation sur milieu PDA.

L'observation microscopique de l'isolat Alt1 (microscope optique GX10 et GX40) a montré la présence des conidies de forme ovale, de couleur brune jaunâtre, avec 3 transepta et 1-2 longisepta ou oblique (figure 15).

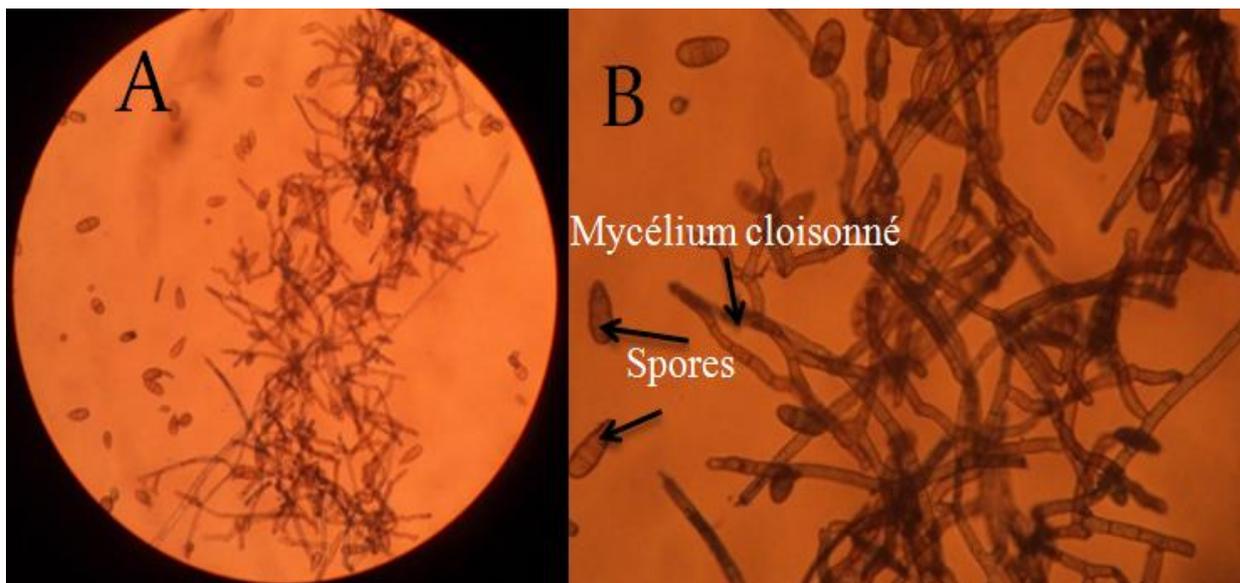


Figure 15 Aspect microscopique d'*Alternaria sp.*, A: GX10; B: GX40.

Les résultats de cette étude préliminaire (aspect macroscopique et microscopique) confirment que l'isolat Alt1 appartient au genre *Alternaria*.

4.2.2- Identification moléculaire

L'identification moléculaire de l'isolat *Alternaria sp.* (Alt1) a été réalisée par l'analyse de l'ADN-ITS

4.2.2.1- Extraction de l'ADN fongique

Le bon déroulement de l'extraction d'ADN de l'isolat d'*Alternaria sp.* a été vérifié par *Nanodrop 2000*. Les résultats obtenus ont révélé une bonne concentration de l'ADN, $R = (DO260/DO280) = 2$, résultat largement satisfaisant, ce qui a permis son amplification.

4.2.2.2- Amplification de l'ADN (réaction PCR)

Le profil de migration sur gel d'agarose de la séquence amplifiée de l'ADN-ITS, est illustré dans la figure (16). La bande d'ADN amplifiée de l'ADN-ITS migre pour atteindre une distance équivalente à celle d'une séquence de 370 pb.

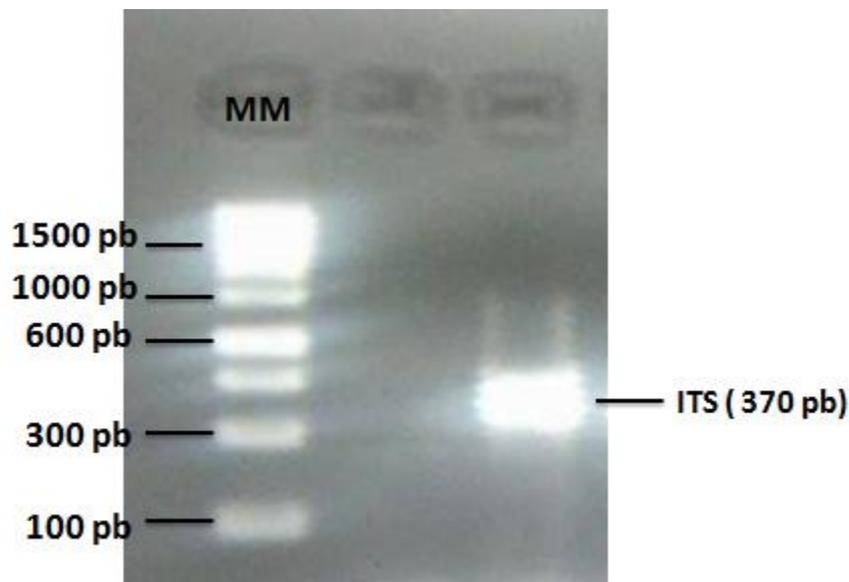


Figure 16 Migration des bandes d'ADN- ITS de l'isolat d'*Alternaria sp.* sur gel d'agarose; MM Marqueurs moléculaires.

4.2.2.3- Séquençage

Après le séquençage du gène *ITS rDNA* d'*Alternaria sp.*, les séquences obtenues (figure 17) ont été corrigées par le programme *Chromas Pro 17*, et comparées à celles précédemment publiées dans la banque *GenBank*. Cette étude a montré que les séquences sont similaires à celles d'*Alternaria alternata*, avec un pourcentage de similitude de 99% et ce qu'a permis son enregistrement sous le numéro d'accèsion (HQ846574.1) au niveau de la même banque.

```
AATGGATGCTAGACCTTTGCTGATAGAGAGTGC GACTTGTGCTGCGCTCCGAAACCAGTAGGCCGGCTGCCAA
TTACTTTAAGGCGAGTCTCCAGCAAAGCTAGAGACAAGACGCCCAACCAAGCAAAGCTTGAGGGTACAAAT
GACGCTCGAACAGGCATGCCCTTTGGAATACCAAAGGGCGCAATGTGCGTTCAAAGATTGATGATTCACTGA
ATTCTGCAATTCACACTACTTATCGCATTTGCTGCGTTCTTCATCGATGCCAGAACCAAGAGATCCGTTGTTGA
AAGTTGTAATTATTAATTTGTTACTGACGCTGATTGCAATTACAAAAGGTTTATGTTTGTCTAGTGGTGGGCG
AACCCACCAAGGAAACAAGAAGTACGCAAAAGACAAGGGTGAATAATTGAGCAAGGCTGTAACCCCGAGAGG
TTCCAGCCCGCCTTCATATATTGTGTAATGATCCCTCCGAGCACCCCCATACGAGAGGGGATCTTACACAAAT
GTAAGGCGGGCTGGCACCTCTGGGGTTACGCACTGCTGAATATTCACCCTTGCTTTGCGTACTCTGTTTCATG
GTGGGTTCCG
```

Figure 17 Séquences du gène *ITS* après correction par le programme « Bioedit ».

Le même résultat de confirmation a été obtenu par la mycothèque de l'Université Catholique de Louvain (BCCM/MUCL, Belgique), ce qui confirme qu'il s'agit réellement d'*Alternaria alternata* (voir annexe, rapport de la Mycothèque).

Le résultat obtenu, montre la présence de l'agent phytopathogène de l'Alternariose, en l'occurrence *Alternaria alternata* dans la région prospectée.

4.3- Test de pathogénicité

Cette étude a été réalisée pour confirmer que la souche d'*A. alternata* est phytopathogène. Des plantules seines de tomate ont été inoculées avec suspension de spores d' *A. alternata*; les plantules témoins ont été pulvérisées avec de l'eau distillée stérile.

Le résultat de ce test a montré que les symptômes obtenus sur les feuilles des plantules de la tomate inoculées par *A. alternata* sont similaires à ceux développés dans le champ d'où la souche phytopathogène a été isolée. Ces symptômes se manifestent d'abord par de petites punctuations qui apparaissent à l'emplacement de l'inoculum et qui marquent la réaction des tissus suite à la pénétration du champignon, et après un temps de 20 jours, l'envahissement des tissus ait lieu et s'est traduit par des taches marron (figure 18A). Ces taches ont un diamètre qui varie entre 0.8 et 2 cm, se développant en forme d'anneaux concentriques caractérisant l'Alternariose. Les plantules témoins (sains) maintenues dans les mêmes conditions en absence d'inoculation n'ont manifesté aucun symptôme d'Alternariose (figure 18B).

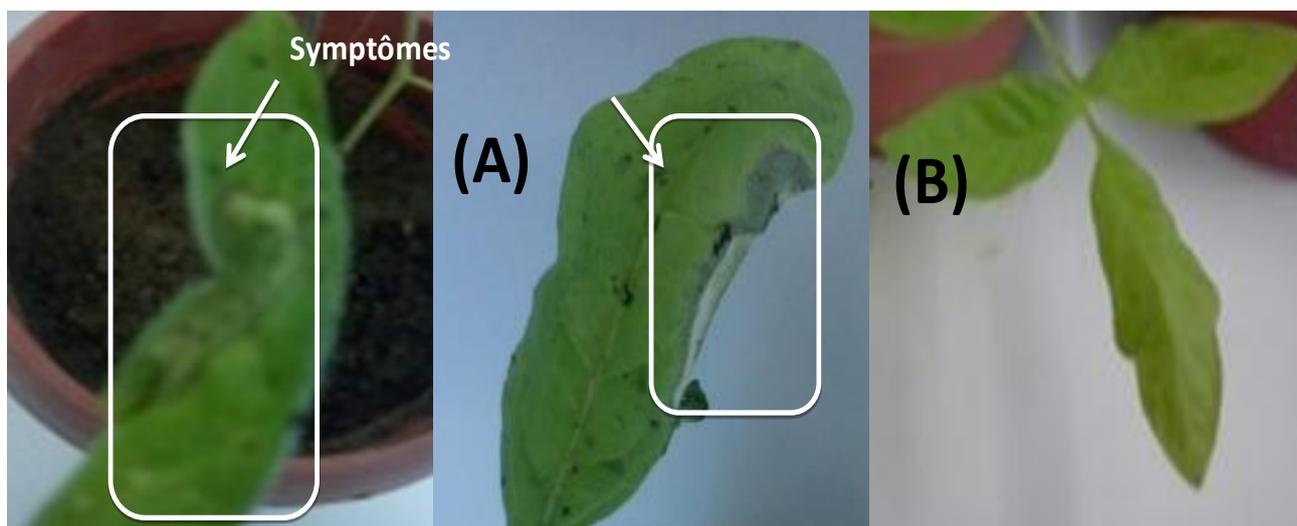


Figure 18 Test de pathogénicité d'isolat d'*A. alternata* sur des plantules de tomate inoculées par suspension sporale après 20 jours d'incubation à 25°C; (A), feuilles infectées, (B) feuilles témoins.

En effet, la souche testée d'*A. alternata* a infecté les plantules de la tomate causant des symptômes typiques d'Alternariose (figure 18) avec un degré de sévérité de la maladie égale ou supérieur à soixante seize pour cent ($\geq 76\%$).

Dans le but de s'assurer de la nature des symptômes et du champignon responsable, un ré-isolement a été effectué à partir des fragments de tiges et de feuilles développant les symptômes précédents et ensemencé sur milieu gélosé (PDA). Après une semaine d'incubation à 28 °C, des colonies typiques du champignon inoculé se sont développées autour des fragments des feuilles et des tiges (figure 19A). Après repiquage, les colonies obtenues ont montré des caractéristiques macroscopiques et microscopiques typiques de l'*A. alternata* (figure 19B).

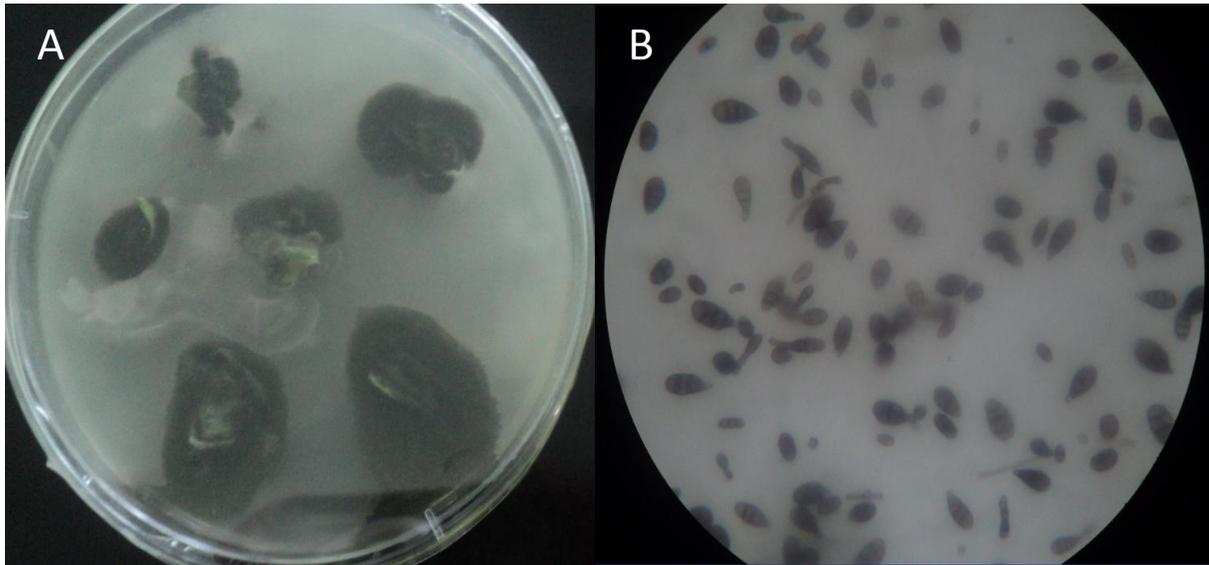


Figure 19 Ré-isollement de l'agent pathogène *A. alternata* : A, Aspect des colonies d'*A. alternata* ; B, Aspect microscopique *A. alternata* (GX 40).

De ce fait, il a été confirmé par ce test que la souche d'*A. alternata* est le pathogène responsable de l'Alternariose, autrement appelée, la maladie de la brûlure précoce de la tomate.

4.4-Isolement de microorganismes antagonistes d'*A. alternata*

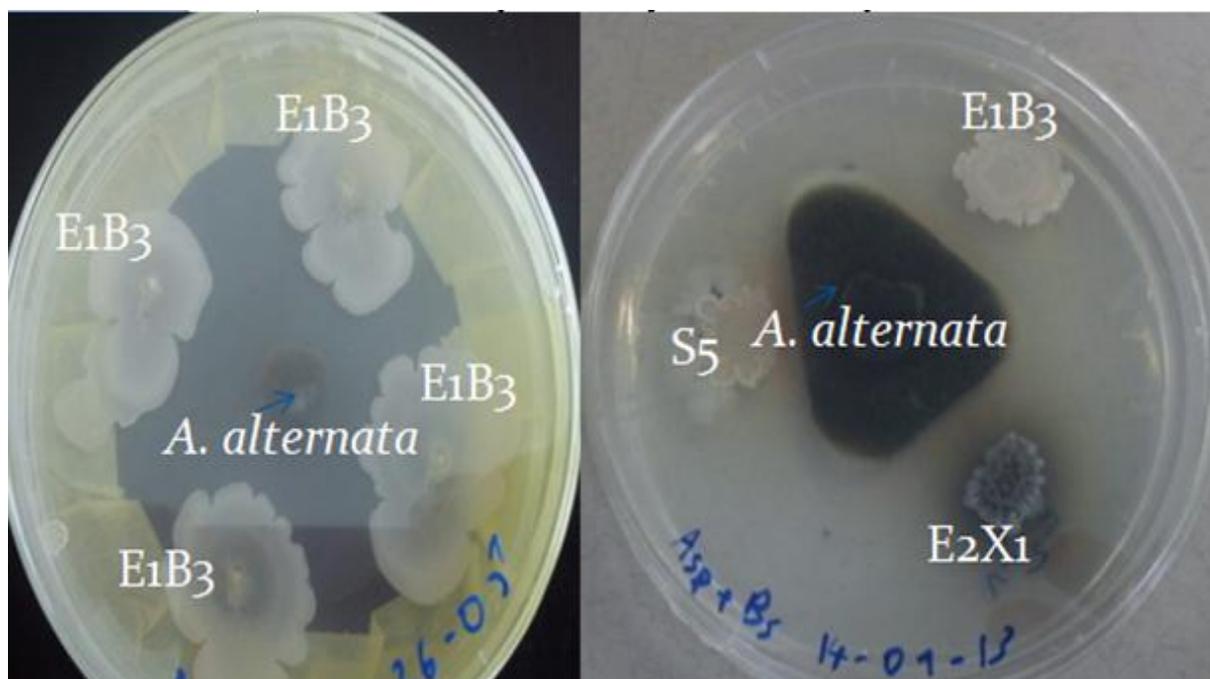
Quarante-cinq isolats microbiens ont été obtenus à partir des échantillons du sol des différents sites explorés (tableau 6). En effet, cinq isolats bactériens et trois isolats fongiques ont été isolés à partir du sol de palmeraie de la région de TOLGA; par ailleurs, quinze isolats bactériens et cinq isolats fongiques ont été isolés à partir du sol de la rhizosphère de palmeraie de la région de RANO (Touggourt); et enfin, dix isolats bactériens et sept isolats fongiques, ont été obtenus à partir de la rhizosphère de la plante «AGA» de la région de RANO (tableau 10). Ces résultats montrent que les sites prospectés sont plus riches en bactéries qu'en mycètes d'une part et que les bactéries sont plus présentes dans le sol des palmeraies en comparaison à d'autres sites d'autre part.

Tableau 10 Isolats microbiens obtenus à partir du sol des différents sites prospectés.

Sites d'isollements prospectés	Microorganismes isolés (45)	
	Bactéries	Moisissures
Sols agricole de palmerais de la région de TOLGA, située à Biskra	5	3
Sols de la rhizosphère de palmerais située à (RANO) Tougourt, Algérie	15	5
Sols de la rhizosphère d'une plante (AGA) située à (RANO) Tougourt, Algérie.	10	7

4.4.1- Sélection des isolats à effet anti-*Alternaria alternata*

Parmi les quarante scinques isolats microbiens testés, quatre bactéries (E1B3, S5, S1.1 et E2X1) possèdent un effet antifongique sur *A. alternata* (figure 20).



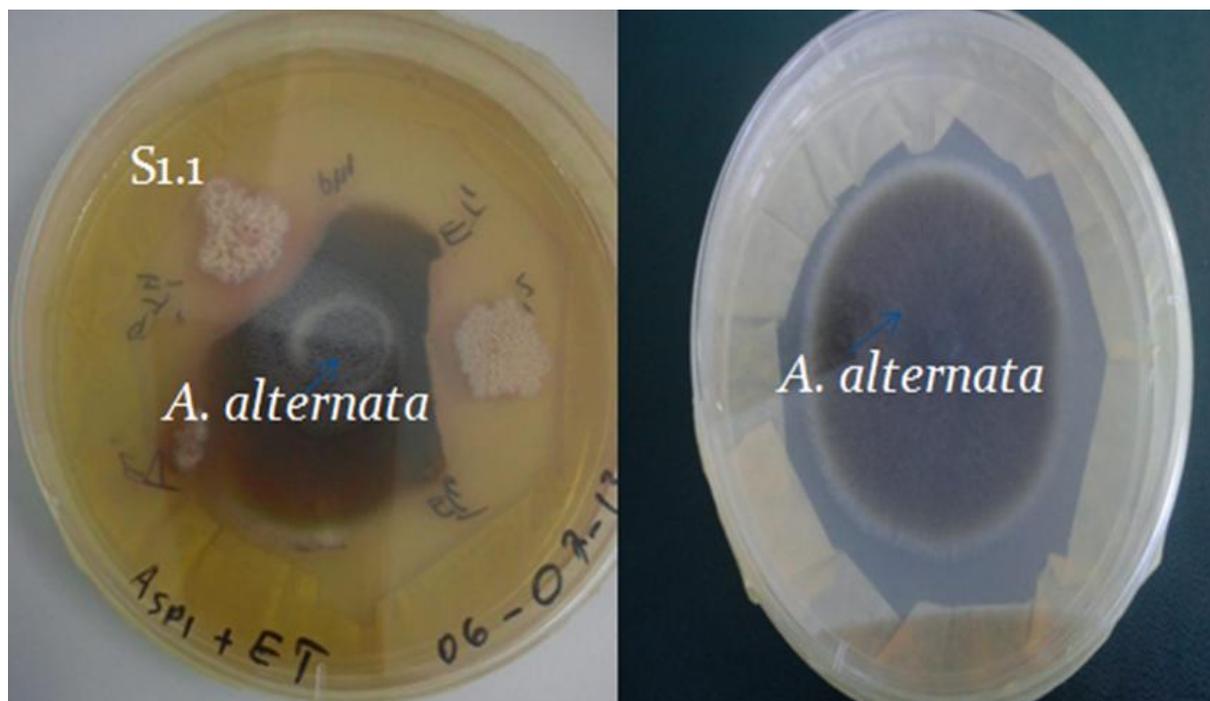


Figure 20 Inhibition *in vitro* de développement de l'agent phytopathogène *A. alternata* (T: témoin) par les isolats antagonistes (E1B3, S5, S1.1 et E2X1). Les résultats précédents montrent que les quatre isolats ont développé un effet inhibiteur sur *A. alternata* en comparaison avec les conditions du test (figure 20).

4.4.2- Taux d'inhibition de la croissance fongique développé par les isolats bactériens

Les résultats de ce test ont montré que les taux d'inhibition d'*A. alternata* par les isolats varient entre 60% et 75% suivant la bactérie testée. En effet, le meilleur effet inhibiteur a été développé par l'isolat E1B3 (tableau 11).

Tableau 11 Taux d'inhibition de la croissance de moisissure phytopathogène *A. alternata* développés par isolats bactériens testés.

Codes d'isolats	Source d'échantillon	Taux d'inhibition de la croissance d' <i>A. alternata</i> (%)
E1B3	Sol de palmeraie	75
S5	Sol de palmeraie	70
S1.1	Sol de la Rhizosphère de palmeraie	65
E2X1	Sol de la Rhizosphère de la plante « AGA »	62.5

4.5- Identification des isolats bactériens à activité antagoniste

4 .5.1- Etude des caractères macroscopiques et microscopiques

Les caractères macroscopiques des isolats sélectionnés E1B3, S5, E2X1, S1.1 ont été étudiés sur milieu GN. Quelques caractéristiques des colonies bactériennes ont été prises en considération notamment, la forme, la couleur et le contour des colonies (figure 21, tableau 12). Par ailleurs, l'observation microscopique a montré que trois isolats en l'occurrence E1B3, S5, E2X1, sont sous forme de bâtonnet Gram + (figure 22). Les tests biochimiques effectués ont révélé en outre que ces isolats sont catalase + et oxydase -, ces résultats laissent prédire que ces isolats appartiennent, éventuellement, au genre *Bacillus*. Quant au quatrième isolat (S1.1), les résultats obtenus (petit bâtonnet, Gram – (figure 22), catalase +, oxydase -) n'ont pas laissé prédire son genre tableau 13.

Tableau 12 Etude macroscopique des colonies bactériennes sur milieu gélosé GN.

Codes d'isolats bactériens	Aspect macroscopique
E1B3	Colonie moyenne d'une couleur crème, d'une forme irrégulière et d'un contour irrégulier.
S5	Grande colonie blanchâtre, d'une forme régulière, plane.
E2X1	Colonie moyenne visqueuse d'une couleur crème, d'un centre élevé, d'une forme irrégulière et d'un contour irrégulier.
S1.1	Colonie moyenne d'une couleur crème, d'une forme irrégulière et d'un contour irrégulier.

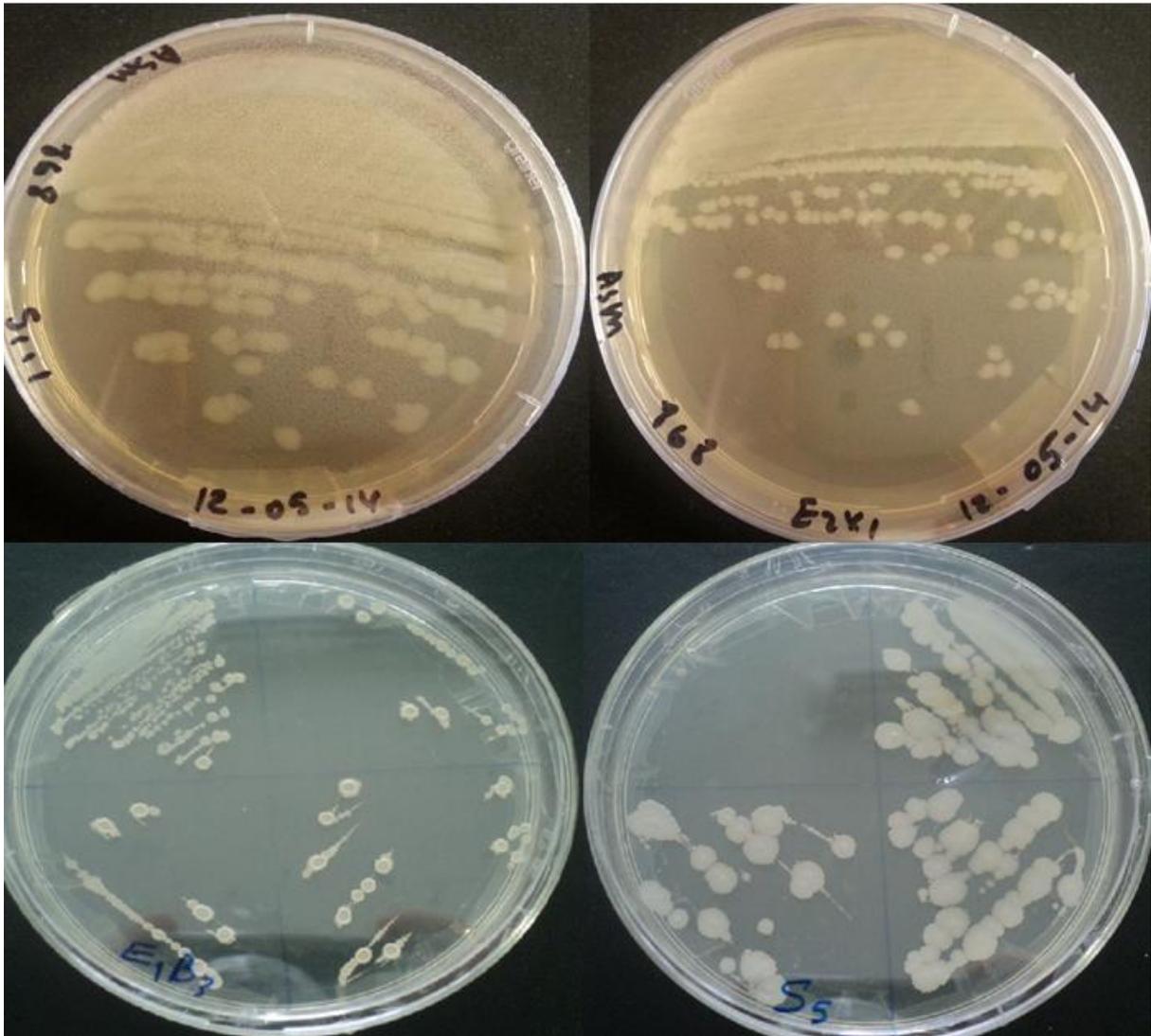


Figure 21 Aspect macroscopique des isolats bactériens E1B3, S5, E2X1, S1.1

Tableau 13 Caractères microscopiques des bactéries E1B3, S5, E2X1, S1.1.

Code des isolats bactériens	Formes apparentes	Taille	Mobilité	Gram
E1B3	Bacilles	Moyens	Mobiles	Positif
S5	Bacilles	Petites	Mobiles	Positif
E2X1	Bacilles	Moyens	Mobiles	Positif
S1.1	Bacilles	Petites	Mobiles	Négatif

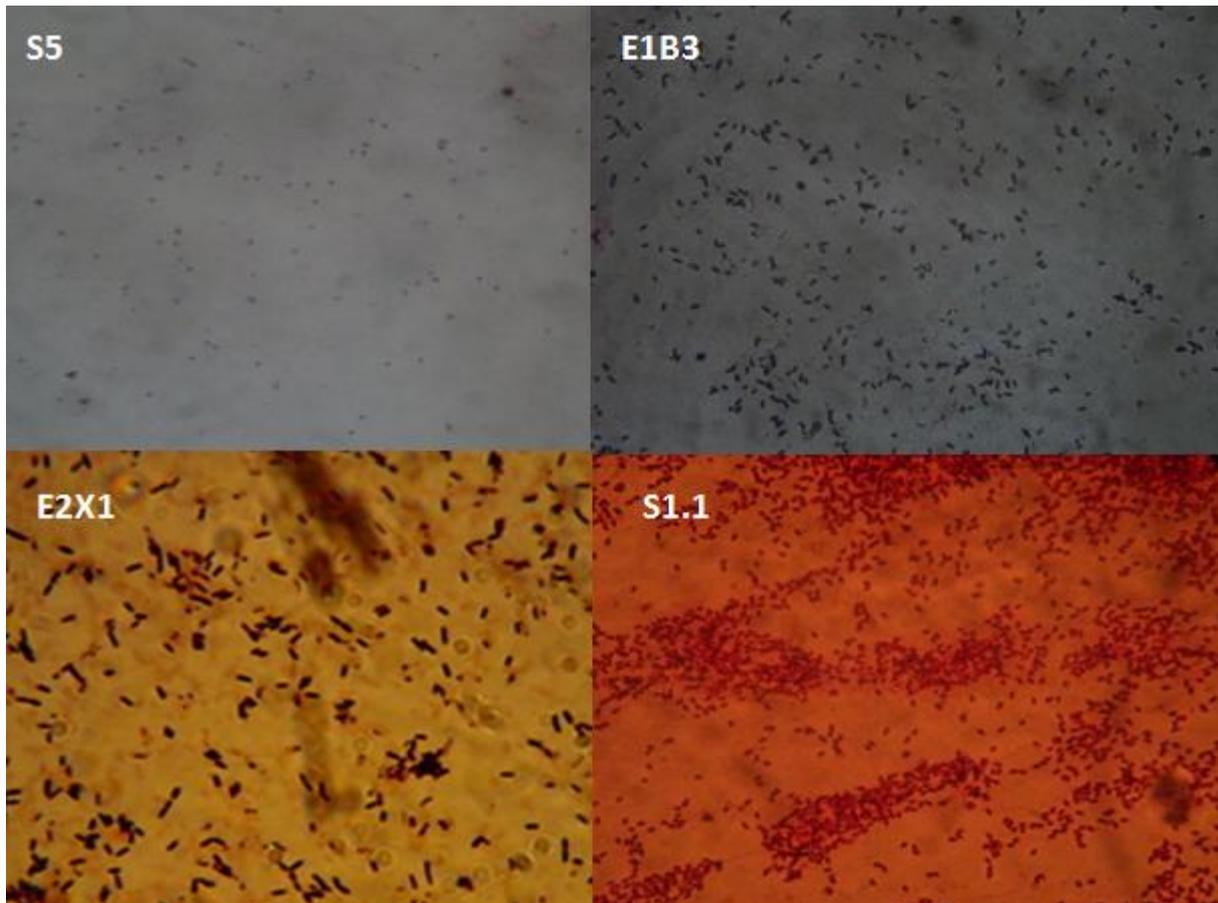


Figure 22 Observation microscopique des isolats bactériens E1B3, S5, E2X1, S1.1 par l'utilisation de coloration de Gram (GX40).

4.5.2- Etude moléculaire

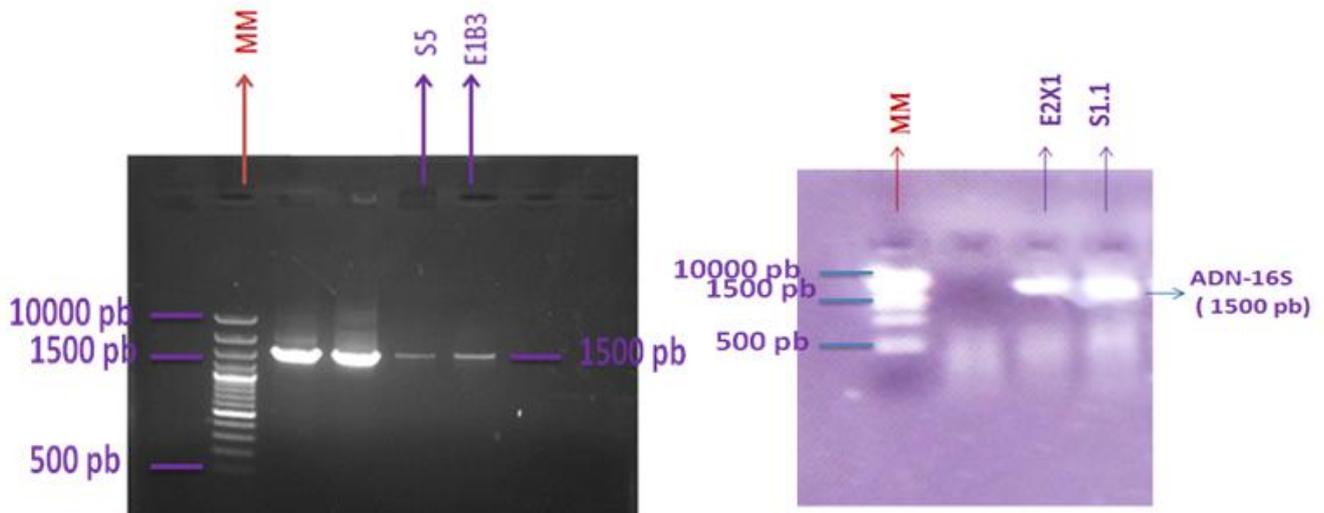
L'identification moléculaire des isolats sélectionnés a été réalisée au niveau du Laboratoire de Biologie Moléculaire, du Centre Wallon de Biologie Industrielle (CWBI), Université de Liège (Ulg), Belgique.

4.5.2.1- Extraction d'ADN

Le bon déroulement de l'extraction d'ADN des isolats bactériens E1B3, S5, E2X1, S1.1 a été vérifié sur gel d'agarose. Les résultats obtenus ont révélé une bonne migration de l'ADN, ce qui a permis de passer à son amplification.

4.5.2.2- Amplification de séquences d'ADN-16S

Le profil de la séquence amplifiée de l'ADN-16S sont illustrés dans la figure 23. La bande d'ADN amplifiée de l'ADN-16S migre pour atteindre une distance équivalente à celle d'une séquence de 1500 pb.



gel d'agarose : ADN-16S, MM Marqueurs moléculaires.

4.5.2.3- Séquençage

L'identification moléculaire des isolats par l'analyse d'ADN-16S a montré que tous les isolats appartiennent au groupe *Bacillus subtilis*, exception faite pour la souche S1.1 qui a été identifiée comme étant *Providencia vermicola*. Cependant, le blast des séquences corrigés est illustré dans les (figure 24, 25, 26, 27).

```
AAGCCGTATAAAAAATCGGCTCGTATCGTCGGAGAAGTTATCGGGAAATACCACCCTCACGGTGATT CAGCGG
TATATGAATCTATGGTCAGAATGGCGCAGGATTTCAACTACCGTTATATGCTGGTGGACGGTCACGGAACTTT
GGTTCTGTAGACGGAGACTCAGCCGCTGCGATGCGGTACACCGAAGCCAGAATGTCTAAGATCGCCATGGAA
ATTCTGCGAGACATTACAAAAGACACGATTGATTATCAAGATAACTATGATGGTTCAGAGAGAGAACCTGTTG
TCATGCCGTCAAGATTCCCGAACCTGCTTGAAATGGAGCAGCCGGTATTGCAGTCGGAATGGCTACAAATAT
ACCGCCGCACCAGCTTGGAGAAATTATTGACGGAGTG
```

Figure 24 Séquences du gène ARN 16S de l'isolat E1B3 après avoir été corrigé à l'aide du programme «Bioedit»

```
GAAAGATACGATTGATTATCAAGATAACTATGACGGCGCAAAAAGAGAACCTGTCGTCATGCCTTCGAGATTT
TCCGAATCTGCTCGTAAACGGAGCTGCCGGTATTGCGGTGCGAATGGCGACAAATATTCTCCGCATCAGCTT
GGGGAAGTCATTTGAAGGCGTGCTTTGCCGTAAGTGAGAATCCTGAGATTACAAACCAGGAGCTGATGGAAT
ACATCCCGGGCCCCGATTTTTCCGACTGCAGTTCAGATTTTTGGGCCGGAGCGGCATCCCGCAAGGCATATG
AATCCGGACGGGGATCCATTACGATCCGGGGCTAAGGCTGAAATCG
```

Figure 25 Séquences du gène ARN 16S de l'isolat S5 après avoir été corrigé à l'aide du programme «Bioedit»

AGCGGACCGATGTGAGAGCTTGCTCCCTGATGTTAGCGGCGGACGGGTGAGTAACACGTGGGTAACCTGCCTGTAAGACTG
GGATAACTCCGGGAAACCGGGGCTAATACCGGATGCTTGTGTTGAACCGCATGGTTCAAACATAAAAGGTGGCTTCGGCTACC
ACTTACAGATGGACCCGCGGCATTAGCTAGTTGGTGAGGTAACGGCTACCAAGGCAACGATGCGTAGCCGACCTGAGA
GGGTGATCGGCCACACTGGGACTGAGACACGGCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTAGGGAATCTCCGCAATGGACG
AAAGTCTGACGGAGCAACGCGCGTGAGTGATGAAGGTTTTCGGATCGTAAAGCTCTGTTGTTAGGGAAGAACAAGTACCG
TTCGAATAGGGCGGTACCTTGACGGTACCTAACAGAAAGCCACGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGTAGG
TGGCAAGCGTTGTCCGGAATTATTGGGCGTAAAGGGCTCGCAGGCGGTTTCTTAAGTCTGATGTGAAAGCCCCGGCTCAAC
CGGGGAGGGTCATTGGAAACTGGGGAAGTGGAGTGCAGAAGAGGAGAGTGAAATTCCACGTGTAGCGGTGAAATGCGTA
GAGATGTGGAG

Figure 26 Séquences du gène ARN *16S* de l'isolat E2X1 après avoir été corrigé à l'aide du programme «Bioedit»

G 3G

GGATAACCACTGGAAACGGTGGCTAATACCGCATAATCTCTTAGGAGCAAAGCAGGGGAACTTCGGTCTTCGCTATCGG
ATGAACCCATATGGGATTAGCTAGTAGTGGGTAATGGCTCACCTAGGCGACGATCCCTAGCTGGTCTGAGAGGATGATC
AGCCCACTGGGACTGAGACACGGCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATATTGCACAATGGGCGCAAGCCTG
ATGCAGCCATGCCGCGTGATGAAGAAGGCCCTAGGGTTGTAAAGTACTTTCAGTCGGGAGGAAGGCGTTGATGCTAATAT
CATCAACGATTGACGTTACCGACAGAAGAAGCACC GGCTAACTCCGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGGAGGGTGCAAGCG
TTAATCGGAATTACTGGGCGTAAAGCGCACGCAGGCGGTTGATTAAGTTAGATGTGAAATCCCCGGGCTTAACCTGGGAAT
GGCATCTAAGACTGGTCAGCTAGAGTCTGTAGAGGGGGTAGAA

Figure 27 Séquences finales du gène ARN *16S* de l'isolat S1.1 après avoir été corrigé à l'aide du programme «Bioedit»

L'a it,

les espèces obtenues et attributaires de numéros d'accèsion, sont illustrées dans le tableau (14).

Tableau 14 Identification des souches bactériennes sélectionnées par analyses d'ADN et les numéros d'accèsion fournis par Genbank.

Isolats bactériens	Identification	Numéros d'accèsion
E1B3	<i>Bacillus mojavensis</i>	KC977492
S5	<i>Bacillus amyloliquefaciens</i>	KC977493
E2X1	<i>Bacillus subtilis</i>	<u>KP699114.1</u>
S1.1	<i>Providencia vermicola</i>	<u>KP059130.1</u>

Les résultats obtenus, montrent qu'il est possible d'identifier des bactéries du genre *Bacillus* et *Providencia* antagonistes à *A. alternata* (agent de l'Alternariose) issus de la zone rhizosphérique des plantes et de palmerais de sud Algérien. Cette efficacité laisse entrevoir la possibilité d'utiliser ces bactéries dans la lutte biologique contre l'Alternariose.

4.6- Etude *in vivo* de l'effet des souches sélectionnées sur la tomate

L'effet des souches *B. amyloliquefaciens*, *B. mojavensis*, *B. subtilis*, *P. vermicola* sur la croissance des plantes de tomate et leur protection contre la maladie causée par le champignon phytopathogène *A. alternata* a été testé *in vivo*, dans des conditions de pots et de plein champ.

4.6.1- Dans les conditions de pots

Le traitement des plantules de tomates (variété : *Bobcat*), avec les suspensions bactériennes (10^8 cell/mL) des souches; *B. amyloliquefaciens*, *B. mojavensis*, *B. subtilis*, *P. vermicola* a permis la promotion (la stimulation de la croissance) et la protection des plantes utilisées dans l'expérience contre l'agent phytopathogène de l'Alternariose (figure 28).



Figure 28 Effet de traitement des souches : *B. mojavensis* (E1B3), *B. amyloliquefaciens* (S5), *B. subtilis* (E2X1), *P. vermicola* (S1.1), Témoin (T) sur la plante de tomate après 20 jours d'inoculation par *A. alternata*.

Les résultats du test *in vivo*, dans les conditions de pots, ont montré que les valeurs des paramètres de croissance concernant la taille et le nombre de feuilles par plante a été variable (figure 28). En effet, la souche *B. mojavensis* a montré le meilleur effet pour le cas de la taille des plantes avec une valeur de 125,6 cm. Par ailleurs, les meilleurs effets ont été révélés par *B. mojavensis*, *B. subtilis* et *P. vermicola* dans le cas du nombre de feuilles avec des valeurs 65.4, 62.8 et 65.6, respectivement, versus 40.6 dans le lot témoin (tableau 11, figure 28).

En ce qui concerne les effets des souches bactériennes sur le nombre de fleurs par plante, l'analyse des résultats montre que les traitements par les souches de *B. mojavensis* et *P. vermicola* stimulent avec des valeurs similaires estimées à 1.8. En effet, le nombre de fleurs des plantes de tomate, inoculées par la souche *B. amyloliquefaciens*, s'est amélioré et a atteint une valeur de 1 fleur par plante, Cependant la souche *B. subtilis* a donné un effet considérable (2,4 fleurs par plante) par rapport aux témoins.

Par ailleurs, l'effet de la protection des plantes de tomate contre *A. alternata* a été significatif pour les souches testées, en conséquence, la souche *P. vermicola* semble être le meilleur agent protecteur contre *A. alternata* avec un nombre de symptômes (tache d'Alternariose) estimé à 1. Cependant, les autres souches bactériennes testées (*B. amyloliquefaciens*, *B. mojavensis*, *B. subtilis*) ont montré des effets de protection qui ont atteint des valeurs de 4.6 ; 5.2 et 6, respectivement. Ces valeurs sont considérées très intéressantes, si on les compare au lot du témoin, où le taux de maladie a atteint 36.4 symptômes par plante.

Tous les traitements bactériens testés ont montré un effet positif significatif ($P < 0.05$) plus important que ceux obtenus dans le lot témoin

L'étude statistique appliquée dans les conditions de pots, révèle que les coefficients de corrélations sont élevés; la taille ($R^2 = 0,9$); le nombre de feuilles ($R^2=0,88$); le nombre de symptômes ($R^2= 0,95$). Par contre, le coefficient de corrélation pour les fleurs est de 0,29 (tableau 15).

Tableau 15 Effet du traitement sur des plantules de tomate (variété: *Bobcat*) par les différentes souches de *Bacillus* (*B. mojavensis*, *B. subtilis*, *B. amyloliquefaciens*) et la souche *P. vermicola* dans des conditions de pots après 20 jours d'inoculation par l'agent phytopathogène.

Variables	Souches						P-value
	<i>B. mojavensis</i>	<i>B. subtilis</i>	<i>P. vermicola</i>	<i>B. amyloliquefaciens</i>	Témoin		
Taille des plates (cm)	125,6 ^{a**}	110,2 ^{b**}	92,2 ^{c**}	69,4 ^{d**}	48,2 ^e		S (P <0,05)
Nombre de feuilles par plante	65,4 ^{a*}	62,8 ^{ab*}	65,6 ^{a*}	59 ^{b**}	40,6 ^c		S (P <0,05)
Nombre de fleurs par plante	1,8 ^{b*}	2,4 ^{a**}	1,8 ^{b*}	1 ^{c**}	0 ^d		S (P <0,05)
Nombre de symptômes (tache d'Alternariose) par plante	6 ^{b*}	5,2 ^{ab*}	1 ^{a**}	4,6 ^{ab*}	36,4 ^c		S (P <0,05)

Différentes lettres indiquent une différence significative au seuil de **p<0,05** par rapport les souches testés et le témoin ; **P- value** degré de signification (S, effet significatif); * le même effet entre les bactéries testées, ** différents effets entre les bactéries testées. Les coefficients de corrélation: la taille ($R^2 = 0,9$); le nombre de feuilles ($R^2 = 0,88$); le nombre de fleurs ($R^2 = 0,29$) et le nombre de symptômes ($R^2 = 0,95$).

4.6.2- Dans les conditions de champ

Pour rappel, le test *in vivo* des souches *B. mojavensis*, *B. amyloliquefaciens*, *B. subtilis*, *P. vermicola*, en plein champ est réalisé à Constantine (Algérie) pendant la période de Mai- Aout 2015. Avant le repiquage, Les racines des plantules de tomate de la variété (*Blacmine*) âgées de 4 semaines ont été plongées dans 10 mL de concentrations bactériennes 10^8 cellules/ ml. Les paramètres prisent en considération sont la taille des plantes, nombre de feuilles par plante et le nombre de fleurs par plante (tableau 16).

L'analyse des résultats présentés dans le tableau (16) montre que des effets significatifs positifs variables, ont été enregistrés entre les lots traités par les différentes souches bactériennes et le témoin sur la plupart des paramètres étudiés, après la période de repiquage. En effet, après 4 semaines de repiquage, aucun effet significatif n'a été enregistré par les souches *B. subtilis*, *P. vermicola* et *B. amyloliquefaciens*, sur la taille des plantes en comparaison avec le témoin. Alors que la souche *B. mojavensis* a augmenté significativement la taille des plantes (23,80 vs 18.10). Par ailleurs, après 8 semaines de repiquage aucune différence significative n'a été observée chez *B. subtilis*, *P. vermicola* sur la taille des plantes en comparaison avec le témoin. Par contre, les meilleurs effets ont été enregistrés chez *B. mojavensis* et *B. amyloliquefaciens* (34.6 et 34.8 vs 25.1).

D'autre part, le nombre de feuilles des plantes de tomate, après 4 semaines est meilleur dans les lots traités par la souche, *B. subtilis*, *P. vermicola* et *B. amyloliquefaciens* (42, 44.1 et 40.9), respectivement, versus 23.1 dans le lot témoin. En outre, le nombre de feuilles des plantes de tomate est meilleur dans les lots traités par la souche *B. mojavensis* atteignant (101.1 vs 39.7), après 8 semaines de culture.

En ce qui concerne le nombre de fleurs, après quatre semaines, les souches *B. mojavensis*, *B. subtilis*, *P. vermicola* et *B. amyloliquefaciens* ont montré des effets significatifs par rapport au témoin, qui ont atteint (3.9, 2.2, et 3.8 et 3.1 vs 0.9). En revanche, les souches *B. mojavensis*, *P. vermicola* et *B. amyloliquefaciens* ont permis une meilleure formation de fleurs (10.9, 13.2 et 13.6 vs 3.4), après 8 semaines de culture (tableau 12).

On récapitule, les meilleurs effets calculés, après 8 semaines de repiquage ont été estimés chez *B. mojavensis* et *B. amyloliquefaciens*, sur la taille des plantes; *B. mojavensis* sur le nombre de feuilles par plantes; *B. mojavensis*, *P. vermicola* et *B. amyloliquefaciens* sur le nombre de fleur par plante.

Tableau 16 Effet du traitement sur des plantules de tomate (variété: *Blacmine*) par les différentes souches de *Bacillus* (*B. mojavensis*, *B. subtilis*, *B. amyloliquefaciens*) et la souche *P. vermicola*, après 4 semaines et 8 semaines, en plein champ .

Variables	Période	Souches					Témoïn
		<i>B. mojavensis</i>	<i>B. subtilis</i>	<i>P. vermicola</i>	<i>B. amyloliquefaciens</i>		
Taille des plantes (cm)	Semaine 4	23,80 ^{a*}	18,90 ^b	18,70 ^b	20,20 ^b	18,10 ^b	
	Semaine 8	34,60 ^{a*}	26,90 ^b	28,90 ^b	34,80 ^{a*}	25,10 ^b	
Nombre de feuilles	Semaine 4	31,60 ^b	42 ^{a*}	44,1 ^{a*}	40,90 ^{a*}	23,1 ^c	
	Semaine 8	101,1 ^{a*}	93,2 ^b	83 ^c	77,5 ^d	39,7 ^e	
Nombre de fleurs	Semaine 4	3,9 ^{a*}	2,2 ^{ab*}	3,8 ^{a*}	3,1 ^{ab*}	0,9 ^b	
	Semaine 8	10,9 ^{ab*}	9,9 ^b	13,2 ^{a*}	13,6 ^{a*}	3,4 ^c	

Les lettres différentes sur la même ligne indiquent une différence significative au seuil de $P < 0,05$. * effet significatif des bactéries par rapport au témoin. Les coefficients de corrélation: la taille ($R^2 = 0,84$); le nombre de feuilles ($R^2 = 0,98$); le nombre de fleurs

L'étude statistique appliquée en plein champ, montre que les coefficients de corrélations sont élevées; la taille ($R^2 = 0,84$); le nombre de feuilles ($R^2=0,98$); et le coefficient de corrélation pour les fleurs est de 0,69. La valeur de P-value ($p<0,05$) et les coefficients de corrélation de différents tests présentés dans cette étude montrent qu'ils sont hautement significatifs.

En général, les plantes de tomate dans tous les lots ne montrent aucun symptôme maladif pendant toute la période de culture. Cependant, quelques feuilles d'un nombre limité de plantes uniquement jaunissent.

Il est intéressant de signaler que, *B. mojavensis* semble être le meilleur agent de biocontrôle pour évaluer l'étude *in vitro* et *in vivo*, de ce fait, cette souche à été ciblée pour la suite du travail.

4.7-Production des substances antifongiques

Dans le présent travail, l'objectif de la recherche des substances antifongiques est de déterminer la capacité de la souche la plus performante (*B. mojavensis*) à produire des enzymes nécessaires dégradant la paroi des cellules fongiques comme la protéase, la lipase la chitinase et d'autres substances bioactives en l'occurrence les lipopeptides.

4.7.1-Enzymes dégradant la paroi des cellules fongiques

La figure 29 cité ci-dessous montre que *B. mojavensis* est capable de sécréter des enzymes en l'occurrence; la protéase et la lipase et n'a pas capable de produire la chitinase

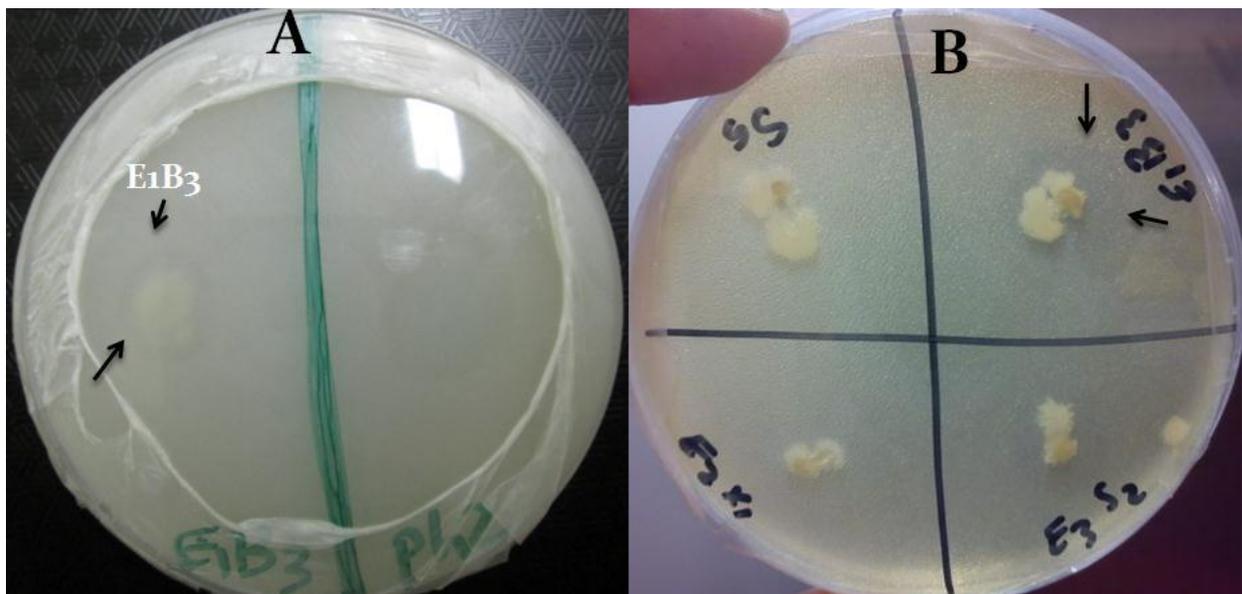


Figure 29 (A), détection de l'activité de protéase développée par *B. mojavensis*; B) Détection de l'activité de lipase développée par *B.*

4.7.2- Les lipopeptides (LPs)

La capacité de *B. mojavensis* à produire des lipopeptides (LPs) a été mise en évidence par des analyses de spectrométrie de masse couplée à l'HPLC (LC-MS). La détermination de la nature des pics HPLC obtenus a été réalisée par comparaison des rapports masse/charge (M/Z) des différents ions moléculaires (MNa^+ pour les iturines et les surfactines et MH^+ pour les fengycines) aux rapports M/Z des ions lipopeptidiques précédemment décrits dans la littérature. La figure illustre un exemple de profil des analyses LC-MS des LPs de la souche *B. mojavensis* comprenant les pics chromatographiques. Les trois familles de lipopeptides sortent selon les chromatogrammes obtenus à différents temps de rétention (iturines: 3min-6min; fengycines: 6min; surfactines: 12min-15min) (figure 30).

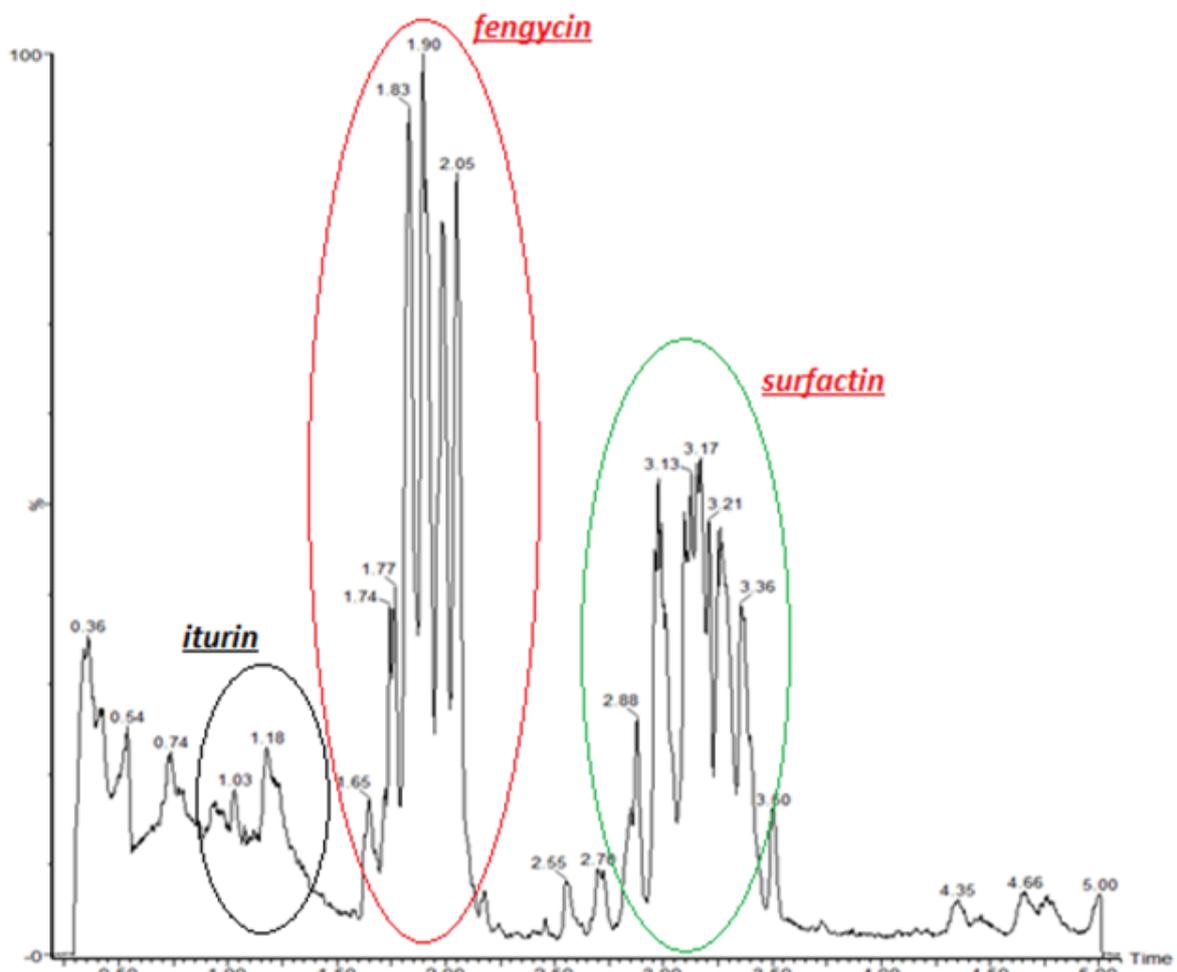


Figure 30 Analyse par LC-MS des lipopeptides produits par la souche *B. mojavensis*: Profil chromatographique de production des lipopeptides, iturines (4min, 5min et 7min), fengycines (8min à 13min), surfactines (23min à 26 min).

Les résultats d'analyses LC-MS ont montré que la souche *B. mojavensis* isolée, produise les trois familles de lipopeptides, en l'occurrence; iturine, surfactines et fengycines.

4.8- Évaluation de l'effet antagoniste par Cytomètre à flux (FCM) de la souche la plus performante

Dans le but d'étudier l'effet antagoniste de la souche la plus performante *B. mojavensis* (E1B3) sur l'agent phytopathogène de l'Alternariose *A. alternata* un suivi de la confrontation des deux souches a été réalisé dans des boîtes de Petri contenant le milieu PDA. L'évolution de l'antagonisme est analysée par une technique pratiquée, jusqu'ici, sur les bactéries, à savoir la technique de cytométrie en flux (CMF) accompagnée par observation au microscope à fluorescence.

La figure 31 présente les différentes étapes de l'interaction entre *B. mojavensis* et *A. alternata* après le 3^{ème}, le 5^{ème} et le 7^{ème} jour de l'incubation, toute en comparaison avec des cultures témoins (cultures seules en boîtes) de *B. mojavensis* et de *A. alternata*.

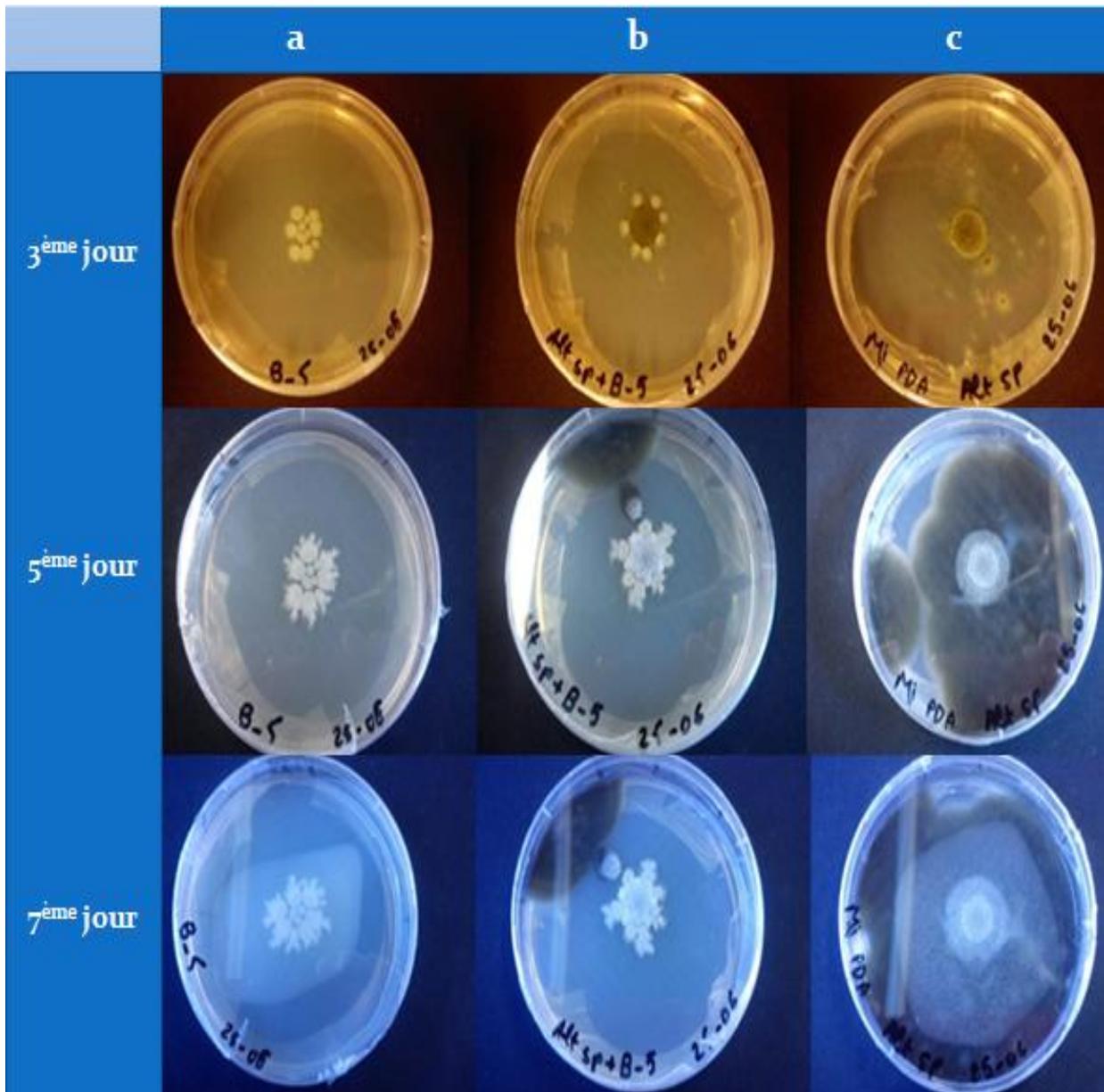


Figure 31 Effet de *B. mojavensis* sur la croissance d'*A. alternata* après le 3^{ème}, le 5^{ème} et le 7^{ème} jours sur PDA inoculé centralement : (a) *B. mojavensis*, (b) *A. alternata* et *B. mojavensis*, (c) *A. alternata*. Les boîtes de PDA centralement inoculées par les deux souches *B. mojavensis* et *A. alternata*, ont montré une inhibition très importante d'*A. alternata*, à partir du cinquième jour d'incubation (figure 31).

La coloration des cellules prélevées à partir de la boîte renfermant les cultures de *B. mojavensis* et *A. alternata* en confrontation, a été réalisée par cFDA avant de lancer les analyses par CMF; l'intensité du vert fluorescent (GFI) a atteint 10^3 à 10^5 MH pour *B. mojavensis* (figure 32A) et 10^4 à 10^5 MH pour *A. alternata* (figure 33A). Par contre; après traitement thermique (90°C pendant 12 min), l'intensité de GFI des cellules mortes a atteint

des valeurs très basses de 10^2 et 10^3 MH, pour les deux souches microbiennes, comme montré dans les figures (figure 32 B, C) and (figure 33 B, C).

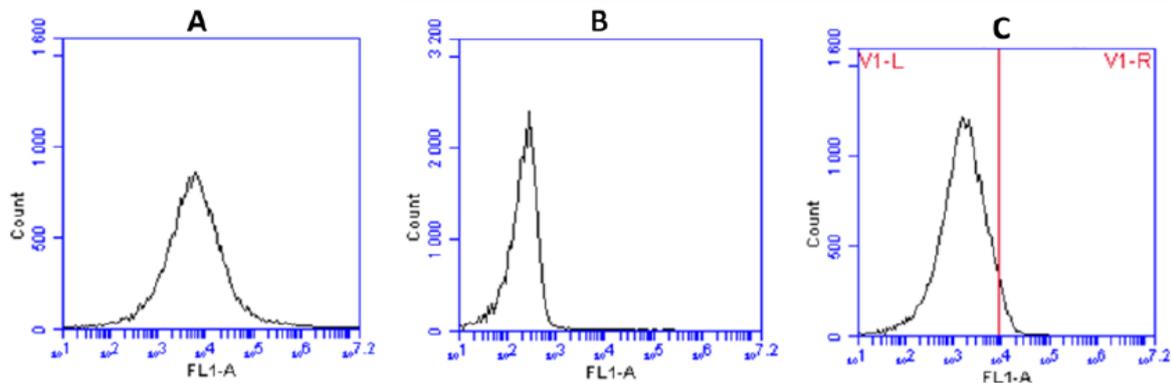


Figure 32 Profil de CMF des boites témoins de *B. mojavensis* lors du 3^{ème} jour d'incubation. (A) des cellules bactériennes vivantes avant traitement thermique (90°C pendant 12 min), (B) des cellules mortes bactériennes non colorées avec cFDA, après traitement thermique, (C) des cellules mortes bactériennes colorées avec cFDA après

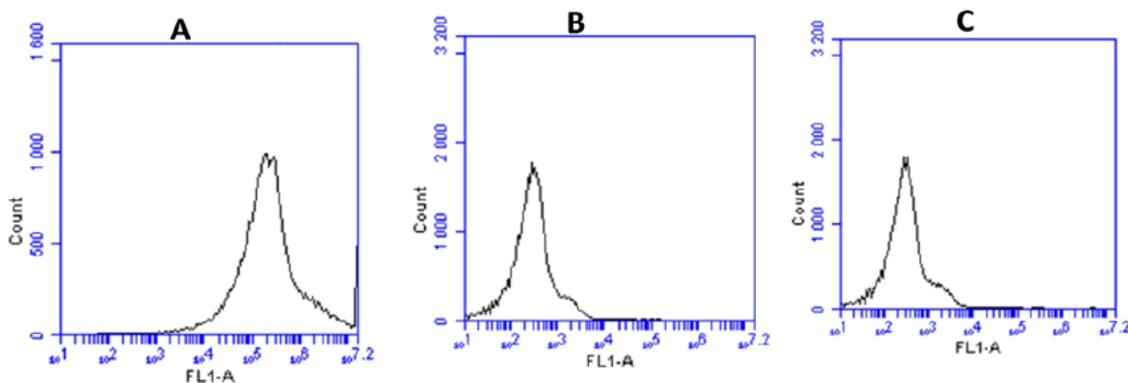


Figure 33 Profil de CMF des boites témoins d'*A. alternata* lors du 3^{ème} jour d'incubation. (A) cellules fongiques vivantes avant traitement thermique (90°C pendant 12 min), (B) cellules fongiques mortes non colorées avec cFDA, après traitement thermique, (C) cellules mortes fongiques colorées avec cFDA, après traitement thermique.

Le suivi de l'évolution de l'intensité du vert fluorescent des boites de PDA contenant *B. mojavensis* et *A. alternata* cultivées ensemble au centre a été effectué le troisième, cinquième et septième jour. Après le 3^{ème} jour, l'intensité de GFI dans les boites de PDA contenant chaque souche a part ; a atteint 10^4 MH et 10^6 MH, pour *B. mojavensis* et *A. alternata* (figure 34) alors que celle des boites d'interaction était entre 10^3 et 10^4 MH.

Après le 5^{ème} jours, l'intensité de GFI des boites de PDA contenant *B. mojavensis* a diminué a atteignant 10^3 MH. Dans le cas des boites d'*A. alternata*, deux piques ont apparus et 10^6 MH, et 10^3 MH. En revanche, les boites d'interaction ont émettre une fluorescence de 10^3 et 10^4 MH d'intensité (figure 34).

Après le 7^{ème} jour d'incubation, les mêmes valeurs d'intensité de GFI du 5^{ème} jour, ont été obtenu dans les boites contenant chaque souche a part. Par contre, les boites d'interaction ont connu une augmentation impressionnante des valeurs d'intensité de GFI, atteignant 10^4 et 10^5 MH.

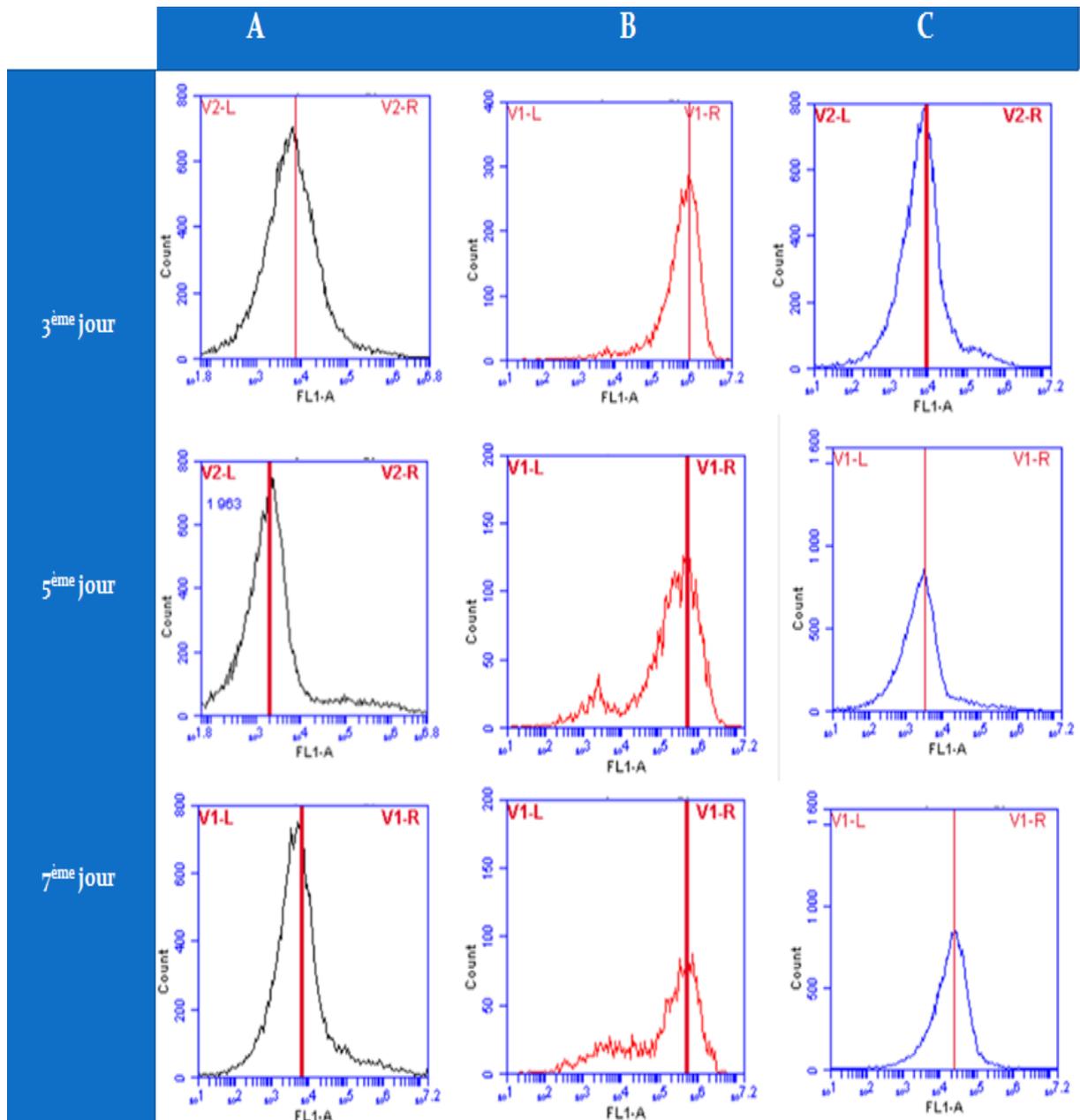


Figure 34 Profils expérimentaux de CMF de *B. mojavensis* (A), *A. alternata* (B), interaction entre *B. mojavensis* et *A. Alternata* (C) après le troisième, le cinquième et le septième jour d'incubation.

Les mêmes échantillons ont été observés par microscope à fluorescence pour confirmer l'activité antagoniste de *B. mojavensis* viv-à-vis *A. alternata* et avec la présence du colorant cFDA, après 7 jours d'interaction.

Le colorant cFDA pénètre dans les cellules de *B. mojavensis* et *A. alternata* parfaitement (figure 35, 36). L'observation d'interaction *B. mojavensis*-*A. alternata* montre une forte inhibition de filament et des spores d'*A. alternata*.

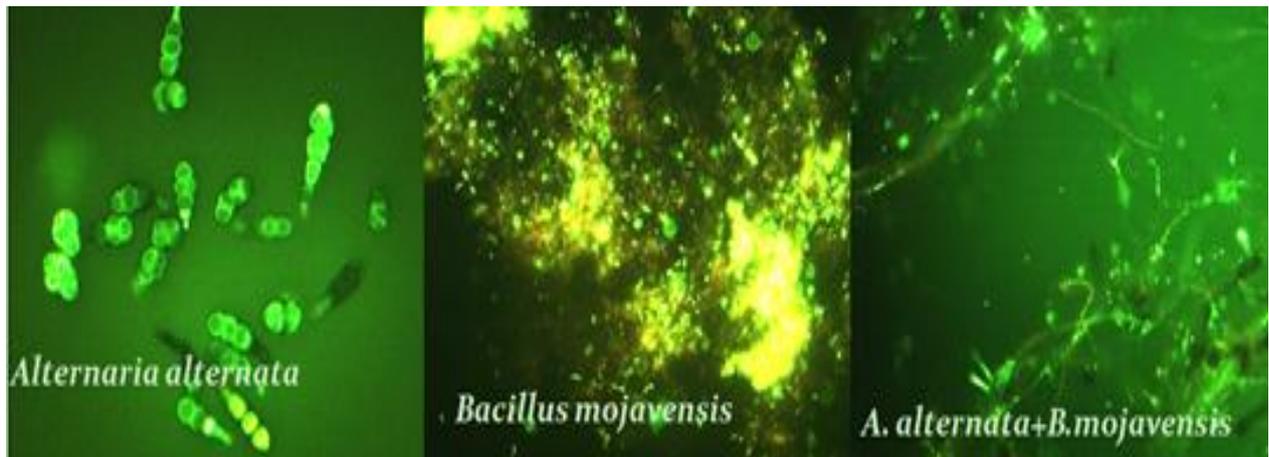


Figure 35 Analyse d'interaction entre *A. alternata* et *B. mojavensis* par microscope à fluorescence. Les cellules ont été traitées comme décrit en Matériel et Méthodes. Les cellules ont été colorées par cFDA avec une observation microscopique (fluorescence verte) après 7 jours d'interaction (GX 40).



Figure 36 Analyse d'interaction entre *A. alternata* et *B. mojavensis* par microscope à fluorescence. après 7 jours d'interaction (GX 40).

Discussions

5- Discussion

L'intensification de la production agricole est survenue en parallèle avec l'expansion de la population mondiale, pendant le XXe siècle. Cette intensification communément connue « Révolution agricole » est principalement caractérisée par l'utilisation intensive des organismes génétiquement modifiés (OGM), des engrais et des pesticides chimiques (Cartillier, 1977). L'utilisation intensive de ces derniers a provoqué de graves conséquences sur l'environnement et la santé de l'homme (Rocha *et al.*, 2014) d'où l'apparition des produits phytosanitaires d'origine naturelle, dits, biologiques. Parmi ces derniers, on note les rhizobactéries promotrices de la croissance des plantes (PGPRs: plant growth promoting rhizobacteria), qui sont largement utilisées en agriculture biologique comme agents naturels de biocontrôle (McSpadden- Gardener, 2004).

Le présent travail s'inscrit dans le cadre de caractérisation d'un ensemble de bactéries, isolées des milieux arides d'Algérie, pour leurs capacités *in vitro* et *in vivo*, de protection des plantes de tomate contre l'agent causal d'Alternariose à savoir, *Alternaria alternata*.

La souche phytopathogène d'*A. alternata* utilisée ici, a été isolée et sélectionnée à partir des différents échantillons, feuilles, tige et fruits, présentant les symptômes d'Alternariose de la tomate (taches marron en forme d'anneaux concentriques). Ce résultat montre que cette souche est responsable de l'Alternariose de la tomate dans la région de Hamma Bouziane (Constantine). La présence de ce champignon phytopathogène dans des plantes de tomate malade a été rapporté par plusieurs études, telle que Fatih *et al.*, (2005); AbdAlla *et al.*, (2014) et Kokaeva *et al.*, (2015).

Les caractéristiques macroscopiques de ce champignon montrent que la couleur de la colonie est claire à une teinte olivâtre verdâtre avec un aspect duveteux ; et une couleur grise de la face inférieure; la croissance mycélienne est à bordures régulière. L'observation microscopique de l'isolat Alt1 montre la présence des conidies de forme ovale, de couleur brune jaunâtre, avec 3 transeptas et 1-2 longisepta ou oblique (Gonzalez, 1995). Selon ces caractères macroscopiques et microscopiques l'isolat Alt1 a été identifié, en présomptive, comme *Alternaria alternata* (Simmons, 2007). Les caractères macroscopiques sont en accord avec ceux de Pusz *et al.*, (2009) qui ont rapporté que la couleur des colonies d'*A. alternata* isolées d'*Amaranthus retroflexus* varie du gris clair au gris foncé. De même, Rai et Kumari, (2009) et Berber *et al.*, (2008) ont observé des colonies d'*A. alternata* à texture cotonneuse compacte et dense avec une couleur claire à noir foncé.

Accessoirement, les caractéristiques microscopiques d'*A. alternata* sont conformes à celles observées par Berber *et al.*, (2008) qui ont montré que les conidiophores de ce champignon sont simples ou ramifiés, de couleur brun-dorée et que les conidies d'*A. alternata*, sont cloisonnées transversalement et longitudinalement, ovoïdes ou elliptiques, souvent branchées en chaînes, de couleur pale à brun-dorée.

La confirmation de l'identification préliminaire de cet isolat a été réalisée par des analyses moléculaires des gènes *ITS*, et *Tef I-α*. Le blast des séquences dans Genbank, a montré que la souche fongique est *Alternaria alternata*. Le numéro d'accèsion; fourni par cette base de donnée pour la souche, est [HQ846574.1](#).

Plusieurs travaux ont montré l'utilisation des gènes *ITS* pour déterminer les espèces du genre *Alternaria*; on cite entre autre; ceux de Mmbaga *et al.*, (2011). En revanche, les travaux de Zur *et al.*, (2002) montrent que les gènes *ITS* ne sont pas suffisants pour confirmer l'identité ou l'espèce de la souche *A. alternata*. En outre, Woudenberg *et al.*, (2011) ont utilisé les gènes *ITS*, *gapdh* et *endoPG* pour identifier les isolats d'*Alternaria* isolés en USA.

L'utilisation d'*A. alternata* isolée des plantes de tomate malades pour réaliser le test de pathogénicité sur cette plante s'est déroulé avec réussite. Cette réussite est auparavant signalée dans le travail de Mirkarimi *et al.*, (2013). La maladie d'Alternariose, en effet, progresse, lentement les premiers jours, mais s'accélère au fur et à mesure pendant la première semaine d'inoculation des plantules de tomate. Les résultats obtenus montrent que la souche fongique testée a pu infecter les plantules de tomate, causant, ainsi, des symptômes typiques d'Alternariose avec un degré de sévérité de $\geq 76\%$ comparativement aux témoins.

Les symptômes sont essentiellement représentés par l'apparition des taches sur les feuilles. Ces taches sont circulaires de couleur foncée à brune claire, se produisant en nombre variable par feuille ; elles sont principalement de diamètre ≥ 5 mm, pendant la première semaine de post-inoculation. La couleur des feuilles atteintes virent vers le jaune, puis vers le brun et la feuille finit par tomber. Ces observations sont plus ou moins identiques à celles décrites par Kumar et Srivastava, (2013); Stammler *et al.*, (2014) et Bessadet, (2014).

Pour lutter contre l'*A. alternata* développé précédemment, différents échantillons ont été ciblés dans le présent travail, en l'occurrence ; le sol des zones rhizosphériques des plantes de palmeraies et de la plante AGA de plusieurs régions du sud Algérien. Ces sites d'échantillonnage sont choisis par rapport à leur importance. En effet, Whipps, (2001); Lugtenberg *et al.*, (2002); Villaceros *et al.*, (2003); Singh *et al.*, (2004); De Carvalho et Pedro, (2010); Dib *et al.*, (2009) ont montré que les milieux particuliers explorés (sol de la rhizosphère) constituent une source écologique importante d'isolement des microorganismes

résistants, ayant des caractéristiques phénotypiques et génotypiques particulières, grâce aux exsudats racinaires et aux interactions diverses microbe-microbes et microbes-plantes, telles que la symbiose, parasitisme, antagonisme, etc. ceci augmente la chance de tomber sur des populations microbiennes à des potentialités importantes de biocontrôle.

L'exploration des échantillons en provenance de divers environnements de Sahara Algérienne (Biskra et Tougourt) a permis l'obtention de 45 isolats microbiens susceptible de développer un effet sur l'agent de l'Alternariose. Le test de sélection a mis en évidence que; E1B3 et S5 (isolés de Biskra), S1.1 et E2X1 (isolé de Tougourt) possèdent un effet antifongique considérable contre *A. alternata* (taux d'inhibition varient entre 60% et 75%), cependant, l'isolat E1B3 a développé le meilleur effet. En effet, trois souches de *Bacillus* sont obtenues à partir du sol des différents sites prospectés, deux *Bacillus* à partir du sol de palmeraie de la région de TOLGA, une souche de *Bacillus* à partir du sol de la rhizosphère de la plante «AGA». Il est très intéressant de signaler qu'un autre genre bactérien a été identifié à partir du sol de la rhizosphère de palmeraie de la région de RANO, il s'agit de *Providencia*. La mise en évidence de ces genres a été réalisée grâce à tests préliminaire d'identification bactérienne.

Le genre *Bacillus* représente un large nombre de microorganismes communément isolés du sol et du sol rhizosphériques (McSpadden- Gardener, 2004). En effet, la présence des bactéries du genre *Bacillus* dans la rhizosphère de diverses plantes a été investigué dans plusieurs études, telle que celle de Ait kaki *et al.*, (2013) et Köberl *et al.*, (2013), qui ont isolé des souches de *Bacillus spp.* et *Paenibacillus spp.* à partir du sol de la rhizosphère des plante médicinales *Matricaria chamomilla*, *Calendula officinalis* et *Solanum distichum*. Sur le même plan, Abbo *et al.*, (2012) et AbdAlla *et al.*, (2014) ont isolé à partir de la rhizosphère de la tomate des souches appartenant au genre *Basillus* (B25, B35, B41, et B45) pour les utiliser en tant qu'agents de lutte biologique. AbdAlla *et al.*, (2014) ont identifié leurs souches comme étant *B. subtilis*, *B. megaterium*, *B. pumilus* and *B. cereus*. Enfin, Foè Ldes *et al.*, (2000) ont isolé la souche *Bacillus subtilis* IFS-01 à partir de la rhizosphère des céréales afin de l'utiliser en tant qu'agents de lutte biologique. En revanche, très peu d'études ont parlé de la présence du genre *Providencia* dans la partie rhizosphérique du sol (Hussain *et al.*, 2015 ; Aish *et al.*, 2015). Et à notre connaissance aucun travail n'a fait allusion à l'isolement de ce genre du même écosystème.

Le test d'antagonisme effectué dans le présent travail, sur PDA, a permis de sélectionner trois isolats de *Bacillus* (E1B3, S5 et E2X1) et un isolat de *Providencia* (S1.1) développant une activité anti-*Alternaria*. Plusieurs études ont décrit les effets antifongiques, *in vitro*, des souches de *Bacillus sp.* vis à vis de certaines moisissures phytopathogènes (Schippers *et al.*,

1992; Jongsik et Kyung, 2000; Gong *et al.*, 2006; Ongena *et al.*, 2007). Par contre, d'après littérature, le présent travail est le premier à étudier l'activité antifongique de *P. vermicola*. L'effet inhibiteur de cette espèce bactérienne a été précédemment montré contre des organismes non microbiens (le nématode *M. javanica*), comme le cas exhibé par Aich *et al.*, (2015) qui ont montré l'effet inhibiteur de la souche *P. vermicola* contre l'agent pathogène *M. javanica*.

Les isolats de *Bacillus* spp, ont donné, dans des boîtes de milieu gélosé, une zone d'inhibition, un secteur du brunissement des microbes pathogènes, ou se sont développés rapidement au-dessus d'agent pathogène et ont empêché leur croissance. Dans la littérature consultée, plusieurs genres bactériens, en plus du genre *Bacillus*, ont montré des effets antimicrobiens divers, en l'occurrence, *Agrobacterium*; *Bacillus*; *Pseudomonas*; et *Streptomyces* (Larkin et Farvel, 1998). Pengnoo *et al.*, (2006) ont prouvé que 16 isolats de *Bacillus* spp. possèdent la capacité d'inhiber la croissance mycélienne de *Rhizoctonia solani* agent causal de la rouille de feuille de l'arachide de bambara. Parmi ces isolats, *Bacillus firmus* a montré la meilleure activité. D'autre part Essam *et al.*, (2006) ont montré que *Bacillus subtilis* 1020 et *B. cereus* 1080 étaient les souches les plus performantes contre l'agent pathogène *Penicillium italicum*. Yazici *et al.*, (2011) ont rapporté que plusieurs bactéries telles que *B. subtilis* (IK-83, IK-92 and IK-159), *B. cereus*-GC sous-groupe A (IK-34) et *B. amyloliquefaciens* (IK-104) étaient très efficaces *in vitro* contre *A. solani*. Des analyses de l'activité antifongiques confirment que *B. mojavensis* KJS-3 a des effets antifongiques sur *Botrytis cinerea*, *Rhizoctonia solani* AG-4, *Sclerotinia sclerotiorum* et *Colletotrichum goeosporioides* (Kim *et al.*, 2015). Varma et Gandhi (2007) et Behera *et al.*, (2013) ont rapporté l'efficacité de *B. subtilis* et *P. fluorescens* sur l'inhibition de croissance d'*A. solani*. L'isolat bactérien R2, identifié comme *Bacillus vallismortis*, a soutenu plus de 50% d'inhibition de différentes moisissures (*Alternaria alternata*, *Rhizoctonia oryzae*, *Fusarium oxysporum*, *Fusarium moniliforme*, *Colletotrichum* sp, *Helminthosporium* sp et *Magnaporthe grisea*) dans les culture en boîtes (Kaur *et al.*, 2015). Dans une autre étude, la bactérie *B. megaterium* s'est avérée pour produire des composés diffusibles et volatiles qui ont inhibé la croissance d'*A. alternata* et *F. oxysporum* (Trivedi et Pandey, 2008). Trivedi et Pandey, 2008; Matar *et al.*, 2009 et Velmurugan *et al.*, 2009 ont montré les capacités de *B. subtilis* et de *B. megaterium* d'inhiber la croissance mycélienne *in vitro* de plusieurs moisissures phytopathogènes.

Après analyse de l'ADNr-16S, il s'est avéré que les souches appartenant au genre *Bacillus* s'agissent des bactéries du groupe *B. subtilis* qui englobe plusieurs espèces très semblables selon le plan taxonomique (Roberts *et al.*, 1994). Par contre, la souche bactérienne représentant le genre *Providencia*, a été identifiée comme étant *P. vermicola* (KP059130.1).

En complément, l'analyse des séquences de *gyrase A* a pu distinguer les espèces du groupe *B. subtilis* les unes des autres. De ce fait, les bacilles isolés de Biskra ont été identifiés comme *B. amyloliquefaciens* (KC977493) et *B. mojavenensis* (KC977492), et ceux isolés de Tougourt appartenant à l'espèce, *B. subtilis* (KP699114.1).

Plusieurs souches de *Bacillus* ont été isolées, auparavant, à partir du sol des régions arides et désertiques (Roberts *et al.*, 1994). *B. mojavenensis* est isolé pour la première fois en 1994, par Roberts *et al.* à partir du sol du désert de Mojave en Californie. Il est important de signaler que la présence de *B. subtilis* dans la rhizosphère de la plante «Aga», est selon nos connaissances est décrite ici pour la première fois. Par ailleurs, la souche *P. vermicola* n'a jamais été isolée du sol de la rhizosphère de palmerais. En revanche, cette souche a été isolée par Hussain *et al.*, (2015) à partir de la rhizosphère de la graine de colza, et par Aish *et al.*, (2015), à partir des plantes saines du poivre.

L'étude de traitement de l'Alternariose de la tomate, en utilisant des souches de *Bacillus* spp. a été largement abordé (Fravel, 2005; Abbo *et al.*, 2012). Par contre, selon nos connaissances, la souche *P. vermicola* est utilisée pour la première fois ici, pour cet objectif.

Dans le présent travail, les souches; *B. amyloliquefaciens*, *B. mojavenensis*, *B. subtilis*, *P. vermicola* ont permis la promotion et la protection des plantules de tomate dans les conditions de pots et en plein champs. L'effet des différentes souches bactériennes testées était variable, selon l'espèce bactérienne, le paramètre étudié et l'expérimentation (en serre ou en plein champs). La même constatation a été observée par Ben Mbarek, (2011) et Abdel-Monaim, (2011). Ceci est dû à l'influence des interactions complexes que développent les plantes avec leur environnement biotique et abiotique (Calvo-Garrido, 2014).

Dans les conditions de pot, la souche *P. vermicola* (S1.1) a révélé un meilleur effet sur la diminution de la sévérité de la maladie d'Alternariose en comparaison avec le témoin. Par ailleurs, la souche *B. mojavenensis* (E1B3) augmente la taille des plantules de tomate. Les souches *B. mojavenensis* (E1B3), *P. vermicola* (S1.1) et *B. subtilis* ont montré les meilleurs effets pour le nombre de feuilles par plante. Concernant le nombre de fleurs, *B. subtilis* (E2X1) a montré le meilleur effet. Yazici *et al.*, (2011) ont révélé que les bactéries (*Paenibacillus macerans*-GC subgroup A, *Serratia plymuthica*, *Bacillus coagulans*, *Serratia marcescens*-GC subgroup A, *Bacillus pumilis* –GC subgroup B et *Pantoea agglomerans*) ont réduit de manière significative la sévérité de la maladie d'Alternariose de la tomate en comparaison avec le témoin.

Dans les conditions du champ, *B. mojavensis* (E1B3) a montré un meilleur effet sur la taille des plantes, après 4 semaines de repiquage; *B. subtilis* (E2X1), *P. vermicola* (S1.1), *B. amyloliquefaciens* (S5) ont révélé un meilleur effet sur le nombre de feuilles par plantes; et *B. mojavensis* (E1B3), *B. subtilis*, *P. vermicola* (S1) et *B. amyloliquefaciens* (S5) ont montré un meilleur effet sur le nombre de fleur par plante. Les meilleurs effets calculés, après 8 semaines de repiquage ont été estimés chez *B. mojavensis* (E1B3) et *B. amyloliquefaciens* (S5), sur la taille des plantes; *B. mojavensis* (E1B3) sur le nombre de feuilles par plante; *B. mojavensis* (E1B3), *P. vermicola* (S1.1) et *B. amyloliquefaciens* (S5) sur le nombre de fleur par plante. Abbo *et al.*, (2012) ont montrés l'effet antifongique des quatre espèces de *Bacillus* spp. isolées à partir de la rhizosphère de tomate contre *A. alternata* (Fr.) Keissl. *in vitro* et *in vivo*. Il est à noter que les souches de *Bacillus* isolées de la rhizosphère d'une plante, peuvent servir de traitement pour d'autres plantes, chose remarquée dans notre travail, ainsi que d'autres ; en fait, Jošić *et al.*, (2011) ont montré la réduction significative d'infection de graine de guimauve par des espèces d'*Alternaria*, en les traitant par *Bacillus* sp. Q3 isolée de la rhizosphère de maïs.

De ce fait, les souches de « *Bacillus* » et de « *Providencia* » isolées et caractérisées dans ce travail ont de performances de bio contrôle intéressantes et *in vitro* et *in vivo*. Ce qui peut faire d'elle des agents de bio contrôle efficaces, dans l'augmentation du rendement des récoltes agricoles. Par ailleurs, l'originalité de ce travail qui consiste en l'utilisation de *P. vermicola* dans le domaine de bio contrôle peut ouvrir des portes vers des axes de recherches, menant à des résultats plus efficaces en termes de gestion de productions agricoles. Surtout que cette souche n'a pas été exploitée dans ce domaine.

L'activité anti-*Alternaria* investiguée dans le présent travail peut être expliquée par le pouvoir de ces souches performantes à produire des substances antifongiques. Les substances antifongiques analysées dans la présente thèse sont les enzymes qui ont été intensivement étudiés pour leur activités potentielles de biocontrôle (Peypoux *et al.*, 1999; Ait Kaki *et al.*, 2013) et les trois types de la famille des C-LPs, à savoir : Iturine, fengycines et surfactines.

Les bactéries du genre *Bacillus*, sont connues par leur capacité à synthétiser une large variété de substances biologiques actives (Liu *et al.*, 2010), présentant un effet antifongique remarquable (Yun-Feng *et al.*, 2012), capables de dégrader la paroi des champignons (Tserkovniak *et al.*, 2009), et les enzymes, en font partie (Dunne *et al.*, 1993). Ces enzymes agissent par le mécanisme de mycoparasitisme, grâce à leur rôle intégral dans l'altération physique directe des parois cellulaires (Cho *et al.*, 2011; Praveen Kumar *et al.*, 2012).

La souche de *B. mojavensis* KC977492 sélectionnée, et qui a des performances intéressantes *in vitro* et *in vivo* dans ce travail, avait la capacité de produire la lipase et la protéase et n'a pas la capacité de produire la chitinase. Des résultats similaires ont été élaborés par Ait Kaki *et al.*, (2013), qui ont trouvé que plusieurs espèces de *Bacillus* (*B. amyloliquefaciens*, *B. atrophaeus*, *B. mojavensis*, *B. subtilis*), ont montré des potentialités importantes dans la production d'amylase, protéase, cellulase et chitinase.

Dans le présent travail, la souche de *B. mojavensis* KC977492 sélectionnée est capable de produire les trois familles de lipopeptides, en l'occurrence, iturine, surfactines et fengycines.

Les lipopeptides représentent une classe importante d'antibiotiques peptidiques synthétisée par voie non ribosomale par le genre *Bacillus*, ces lipopeptides sont largement exploités pour des applications biotechnologiques et biopharmaceutiques (Peypoux *et al.*, 1999). Ces trois familles sont des substances antimicrobiennes connues pour leurs propriétés surfactantes et antifongiques (Sandrin *et al.*, 1990; Ongena *et al.*, 2007; Malfanova *et al.*, 2012). Par ailleurs, les LPs incitent les souches de *Bacillus* à coloniser les racines des plantes, à former des biofilms (Bonmatin *et al.*, 2003; Raaijmakers *et al.*, 2006; Leclere *et al.*, 2006). En plus, ils stimulent le système immunitaire des plantes (Induced systemic resistance:ISR), comme démontré par Ongena *et al.*, (2007) et Jourdan *et al.*, (2009).

Dans la littérature, la production des iturines semble être limitée aux espèces *B. subtilis* (Bonmatin *et al.*, 2003) et *B. amyloliquefaciens* (Koumoutsi *et al.*, 2004), tandis que, les surfactines ont été détectées chez *B. coagulans* (Huszcza et Burczyk, 2006), chez *B. pumilus* et chez *B. licheniformis* (Peypoux *et al.*, 1999). Enfin, la production des fengycines a été identifiée chez *B. cereus* (Tsuge *et al.*, 1999) et *B. thuringiensis* (Kim *et al.*, 2004) en plus de *B. subtilis* (Jacques *et al.*, 1999) et *B. amyloliquefaciens* (Koumoutsi *et al.*, 2004). Dans l'étude réalisée par Kim *et al.*, (2015), la souche *B. mojavensis* KJS-3 a été employée pour produire les trois familles de LPs.

Il a été mentionné dans la littérature que les souches de *Bacillus* pourraient avoir un important rôle dans l'agriculture et horticulture en améliorant la productivité des récoltes. Ceci est assuré grâce à leur capacité à coloniser la rhizosphère et la phyllosphère et de produire un large éventail de métabolites bioactifs dont les lipopeptides cycliques (CLPs) qui représentent la classe la plus importante (Koumoutsi *et al.*, 2004; Mukherjee et Das, 2005; Pal et Gardner, 2006; Chen *et al.*, 2008; Baruzzi *et al.*, 2011).

L'effet antagoniste des souches de *Bacillus* vis à vis *A. alternata* a été déterminé dans le présent travail comme dans beaucoup de travaux précédemment cités dans la littérature, par la technique de double culture (Ait Kaki *et al.*, 2013). En revanche, l'utilisation de la technique de cytométrie en flux est à notre connaissance est très peu utilisé dans ce contexte. La CMF est apparue comme une technologie à haute résolution qui soutient la caractérisation de types de cellules individuelles au sein de populations mixtes. elle fournit une analyse d'un grand nombre de cellules et peut identifier les changements au sein d'une population et entre différentes populations (O'Donnell *et al.*, 2013). Le diacétate de carboxyfluorescéine (CFDA) est un colorant lipophile non fluorescent, utilisé principalement pour l'évaluation d'une activité enzymatique cellulaire et pour l'étiquetage par fluorescence. Les liaisons ester sont hydrolysées par des enzymes à activité estérase, donnant la fluorescence verte du colorant. L'intégrité de la membrane est nécessaire pour la rétention à l'intérieur des cellules de cette fluorescence. Il est donc supposé que les cellules viables accumulent de la fluorescéine (dérivés) mais que les cellules mortes ne sont pas capables de le faire (Rotman et Papermaster, 1966). C'est grâce à ce principe que les cellules mortes d'*A. alternata* sont évaluées et par conséquent l'inhibition développée par *B. mojavensis* peut être constatée. Effectivement, un fort effet inhibiteur (réduction de nombre de cellules vivantes) a été enregistré ici, après le 3^{ème}, le 5^{ème} et le 7^{ème} jour d'incubation. Des résultats similaires ont été trouvés par Rocha *et al.*, (2014) qui ont utilisé la CMF pour étudier l'interaction entre *Fusarium verticillioides* et *Bacillus thuringiensis* Subsp. Kurstaki. La coloration des cellules était réalisée dans leur cas par le Calcofluore blanc (CFW) et 7 aminoactinomycine (7-AAD).

Conclusion et perspectives

6- Conclusion et perspectives

Dans cette étude, l'exploration des échantillons de la tomate (feuilles, tige et fruits), cultivée en serre dans la région (Hamma Bouzienne, Constantine), et présentant des symptômes de l'Alternariose, a permis l'isolement d'un *Alternaria sp.* d'après l'identification morphologique. L'identification moléculaire de cet isolat a révélé qu'il s'agit d'*Alternaria alternata* (HQ846574.1). Le test de pathogénicité a démontré que cette souche infecte les plantules de la tomate causant des taches marron en forme d'anneaux concentriques, avec un degré de sévérité de la maladie égale ou supérieur à soixante seize pour cent ($\geq 76\%$).

Il a été conclu de cette partie, que la souche *Alternaria alternata*, isolée ici, est l'agent causal des symptômes typiques d'Alternariose dans la région de Hamma Bouziane (Constantine).

Un isolement des souches de bactéries et de moisissures à partir des zones arides de saharas Algérienne a été effectué, dans le but de sélectionner des souches qui pourront développer un effet antagoniste contre l'agent phytopathogène de l'Alternariose susmentionné. Le test de sélection, *in vitro*, a permis d'obtenir quatre isolats bactériens (E1B3, S5, S1.1 et E2X1) possédant un effet antifongique sur *A. alternata*. Les taux d'inhibition d'*A. alternata* par les souches sélectionnées varient entre 60% et 75% suivant la bactérie testée, du coup, le meilleur effet inhibiteur a été développé par l'isolat E1B3.

Il a été conclu de cette partie, que les bactéries de sol arides (conditions environnementales particulières) possèdent la capacité de sécréter des substances bioactives inhibant la croissance de l'agent phytopathogène de l'Alternariose; *Alternaria alternata*.

L'identification moléculaire des bactéries sélectionnées à activité anti-*A. alternata*, a montré que E1B3, S5, S1.1 et E2X1 sont identifiées comme suit ; *Bacillus mojavensis* (KC977492), *Bacillus amyloliquefaciens* (KC977493), *Bacillus subtilis* (KP699114.1) et *Providencia vermicola* (KP059130.1), respectivement. Il est très intéressant de signaler que le présent travail est le premier à avoir étudié l'activité antifongique de *P. vermicola*.

Les tests réalisés *in vivo* dans des conditions de pots et de plein champ sur la tomate ont montré des effets différents, selon l'espèce bactérienne. Tous les traitements bactériens testés ont montré des effets positifs significatifs plus importants que ceux obtenus dans le lot témoin.

Il est important de mettre en exergue que, les meilleurs effets sur la taille des plantes, le nombre de feuilles et le nombre de fleurs sont révélés par *B. mojavensis*. Par ailleurs, *P. vermicola* était la meilleure à gérer les symptômes d'Alternariose de la tomate. Comme la littérature n'a pas fournie assez d'information concernant l'utilisation de *P. vermicola* dans le

domaine de biocontrôle, ce ci ouvre désormais des voies vers l'exploitation de cette souche et son rôle dans la lutte biologique.

Au terme de ce travail, il a été conclu que *B. mojavensis* est le meilleur agent antagoniste *in vitro* et *in vivo*; de ce fait, la performance intéressante de cette souche est démontrée par sa capacité à produire des substances antifongiques en l'occurrence; les enzymes (la lipase, la protéase) et les trois familles de lipopeptides (iturine, surfactines et fengycines). L'évaluation de l'effet antagoniste par Cytomètre à flux (FCM) (technique rarement utilisée avec les mycètes filamenteux) de *B. mojavensis* a montré une baisse considérable dans le taux des cellules vivantes d'*A. alternata*, ce qui confirme l'effet inhibiteur de *B. mojavensis* contre l'agent pathogène de l'Alternariose.

Au terme de cette ébauche, de nombreuses perspectives découlent. En effet, des études plus approfondies sur les mécanismes biochimiques, moléculaires et physiologiques qu'exercent les bactéries sélectionnées;

La préparation de biofertilisant et de biocontrôle par la production de la biomasse de *B. mojavensis*;

Tester la co-culture des deux bactéries (*B. mojavensis* et *P. vermicola*) pour favoriser la stimulation et la protection des plantes surtout en plein champs ou les conditions restent instable;

Une attention particulière sera réservée à *Providencia vermicola* pour élucider ces vertus dans les domaines de la lutte biologique et de biocontrôle.

Cependant, d'un point de vue appliqué, nous ne disposons pas encore d'informations suffisantes pour concevoir une utilisation efficace et rationnée de ces bactéries, en tant que biopesticides. De ce fait, plusieurs expériences complémentaires doivent être réalisées, en l'occurrence, élargir le spectre des plantes hôtes et des pathogènes ; déterminer la dose minimale effectrice du produit et de suivre sa viabilité à longs termes lors du stockage et au niveau du sol inoculé ; tester les souches bactériennes dans des phénomènes inductibles autres que ceux liés aux maladies biotiques, comme la résistance à des stress hydriques, salins ou des blessures et leurs interactions avec les autres techniques culturales de l'agriculture intégrée.

Abstract

7- Abstract

Early blight is one of the most important diseases of tomato in eastern Algeria. Tomato samples exploration (leaves, stems and fruits) with symptoms of early blight, grown under glass in Hamma Bouziane locality (Constantine), allowed obtaining a filamentous fungal isolate (Alt 1). The morphological and molecular identification (DNA-ITS analysis) of this isolate revealed that it is *Alternaria alternata* (HQ846574.1). Pathogenicity testing of seedlings by isolate resulted in the challenge of the typical early blight disease with a severity of $\geq 76\%$. Samples exploration from various environments in the Algerian Sahara (Biskra and Tougourt) resulted in the obtaining of 45 microbial isolates capable of developing an effect on early blight agent. The selection test showed that; E1B3, S5 (isolated from Biskra) and E2X1, S1.1 (isolated from Tougourt) possess a considerable antifungal effect against *A. alternata* (inhibition rates vary between 60% and 75%), however, the E1B3 isolate developed the best effect. The morphological and molecular identification of the selected isolates by analysis of the 16S DNA and the "gyrase-A" gene showed that the bacterial isolates; E1B3, S5, and S1.1, are identified as *Bacillus mojavensis* (KC977492), *Bacillus amyloliquefaciens* (KC977493), and *Bacillus Subtilis* (KP699114.1) respectively, whereas the bacterial isolate E2X1 is identified as *Providencia vermicola* (KP059130.1). To the best of our knowledge, the isolation of *P. vermicola* from the palmerais rhizospheric soil and the demonstration of its antifungal potential are established for the first time in this work.

The *in vivo* tests that carried out in pots and field conditions on tomato showed different effects according to the bacterial species, and *B. mojavensis* developed the best effect considering the most studied parameters (disease severity, Seedling size, leaves number and flowers number per seedling). The *P. vermicola* strain showed the greatest result on the severity reduction of early blight disease, indicating that the present work is the first one which revealed this effect. In contrast, *B. mojavensis* developed the best protective effect, considering the majority of the parameters studied *in vitro* and *in vivo*. This impact is due to the ability of this strain to produce antifungal substances in this case; the enzymes (lipase and protease) and the three families of lipopeptides (iturin, surfactins, and fengycins). The evaluation of the antagonistic effect developed by *B. mojavensis* versus *A. alternata* through flow cytometer (FCM) showed a considerable decrease in the rate of *A. Alternata* living cells, confirming the inhibitory effect of *B. mojavensis* against the pathogenic agent of early blight.

Key words: Tomato, early blight, *Alternaria alternata*, *Bacillus*, *Providencia vermicola*, lipopeptides, Flow cytometer, biocontrol.

المُلخَص

ملخص

تعتبر اللفحة المبكرة من أهم الأمراض التي تتعرض لها الطماطم في شرق الجزائر. أسفر فحص العينات المأخوذة من الطماطم المعفنة بأعراض اللفحة المبكرة النوعية (الأوراق والسيقان والثمار)، المزروعة في البيوت البلاستيكية الزراعية في مدينة (قسنطينة) حمامة بوزيان عن عزل فطر ال (Alt 1)

أظهرت الملاحظة الماكروسكوبية، الميكروسكوبية والتعريف الجزيئي للعزلة طريق تحاليل الجينات *ADN-ITS* أن العزلة هي *Alternaria alternata* ذات الرقم التسلسلي *HQ846574.1*.

أظهرت الاختبارات المرضية لـ *Alternaria alternata* التي أجريت على شتلات الطماطم تشكل مجمع يسبب اللفحة المبكرة لنبات الطماطم بنسبة $\leq 76\%$.

أسفر فحص العينات المأخوذة من منطقة طولقة (ببسكرة) والمتمثلة في التربة المجاورة لشجر النخيل و منطقة رانو (بقرت) على الحصول عن 45 عزلة. من بينها عزلتين من بسكرة E1B3 و S5، عزلتين من بقرت S1.1 و E2X1 (معدلات تثبيطها لـ *Alternaria alternata* تختلف ما بين 60% و 75%) واحدة تم اختيارها لحصولها على أكبر نسبة تثبيط.

أظهرت الملاحظة الماكروسكوبية، الميكروسكوبية والتعريف الجزيئي للعزلات عن طريق تحاليل الجينات *ADN-16 S* والـ *gyrase-A* أن العزلات من نوع

Bacillus subtilis (KC977493)، *Bacillus amyloliquefaciens* (KC977492)، *Bacillus mojavensis* (KP699114.1) بينما الأخرى من نوع *Providencia vermicola* (KP059130.1) على حد علمنا، يتم تأسيس عزل *P. vermicola* من التربة ريزوسفير من بساتين النخيل والتدليل على قدرته المضادة للفطريات للمرة الأولى في هذا العمل. وأظهرت التجارب التي أجريت في ظروف المجرات في الأواني وفي حقل مفتوح على الطماطم تأثيرات مختلفة، اعتمادا على الأنواع البكتيرية *B. mojavensis*. لوحضت أفضل النتائج في معظم المعلمات المدروسة (شدة المرض، حجم الشتلات، وعدد الأوراق وعدد الزهور في الشتلات). (سلالة *P. vermicola* كشفت أفضل تأثير على الحد من شدة مرض اللفحة المبكرة، مشيرا إلى أن هذا العمل هو أول من كشف هذا الغرض. في المقابل، وضعت *B. mojavensis* أفضل تأثير وقائي، في حين أن غالبية المعلمات المدروسة في المختبر، ويرجع ذلك إلى قدرة هذه السلالة لإنتاج المواد المضادة للفطريات في هذه الحالة؛ الأنزيمات (اللياز، الأنزيم البروتيني) والأنواع الثلاثة للليبوبيبتيدات (البنجسين السيرفاكتين و الأترين)

وأظهر تقييم التفاعل بين السلالة *B. mojavensis* و *Alternaria alternata* بواسطة تقنية تدفق الكريات (FCM) إلى انخفاض كبير في معدل الخلايا الحية لـ *Alternaria alternata*، مما يؤكد تأثير *B. mojavensis* ضد مسببات الأمراض النباتية.

كلمات البحث: الطماطم، اللفحة المبكرة، *Bacillus*، *Providencia vermicola*، تقنية تدفق الكريات، والمكافحة البيولوجية

*Références
Bibliographiques*

9- Références bibliographiques

1. Abbo A.S., Idris M.O., Hammad A.M. (2014). The Antifungal Effects of Four Tomato Rhizosphere *Bacillus* spp. against *Alternaria Alternata*. *International Journal of Science and Research*; ISSN (Online). 3 (7): 2319-7064.
2. AbdAlla S.A., Algam S.A., Elshiekh I., Ahmed M. El Naim. (2014). In Vitro Screening of *Bacillus* Isolates for Biological Control of Early Blight Disease of Tomato in Shambat Soil. *World Journal of Agricultural Research*. 2 :147-150.
3. Abdel-Monaim M.F. (2011). Integrated management of dampingoff, root and/or stem rot diseases of chickpea and efficacy of the suggested formula. *Not Sci Biol* 3:80–88.
4. Adam A. (2008). Elicitation de la résistance systémique induite chez la tomate et le concombre et activation de la voie de la lipoxigénase par des rhizobactéries non-pathogènes. Thèse Université de Liège.
5. Agrios G.N. (1997). *Plant pathology*, 3rd edition. Academic Press, New York. U.S.A.
6. Agrios G.N. (2005). *Plant Pathology*, 5^e édition, Elsevier - Académie Press, Burlington MA. p 922.
7. Ahimou F., Jacques P., Deleu M. (2000). Surfactin and iturin A effects on *Bacillus subtilis* surface hydrophobicity. *Enzyme Microb. Technol.* 27 : 749– 754.
8. Aish A., Youssef S.A., Masoud S.I. (2015). A potential biocontrol and pgpr activities of bacteria *Providencia vermicola* against root knot nematode meloidogyne jovancia. *Journal of Nematology*. 47(3): 218–281.
9. Aissa B.F. (1999). Encyclopédie des plantes utiles, Flore d'Algérie et du Maghreb. (ed). Librairie moderne. Rouïba. 278-279.
10. Ait-Kaki A. (2013). Recherche de nouvelles potentialités de bactéries du genre *Bacillus* pour l'agriculture et l'agroalimentaire. Université Constantine 1 (Algérie).
11. 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. J. Microbiol.* doi: 10.1007/s12088-013-0395-y.
12. Aneja K.R. (2003). Experiments in Microbiology Plant Pathology and Biotechnology, Fourth Edition, *New Age International (P) Ltd., Publishers, New Delhi*. pp. 320.

13. Ariffin H., Abdullah N., Umi Kalsom M.S., Shirai Y., Hassan M.A. (2006). Production and characterisation of cellulase produced by *Bacillus pumilus* EB3. *Int J Eng Technol.* 3:47–53.
14. Asaka O., Shoda M. (1996). Biocontrol of *Rhizoctonia solani* damping-off of tomato with *B. subtilis* Rb14. *Appl Environ Microbiol.* 62 : 4081–4085.
15. Attrassi K., R Benkirane., B Attrassi et A Douira. (2007). Effet de l'association de certains fongicides avec le chlorure de calcium sur le développement d'un complexe fongique responsable de la pourriture des pommes en conservation. *Phytoprotection.* 88(1) : 17-26.
16. Bais H.P., Park S.W., Weir T.L., Callaway R.M., Vivanco J.M. (2004). How plants communicate using the underground information superhighway. *Trend Plant Sci.* 9: 26–32.
17. Baruzzi F., Quintieri L., Morea M., Caputo L. (2011). Antimicrobial compounds produced by *Bacillus spp.* And applications in food. In: Science against Microbial Pathogens: Communicating Current Research and Technological Advances.
18. Basu P.K. (1974). Measuring early blight, its progress and influence on fruit losses in nine tomato cultivars. *Can Plant Dis surv.* 54: 45-51.
19. Batista D. C., Lima M. A., Haddad F., Maffia L. A., Mizubuti E. S. G. (2006). Validation of decision support systems for tomato early blight and potato late blight, under Brazilian condition. *Crop Protection.* 25: 664-670.
20. Bedrani S., Elloumi M., Zagdouni L. (1993). La vulgarisation agricole au Maghreb : théorie et pratique. Paris CIHEAM, 129-132.
21. Bedrani S., Elloumi M., Zagdouni L. (1993). La vulgarisation agricole au Maghreb : théorie et pratique. Paris CIHEAM. 129-132.
22. Behera S., Behera B., Mahapatra S. S. (2013). Efficacy of chemicals and bioagents on the growth of tomato seed mycoflora. *Journal of Plant Protection and Environment.* 10 (1) : 60-64.
23. Bell P.L., Deere D., Shen J., Chapman B., Bissinger P.H., Attfield P.V. (1998). A flow cytometric method for rapid selection of novel industrial yeast hybrids. *Applied and Environmental Microbiology.* 64 : 1669-1672.
24. Ben Mbarek K. (2011). Comportement du pois chiche (*Cicerarietinum* L.) du type « Kabuli » vis à vis de stress hydrique et identification de génotypes tolérant la sécheresse. Dissertation, Univ Sousse of tunisia.

25. Benhamou N., Chet I. (1996). Parasitism of sclerotia of *Sclerotium rolfsii* by *Trichoderma harzianum*: ultrastructural and cytochemical aspects of the interaction. *Phytopathology*. 86: 405–416.
26. Benton j. (2007). Tomato Plante Culture: In the field, Grennhouse, and home Garden. 2nd (ed). *CRC Presse*.
27. Berber F., Ouazzani T.A., Allal D. (2008). Identification de la mycoflore pathogène de *Sorghum bicolor* (L.) Moench, cultivé dans le Gharb et le Loukkos (Nord-ouest du Maroc). *Bulletin de l'Institut Scientifique*, Rabat, section Sciences de la Vie.
28. Bessadat N. (2014). Isolement, identification et caractérisation des *Alternaria sp.* responsables de la détérioration des plantes maraichères par des systèmes enzymatiques et moléculaires. Thèse de doctorat LMD.
29. Blancard D., Laterrot H., Marchoux G., Candresse T. (2009). Les maladies de la tomate. INRA.
30. Bleve G., Rizzoti L., Dellagio F., Torriani S. (2003). Development of reverse transcription (RT)-PCR and real-time RT-PCR assays for rapid detection and quantification of viable yeasts and molds contaminating yoghurts and pasteurized food products. *Applied and Environmental Microbiology*. 69 : 4116-4122.
31. Bonmatin J.M., Laprévotte O., Peypoux F. (2003). Diversity among microbial cyclic lipopeptides: iturins and surfactins. Activity-structure relationships to design new bioactive agents. *Comb. Chem. High Throughput Screen*. 6 : 541–556.
32. Botton B., Breton A., Fevre M., Gautier S., Guy P.H., Larpent J.P., Reymond P., Sanglier J. J., Vayssier Y., Veau P. (1990). *Moisissures utiles et nuisibles, importance industrielle*. Paris : Masson.
33. Bovey R. (1972). La défense des plantes cultivées traité pratique de phytopathologie et de zoologie agricole. 6^{ème}(ed). *Payot Lausnne*.
34. Boyd A.R., Gunasekera T.S., Attfield P.V., Simic K., Vincent S.F., Veal D.A. (2003). A flowcytometric method for determination of yeast viability and cell number in a brewery. *FEMS Yeast Res*. 1 (3): 11-16.
35. Bradley J.C., Galil B. (1977). The taxonomic arragement of the Phasmatodea with keys to the subfamilies ans tribes. *Proc. Entomol. Soc. Washington* èç. (2), 176-208.
36. Bullini L., Nascetti G., Bianchi Bullini A. P. (1983). A new stick insect of hybrid origin : *Bacillus lynceorumn. sp.* (Cheleutoptera, Bacillidae). *Atti Accad. Naz. Lincei*. 75, 169-176

37. Calvo-Garrido C., Viñas I., Usall J., Rodríguez-Romera M., Ramos M. C., Teixidó N. (2014). Survival of the biological control agent *Candida sake* CPA-1 on grapes under the influence of abiotic factors. *J Appl Microbiol.* 117: 800–11. doi: 10.1111/jam.12570.
38. Carrillo P.M., Robinson H.S., Anumba C.J., Al-Ghassani, A.M. (2003) *A Framework for Linking Knowledge Management to Business Performance*. Electronic Journal of Knowledge Management, Vol.1, Issue 1, 1-12.
39. Cartillier M. (1977). La révolution verte en Inde et le rôle des petites industries : le cas des pompes d'irrigation. *Tiers-Monde.* 70 : 397-412.
40. Chaerani R. Voorrips R.E. (2006). Tomato early blight (*Alternaria solani*): the pathogen, genetics, and breeding for resistance (review). *J Gen Plant Pathol.* 72: 335-347.
41. Champion R. (1997). *Identifier les Champignons Transmis par les Semences*. INRA. Paris.
42. Chen H., Wang L., Su C.X., Gong G.H., Wang P., Yu Z.L. (2008). *Lett Appl Microbiol.* DOI:10.1111/j.1472-765X.2008.02412.x. 47:180-186.
43. Chen T. (2012). Développement de biocapteurs hyperfréquences microfluidiques pour la spectroscopie diélectrique non-invasive de la cellule unique. Applications en cancérologie. Thèse Doctorat, Université Toulouse.
44. Chernin L, Ismailov Z, Haran S, Chet I. (1995). Chitinolytic *Enterobacter* agglomerans antagonistic to fungal plant pathogens. *Appl Environ Microbiol* 61:1720–1726.
45. Chernin L., Ismailov Z., Haran S. et Chet I. (1995). Chitinolytic *Enterobacter agglomerans* antagonistic to fungal plant pathogens. *Applied and Environmental Microbiology.* 61 : 1720-1726.
46. Chibane A. (1999). Tomate sous serre, Bulletin: transfère de technologie en agriculture, n° 57. Ed. P.N.T.T.A. Rabat, p 4.
47. Cho K.M., Math R.K., Young Hong S., Asraful Islam S., Mandanna D K., Cho J J., Yun M.G., Kim J.M., Yun H.D. (2009). Iturin produced by *Bacillus pumilus* HY1 from Korean soybean sauce (kanjang) inhibits growth of aflatoxin producing fungi. *Food Control.* 20: 402-406.
48. Cirad (Organisme, France Ministère des affaires étrangères, Cirad, centre de coopération internationale en recherche agronomique pour le développement France), et Gret (groupe de recherche et d'échanges technologique, ministère des affaires étrangère). (2002). Mémento de l'agronomie. (ed). Quae. 1045-1046.

49. Criquet S., Calvert V. (2008). IMEP UMR CNRS 6116. Planche Tp mycologie.
50. Czechowska K., Johnson D.R., Meer V.D.J.R. (2008). Use of flow cytometric methods for single-cell analysis in environmental microbiology. *Curr Opin Microbiol.* 3(11): 205-212.
51. Daniels R., Vanderleyden J., Michiels J. (2004). Quorum sensing and swarming migration in bacteria. *FEMS Microbiol. Rev.* 28: 261–289.
52. Datar V.V., Mayee C.D. (1981). Assessment of losses in tomato yield due to early blight. *Indian Phytopath.* 34: 191-195.
53. Davet P. (1996). Vie microbienne du sol et production végétale. Editions INRA, Paris (France). 383 pp.
54. De Carvalho, C.C.C.R., Pedro, F.M. (2010). Production of metabolites as bacterial responses to the marine environment. *Drugs.* 8: 705-27.
55. Dib, J.R., Weiss, A., Neumann, A., Ordoñez, O., Estévez, M.C., Farías, M.E. (2009). Isolation of bacteria from remote high altitude Andean lake able to grow in the presence of antibiotics. *Recent Patents on Anti-Infective Drug Discovery.* 4: 66–76.
56. Dunne C, Crowley J J, Loccoz Y M, Dowling D N, De Bruijn F, Gara F O. (1993). Biological control of *Pythium ultimum* by *Stenotrophomonas maltophilia* W81 is mediated by an extracellular proteolytic activity. *Microbiology.* 143:3921- 3931.
57. Ellis, M.B. (1971). Dematiaceous hyphmycetes. Kew. p 608.
58. Erikson O.E., Hawksworth D.J. (1991). Outline of ascomycetes. *Syst. Ascomycet.* 9 : 39-271.
59. Essam A.A, Soad M.A.S., Mostafa A.E.S., Mervat F. (2006). Toward the biological control of post harvest blue mold of Citrus sinensis fruits in Egypt I- Isolation and characterization of antagonistic strain of *Streptomyces alni* Pak. *J. Biolog. Sci.* 9 : 2945-2956.
60. FAO. (2007). La situation mondiale de l'alimentation et de l'agriculture.
61. FAO. (2008). L'actualité agricole en Méditerranée. Ed. CIHEAM ,33 p.
62. FAOSTA. (2012). [Thttp://faostat.fao.org/site/339/default.aspx](http://faostat.fao.org/site/339/default.aspx), Food and Agricultural commodities production.
63. Fatih K.A.U., Tamer M., Oskay. (2005). Determination of fungi associated with tomatoes (*lycopersicum esculentum* M.) and tomato pastes. *Plant Pathology Journal.* 4(4) : 146-149.
64. Fernandes B. (2005). Lutte biologique. *PHM- Revue horticole*, 465: 31-34.
65. Flint S., Drocourt J.L., Walker K., Stevenson B., Dwyer M., Clarke I., McGill D. (2006). A rapid, two-hour method for the enumeration of total viable bacteria in samples from

- commercial milk powders and whey protein concentrate manufacturing plants. *Int. Dairy J.* 16: 379-384.
66. FoÈ Ides T., I. BaÂnhegyi, Z. Herpai, L. Varga and J. Szigeti. (2000). Isolation of *Bacillus* strains from the rhizosphere of cereals and *in vitro* screening for antagonism against phytopathogenic, food-borne pathogenic and spoilage micro-organisms. *Journal of Applied Microbiology*, 89, 840-846.
 67. Fravel D.R. (2005). Commercialization and implementation of biocontrol. *Ann Rev Phytopathol.* 43: 337-359.
 68. Gallais A., Bannerot H. (1992). Amélioration des espèces végétales cultivées. Objectifs et critères de sélection. (ed) INRA. Paris.
 69. Gauthier C., St-Pierre Y., Villemur R. (2002). Rapid antimicrobial susceptibility testing of urinary tract isolates and samples by flow cytometry. *J. Med. Microbiol.* 3(51): 192.
 70. Gong W., Ren Y., Xu Q., Wang Y., Lin D., Zhou H., Li T. (2006). Integrated siRNA design based on surveying of features associated with high RNAi effectiveness. *BMC Bioinformatics.* 7: 516.
 71. Gonzalez H.H.L., Resnik S.L., Boca R.T., Marasas W.F. (1995). Mycoflora of Argentinean corn harvested in the main production area in 1990. *Mycopathologia* .130: 29-36.
 72. Guillemette T. (2003). *Contribution à l'étude du déterminisme moléculaire du pouvoir pathogène d'Alternaria brassicae, l'agent du black spot des crucifères.* Thèse de doctorat. Université d'Angers, Angers, 195 p.
 73. Gwary D. M., Nahunnaro H. (1998). Epiphytotics of early blight of tomatoes in Northeastern Nigeria. *Crop Prot.* 17: 619-624.
 74. Haas D., Defago G. (2005). Biological control of soil-borne pathogens by fluorescent pseudomonads. *Nature Reviews in Microbiology* 3(4): 307-19.
 75. Hachemi B. (1999). Evolution de la croissance de la production de deux variétés de tomate industrielle, Mémoire d'Ingénieur d'état en Agronomie, Option : Culture Maraichère, p74.
 76. Hansen D.B., Bumpus S.B., Aron Z.D., Kelleher N.L., Walsh C.T. (2007). The loading module of mycosubtilin: an adenylation domain with fatty acid selectivity. *J Am. Chem. Soc.* 129: 6366–6367.
 77. Harwood C.R., Wipat A. (1996). Sequencing and functional analysis of the genome of *Bacillus subtilis* strain 168. *FEBS Letters.* 389:84-87.

78. Hashidoko Y., Nakayama T., Homma Y., Tahara S. (1999). Structure elucidation of xanthobaccin A, a new antibiotic produced from *Stenotrophomonas* sp. strain SB-K88. *Tetrahedron Lett.* 40: 2957-2960.
79. Heiser C., Andersson G. (1999). New solanums. In: Janick.j. (ed) Perspectives on New Crops and New Uses. *ASHS Press. Alexandria. Virginia.* 379-384.
80. Hussain K.S., Hameed M., Shahid A., Ali J., Iqbal Hahn D. (2015). First report of *Providencia vermicola* strains characterized for enhanced rapeseed growth attributing parameters. *Int. J. Agric. Biol.* 17: 1110–1116.
81. Huszcza E., Burczyk B. (2006). Surfactin Isoforms from *Bacillus coagulans*. *Z. Naturforsch.* 61 : 727-733.
82. Jacques P., Hbid C., Destain j., Razafindralambo H., Paquot M., De Pauw E., Thonart P. (1999). Optimization of biosurfactant lipopeptides production from *Bacillus subtilis* S499 by Plackett–Burman design. *Appl Biochem Biotechno.* 177: 223–233.
83. Jahn B., Rampp A., Dick C., Jahn A., Palmer M., Bhakdi S. (1998). Accumulation of amphotericin B in human macrophages enhances activity against *Aspergillus fumigatus* conidia: quantification of conidial kill at the single-cell level. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy.* 42: 2569-2575.
84. Janda J.M., Abbott L.S. (2006). *The Enterobacteria*, 2nd ed. ASM Press, Washington, D.C. 279–299.
85. Jean-Claud F., Jayane I.R., Carol T., Max F. (2003). Répertoire général des aliments-table de composition, Tec et Doc-INRA.
86. Joly P. (1964). Le genre *Alternaria*. Encyclopédie Mycologique, Ed. J. P. Lechevalier. Paris. p 250.
87. Jones J.B, Jones P.J, Stall et Zitter T.A., Eds. (1991). Compendium of tomato diseases. APS Press, Minnesota, p 73.
88. Jones J.B., Jones J.P., Stall R.E., Zitter T.A. (1997). *Compendium of Tomato Diseases* p. 1-8, 13-15, 28-29. APS press.
89. Jongsik C., Kyung S.B. (2000). Phylogenetic analysis of *Bacillus subtilis* and related taxa based on partial *gyrA* gene sequences. *Antonie Van Leeuwenhoek.* 78: 123–127.
90. Jošić D.J., Radmila N., Pivić, Pavlović S., Saša D. Stojanović, Goran A. Aleksić, Starović S., Mira. (2011). Antifungal activity of indigenous *Bacillus* sp. Isolate q3 against marshmallow mycobiota. *Proc. Nat. Sci, matica srpska novi sad.*

91. Jourdan E., Henry G., Duby F., Dommes J., Barthelemy J.P., Thonart P., Ongena M. (2009). Insights into the defense-related events occurring in plant cells following perception of surfactin-type lipopeptide from *Bacillus subtilis*. *Mol. Plant Microbe Interact.* 22: 456–468.
92. Juneja P., Lazzaro B.P. (2009). *Providencia sneebia* sp. nov., and *Providencia burhodogranariaea* sp. nov., isolated from wild *Drosophila melanogaster*. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 59, 1108–1111.
93. Kaur P.K., Kaur J., Saini H.S. (2015). Antifungal potential of *Bacillus vallismortis* R2 against different phytopathogenic fungi. *Spanish Journal of Agricultural Research.* 13(2) : 1004, 1015.
94. Khunthongpan S., Sumpavapol P., Tanasupawat S., Benjakul S., Kittikun A.H., (2013). *Providencia thailandensis* sp. nov., isolated from seafood processing wastewater. *J. Gen. Appl. Microbiol.* 59, 185–190.
95. Kim B.S., Moon S.S., Hwang B.K. (1999). Isolation, identification and antifungal activity of a macrolide antibiotic, oligomycin A, produced by *Streptomyces libani*. *Can. J. Bot.* 77: 850-858.
96. Kim K.M., Jie L., Youn S.G, Jae S.K. (2015). Characterization of *Bacillus mojavensis* KJS-3 for the Promotion of Plant Growth. *Journal of Life Science.* 25(8): 910-916.
97. Kim P.I., Bai H., Bai D., Chae H., Chung S., Kim Y., Park R., Chi Y.T. (2004) Purification and characterization of a lipopeptides produced by *Bacillus thuringiensis* CMB26. *J. Appl. Microbiol.* 97, 942– 949.
98. Kinsinger R.F., Shirk M.C., Fall R. (2003). Rapid surface motility in *Bacillus subtilis* is dependent on extracellular surfactin and potassium ion. *J. Bacteriol.* 185: 5627–5631
99. Koberl, M., Zachow, C., Muller, H., Ramadan, E.M., Bauer, R., Berg, G. (2013). Biological control agents for combating soil-borne pathogens in Egypt. Source: <http://ebookbrowse.com/bi/biological-control-agents>.
100. Kokaeva K.N., Pobedinskaya M., Statsyuk N., Zaitchik B., Elansky S. (2015). Virulence of *Alternaria* strains toward potato and tomato cultivars, Fifteenth Euroblight Workshop, Brasov – Romania, ppo – special report. 17: 121-126.
101. Koumoutsi A, Chen X H, Henne A, Liesegang H, Hitzeroth G, Franke P, Vater J, Borriss R. (2004). Structural and functional characterization of gene clusters directing nonribosomal synthesis of bioactive cyclic lipopeptides in *Bacillus amyloliquefaciens* strain FZB42. *J. Bacteriol.* 186: 1084–1096.

102. Kumar S, Srivastava K. (2013). Screening of tomato genotypes against early blight under field condition. *the bioscan. an international quarterly journal of life sciences*. 8 (1): 189-193.
103. Latha P., Anand T., Ragupathi N., Prakasam V., Samiyappan R. (2009). Antimicrobial activity of plant extracts and induction of systemic resistance in tomato plants by mixtures of PGPR strains and Zimmu leaf extract against *Alternaria solani*. *Biological Control*, 50: 85–93.
104. Larkin R.P., Farvel D.R. (1998). Efficacy of various fungal and bacterial bio-control organisms for control of Fusarium wilt of some vegetables. *Plant Dis*, 82: 1022-1028.
105. Larpent J.P., Larpent G.M. (1985). Manuel pratique de microbiologie. Hermann 21, France. pp. 230.
106. Leclere V, Marti R., Béchet M., Fickers P., Jacques P. (2006). The lipopeptides mycosubtilin and surfactin enhance spreading of *Bacillus subtilis* strains by their surface-active properties. *Arch. Microbiol.* 186: 475–483.
107. Ligon J.M., Hill D. S., Hammer P.E., Torkewitz N.R., Hofmann D., Kempf H. J., Van Pee K.H. (2000). Natural products with antifungal activity from *Pseudomonas* biocontrol bacteria. *Pest Manage Sci.* 56: 688–695.
108. Lim, H.-S., Kim, Y.-S. et Kim, S.-D. (1991) *Pseudomonas stutzeri* YPL-1 genetic transformation and antifungal mechanism against *Fusarium solani*, an agent of plant root rot. *Applied Environmental Microbiology*, 57 : 510-516.
109. Lolloo, R., Maharaih, D., Görgens, J., Gardiner, N. (2010). A downstream process for production of a viable and stable *Bacillus cereus* aquaculture biological agent. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 86: 499-508.
110. Lugtenberg B.J, Chin-A-Woeng T.F.C, Bloemberg G.V. (2002). Microbe-plant interactions: principles and mechanisms. *A Van Leeuw J Microb.* 81: 373-383.
111. Madigan M., Martinko J. (2007). *Biologie des microorganismes*, (11th edition) Pearson education. France.
112. MADR. (2009). Ministère de l’Agriculture et du Développement Rural, Direction des statistiques.
113. Malfanova N., Franzil L., Lugtenberg B., Chebotar V., Ongena M. (2012). Cyclic lipopeptide profile of the plant-beneficial endophytic bacterium *Bacillus subtilis* HC8. *Arch Microbiol.* 194: 893–899

114. Mantovani B., Scali V. (1990). Preliminary report on a hybridogenetic stick-insect (Phasmatodea): the first case among invertebrates. *Invert. Reprod. Develop.* 18 (3), 185-188.
115. Mantovani B., Scali V. (1991). Allozymic characterization of Sardinian *Bacillus rossius* (rossi) and *B. atticus* Brunner (Insecta Phasmatodea). *Genetica* 83, 275-287.
116. Matar S.I, El-Kazzaz, S.A, Wagih E.E, El-Diwany A.I, Moustafa H.E, Abo-Zaid G.A, Abd-Elsalam H.E., Hafez E.E. (2009). Antagonistic and inhibitory effect of *Bacillus subtilis* against certain plant pathogenic fungi, I. *Biotechnology.* 8(1): 53-61.
117. Mayoral M.B., Martín R., Hernández P.E, González I., García T. (2006). A reverse transcriptase PCR technique for the detection and viability assessment of *Kluyveromyces marxianus* in yoghurt. *Journal of Food Protection.* 69 :2210-2216.
118. McSpadden Gardener B. (2004). Ecology of *Bacillus* and *Paenibacillus* spp. in agricultural systems. *Phytopathology.* 94: 1252-1258.
119. Melacrino P., Zapparoli G., Torriani S., Dellaglio F. (2001). Rapid detection of viable yeasts and bacteria in wine by flow cytometry. *Journal of Microbiological Methods.* 45 : 127-134.
120. Milner J.L., Raffel S.J., Lethbridge B.J., Handelsman J. (1995). Culture conditions that influence accumulation of zwittermicin A by *Bacillus cereus* UW85. *Appl Microbiol Biotechnol.* 43: 685-691.
121. Mirkarimi H.R, Abasi-Moghadam A, Mozafari J. (2013). *In vitro* and greenhouse evaluation for resistance to early blight of potato isolated from *Alternaria alternata*. *Agricultural Sciences.* 4: 473-476.
122. Mmbaga M.T., Ainong Shi and Mee-Sook Kim. (2011). Identification of *Alternaria alternata* as a Causal Agent for Leaf Blight in *Syringa* Species. pISSN 1598-2254 eISSN 2093-9280, *Plant Pathol. J.* 27(2) : 120-127, DOI: 10.5423/PPJ.2011.27.2.120.
123. Mouria Btissam., Amina Ouazzani-Touhami et Allal Douira. (2007). Effet de diverses souches du *Trichoderma* sur la croissance d'une culture de tomate en serre et leur aptitude à coloniser les racines et le substrat. *Phytoprotection.* 88 : (3):103-110.
124. Moyne A.L., Cleveland T.E., Tuzun S. (2004). Molecular characterization and analysis of operon encoding the antifungal lipopeptide bacillomycin D. *FEMS Microbiol Lett.*234(1):43–49. doi:10.1111/j.1574-6968.2004.tb09511.x.
125. Mukherjee A K, Das K. (2005). *FEMS Microbiol Ecol.* 54: 479-489.

126. Müller S., Caron N.V.G. (2010). Functional single cell analyses: Flow cytometry and cell sorting of microbial populations and communities. *FEMS. Microbiol. Rev.* 34(4): 554-587.
127. Munro D.B., Small E. (1998). *Les legumes du Canada*. NRC Research Press.
128. 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. *Appl Environ Microbiol.* 65: 4334-4339.
129. Neergaard P. (1945). *Danish species of Alternaria and Stemphylium: taxonomy, parasitism, economic significance*. Oxford University Press, London. 2-287.
130. Nguéfack J., Budde B.B., Jakobsen M. (2004). Five essential oils from aromatic plants of Cameroon: their antibacterial activity and ability to permeabilise the cytoplasmic membrane of *Listeria innocua* examined by flow cytometry. *Lett. Appl. Microbiol.* 39: 395-400.
131. Nihorimbere V, Pascal K, Ernest S. (2013). Isolation of *Bacillus* strains from the rhizosphere of Tomato and their *in vitro* antagonistic effects against phytopathogenic fungi. *Glo. Adv. Res. J. Microbiol.* 3(2): 065-071.
132. Ongena M. & Thonart P. (2006). Resistance induced in plants by non-pathogenic microorganisms: elicitation and defense responses. *In: Floriculture, ornamental and plant biotechnology: advances and topical issues*. 1st ed. Japan: Global Science Books, 447-463.
133. Ongena M., Jacques P. (2008). *Bacillus* lipopeptides: versatile weapons for plant disease biocontrol. *Trends Microbiol.* 16: 115–125.
134. Ongena M., Jourdan E., Adam A., Paquot M., Brans A., Joris B., Arpigny J. L., Thonart P. (2007). Surfactin and fengycin lipopeptides of *Bacillus subtilis* as elicitors of induced systemic resistance in plants. *Environ. Microbiol.* 9: 1084–1090.
135. O'Donnell E. A., Ernst D. N., Hingorani R. (2013) Multiparameter flow cytometry: advances in high resolution analysis. *Immune Netw.* 13, 43–54.
136. Ormerod M.G. (2000). *Flow Cytometry — a practical approach*, 3rd edition.
137. Pal K.K, Gardner B.M. (2006). *Palant Health Instructor.* 25 : 1117.
138. Palumbo J.D., Yuen G.Y., Jochum C.C., Tatum K et Kobayashi, A. (2005) Mutagenesis of β -1,3- glucanase genes in *Lysobacter enzymogenes* strain C3 results in reduced biological control activity toward bispolaris leaf spot of trall fescue and *Pythium* damping-off of sugar beet. *Phytopathology* 95 : 701-707.

139. Pengnoo A., Wiwattanapattapee R., Chumthong A., Kanjanamaneesathian M. (2006). Bacterial antagonist as seed treatment to control leaf blight disease of bambara groundnut (*Vigna subterranean*). *World J. Microbiol. Biotechnol.* 22: 9-1
140. Petit J.M., Gay D.M., Ratinaud MH. (1993). Assessment of fluorochromes for cellular structure and function studies by flow cytometry. *Biology of the Cell.* 78: 1-13.
141. Peypoux F., Bonmatin J.M., Wallach J. (1999). Recent trends in the biochemistry of surfactin. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 51: 553-563.
142. Pleban S., Chernin L et Chet I. (1997) Chitinolytic activity of an endophytic strain of *Bacillus cereus*. *Letters in Applied Microbiology* 25 : 284-288.
143. Praveen Kumar D., Anupama P., Rajesh Kumar Singh D., Thenmozhi R., Nagasathya A, Thajuddin A, Paneerselvam A. (2012). Evaluation of extracellular lytic enzymes from indigenous *Bacillus* isolates. *J. Microbiol. Biotech. Res.* 2: 129-137.
144. Preecha C., Michael Sadowsky J., Prathuangwong S. (2010). Lipopeptide Surfactin Produced by *Bacillus amyloliquefaciens* KPS46 is Required for Biocontrol Efficacy Against *Xanthomonas axonopodis* pv. *Glycines*. *Kasetsart J. (Nat. Sci.)*. 44 : 84 – 99.
145. Pusz W. (2009). Morpho-physiological and molecular analyses of *Alternaria alternata* isolated from seeds of *Amaranthus*. *Phytopathologia.* 54: 5-14.
146. Raaijmakers J.M., De Bruijn I., De Kock M.J. (2006). Cyclic lipopeptide production by plant-associated *Pseudomonas* spp.: diversity, activity, biosynthesis, and regulation. *Mol. Plant Microbe Interact.* 19: 699–710.
147. Raaijmakers J.M., Vlami M., De Souza J.T. (2002). Antibiotic production by bacterial biocontrol agents. *Antonie van Leeuwenhoek.* 81: 537 – 547.
148. Rai P.K., Kumari L. (2009). Variability in *Alternaria alternata* infecting periwinkle (*Catharanthus roseus*). *Progr. Agric.* 9: 269-272.
149. Ramey B.E., Koutsoudis, M., von Bodman S.B., Fuqua C. (2004). Biofilm formation in plant-microbe associations. *Curr. Opin. Microbiol.* 7: 602–609.
150. RAO V.G. (1964). The fungus genus *Alternaria* Nees. In Bombay- Maharashtra - II. *Sydowia* 18: 65-85.
151. Rault A., Béal C., Ghorbal S., Ogier J.C., Bouix M. (2007). Multiparametric flow cytometry allows rapid assessment and comparison of lactic acid bacteria viability after freezing and during frozen storage. *Cryobiology.* 1(55): 35-43.
152. Roberts M.S., Nakamura L.K., Cohan F.M. (1994). *Bacillus mojavensis* sp. nov., distinguishable from *Bacillus subtilis* by sexual isolation, divergence in DNA sequence, and differences in fatty acid composition. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 44: 256–264.

153. Rocha L.O, Tralamazza S.M, Reis G.M, Rabinovitch L, Barbosa C.B. (2014). Multi-Method Approach for Characterizing the Interaction between *Fusarium verticillioides* and *Bacillus thuringiensis Subsp. Kurstaki*. *PLoS ONE*. 4(9): e92189.
154. Rotem J. (1994). *The genus Alternaria: biology, epidemiology, and pathogenicity*. APS, Press. p 344.
155. Rotman, B., Papermaster, B. W. (1966) Membrane properties of living mammalian cells as studied by enzymatic hydrolysis of fluorogenic esters. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 55,134–141.
156. Sallam M.A., Nashwa., Kamal A.M Abo-Elyousr. (2012). Evaluation of various plant extracts against the early-blight disease of tomato plants under greenhouse and field conditions. *Plants protect. Sci.*, 48 : 74-79.
157. Sandrin C., Peypoux F., Michel G. (1990). Coproduction of surfactin and iturin A lipopeptides with surfactant and antifungal properties by *Bacillus subtilis*. *Biotechnol. Appl. Biochem.* 12: 370–375.
158. Schippers B. (1992). Prospects for management of natural suppressiveness to control soilborne pathogens. *Biological control of plant diseases, Progress and Challenges for the future*. Plenum Press, New York.
159. Shankara N., van lidt d. J., De goffau M., Hilmi M., Van Dam B., Florijn. A. (2005). *La culture de la tomate: Production, transformation et commercialisation*. 5^{ème} (ed). Foundation Agromis et CTA, Wageningen.
160. Sherf A.F., Macnab A.A. (1986). *Vegetable Diseases and Their Control*. 2^{ème} (ed). Wiley-IEEE.
161. Siddig A., Idris M.O., Hammad A.M. (2014). The Antifungal Effects of Four Tomato Rhizosphere *Bacillus* spp. against *Alternaria Alternata*. *International Journal of Science and Research (IJSR)*. 3 (7): 2319-7064.
162. Simmons E.G. (1986). *Alternaria* terms and variations.(22-26). *Mycotaxon*. (*Pleospora /Stemphylium* and *Lewia/ Alternaria*). 25: 287- 308.
163. Simmons E.G. (1999). *Alternaria* themes and variation (236-243). Host- specific toxin producers. *Myctaxon*. 70 : 325-69.
164. Simmons E.G. (2007). *Alternaria*. An Identification Manual: CBS Biodiversity Series No. 6. CBS, Fungal Biodiversity Centre, Utrecht, the Netherlands. 775.
165. Simmons E.G.J., Chelkowski., Visconti A. (1992). “*Alternaria* taxonomy: current status, viewpoint, change,” in *Alternaria Biology, Plant Disease and Metabolites*, Eds. Elsevier, Amsterdam. The Netherlands. 1- 35.

166. Simmons G.G. (1993). *Alternaria* themes and variation (63-72). *Mycotaxon* 48: 109-140.
167. Singh B.K, Millard P., Whiteley A.S., Murrell J.C. (2004). Unravelling rhizosphere-microbial interactions: opportunities and limitations. *Trends Microbiol.* 12: 386-393.
168. Singh P.P., Shin Y.C., Park C.S., Chung Y.R. (1999) Biological control of *Fusarium* wilt of cucumber by chitinolytic bacteria. *Phytopathology* 89 : 92-99.
169. Snoussi S. (2010). Rapport de mission : Etude de base sur la tomate en Algérie. Ministère de l'Agriculture et du Développement Rural, Direction des statistiques. (MADR).
170. Somvanshi V.S., Lang E., Straäubler B. (2006). *Providencia vermicola* sp. nov., isolated from infective juveniles of the entomopathogenic nematode *Steinernema thermophilum*. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 56, 629–633.
171. Stammler G., Bohme F., Philippi J., Miessner S., Tegge V. (2014). Pathogenicity of *Alternaria*-species on potatoes and tomatoes. *Fourteenth Euro blight Workshop.* 16: 85-96.
172. Taylor. (1986). Tomatoes. *CABI Publishing*, 1-4.
173. Trivedi P., Pandey A. (2008). Plant growth promotion abilities and formulation of *Bacillus megaterium* strain B 388 (MTCC 6521) isolated from a temperate Himalayan location. *Indian J. Microbiol.* 48(3): 342-347
174. Tserkovniak L.S., Roi A.O., Kurdysh I.K. (2009). Synthesis of amino acids of *Bacillus subtilis* IMV V-7023 in the medium with glycerophosphates. *Mikrobiol. Z.* 71: 218-232.
175. Tsuge K., Akiyama T., Shoda M. (2001). Cloning, sequencing, and characterization of the iturin A operon. *J Bacteriol.* 183: 6265–6273.
176. Varma P.K, Gandhi S.K. (2007). Bioefficacy of some plant extracts and biocontrol agents against *Alternaria solani* and their compatibility. *Plant Disease Research.* 22(1):12-17
177. Velmurugan N., Choi M.S., Han S.S., Lee Y.S. (2009) Evaluation of antagonistic activity of *Bacillus subtilis* and *Bacillus licheniformis* against wood staining fungi: *in vitro* and *in vivo* experiments. *J. Microbiol.* 47(4): 385-392.
178. Ventura, M., Elli, M., Reniero, R., Zink, R. (2001). Molecular microbial analysis of *Bifidobacterium* isolates from different environments by the species-specific amplified ribosomal DNA restriction analysis (ARDRA). *FEMS Microbiology Ecology.* 36: 113-121.

179. Villaceros M., Power B., Sanchez-Contreras M., Loret J., Oruezabal R.I, Martin M., Fernandez-Pinaz F., Bonilla I., Whelan C., Dowling D.N., Rivilla R., (2003). Colonization behaviour of *Pseudomonas fluorescens* and *Sinorhizobium meloti* in the alfalfa (*Medicago sativa*) rhizosphere. *Plant Soil* 251: 47-54.
180. Villas B.H. (1998). Flow cytometry: an overview, *Cell Vis*; 5(1):56-61.
181. Walberg M, Gaustad P, Steen HB (1996). Rapid flow cytometric assessment of mecillinam and ampicillin bacterial susceptibility. *J Antimicrob Chemother.* 6(37): 1063.
182. Watterson J. C. (1986). Diseases In: Atherton, J.G. *The Tomato crop.* p. 443-445,453, 457-460.
183. Whipps J.M. (2001). Microbial interactions and biocontrol in the rhizosphere. *J Exp Bot.* 52: 487-511.
- 184.
185. Woo S.L.A, Zoina G., Del Sorbo M., Lorito B., Nanni F., Scala Noveiello. (1996). Characterization of *Fusarium oxysporum* f. sp. phaseoli by pathogenic races, VCGs, RFLPs, and RAPD. *Phytopathology.* 86 : 966-972.
186. Woudenberg J.H.C., van der Merwe N.A., Jurjevic Z., Groenewald J.Z., Crous P.W. (2015). Diversity and movement of indoor *Alternaria alternata* across the mainland USA, *Fungal Genetics and Biology* 81 62–72.
187. Yazici S., Yanar Y., Karaman I. (2011). Evaluation of bacteria for biological control of early blight disease of tomato. *African Journal of Biotechnology.* 10(9) : 1573-1577.
188. Yun-Feng Y.E., Qi-Qin L.I., Gang F.U., Gao-Qing Y., Jian-Hua M., Wei L. (2012). Identification of antifungal substance (Iturin A2) produced by *Bacillus subtilis* B47 and its effect on southern corn leaf blight. *J. Integr. Agric.* 1:90-99.
189. Zur G., Shimoni E., Hallerman E. and Kashi Y. (2002). Detection of *Alternaria* fungal contamination in cereal grains by a polymerase chain reaction-based assay. *J. Food Prot.* 65:1433– 1440.

Annexe

Annexe 1

1- Milieux de cultures

1.1- Milieu GN Gélose nutritive

Gélose nutritive (GN) ou gélose ordinaire, est un milieu d'isolement non-sélectif dont la composition chimique théorique en g/L d'eau purifiée est :

Peptone 10

Extrait de viande 5

Chlorure de sodium 5

Gélose 15

pH 7.2, autoclaver 15 minutes à 120°C (Guiraud, 1998).

1.2-Milieu PDA (Potato Dextrose Agar)

Laver et couper en petits cubes 200g de pommes de terre non pelées. Les mettre dans un litre d'eau distillée et porter à l'ébullition pendant une heure. Ecraser, filtrer et compléter un litre.

Composition du milieu finale :

Extrait de pomme de terre 1000ml

Glucose 20g

Agar 15g

Stériliser 30 minutes à 110°C (Larpen, 1997)

1.3-Milieu optimal (opt)

- Saccharose	20
- Peptone	30
- Extrait de levure	7
- KH ₂ PO ₄	1,9
Solution d'oligo- éléments	(mg.l ⁻¹)
- CuSO ₄	0,001
-FeCl ₃ .6H ₂ O	0,005
-Na ₂ MoO ₄	0,004
-KI	0,002
-ZnSO ₄ .7H ₂ O	0,014
-H ₃ BO ₃	0,01
-Acide citrique	10
Solution de Mn/Mg	(mg.l ⁻¹)

-MnSO ₄ .H ₂ O	3,6
-MgSO ₄	450

Annexe 2

2- Réactif

3.1- Préparation de 5(6)-carboxyfluorescein diacétate (cFDA)

C'est un marqueur cellulaire, 100 µg/ml une solution a été préparée à (PBS), la solution est conservée à 4 °C à l'obscurité.

3.2- Les solutions tampons

1- Tampon PBS

136 mM NaCl, 1.4 mM KH₂PO₄, 8.09 mM Na₂HPO₄ 12 H₂O, 6 mM KCl, pH 7.2.

Annexe 3

BELGIAN CO-ORDINATED COLLECTIONS OF MICRO-ORGANISMS



GREAT AT SMALL THINGS

Louvain-la-Neuve,
August 13, 2014

Prof. Philippe Thonart
Bioindustries
Passage des Déportés 2
5030 Gembloux

ANALYSIS REPORT

Object: identification of one sample
Your references: ULG14/1629465/R / Milet ASMA
Our references: DIV/14-126
Identifications: C. Decock

Dear Prof. Thonart,

Following your request of identification of your sample received on July 30, 2014, please find below our result.

Y/Ref.	O/Ref.	Identifications
Milet ASMA	126A	<i>Alternaria cf. alternata</i>

The strain was identified by comparison of DNA sequence with reference sequences deposited in public database, cross checked with the morphology. The ITS region of the nuclear ribosomal operon and a segment of the Tef 1- α gene were sequenced. Your strain is identified to *Alternaria cf. alternata*. The taxonomy of the genus *Alternaria* is complex, under constant changes and not yet stabilized; *Alternaria alternata* might represent a species complex.

However, your strain is very different from *Alternaria tomatophila*, both in morphology and sequences. *Alternaria tomatophila* has long mostly transversally septate conidia with long, often ramified beak. Your strain has typical wide conidia with both transversal and longitudinal septa, and externally roughened.

With our best regards.

Yours sincerely,

Dr. C. Decock

BCCM
DCG

BCCM
IHEM

BCCM
ITM

BCCM
LMBP

BCCM
LMG

BCCM
ULC

BCCM
CC

Université catholique de Louvain
Earth and Life Institute (ELI) - Applied Microbiology (ELIM) - Laboratory of Mycology
Croix du Sud 2 box L7.05.06 - B-1348 Louvain-la-Neuve - Belgium
T +32 (0)10 47 37 42 - bccm-mucl@uclouvain.be

UCL
Université
catholique
de Louvain
Belgian
Science
Policy
Office
.be

Nom et Prénom : MILET Asma

Date de soutenance : 10 07 2017

Thème : Isolement des microorganismes à partir du sol des régions arides et sélection d'isolats à effet antagoniste sur l'agent de l'Alternariose

Résumé :

L'Alternariose figure parmi les maladies les plus importantes de la tomate dans l'Est Algérien. L'exploration des échantillons de tomate (feuilles, tiges et fruits) présentant des symptômes de l'Alternariose, cultivée en serre dans la localité de Hamma Bouziane (Constantine) a permis d'obtenir un isolat fongique filamenteux (Alt 1). L'identification morphologique et moléculaire (analyse d'ADN-ITS) de cet isolat a révélé qu'il s'agit d'*Alternaria alternata* (HQ846574.1). Le test de pathogénicité par rétro-infection de plantules par l'isolat a abouti à la provocation de la maladie typique d'Alternariose avec un degré de sévérité de $\geq 76\%$.

L'exploration des échantillons en provenance de divers environnements de Sahara Algérienne (Biskra et Tougourt) a permis l'obtention de 45 isolats microbiens susceptible de développer un effet sur l'agent de l'Alternariose. Le test de sélection a mis en évidence que; E1B3 et S5 (isolés de Biskra), S1.1 et E2X1 (isolé de Tougourt) possèdent un effet antifongique considérable contre *A. alternata* (taux d'inhibition varient entre 60% et 75%), cependant, l'isolat E1B3 a développé le meilleur effet.

L'identification morphologique et moléculaire des isolats sélectionnés par analyse de l'ADN *16S* et du gène « *gyrase-A* » a montré que les isolats bactériens ; E1B3, S5, E2X1, sont identifiés comme étant *Bacillus mojavensis* (KC977492), *Bacillus amyloliquefaciens* (KC977493) et *Bacillus subtilis* (KP699114.1) respectivement, alors que l'isolat bactérien S1.1 est identifié comme *Providencia vermicola* (KP059130.1). À notre connaissance, l'isolement du *P. vermicola* à partir du sol rhizosphérique de palmerais et la mise en évidence de ses potentialités antifongiques sont établis pour la première fois dans le présent travail.

Les tests réalisés *in vivo* dans des conditions de pots et en pleins champs sur la tomate ont montré des effets différents, selon l'espèce bactérienne et *B. mojavensis* a développé le meilleur effet considérant la plupart des paramètres étudiés (la sévérité de la maladie, la taille des plantules, le nombre de feuilles et le nombre de fleurs par plantule). La souche *P. vermicola* a révélé un meilleur effet sur la diminution de la sévérité de la maladie de l'Alternariose, en signalant que le présent travail est le premier à révéler cet effet.

En revanche, *B. mojavensis* a développé le meilleur effet protecteur, en considérant la majorité des paramètres étudiés *in vitro* et *in vivo*. Cet effet est dû à la capacité de cette souche à produire des substances antifongiques en l'occurrence ; les enzymes (la lipase, la protéase) et les trois familles de lipopeptides (iturine, surfactines et fengycines).

L'évaluation de l'effet antagoniste développé par *B. mojavensis* vis-à-vis *A. alternata* par Cytomètre à flux (FCM) a montré une baisse considérable dans le taux des cellules vivantes d'*A. alternata*, ce qui confirme l'effet inhibiteur de *B. mojavensis* contre l'agent phytopathogène de l'Alternariose.

Mots clés: Tomate, Alternariose, *Alternaria alternata*, *Bacillus*, *Providencia vermicola*, lipopeptides, Cytomètre à flux, biocontrôle.

Laboratoire de Recherche : Laboratoire de Mycologie, Biotechnologie et de l'Activité Microbienne (LaMyBAM)

Président de jury: Mr. DEHIMAT L.

Directeur de thèse: Mr. KACEM CHAOUCHE N.

Examineurs: Mr. HAMIDECHI M A.

Mr. RIBA A.

Mm. BARKAT M.

Prof. Univ. Frères Mentouri –Constantine1.

Prof. Univ. Frères Mentouri –Constantine1.

Prof. Univ. Frères Mentouri –Constantine1.

Prof. Univ. M'Hamed Bougara-Boumerdès.

Prof. INATAA Univ. Frères Mentouri–Constantine1.