

**République Algérienne Démocratique et Populaire Ministère de  
l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique  
Université Mouloud Mammeri Tizi-Ouzou  
Faculté des Sciences Biologiques et des Sciences Agronomiques  
Département de Biochimie – Microbiologie**



*Mémoire de fin d'études  
En vue de l'obtention du diplôme de Master  
Filière : Biotechnologies  
Spécialité : Biotechnologie microbienne*

### **Thème**

**Evaluation de l'activité antagoniste de deux  
bacteries : *Pseudomonas* sp et *Bacillus* sp vis-à-  
vis des champignons phytopathogènes**

**Travail réalisé par :**

**Melle : MEBARKI Hammama**

**Melle : BENAKLI Loundja**

**Présidente : Mme AFIF CHAUCHE T. : Maître de conférences B à l'UMMTO**

**Promoteur : Mr OUELHADJ A. : Maître de conférences A à l'UMMTO**

**Examinatrice : Mme KASBIA K. : Maître assistante A à l'UMMTO**

**Examineur : Mme HELLAL Z. : Maître assistante B à l'UMMTO**

**Année universitaire: 2017-2018**

# *Remerciements*

*Je remercie dieu très clément et sa sainte miséricorde de m'avoir aidé a réalisé ce modeste travail.*

*Mes remerciements les plus sincères s'adressent en premiers lieu à mon honorable encadreur **Mr OUELHADJ. A** : Maitre de conférences A à l'UMMTO pour ses orientations, et pour la confiance qu'il nous a accordé tout au long de cette étude .Ce travail est pour nous l'occasion de vous témoigner nos profonde gratitude.*

*Nous tenons à exprimer notre très grande considération et notre vive reconnaissance à **Mme AFIF CHAOUCHE.T**: Maitre de Conférences B à l'UMMTO pour l'honneur qu'il nous a fait en acceptant de présider le jury de ce mémoire.*

*Nous tenons à remercier vivement **Mme KASBIA K**: Maitre assistante A à l'UMMTO pour l'honneur qu'il nous a fait en acceptant d'examiner ce modeste travail et d'être parmi le jury.*

*Nous tenons également à remercier **Mme ABROUS**, Maitre assistante a l'UMMTO pour son soutien et ses encouragements qui m'ont été d'une grande utilité.*

*Un grand merci à nos familles respectives pour leur soutien et leur affection sans retenue au cours de nos longues années d'études. Sans oublier l'ensemble de nos camarades et amis(es), ainsi qu'à toutes les personnes qui ont contribué à la réalisation de ce travail de près ou de loin.*



# Dédicaces



*Je dédie ce modeste travail à :*

- ☞ *Ma très chère mère « DJOUHRA » qui a consacré tout son temps pour notre bien.*
  - ☞ *Mon très cher père « AZZEDINE » à qui je dois tous et je ne rendrais assez jamais.*
  - ☞ *Mes chers frères : KARIM et TARIK*
  - ☞ *Mes chères tantes : « ZOUBIDA et NADIA »*
  - ☞ *Mon très cher « AMINE » qui m'a toujours aidé*
- Et tous ce qu'ils m'encouragent de près ou de loin.*

*Hammama*

# Dédicaces

*Je dédie ce modeste travail à mes très chers parents pour leur aide et leur soutien tout au long de mes études, et qui ont fait de moi ce que je suis aujourd'hui et j'espère qu'un jour je serai capable de leur donner au moins le minimum car quoiqu'on face on arrivera jamais à leurs rendre tout.*

*A mes très chers frères : Karim, Jughurta et Massinissa à qui je souhaite le succès dans leur vie.*

*A mes très chères sœurs : Kahina, Ouardia , Thiziri, Fouzia et Massilia qui m'ont aidé énormément .*

*A mes très chères nièces : Aya, Taous, Malika, Isra , Malak, Marinel, Houda, Melina et Doua chers neveux : Ishak, Ilian et l'adorable Yannis a qui je souhaite la réussite dans leurs parcours scolaires.*

*A mes très chers neveux : Ishak, Ilian et l'adorable Yannis .*

*A tout mes cousins (es), tantes et oncles et leurs enfants et cher cousin Hocine*

*A toutes mes chères belles : Dyhia , Katia, Maya et Faroudja , Sabrina, Sarah, sonia*

*A toutes la famille Toufouti surtout Yahia*

*A tous mes amis : Mourad, Ghiles, Said, Lyes, Ahmed , Yannis, Sofiane(D), Yacine(K), Kouci(F).....*

*A tous mes collègues de travail*

*A mon prof formateur : Mr Yahou Akli*

*En fin a tous e qui me connaisse de prés et de loin et a tout e qui sont chers a moi*

*Loundja*

# Le sommaire

Liste des abréviations  
Liste des tableaux.  
Liste des figures.  
Introduction

## Synthèse Bibliographique

### Chapitre 1 : Le monde microbien

1- <i>Pseudomonas</i> sp .....	2
1-1-taxonomie .....	2
1-2-phylogénie .....	2
1-3-habitat .....	3
1-4-caractères généraux des <i>Pseudomonas</i> sp .....	3
1-4-1-Caractères morphologiques .....	3
1-4-2-Caractères culturels .....	4
1-4-3- Caractéristiques métaboliques .....	4
1-4-4- Caractères génomiques .....	4
1-4-5-Pouvoir pathogène .....	5
1-4-6-L'antibiorésistance .....	6
1-4-6-1-Différents types de la résistance bactérienne .....	7
1-4-6-1-1-Résistance naturelle .....	7
1-4-6-1-2-Résistance acquise .....	7
2- <i>Bacillus</i> sp.....	8
2-1-caractéristiques .....	8
2-2-taxonomie .....	8
2-3-cycle de vie .....	9

### Chapitre 2 : Les champignons phytopathogènes

1- <i>Botrytis cinerea</i> ... ..	11
1-1-définition.....	11
1-2-classification .....	12
1-3-caractères morphologiques .....	12
1-4-cycle de développement.....	13
1-4-1-Le cycle asexué .....	13
1-4-2-Cycle sexuel .....	14
1-5- importance économique de la maladie .....	15
1-6-les symptômes.....	15
1-6-1- Symptômes sur la tomate.....	15
1-6-2- Symptômes sur le piment .....	16
1-6-3- Symptômes sur la courgette.....	17

2- <i>Penicillium</i> sp.....	17
2-1-caractères généraux .....	18
3- <i>Aspergillus niger</i> .....	18
3-1- caractères morphologique .....	19
3-2- caractères culturels .....	19
3-3- les applications.....	20
3-4- pouvoir pathogène des <i>Aspergillus</i> .....	20
3-5- le risque aspergillaire chez les patients immunodéprimés.....	21

### **Chapitre 3 : Les méthodes de lutte phytosanitaires**

1-Introduction.....	23
2-Lutte biologique .....	23
2-1- Les agents biologiques .....	23
2-2- Les facteurs abiotiques .....	25
3-Lutte chimique .....	26
3-1-Les fongicides.....	26
3-1-1-Les fongicides uni-sites .....	26
3-1-2- Les fongicides polyvalentes ou multi-sites .....	27
3-1-3- Les fongicides anti-botrytis autorisés en France .....	27
4- Mécanisme de résistance .....	28
4-1-La modification de la cible .....	28
4-2-La surexpression de la cible .....	29
4-3-Modification du transport .....	29
4-4-Le contournement par une voie alternative ou un système secondaire .....	29
4-5-La métabolisation .....	29
5-Les mesures prophylactiques .....	29

## **Partie expérimental**

### **Chapitre 1 : Matériel et méthodes**

1-Matériel .....	31
1-1-Les souches fongiques et microbiennes.....	31
1-2-Milieus de culture.....	31
1-3-Solutions et réactifs .....	31
1-4-Appareillage.....	31
2-Méthodes.....	32
2-1-Ensemencement .....	32
2-2-Examen macroscopique .....	32
2-2-Examen microscopique.....	32
2-3-Préparation de l'inoculum .....	33

2-4-Préparation de la suspension bactérienne .....	33
2-5-Tests d'activités antifongiques .....	33
2-6-Recherche d'une substance inhibitrice volatile .....	34
2-7-Test d'antagonisme <i>in vivo</i> .....	34
2-8-Préparation des plantes de piment .....	34
2-9-Analyse statistique .....	34

## Chapitre 2 : Résultats et discussion

I-Résultats.....	35
1-Critères morphologiques .....	35
1-1-Examen macroscopique .....	35
1-2-Examen microscopique.....	36
2- <i>Aspergillus niger</i> .....	37
2-1-Morphologie macroscopique .....	37
2-2-Morphologie microscopique.....	37
3- <i>Penicillium</i> sp.....	38
3-1-Morphologie macroscopique .....	38
3-2-Morphologie microscopique.....	38
4- <i>Botrytis cinerea</i> .....	39
4-1-Morphologie macroscopique .....	39
4-2-Morphologie microscopique.....	39
5-Confrontation du champignon et de la bactérie en boîte de Pétri .....	39
5-1-Action sur <i>Aspergillus niger</i> .....	40
5-2-Action sur <i>Botrytis cinerea</i> .....	41
5-3- Action sur <i>Penicillium</i> sp .....	42
6-Activité antifongique des bactéries par les composés volatils .....	43
7-Evaluation de l'activité antifongique <i>in vivo</i> .....	47
II- Discussions .....	49
9-Conclusion et perspectives .....	53

Références bibliographiques

Résumé

## Liste des tableaux

<b>Tableau I</b> : Taxonomie de <i>Pseudomonas</i> .....	02
<b>Tableau II</b> : Principales pathologies causées par <i>Pseudomonas</i> sp et classées selon le site d'infection .....	06
<b>Tableau III</b> : la taxonomie de l'espèce <i>Botrytis cinerea</i> .....	13
<b>Tableau IV</b> : les champignons phytopathogènes et leurs rôles dans la lutte.....	25
<b>Tableau V</b> : les différentes familles chimiques de fongicides multi-sites.....	27
<b>Tableau VI</b> : Résultats de l'examen macroscopique des souches bactériennes.....	35
<b>Tableau VII</b> : résultats de l'examen microscopique des souches bactériennes .....	36
<b>Tableau VIII</b> : Taux d'inhibition (%) de la croissance mycélienne dans la confrontation direct <i>in vivo</i> .....	40
<b>Tableau IX</b> : Taux d'inhibition (%) de la croissance mycélienne par les composés volatil .....	43

# Liste des figures

<b>Figure 1</b> : Relations phylogénétiques entre les différents groupes des protéobactéries contenant les genres bactériens actuellement ou anciennement associés aux <i>Pseudomonas</i> ...	03
<b>Figure 2</b> : Antibiogramme de la souche sauvage de référence PAO1 .....	07
<b>Figure 3</b> : Représentation des cycles de vie de <i>Bacillus</i> sp .....	09
<b>Figure 4</b> : Caractéristiques morphologiques de l'espèce <i>Botrytis cinerea</i> .....	13
<b>Figure 5</b> : Structures d'infection provoquée par des conidies de <i>Botrytis cinerea</i> .....	14
<b>Figure 6</b> : Cycle de vie de <i>Botrytis cinerea</i> .....	15
<b>Figure 7</b> : Symptômes de maladie causée par la moisissure grise sur feuilles et le fruit tomate.....	16
<b>Figure 8</b> : la moisissure grise développé sur piment récoltés.....	16
<b>Figure 9</b> : Jeune fruit de courgette dont les pétales infectés et pourris permettront la contamination rapide du fruit par <i>Botrytis cinerea</i> .....	17
<b>Figure 10</b> : Représentation schématique de l'infection par les spores aspergillaires avec inhalation puis germination des spores au niveau alvéolaire .....	35
<b>Figure 12</b> : <i>Pseudomonas</i> sp., cultivé sur milieu GN.....	35
<b>Figure 13</b> : <i>Aspergillus niger</i> cultivé sur milieu sabouraud.....	37
<b>Figure 14</b> : Aspect microscopique de <i>Aspergillus</i> sous microscope photonique.....	37
<b>Figure 15</b> : <i>Penicillium</i> sp cultivé sur milieu sabouraud .....	38
<b>Figure 16</b> : L'aspect microscopique de genre <i>Penicillium</i> sp .....	38
<b>Figure 17</b> : <i>Botrytis</i> sur milieu sabouraud .....	39
<b>Figure 18</b> : L'aspect microscopique de <i>Botrytis cinerea</i> .....	39
<b>Figure 19</b> : <i>Aspergillus niger</i> (Témoin négatif).....	41
<b>Figure 20</b> : Effet antagoniste de <i>Bacillus</i> sp., sur <i>Aspergillus niger</i> .....	41
<b>Figure 21</b> : Effet antagoniste de <i>Pseudomonas</i> sp., sur l' <i>Aspergillus niger</i> .....	41
<b>Figure 22</b> : <i>Botrytis cinerea</i> (Témoin négatif).....	41
<b>Figure 23</b> : Effet antagoniste de <i>Bacillus</i> sp., sur <i>Botrytis cinerea</i> .....	41
<b>Figure 24</b> : Effet antagoniste de <i>Pseudomonas</i> sp., sur <i>Botrytis cinerea</i> .....	42
<b>Figure 25</b> : <i>Penicellium</i> sp., (Témoin négatif).....	42
<b>Figure 26</b> : Effet antagoniste de <i>Bacillus</i> sp., sur <i>Penicellium</i> sp. ....	42
<b>Figure 27</b> : Effet antagoniste de <i>Pseudomonas</i> sp., sur <i>Penicellium</i> sp. ....	42

<b>Figure 28</b> : Diagramme représentant les pourcentages d'inhibition de la croissance mycélienne par les bactéries.....	43
<b>Figure 29</b> : <i>Botrytis cinerea</i> (Témoin négatif) (contact indirect) .....	44
<b>Figure 30</b> : Effet antagoniste de <i>Bacillus</i> sp., sur <i>Botrytis cinerea</i> après 15 jours d'incubation(contact indirect) .....	44
<b>Figure31</b> : Effet antagoniste de <i>Pseudomonas</i> sp., sur <i>Botrytis cinerea</i> après 15 jours d'incubation(contact indirect) .....	44
<b>Figure 32</b> : <i>Aspergillus niger</i> (Témoin négatif) (contact indirect) .....	44
<b>Figure 33</b> : Effet antagoniste de <i>Bacillus</i> sp., sur l' <i>Aspergillus niger</i> après un temps d'incubation d'environ 15jours(contact indirect) .....	44
<b>Figure 34</b> : Effet antagoniste de <i>Pseudomonas</i> sp., sur l' <i>Aspergillus niger</i> après l'incubation après 15 jours d'incubation(contact indirect).....	45
<b>Figure 35</b> : <i>Penicillium</i> sp (Témoin négatif) (contact indirect) .....	45
<b>Figure 36</b> : Effet antagoniste de <i>Bacillus</i> sp., sur <i>Penicillium</i> sp., après 15 jours d'incubation( contact indirect) .....	45
<b>Figure 37</b> : Effet antagonite de <i>Pseudomonas</i> sp., sur <i>Penicillium</i> sp., après 15 jours d'incubatioin (contact indirect).....	45
<b>Figure 38</b> : Diagramme représentant les pourcentages d'inhibition de la croissance mycélium d' <i>Aspergillus</i> ; <i>Botrytis</i> et <i>Penicillium</i> sp., en confrontation indirecte avec les bactéries antagonistes. ....	46
<b>Figure 39</b> : La plante du piment traite par le pathogène <i>Botrytis cinerea</i> (Témoin positif) ..	47
<b>Figure 40</b> : La plante du piment sans traitement (Témoin négatif) .....	47
<b>Figure 41</b> : Le devenir des plantes du piments infectées par <i>Botrytis cinerea</i> et pulvérisées par <i>Pseudomonas</i> sp., après 20 jours d'incubation .....	48
<b>Figure 42</b> : Le devenir des plantes du piment infectées par <i>Botrytis cinerea</i> et Pulvérisées par <i>Bacillus</i> sp., après 20 jours d'incubation.....	48

## Liste des abréviations

**ABPA** : Aspergillose Broncho-Pulmonaire Allergique

**AFLP** : Amplified Fragment Length Polymorphism

**API** : Aspergillose Pulmonaire Invasive

**BHIB** : Bouillon infusion cœur-cervelle

**EPS** : Exo-PolySaccharide

**GMT** : Gouts Moisi-Terreux

**GN** : Gelose Nutritive

**ISR** : Résistance systémique induite

**LPS**: Lipopolysaccharide

**MDR**: Multi Drogue-Resistance

**MH**: Muelle-Hinton

**MLEE**: Multi Locus Enzyme Electrophoresis

**MLST**: Multi Locus Sequence Typing

**NBG**: Nova Plantarum Genera

**OILB**: Organization International de la Lute Biologique

**PGPR** : Rhizobactéries Promotrices de la Croissance des Plantes  
(*Plant Growth Promoting Rhizobacteria*).

**RM** : Rouge de Méthyle

**TIA**: Toxi-Infection Alimentaires

**VGM**: Vésicules Groupées Macrocytaires

**VP** : Vogs Proskaur

# Introduction

---

Les plantes, en tant qu'éléments pionniers du fonctionnement des écosystèmes terrestres vivent universellement en symbiose avec d'autres organismes microscopiques. Ces symbioses jouent un rôle extrêmement déterminant et décisif dans le succès de la conquête des divers biotopes par le partenaire végétal.

Deux catégories d'effets bénéfiques des microorganismes sur les plantes peuvent être distinguées (VAN DERHEIJDEN *et al.*, 2008) : les effets directs via les organismes microbiens associés à la racine qui mettent en place des relations mutualistes avec les plantes et les effets indirects via l'action des microorganismes vivant librement dans la rhizosphère qui modifient les taux de disponibilité des éléments nutritifs et donc la productivité, la santé et la diversité des plantes. Parmi les microorganismes à effets bénéfiques indirects, il existe notamment des bactéries dont l'effet global favorise la croissance de la plante (LEMANCEAU, 1992). Certaines sont utilisées en agriculture comme agents de lutte biologique (BLOEMBERG et LUGTENBERG, 2001). On prend l'exemple de ces deux bactéries de genre *Pseudomonas* et *Bacillus* qui sont capables de former des associations intimes avec leurs hôtes. Ces associations peuvent mener à une maladie chez les plantes hôtes sensibles (HOFTE et DE VOS, 2006). Par ailleurs ils sont capables de mettre en place des interactions mutualistes.

Les plantes subissent les attaques de nombreux bio-agresseurs. Parmi eux, les champignons pathogènes causent des maladies sur tous les organes des plantes. La fréquence des infections fongiques a augmenté de façon dramatique au cours des deux dernières décennies en raison principalement des agents chimiques et même environnementaux. L'émergence de nouveaux agents fongiques pathogènes et le développement de résistance sont également des facteurs importants (PEREZ *et al.*, 2002).

Dans ce travail nous avons étudié l'effet antagoniste de ces deux bactéries sur les trois agents phytopathogènes: *Aspergillus niger*, *Botrytis cinerea* et *Penicillium sp.* Et ceci par des confrontations *in vitro* en boîtes de pétri. Une deuxième série d'essais a été effectuée *in vivo* afin d'apprécier l'effet protecteur des bactéries vis-à-vis des plantes de piments infectées par *Botrytis cinerea*.

# **Synthèse bibliographique**

# Chapitre 1 : Le monde microbien

---

## 1-*Pseudomonas* sp.

Considéré longtemps comme un organisme largement opportuniste, *Pseudomonas* sp., est aujourd'hui clairement reconnu comme un pathogène nosocomial majeur chez les patients immuno-compromis ou affaiblis (**PIER et RAMPHAL, 2005**).

Cette souche a été isolée pour la première fois en 1882 par Charles Gessard comme agent de surinfection des plaies au cours de la 1<sup>ère</sup> guerre mondiale (**CHAKER, 2012**). C'est une bactérie redoutable car elle est considérée comme le paradigme des espèces environnementales pathogènes opportunistes de l'homme (**PLESIAT, 2011**).

### 1-1-Taxonomie

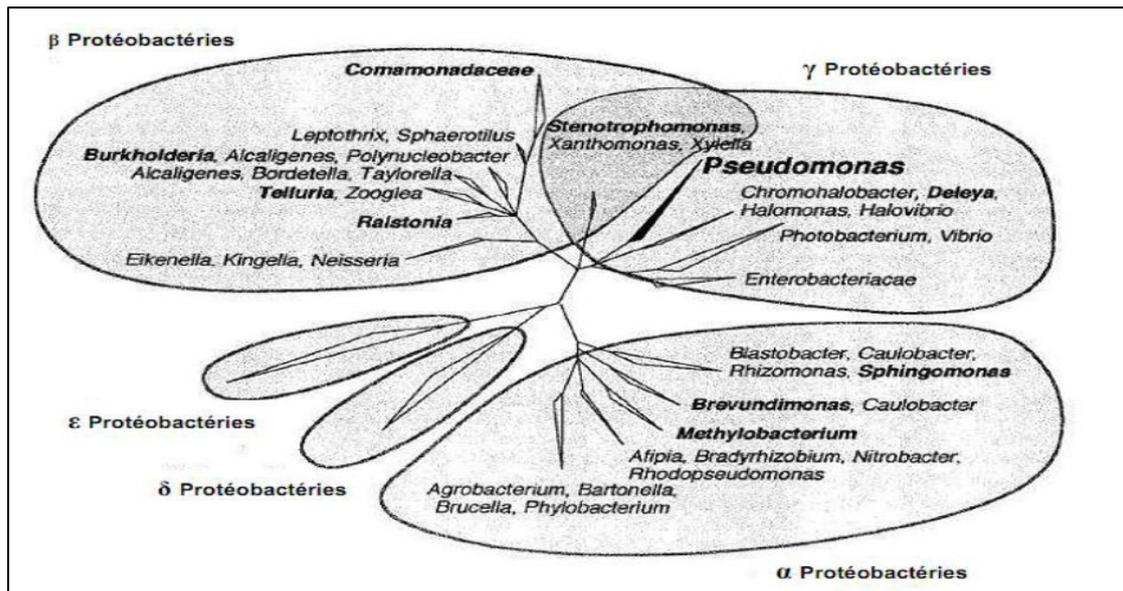
Il s'agit d'une bactérie que l'on répertorie conventionnellement comme mentionné dans le tableau I.

**Tableau I:** Taxonomie de *Pseudomonas* sp. (**CHAKER, 2012**)

Règne	Bacteria
Embranchement	<i>Prokaryota</i>
Division	<i>Proteobacteria</i>
Classe	<i>Gammaproteobacteria</i>
Ordre	<i>Pseudomonadales</i>
Famille	<i>Pseudomonadaceae</i>
Genre	<i>Pseudomonas</i>

### 1-2- Phylogénie

Le genre *Pseudomonas* sp., est un grand groupe bactérien particulièrement important qui appartient à la sous-classe  $\gamma$  des protéo-bactéries. La figure 1 représente les relations phylogénétiques entre les différents groupes des protéo-bactéries.



**Figure 1.** Relations phylogénétiques entre les différents groupes des protéobactéries contenant les genres bactériens actuellement ou anciennement (en gras) associés aux *Pseudomonas* (BOSSIS et al., 2000).

### 1-3-Habitat

La bactérie *Pseudomonas* sp., est omniprésente dans l'environnement, on la trouve dans de très nombreux milieux : végétaux, poussières, aliments crus (particulièrement les légumes : tomates, carottes, céleris) et même parfois commensale du tube digestif de l'homme (LECLERC, 2002). C'est une bactérie saprophyte d'eau, ubiquitaire de l'environnement humide, son réservoir naturel est le sol, les lacs, les rivières, l'eau polluée, les piscines et les jacuzzis...etc (FLORET, 2009). *Pseudomonas* sp., est un germe aquicole qui se multiplie dans l'eau quel que soit son contenu en matières organiques (LECLERC, 2002) et comme leur multiplication est favorisée par la température, on les trouve aussi dans les eaux chaudes sanitaires, dans les tours de refroidissement, et dans les piscines, les bains bouillonnants, ventilateurs, nébuliseurs, humidificateurs et malheureusement au milieu hospitalier [évier, siphons, vases, antiseptiques (dans les solutions de désinfectants)] incriminé dans les infections nosocomiales (LECLERC, 2002).

### 1-4- Caractères généraux des *Pseudomonas* sp.

#### 1-4-1- Caractères morphologiques

*Pseudomonas* sp., est un bacille fin sous forme de bâtonnet de 1 à 5 µm de longueur et 0,5 à 1 µm de largeur (CHAKER, 2012). C'est une bactérie à Gram négatif, non sporulée, strictement aérobie (cytochrome oxydase), généralement non capsulée mais parfois entourée

## Chapitre 1 : Le monde microbien

---

d'une pseudo-capsule, elle est très mobile grâce à la présence de plusieurs flagelles polaires. Elle est mésophile et capable de se développer dans des températures allant de +4°C à +45°C, mais il faut bien savoir que sa température optimale de croissance se situe entre 30 et 37°C (**CLAVE D, 2011**).

### 1-4-2- Caractères culturels

*Pseudomonas* sp., sont des aérobies à métabolisme strictement respiratoire, oxydase+ (**CLAVE, 2011**) (utilisent l'oxygène comme accepteur d'électrons, mais en absence ou en carence de ce dernier, elles utilisent les nitrates (**VASIL, 1986**), et chimio-organo-trophes puisqu'elles peuvent croître dans un milieu minéral ne contenant qu'une seule source de carbone. Elles sont aussi catalase positive (**MEZAACHE, 2012**).

Toutes les espèces de ce genre ne peuvent croître à pH inférieur à 4.5, ni métaboliser le lactose sur Mc Conkey, l'examen au rouge de méthyle et celui de Voges Proskauer (VP) sont négatifs (**PALLERONI, 1984**).

### 1-4-3- Caractéristiques métaboliques

*Pseudomonas* sp., sont caractérisée par un métabolisme oxydatif et non fermentatif (**MEZAACHE S, 2012**). Ces bactéries ont la capacité de dégrader des composés complexes, tels que les protéines et les polysaccharides complexes comme l'amidon, la cellulose (**PALLERONI, 1984**).

Les espèces du genre *Pseudomonas* produisent une couche d'exopolysaccharide entourant leurs cellules, la protègent de la phagocytose par les macrophages chez les mammifères. Cette couche d'exopolysaccharide (E.P.S) leur permet de former des bio films, grâce auxquels elles peuvent rester collées aux surfaces, de telle manière qu'il est difficile de les déloger (**VISCAET al.,2007**). Ce genre produit beaucoup de poly hydroxy alcanates et d'alginate ainsi que d'autres substances métaboliques. Ce qui les rend d'un grand intérêt biotechnologique (**HOLLOWAY,1992**).

### 1-4-4- Caractères génomiques

Le génome de cette bactérie a été séquencé en 2000 et a été publiée et révélait le plus large génome bactérien séquencé à ce jour. Il possède 6.3 millions de paires de bases, codant 5570 cadres de lecture de la souche modèle PAO1 (**STOVER et al.,2000**).

Ce génome contient un nombre important de gènes régulateurs impliqués dans le métabolisme, le transport, l'efflux de composés organiques et différents systèmes de sécrétion et de mobilité, (**STOVER et al.,2000**) mais il contient aussi une quantité très élevée de gènes

## Chapitre 1 : Le monde microbien

---

codant pour des facteurs de virulence et des mécanismes de régulation, ce qui lui confère une grande capacité à s'adapter à divers environnements et la capacité d'infecter différents hôtes (FAILLE, 2010).

La virulence de *Pseudomonas* sp., est multifactorielle (LAMONT I et al., 2003), cette bactérie pouvant produire une multitude de métabolites secondaires dont des facteurs de virulence extracellulaires de faibles poids moléculaire, qui sont régulés en partie par la signalisation intercellulaire. De plus, de nombreux facteurs de virulence se retrouvant à la surface des cellules font de cette espèce un pathogène redoutable. Parmi ces facteurs, on retrouve le flagelle qui permet à la bactérie de nager, les pilis pour le déplacement et l'adhésion, et la couche de lipopolysaccharides (LPS) qui se situe à la surface externe de la membrane et qui est aussi nécessaire à l'adhésion (KIPNIS et al., 2006).

### 1-4-5-Pouvoir pathogène

*Pseudomonas* sp., sont des bactérie opportuniste qui provoquent rarement des infections chez les sujets en bonne santé. Il s'agit alors :

- D'infestations massives par exemple chez les nageurs de piscines contaminées.
- Ou d'inoculations traumatiques directes dans un tissu ou une cavité (méningites ou ostéomyélite d'inoculation).

En fait, il est de règle que les infections à pyocyanique surviennent chez les malades fragilisés en milieu hospitalier. L'antibiothérapie favorise l'implantation des bactéries sur la peau ou les muqueuses de ces malades. Le concept d'immunodépression inclut l'état consécutif aux stress, à des traumatismes divers (brulures, fractures, interventions chirurgicales, injections intraveineuses d'héroïne, manœuvres instrumentales), à des chimiothérapies neutro-péniantes utilisées par le traitement des cancers ou des leucémies mais aussi les tares (diabète, mucoviscidose...) la malnutrition (kwashiorkor), l'âge (prématurité) ou le délabrement physiologique (vieillesse) (SOULEY, 2002). Les principales pathologies causées par *Pseudomonas* sp., sont résumées dans le Tableau II.

## Chapitre 1 : Le monde microbien

**Tableau II** : Principales pathologies causées par *Pseudomonas* sp., et classées selon le site d'infection (MESAROS, 2007).

Site d'infection	Pathologie spécifique	Fréquence (dans une population à risque)
Tractus respiratoire	Pneumonie aiguë Infections chroniques de l'arbre bronchique	Fréquent (hôpital, soins intensifs) Mucoviscidose
Sang	Bactériémie et septicémie	Fréquent
Tractus urinaire	Infections aiguës Infections chroniques	Relativement fréquent (complication suite à la présence de corps étrangers)
Oreille	Otite externe ("oreille du nageur") Otite externe maligne Otite moyenne chronique suppurative	Fréquent
Peau et tissus mous	Dermatite Infections de plaies Ecthyma gangrenosa pyodermite Folliculite acnévulgaris résistant	Relativement fréquent (Traumatismes) Relativement fréquent (Traumatismes)
OEil	Kératite (ulcère cornéen) Enophtalmie Ophtalmie néonatale	Rare (traumatisme)
Système nerveux central	Méningite Abscesses cérébrales	Rare (secondaire à une neurochirurgie ou à un traumatisme)
Tractus gastrointestinal	Entérocolite nécrosante Infections périrectales	Rare
Os et articulations	Pyoarthrose sténo-articulaire Ostéomyélite vertébrale Infection de la symphyse pubienne Ostéochondrite du pied Ostéomyélite	Rare

### 1-4-6-L'antibiorésistance

La résistance bactérienne à un antibiotique est définie comme la capacité d'une bactérie à survivre à une concentration bien déterminée de cette molécule. En pratique, cette résistance se traduit de différentes façons. Pour le clinicien, c'est la présence d'échec clinique d'antibiothérapie après un traitement adapté, Pour le biologiste, c'est l'acquisition par une

## Chapitre 1 : Le monde microbien

bactérie de mécanismes lui permettant de résister à la concentration minimale inhibitrice déterminée pour des souches sensibles (WEISS, 2002).

### 1-4-6-1-Différents types de la résistance bactérienne

#### 1-4-6-1-1-Résistance naturelle

*Pseudomonas* sp., possèdent une résistance naturelle à un grand nombre d'antibiotiques en raison de la production d'une bêta-lactamase chromosomique inductible de classe C qui n'est pas inhibé par le clavulanate, et une mauvaise perméabilité membranaire. *Pseudomonas* sp., sont donc naturellement résistants aux pénicillines des groupes V G M et A, à la plupart des céphalosporines de troisième génération . *Pseudomonas* sp sont aussi résistant à la kanamycine (POOLE, 2004) .



**Figure 2** : Antibiogramme de la souche sauvage de référence PAO1, (MESAROS et al., 2007).

#### 1-4-6-1-2-Résistance acquise

A côté de la résistance naturelle, il existe aussi la résistance acquise. Cette résistance ne concerne que quelques ou de nombreuses souches d'une espèce donnée. Ces souches dérivent de bactéries initialement sensibles (phénotype résistance). Elle résulte de changements dans le génome bactérien par une mutation comme l'acquisition des informations génétiques étrangères (MULVEY et SIMOR, 2009).

## 2- *Bacillus* sp.

Le groupe *Bacillus* sp., est composé de bactéries à Gram-positif, anaérobies facultatifs et capables de former des endospores. Ce sont des bâtonnets, d'environ 4 µm de long et 1 µm de large, possédant une ciliature péritriche (GUINEBRETIERE *et al.*, 2008).

Les espèces de ce groupe sont fréquemment retrouvées dans le sol, l'eau, les poussières et sur les végétaux. Certaines espèces se retrouvent dans le tube digestif des animaux où elles établissent une relation d'endosymbiose avec leur hôte (HONG *et al.*, 2005).

### 2-1-Caractéristiques

*Bacillus* sp., sont des bacilles de grande taille (>1.0 µm) à Gram positif, généralement mobiles grâce à une ciliature péritriche. Sont aussi très répandues dans la nature et de végétaux, ce qui sont souvent isolées du sol, de la poussière ou de la surface favorise leur propagation dans les aliments. Certaines espèces sont aussi capables d'infecter des mammifères et/ou des insectes (DROBNIIEWSKI, 1993, KOTIRANTA, *et al.*, 2000). La capacité à produire des spores leur permet de résister à des environnements extrêmes tels que la pasteurisation ou l'acidité rencontrée dans l'estomac mais aussi à adhérer aux matériaux utilisés au cours de la chaîne de fabrication des plats cuisinés (LEQUETTE, *et al.*, 2011, MOLS et ABEE, 2011, CEUPPENS, *et al.*, 2012). La gamme de température de croissance varie en fonction des souches et s'étend de 5°C à 50°C

### 2-2-taxonomie

Le groupe *Bacillus* inclut six espèces génétiquement apparentées :

- *Bacillus anthracis*, responsable de la maladie du charbon (MOCK et FOUET, 2001).
- *Bacillus huringiensis*, qui synthétise un cristal parasporal contenant des toxines létales pour les insectes (SCHNEPF *et al.*, 1998).
- *Bacillus mycoides* et, *Bacillus pseudomycoides* forment des colonies rhizoïdes (NAKAMURA, 1998).
- *Bacillus weihenstephanensis* est une espèce psychrotolérante pouvant se développer à des températures de réfrigération comprises entre 4°C et 7°C (LECHNER, *et al.*, 1998).
- *Bacillus cereus sensu stricto* aussi appelé *Bacillus cereus*, reconnu comme agent causal de toxi-infections alimentaires (TIA) mais aussi responsable dans une moindre mesure d'infections opportunistes locales et systémiques (BOTTONNE, 2010, LOGAN, 2012).

Plusieurs études basées sur différents types d'analyses tels que les profils AFLP (Amplified Fragment Length Polymorphism), MLST (Multi Locus Sequence Typing), MLEE (Multi

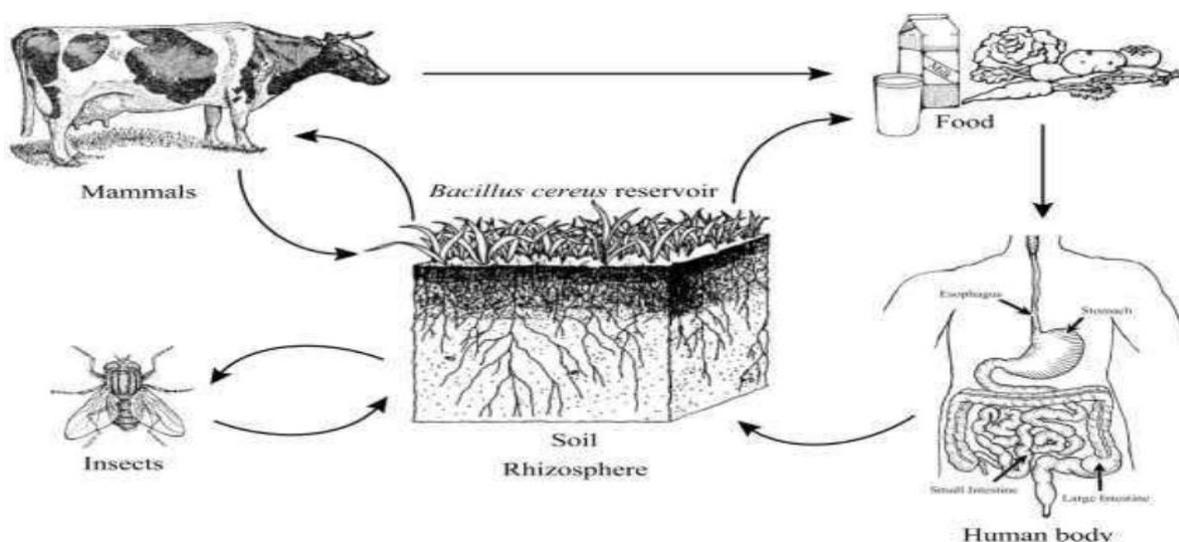
# Chapitre 1 : Le monde microbien

Locus Enzyme Electrophoresis), les séquences des gènes ribosomaux et la séquence du gène *pan C* ont montré que ces espèces se répartissent en sept groupes phylogénétiques, chacun se divisant en sous-groupes (GUINEBRETIERE, *et al.*, 2008, TOURASSE, *et al.*, 2011). Le groupe phylogénétique I inclut l'espèce *Bacillus pseudomycoïdes*. Les groupes II, III, IV, V contiennent les espèces *Bacillus cereus* et *Bacillus thuringiensis*. *Bacillus anthracis* est quant à lui présent uniquement dans le groupe III. *Bacillus weihenstephanensis* et *Bacillus pseudomycoïdes* appartiennent au groupe VI. Le groupe VII contient une espèce nouvellement décrite : *Bacillus cytotoxicus* (GUINEBRETIERE, *et al.*, 2012).

## 2-3-Cycle de vie

La connaissance de l'écologie de *Bacillus* sp., dans le sol est loin d'être complète. Les premiers travaux favorisaient un modèle où *Bacillus cereus sensu lato* existe dans le sol sous forme de spore, puis germe et croît en interaction symbiotique avec un hôte invertébré ou en tant que pathogène chez un hôte vertébré ou invertébré (JENSEN, *et al.*, 2003).

Ce mode de vie de *Bacillus cereus sensu lato*, a été complété par les travaux de Vilain et collaborateurs qui montrent qu'elle est aussi capable de germer, de se multiplier et par la suite de sporuler dans le sol prouvant ainsi que *Bacillus*, peut également adopter un mode de vie saprophyte (VILAIN, *et al.*, 2006).



**Figure 3 :** Représentation des cycles de vie de *Bacillus* sp, d' après (MOLS et ABEE, 2011).

Les auteurs décrivent un phénotype multicellulaire avec un mode de croissance filamenteux qui permettrait à *Bacillus* sp., de se déplacer dans le sol. La forme filamenteuse de *Bacillus*

## Chapitre 1 : Le monde microbien

---

sp., aussi décrite par Margulis et collaborateurs, existe également au niveau de l'intestin d'insecte (**MARGULIS *et al.*, 1998**). Ainsi le mode de croissance filamenteux serait associé aux modes de vie saprophytique et symbiotique de *Bacillus* sp., tandis que le mode de croissance rapide serait associé à un cycle de vie en tant qu'agent infectieux. Il est à noter que les souches de *Bacillus* sp., ne sont pas toutes responsables de pathologie chez l'hôte. Plusieurs souches sont inoffensives et certaines sont utilisées comme probiotiques (**CUTTING, 2011**).

## Chapitre 2 : Les champignons phytopathogènes

---

### 1-*Botrytis cinerea*

#### 1-1-Définition

L'étymologie de son nom fait référence directement à sa morphologie : «*Botrytis* » signifie « en forme de grappe », indiquant ainsi la morphologie des conidiophores, et « *cinerea* » renvoie à la couleur gris cendrée de la sporulation.

Le genre *Botrytis* a été décrit pour la première fois en 1729 par *Pier Antonio Micheli* qui la répertorié dans le « *Nova Plantarum Genera* » puis le nom de l'espèce *Botrytis cinerea* a été attribué par *Elias Magnus Fries*, le botaniste suédois qui, à la suite de *Linné*, fut le fondateur de la systématique des champignons.

C'est un champignon aérien qui se conserve assez bien dans le sol sous forme de petits nodules de consistance dure, de couleur sombre, formé de filaments mycéliens entrelacés appelés sclérotés.

C'est un pathogène ubiquiste et polyphage capable de se développer sur plusieurs plantes hôtes différentes (**ELAD et al., 2007**).

Il a un mode de vie nécrotrophe : Après infection de son hôte, les cellules touchées meurent et *Botrytis cinerea* s'y développe de façon saprophyte (**HOLZ et al., 2007**).

Se multiplie dans un intervalle de température comprise entre 15 et 20°C et **ELAD (2007)** précise qu'une humidité relative élevée (>90%) est primordiale pour que *Botrytis* envahit les tissus.

D'autres auteurs (**DEYTIEUX-BELLEAU et al., 2009 ; AZOUZ, 2009**) accordent une bien plus grande importance aux nutriments disponibles, notamment les sucres comme source de carbone qu'ils considèrent comme un des facteurs clés dans le développement du tube germinatif.

*Botrytis cinerea* est un champignon à risque fort de résistance parce que de nombreuses caractéristiques de sa biologie rendent plus efficace l'effet de la sélection naturelle (grandes tailles de populations, dissémination des conidies par le vent sur de longues distances, importante variabilité génétique, existence d'une reproduction sexuée et asexuée, large spectre d'hôtes...etc)

Ce champignon est une espèce dotée d'un fort pouvoir adaptatif, décrit *in natura* pour la résistance aux fongicides. Cependant, très peu d'éléments sont connus concernant les mécanismes évolutifs de la sélection au niveau populationnel.

## Chapitre 2 : Les champignons phytopathogènes

### 1-2-Classification

La classification est récapitulée dans le tableau suivant :

**Tableau III** : la taxonomie de l'espèce *Botrytis Cinerea*

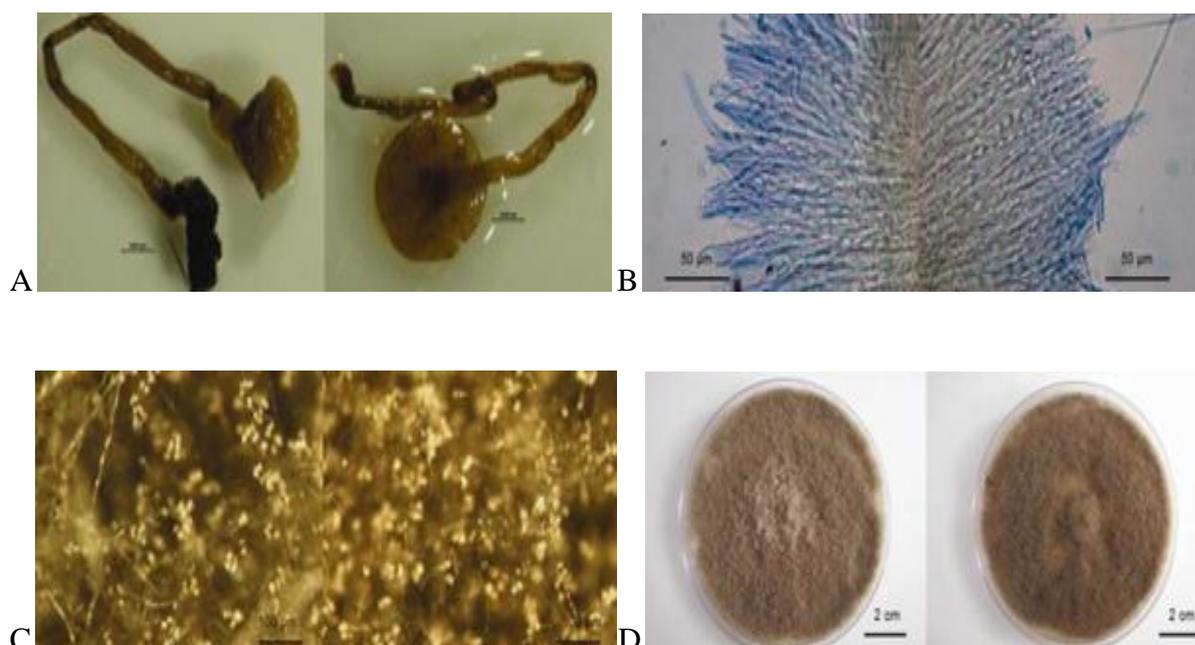
Règne	Mycètes (Fungi)
Embranchement	<i>Amastigomycota</i>
Division	<i>Deutéromycotina</i>
Classe	<i>Ascomycètes</i>
Ordre	<i>Leotiales</i> (la forme parfaite téléomorphe) <i>Moniliales</i> (la forme imparfaite anamorphe)
Famille	<i>Scleroteniaceae</i> (téléomorphe) <i>Moniliaceae</i> (anamorphe)
Genre	<i>Botrytis</i>
Espèce	<i>Botrytis cinerea</i>

La classification ancienne, basée essentiellement sur des caractères morphologiques et les spectres d'hôtes a été révisée récemment par une approche de généalogie multiple (STAATS *et al.*, 2005).

### 1-3-Characteres morphologiques

Possède des conidies ovoïdes hyalines à marron à pale, unicellulaire et hydrophobe d'une taille 8-14×6-9µm qui sont libérées par le mouvement hygroscopique de rétrécissement des cellules conidiospores.

Conidiophores sont renflés et ornés de courts stigmates simples, sur lesquels se déposent les conidies Micro-conidies : sont de taille de 2,5 à 3 µm de diamètre Sclérotos : toujours petites et arrondies ou ovoïdes, aplaties à la surface de l'organe qui les porte, constitués par des mycéliums agrégés blanchâtres. Ils mesurent 2 à 4mm de longueur et 1 et 3 mm de largeur (COLEY-SMITH et COOKE, 1971).



**Figure 4:** Caractéristiques morphologiques de l'espèce *Botrytis cinerea*

A : Apothécie, B : des asques contenant des ascospores, C : Sporulation mycélienne et  
D : Culture *in vitro* sur un milieu synthétiques (WALKER *et al.*, 2011).

### 1-4- Cycle de développement de *Botrytis cinerea*

Il existe deux cycles infectieux possibles pour ce champignon du genre *Botrytis* :

#### 1-4-1-Le cycle asexué

Dans les conditions favorables, *Botrytis cinerea* fructifie pour donner des conidies et leur développement se manifeste par la production de conidiospores dressés en touffes souvent étendues.

L'attachement des conidies à la surface de l'hôte se réalise par deux liaisons: la première implique des forces d'adhésion faibles qui résultent d'interactions hydrophobes entre les conidies et la surface (DOSS *et al.*, 1993). La deuxième liaison est renforcée par l'adhésion entre les conidies et la surface des tissus infectés.

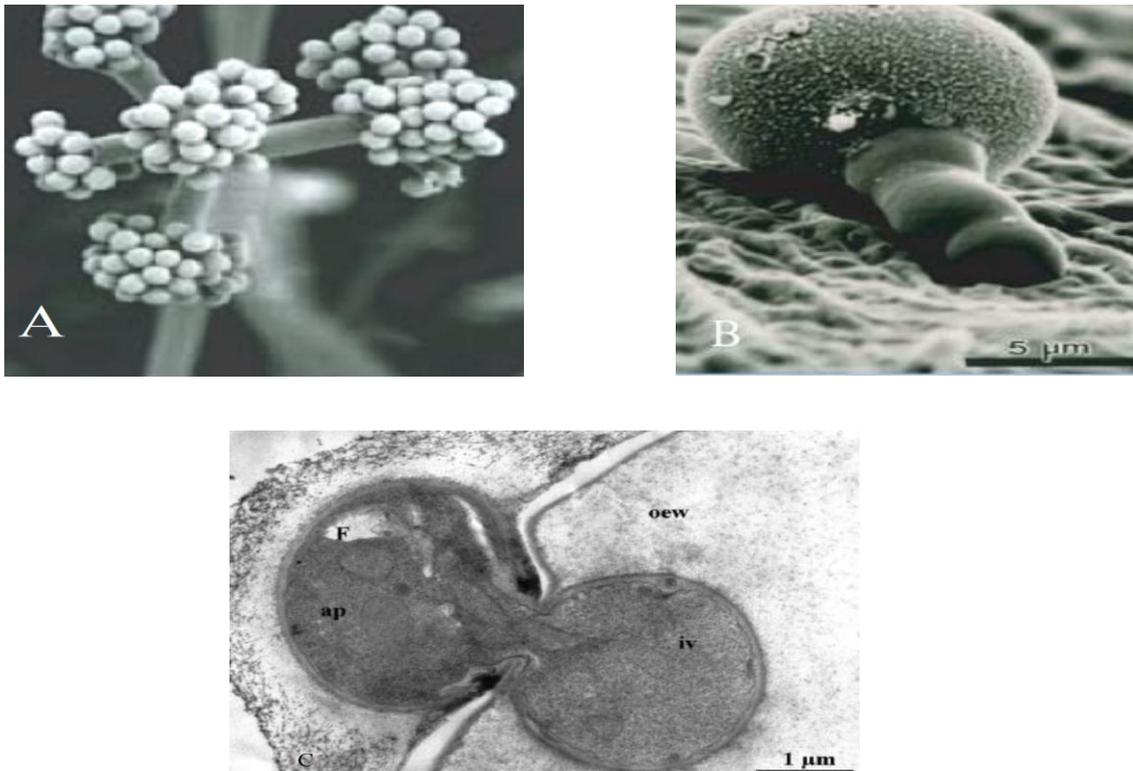
Une fois attachées à la surface de l'hôte, les conidies commencent le processus de germination, à l'extrémité du tube germinatif produit une couche extracellulaire (colle biologique) qui agit comme un adhésif à la surface de l'hôte. Cette couche protège ces conidies contre les mécanismes de défense de l'hôte (DOSS *et al.*, 1995).

Les conidies prennent une part importante dans la dissémination du champignon, elles peuvent être produites en continue, selon les conditions climatiques, dans le cas de cultures sous abris. Leur libération est favorisée par un climat humide, puis elles sont transportées par

## Chapitre 2 : Les champignons phytopathogènes

le vent, la pluie et les insectes sur de longues distances ou elles forment une source d'inoculum primaire (**HOLZ et al., 2004**) ce qui permet de provoquer un nouveau cycle d'infection. Ce cycle est très court et ne dure que quelques jours (6 à 7 jours).

Lorsque les conditions deviennent défavorables au développement de mycélium et de conidies, des sclérotés se forment (reproduction sexuelle).



**Figure 5:** Structures d'infection provoquée par des conidies de *Botrytis cinerea*.

A) Conidiophore de *Botrytis cinerea* avec des conidies matures.

B) Germination d'une conidie à la surface d'un pétale d'une rose.

C) Structure d'infection de *Botrytis cinerea* sur feuille d'un fruit et pénétration de *Botrytis cinerea* dans la paroi externe de l'épiderme de la feuille après 12h d'inoculation. (ap) appressorium, (oew) paroi externe de l'épiderme et (v) : vésicule d'infection (**Williamson et al., 2007**).

### 1-4-2-Cycle sexuel

Se traduit par la fusion entre les ascogones (gamètes femelles) produite par les sclérotés et les microconidies (gamètes mâles) produite par les microconidiophores. Elle est suivie d'une division méiotique et d'une mitose conduite à la formation des apothécies (**BEEVER et WEEDS, 2007**) contenant des asques à 8 ascospores.

## Chapitre 2 : Les champignons phytopathogènes

Le cycle sexuel est rarement détecté dans la nature facilement mais il est réalisable au laboratoire et il joue un rôle important dans la diversité génétique de *Botrytis cinerea*.

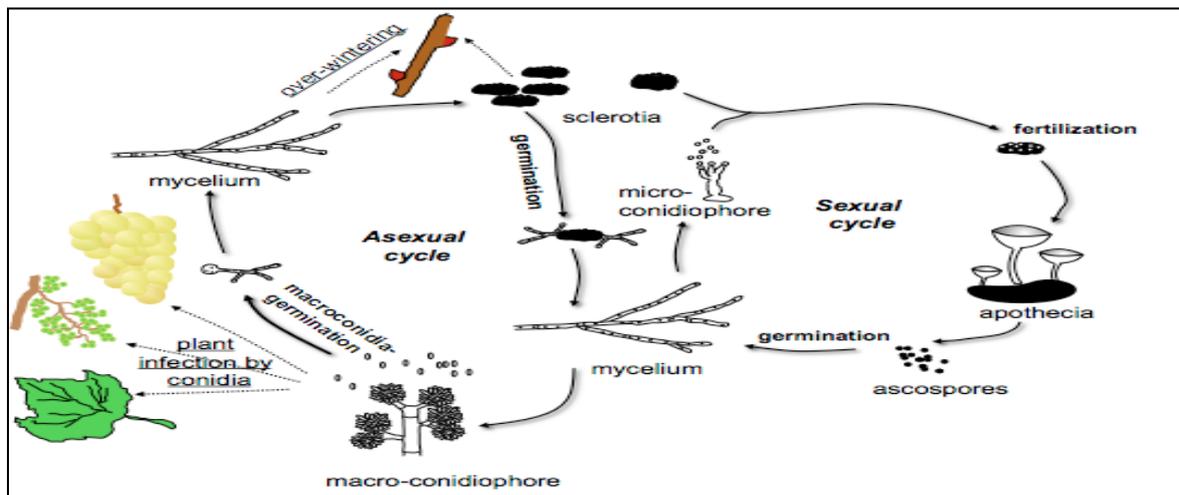


Figure 6: Cycle de vie de *Botrytis cinerea* (FILLINGER *et al.*, 2007)

### 1-5- Importance économique de la pourriture grise

La pourriture grise est l'une des maladies cryptogamiques la plus dévastatrice dans le monde qui est provoquée par *Botrytis cinerea*, cet agent pathogène peut entraîner la destruction partielle ou totale de l'organisme infecté.

Sur le plan économique, ce champignon est considéré comme un problème phytosanitaire majeur dans le monde (MARTINEZ *et al.*, 2005).

Chez de nombreux fruits et légumes, l'infection commence généralement sur soit les ouvertures naturelles (des pétales, des sépales) des feuilles, soit par des blessures et soit par le tissu intact (CLARK et LORBEER, 1977) (ELAD, 1988). Les symptômes se propagent ensuite sur les fruits ou les légumes adjacents en phase de croissance.

### 1-6- Les symptômes sur quelques légumes.

#### 1-6-1-Symptômes sur la tomate

- Les symptômes apparaissent en premier sur les feuilles les plus anciennes et ensuite remonter progressivement vers des feuilles plus jeunes.
- Les fruits infectés développent un halo léger de couleur blancs-gris et deviennent doux et pourri qui est à l'origine d'une infection par les spores dans l'air.
- Cette pourriture est plus considérée sur tomates cultivées à l'extérieur ou en serre, les dommages sont visibles sur les tiges (WILLIAMSON *et al.*, 2007).



**Figure 7** : Symptômes de maladie causée par la moisissure grise sur feuilles et le fruit tomate  
(<https://www.iriisphytoprotection.qc.ca/Fiche/Champignon?imageId=8229>)

### 1-6-2-Symptômes sur le piment

- Les racines pourrissent.
- Les tiges contaminées sèchent et meurent.
- Les feuilles se couvrent de taches crème à brunes, puis sèchent ou pourrissent.
- Les fleurs flétrissent.
- Les fruits et légumes atteints se couvrent d'un feutrage d'abord brunâtre, puis résolument gris.

En cultures sous abris, les risques d'attaque par ce champignon pathogène sont permanents sur par exemple le poivron, la laitue ou la fraise (JARVIS, 1992).



**Figure 8** : la moisissure grise développée sur piment récoltés  
(<https://www.alamyimages.fr/photo-image-la-moisissure-grise-botrytis-cinerea-developpe-sur-piments-recoltes-99931391.html>)

## Chapitre 2 : Les champignons phytopathogènes

---

### 1-6-3-Symptômes sur la courgette

Les symptômes se manifestent par l'apparition des taches beignes avec un halo jaune à la bordure de la feuille, on observe une moisissure grise qui gagne ultérieurement la tige et le fruit.

Le champignon se conserve sous forme sclérotés sur les déchets végétaux et sur le sol, Une forte humidité favorise son développement .

Les conidies se dispersent par le vent ou la pluie dans le cas d'une culture en plein champ soit par le courant d'air ou l'eau de condensation pour le cas de culture sous serres.



**Figure 9** : Jeune fruit de courgette dont les pétales infectés et pourris permettront la contamination rapide du fruit par *Botrytis cinerea* .(<http://ephytia.inra.fr/fr/C/8072/Courgette-courges-Principaux-symptomes>)

### 2-*Penicillium* sp.

Parmi les champignons pathogènes, le genre *Penicillium* est probablement qui est le plus ubiquitaire. Il comporte plus de 200 espèces qui se rencontrent partout de l'équateur aux pôles (REBOUX *et al.*, 2010).

Les *penicilliums* sp., sont des champignons pour la plus part très connus dans l'environnement, prophage, pouvant être responsables de nombreuses dégradations .Ils ont pour habitat naturel le sol, les denrées alimentaires, les matières organiques en décomposition et les céréales

Ces champignons occasionnent une pourriture bleue verte, entraînant une perte de couleur des moûts et une diminution de leur concentration en sucres.

## Chapitre 2 : Les champignons phytopathogènes

---

L'émergence de défauts organoleptiques (goûts moisi-terreux dits GMT) depuis les années 2000 a donné lieu à la mise en place d'études sur les origines de ces défauts et plus particulièrement sur les populations fongiques potentiellement responsables.

Ce genre de champignons majeurs sont impliqués dans la chaîne alimentaire humaine et animale comme des précurseurs (**DELAGE *et al.*,2003 ; LOPEZ DE CERAIN *et al.*,2002 ; FILALI *et al.*,2001 ;OTTENDER *et MAJERUS*,2000 ).Il permet aussi de produire des toxines telles que les mycotoxines (**MILLER *et TRENHO*, 1994**).**

Comme dans le cas des *Aspergillus*, les spores asexuées ou bien les conidies ou conidiospores sont produites par bourgeonnement (**LARPENT *et LAPRENT-GOURAUD*, 1990**).

Ce genre se caractérise par l'aspect du conidiophore qui est divisé en articles, rappelant ainsi la forme d'un pinceau (**CHAMPION, 1997**).

### 2-1-Caractères général

La morphologie du penicillium se distingue par son organisation en pinceau.

Le thalle, forme de filaments mycéliens septés et hyalins porte des conidiophores lisses et granuleux, simples ou ramifié qui se terminent par un pénicille .Les conidiospores peuvent être isolés, groupe en faisceaux lâche ou agrégés en cormiers bien individualisés.

Les phialides sont disposés en verticilles à l'extrémité des conidiophores. Ce dernier donne naissance à des conidies disposés aux longues chaînes.

Les phialides sont ampulliforme ou lancéolées, sont serrés les uns contre les autres donnant à l'ensemble l'aspect d'un pinceau.

Les conidies sont des spores unicellulaires, globuleuses, elliptiques, cylindriques ou fusiformes, lisses ou rugueuses, hyalines, grisâtres ou verdâtre (**BOTTON *et al.*, 1990**) .les caractères des pénicilles servent à la différenciation des groupes et des espèces, certaines espèces peuvent présenter une reproduction sexuée avec la production d'ascocarpes.

### 3-*Aspergillus niger*

Les champignons du genre *Aspergillus* ont été décrits pour la première fois en 1729. Sont des champignons filamenteux qui se développent en aérobiose sur la matière organiques en décomposition (saprophytisme) de plus, ils participent au recyclage du carbone et de l'azote de l'environnement.

Cette espèce est ubiquitaires : on les rencontre en milieu rural (la paille tasse et humides, les fruits moisissés et les matières organiques en décompositions) qu'en milieu urbain, et aussi bien

## Chapitre 2 : Les champignons phytopathogènes

---

à l'extérieur dans l'atmosphère qu'à l'intérieur des habitations (Poussières, conduits d'aérations) (VAUBOURDOLLE, 2007).

Ils sont capable de se multiplie dans un intervalle de température qui varie entre 6 à 47 °C. Les espèces thermophiles se développent a un optimum de 35 à 37 ° C, sa capacité de produire des conidies lui offre une large résistance au milieu les chauds et humides (SCHUSTER *et al.* , 2002).

La limite d'activité de l'eau pour la croissance est 0,88 et est une espèce qui peut pousser sur une très large gamme de pH : 1,4–9,8.

La multiplication de cette espèce est végétative. Il n'y a pas de reproduction sexuée.

### 3-1-Caractères morphologiques

- Un thalle mycélium blanc et de très nombreuses structures sporifères érigées, pulvérulentes, brun-noir, qui est généralement disposées en cercles concentriques et le verso est souvent incolore à jaune.
- Des têtes conidiennes larges, bisériée radiée, brun très sombre a noir, tout d'abord sphériques et secondairement radiées
- Des conidiophores (1,5 à 3 mm de long) qui présentent une paroi épaisse, lisse et incolore.
- La vésicule est globuleuse, brune, et de grande taille (40 à 70 µm de diamètre).
- Les phialides, très serrées, sont insérées sur la vésicule par l'intermédiaire de métules disposées sur tout le pourtour de la vésicule.
- Les conidies sont produites en très longues chaînes qui, au fur et a mesure, ont tendance à se regrouper en plusieurs colonnes compactes. De forme globuleuses, brunes, échinulées à très verruqueuses, et mesurent 3,5 à 5 µm de diamètre (QUATRESOUS, 2011)

### 3-2-Caractères culturaux

Les *Aspergillus* présentent une croissance rapide sur les milieux de culture classiques (milieu gélosé (GACEM, 2011), Sabouraud (TABUC, 2007), PDA (GACEM, 2011)) additionnés d'antibiotiques. Après une incubation de 24h à 37 ° C on observe des colonies plates apparaissent d'abord blanches, puis jaunes, et enfin granuleuses noires.

Les *Aspergillus* forment des colonies souvent poudreuses ou granuleuses. La couleur de colonies permet une orientation rapide dans l'identification d'espèces. Le virement de la couleur de jaune vers noir .Le revers de la colonie est incolore ou jaune, mais il peut brunir ou rougir avec l'âge (TABUC, 2007).

### 3-3-Les applications

Cette catégorie de moisissures joue un rôle utile dans la fabrication de nombreux aliments (boissons, fromages, saucisses et saucissons...) dans les industries alimentaires **(DELARRAS, 2007)**

*Aspergillus niger* est devenu un organisme industriellement utilisé lorsque l'acide citrique a été tout d'abord produit par fermentation en 1919.

En plus il offre plusieurs applications par sa production d'enzymes comme Pectinase, protéase et amyloglucosidase qui ont été initialement produites en culture de surface et exploité pour la première fois **(SCHUSTER et al., 2002)**.

### 3-4-Pouvoir pathogène d'*Aspergillus*

Les moisissures sont des organismes peu virulents mais très opportunistes. Les espèces du genre *Aspergillus* ne deviennent pathogènes que dans certaines conditions très particulières où elles profitent d'une défaillance des systèmes de défense de l'hôte pour l'infecter latget ,1990 Les *Aspergillus* sont les plus impliqué en pathologie humaine : Il est en cause dans environ deux tiers des infections fongiques aspergillaires chez l'homme et de 80 % des cas documentés d'infection invasive ( **DESOUBEAUX et CHANDENIER ,2010**), Il est aussi connu pour sa capacité à se développer sous la forme de truffes aspergillaires, sans invasion réelle des tissus. Les espèces suivantes sont également incriminées dans les manifestations pathologiques :*Aspergillus flavus, niger, nidulans, terreus, versicolor, etc.*

La plupart des espèces d'*Aspergillus* sont incapables de se développer à 37°C et cette caractéristique fondamentale distingue les espèces inoffensives des espèces pathogènes.

D'autres caractéristiques participent au pouvoir pathogène de cette espèce **(DENNING,1998 ;BEUNET, 1995 ; PITT, 1994)**:

- la petite taille des spores ainsi que leur hydrophobicité facilitent leur mise en suspension dans l'air **(PARIS et al ., 2003)** .
- la petite taille des spores leur permet également de pénétrer les poumons profondément
- les hydrophobines présentes à la surface des spores empêchent leur reconnaissance par le système immunitaire **(AIMANIANDA et al ., 2009)**.
- le tropisme vasculaire des spores, c'est à dire leur capacité à atteindre les vaisseaux sanguins, leur permet de se disséminer dans l'organisme.
- la production de mycotoxines impliquées dans des processus de sensibilisation est responsable de manifestations allergiques

## Chapitre 2 : Les champignons phytopathogènes

---

De nombreux sites d'infections ont été décrits, comme la peau, le péritoine, les reins, les os, les yeux et l'appareil digestif. Cependant, chez la plupart des patients, l'appareil respiratoire, qui est la principale porte d'entrée des spores, reste la zone d'infection majoritaire.

### **3-5-Le risque aspergillaire chez les patients immunodéprimés**

C'est en 1847 que le premier cas de pneumopathie humaine associée à *Aspergillus* est décrit, par Theodor Sluyter (1817-1895), dans le cadre de sa thèse de médecine. Il s'agissait vraisemblablement d'une Aspergillose Pulmonaire Invasive (API). Dans les années 1970, les premières grandes séries d'API sont décrites (**YONG *et al.*, 1970**), en relation avec l'augmentation croissante des thérapeutiques immunosuppressives pour le traitement des leucémies et pour les transplantations

Les sujets immunocompétents développent très rarement des pathologies pulmonaires aspergillaires.

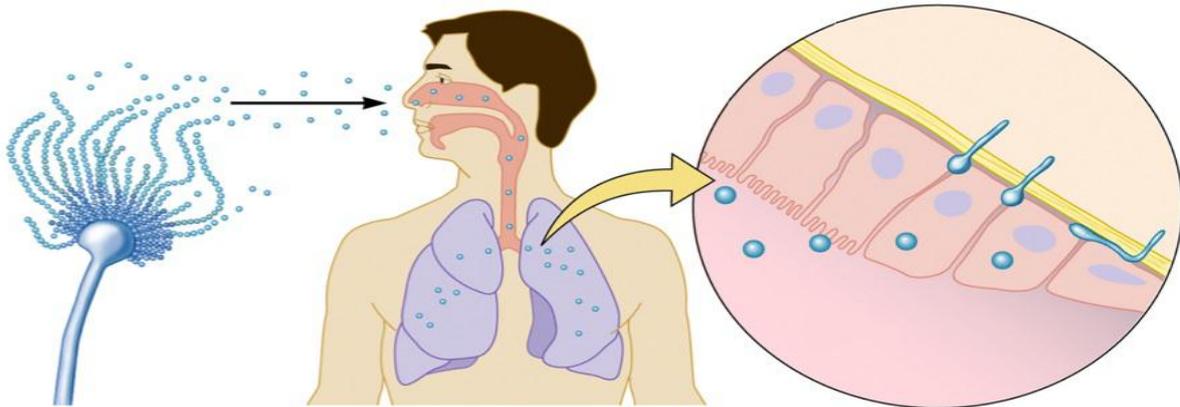
L'inhalation de spores d'*Aspergillus* est la plupart du temps sans conséquences car le système immunitaire élimine les spores et empêche leur croissance. Cependant, le tabac, une infection par d'autres agents pathogènes (virus, bactéries), une fibrose pulmonaire ou d'autres antécédents broncho-pulmonaires (mucoviscidose, sarcoïdose, broncho-pneumopathie chronique obstructive) peuvent altérer le tapis muco-ciliaire et créer des lésions des cellules épithéliales des muqueuses. Ces lésions favoriseraient l'adhésion des spores, pouvant mener à des pathologies sévères comme l'Aspergillose Broncho-Pulmonaire Allergique (ABPA). Après le poumon, le cerveau est l'organe le plus fréquemment atteint mais la peau, le rein, la thyroïde, les os, le cœur et les yeux peuvent être touchés également (**RIBAUD *et al.*, 1999**). Elle est de très mauvais pronostic, d'une part parce qu'elle touche des patients sévèrement immunodéprimés (**GRAF *et al.*, 2011**) et d'autre part parce que son diagnostic est souvent tardif.

Une exposition répétée à des spores ou à des antigènes d'*Aspergillus* peut également être responsable de pathologies allergiques bénignes, incluant l'asthme, la sinusite allergique et l'alvéolite. Ces pathologies n'impliquent pas de croissance fongique dans le corps du patient, et il suffit en général de supprimer le facteur environnemental pour que les symptômes s'estompent.

Les taux de mortalité rapportés varient de 28 % à 100 % selon les sources. C'est aujourd'hui une pathologie directement responsable de la mort de patients leucémiques, et de l'échec de traitements chimiothérapeutiques. C'est également une cause principale de décès chez les greffés de moelle osseuse.

## Chapitre 2 : Les champignons phytopathogènes

Le risque aspergillaire constitue un problème de santé publique important: *Aspergillus* est progressivement devenu l'un des pathogènes fongiques les plus prévalent, responsable en 1992 de 30 % des infections fongiques chez les patients cancéreux ; Ces dernières sont récemment devenues la première cause de mortalité d'origine infectieuse dans les services d'hématologie et de greffe de moelle osseuse (DESOUBEAUX, GAUD CHAUDEMIER, 2010).



**Figure 10:** Représentation schématique de l'infection par les spores aspergillaires avec inhalation puis germination des spores au niveau alvéolaire (AIMANIAUDA *et al.* , 2009)

# Chapitre 3 : Les méthodes de lutte phytosanitaires

---

## 1-Introduction

La protection phytosanitaire est mise en œuvre des méthodes appropriées pour éviter au maximum la réduction de la valeur marchande de la production agricole occasionnée par des parasites, des ravageurs, des adventices ou encore par des troubles d'ordre physiologique.

## 2-Lutte biologique

Selon l'organisation internationale de la lutte biologique (**OILB**), la lutte biologique est définie ainsi : «Utilisation d'organismes vivants pour prévenir ou réduire les dégâts causés pas des bio-agresseurs. Elle se base sur la relation naturelle entre deux êtres vivants, ainsi que sur l'utilisation de composés minéraux, organiques et d'extraits de plantes.

### 2-1-Les agents biologiques

Ces agents biologiques décrits dans la littérature sont principalement représentés par des bactéries appartenant aux genres *Acinetobacter*, *Bacillus*, *Pantoea* et *Pseudomonas* et par des champignons non phytopathogènes tel que *Trichoderma* spp, capables d'avoir une efficacité contre les moisissures et/ou en même temps d'induire des réactions de défense avec la cellule hôte (**MASIH et al., 2001; MAGNIN-ROBERT et al., 2007; TROTEL-AZIZ et al., 2008; GABRILOTTA et al., 2009**).

Les agents de la lutte biologique peuvent avoir les activités suivantes :

- **Antibiose** : Ce phénomène se passe quand un microorganisme sécrète des substances secondaires toxiques pour l'agent pathogène qui ont un effet négatif sur la croissance de celui-ci (**MELIN et al., 2007**). Plusieurs genres fongiques sont considérés comme des producteurs d'antibiotiques. Certains métabolites sont capables d'interférer avec la germination, la croissance mycélienne et/ou la sporulation des agents phytopathogènes par une inhibition de la germination des spores des champignons ou une lyse du mycélium des champignons (**SOUFIANE, 1998**).
- **Hyperparasitisme** : est l'association étroite entre deux espèces fongique, elle se représente dans l'attaque directe d'un microorganisme par un autre dans un but nutritionnel. Le parasite tire de l'hôte un profit de ressources normalement destinée à sa croissance, sa survie et sa reproduction (**SOUFIANE, 1998**). Il s'agit aussi d'un organisme antagoniste, qui colonise sa cible, en l'occurrence *Botrytis cinerea* est la détruit (**BULL et al., 1998**).
- **Compétition nutritive** : **IZALLALEN (1997)** a défini la compétition comme étant deux populations ou plusieurs sont limitées, en termes de vitesse de croissance ou de taille de population, par une dépendance commune envers un facteur externe

## Chapitre 3 : Les méthodes de lutte phytosanitaires

---

nécessaire pour la croissance. On peut prendre l'exemple de *Botrytis cinerea* qui a besoin de nutriments exogènes pour assurer son cycle infectieux. La présence d'autres microorganismes peut inhiber sa croissance par la compétition pour certains éléments nutritifs (ELAD et STEWART, 2004).

- **Interférence avec le pouvoir pathogène** : l'agent de contrôle biologique peut interférer avec les facteurs de pathogénie du champignon, par exemple, en inhibant les enzymes hydrolytiques. L'interférence est efficace à des phases précoces de l'infection (BAARLEN *et al.*, 2004).
- **Stimulateur des défenses des plantes** : ce mode d'action est majoritaire chez les bactéries telles que *Pseudomonas sp* (BUNSTER *et al.*, 1989). Elles induisent des changements physiologiques de la plante qui répond à cette infection, notamment, par un changement des caractéristiques de surface des feuilles de la plante. Ceci a pour conséquence de gêner l'attachement et la croissance des agents pathogènes sur les feuilles.

Des nombreuses études ont décrites des organismes ayant une activité antagoniste qui peuvent être isolés de l'environnement naturel. Ces organismes se sont de bons candidats de bio-contrôle antifongique dans les conditions de laboratoire alors que, dans les conditions du champ, seuls certains sont efficaces et il peut s'agir de champignons, de levures ou de bactéries (DROBY *et al.*, 2009); (ELMER et REGLINSKI, 2006).

La lutte biologique utilise un ensemble de méthodes satisfaisant les exigences à la fois économiques, écologiques et toxicologiques, en réservant la priorité à la mise en œuvre délibérée des éléments naturels de limitation et en respectant les seuils de tolérance.

En fait, l'utilisation des moyens de lutte biologique contre les agents phytopathogènes antagonistes a connu un essor considérable durant les deux dernières décades (MOURIA *et al.*, 2013).

Plusieurs genres de champignons appartenant à différents groupes antagonistes de champignons phytopathogènes intervient dans ce type de lutte. Parmi ceux-ci, ceux qui sont présenté dans le tableau suivant :

## Chapitre 3 : Les méthodes de lutte phytosanitaires

**Tableau IV** : les champignons phytopatogènes et leurs rôles dans la lutte

Le champignon	rôle	Référence
<i>Microdochiumdimerum</i> (Penz.) Arx 1984	un agent fongique potentiel de lutte contre <i>Botrytis cinerea</i>	(AJOUZ, 2009)
<i>Trichodermaspp.</i>	semblent être les champignons les plus utilisés dans la lutte biologique contre de nombreux champignons phytopathogènes : <i>Phytophthora cryptogea</i> , <i>Botrytis cinerea</i>	(MOAYEDI et MOSTOWFIZADEH-GHALAMFARSA R., 2010) (HMOUNI et al., 1999 ; TRONSMO et YSTAAS, 1980).
<i>Gliocladium virens</i>	efficace contre plusieurs agents phytopathogènes comme des espèces des champignons décomposeurs du bois	(HIGHLEY et RICARD, 1988)
<i>Paraconiothyriumminitans</i> (W.A. Campb.)	un parasite fongique obligatoire de <i>Sclerotiniasclerotiorum</i> qui se développe au détriment de son hôte dont il empêche sa prolifération	(VERKLEY et al, 2004)
<i>Penicillium restrictum</i>	a un effet antagoniste sur de nombreux champignons phytopathogènes	

### 2-2- Les facteurs abiotiques

Le climat semble jouer un rôle essentiel sur le développement des champignons et notamment sur *Botrytis cinerea*. Une pluviométrie importante pendant et après la floraison

## Chapitre 3 : Les méthodes de lutte phytosanitaires

---

conditionnerait très précocement l'état physiologique de la pellicule, la rendant plus vulnérable aux attaques de *Botrytis*. La grêle et les pluies violentes peuvent également occasionner des blessures sur baies qui peuvent être alors, colonisées par différentes moisissures (DUBOS, 2002).

### 3-Lutte chimique

La lutte chimique a pris son ampleur considérable grâce au développement de la chimie organique et des pesticides. Elle reste une nécessité économique, à cause des pertes de récolte importantes et en l'absence de la mise en points d'autres méthodes efficaces et économiques.

L'objectif serait de trouver un équilibre entre la sauvegarde des produits agricoles et la protection de la santé publique et l'environnement. Ce genre de lutte utilise principalement les fongicides contre les parasites et les acariens.

#### 3-1-Les fongicides

Les fongicides sont destinés à lutter contre les maladies des plantes provoquées par des champignons ascomycètes, basidiomycètes et des oomycètes, de façon directe ou indirecte.

Ils peuvent être classés selon plusieurs critères : mode d'action biologique (préventif/curatif), comportement dans les plantes (pénétrant, systémique) et leurs structures chimiques.

L'industrie phytosanitaire s'est accordée à classer les fongicides selon leurs modes d'action biochimique (FRAC). Il y a des fongicides dits multi-sites qui affectent plusieurs cibles. D'autres fongicides, dits uni-sites, ont pour cible une protéine essentielle au champignon (LEROUX *et al.*, 2002)

##### 3-1-1-Les fongicides uni-sites

Les fongicides uni-sites sont les plus utilisés actuellement. Ils se caractérisent par une matière active ciblant une protéine cellulaire, perturbant un processus cellulaire donné.

L'un des processus ciblés par les fongicides est la respiration cellulaire qui permet la production d'énergie sous forme d'ATP.

Chez les champignons et les eucaryotes en général, les phases finales se déroulent dans la mitochondrie. Celle-ci contient une série de transporteurs d'électrons (YAMAGUCHI et FUJIMURA, 2005) parmi lesquels cinq complexes protéiques ayant des fonctions enzymatiques cataboliques. Tous les complexes enzymatiques de la chaîne respiratoire, mis à part le complexe IV, constituent les cibles de divers fongicides. Ces derniers ont une action préventive car ils bloquent la germination des spores de champignons et immobilisent les zoospores des Oomycètes

## Chapitre 3 : Les méthodes de lutte phytosanitaires

### 3-1-2- Les fongicides polyvalentes ou multi-sites

Il s'agit de la première classe de fongicides apparus dès le XIX<sup>e</sup> siècle, aux prémices de la lutte chimique, Les premiers fongicides multi-sites étaient à base de cuivre ou de soufre.

L'intégration de la chimie de synthèse dans le domaine de l'agrochimie a permis de développer plusieurs familles chimiques de fongicides multi-sites (LEROUX *et al.*, 2002).

Ils peuvent inhiber les enzymes impliquées dans le catabolisme primaire, le cycle de Krebs ou la chaîne respiratoire. Ils inhibent aussi d'autres processus comme la perméabilité cellulaire. Peu affectés par la sélection de résistances, ces fongicides se caractérisent par leurs effets non sélectifs et une efficacité à forte dose. Par conséquent, ils comportent des risques éco-toxicologiques et toxicologiques pour les organismes non cibles.

**Tableau V :** les différentes familles chimiques de fongicides multi-sites (LEROUX *et al.*, 2002).

Famille chimique	Fongicides
Sulfamides	dichlofluanide, tolyfluanide
Phtalimides	captafol, captane, folpet
Dithiocarbamates	ferbame, mancozebe, manebe, metirame, propinebe, thirame, zinebe, zirame
Chloronitriles	Chlorothalonil
Triazines	anilazine
Guanidines	guazatine, iminoctadine
Quinones	dithianon
Quinoxalines	Chinomethiona te/quinomethionate
Maleimides	fluoroimide
Minéraux	cuivre, soufre

### 3-1-3- Les fongicides anti-*botrytis* autorisés en France

Les différentes familles chimiques utilisées pour lutter contre *Botrytis cinerea* en France se caractérisent par des modes d'actions différentes : Les thiophanates représenté par le *thiophanate méthyl* (WALKER *et al.*, 2013). Il inhibe l'élongation du tube germinatif et la

## Chapitre 3 : Les méthodes de lutte phytosanitaires

---

croissance mycélienne en se fixant sur la  $\beta$ -tubuline (CLEMONS et SISLER, 1971, DAVIDSE, 1973).

Après plusieurs années d'utilisation, des souches résistantes ont été sélectionnées chez *Botrytis cinerea*, la famille des N-phenyl carbamates *diethofencarbe* est largement utilisée contre la pourriture grise en association avec la carbendazime, un benzimidazole.

À cause de l'émergence des souches résistantes, l'utilisation des fongicides anti-microtubules a diminué et ils ont été remplacés par des fongicides d'autres modes d'action.

En France, un seul fongicide multi-site est autorisé. Il s'agit du thirame appartenant à la famille des dithiocarbamates. Son utilisation est limitée à une application par saison à cause de sa faible efficacité contre *Botrytis cinerea*, ainsi que de sa faible pénétration dans la plante.

Le thirame cible plusieurs fonctions thiol des enzymes impliquées dans la respiration des spores.

D'autres fongicides ciblent les enzymes impliqués dans le processus respiratoire : En France, deux fongicides sont autorisés; le premier est le fluazinam qui inhibe la germination des spores et la croissance mycélienne chez *Botrytis cinerea*. Il s'agit d'un découplant de la phosphorylation oxydative. Le fluazinam peut être appliqué une fois par saison.

Le deuxième fongicide est le boscalid, un pyridine-cardoxamide, introduit en France en 2005. C'est un inhibiteur du complexe II (Succinate déshydrogénase). Il bloque le transfert d'électrons du succinate vers l'ubiquinone, en se positionnant dans une zone délimitée par les sous unités de la SDH (SdhB, SdhC et SdhD) (RAMSAY *et al*.,1981). Il existe deux familles chimiques affectant l'osmo-régulation chez *Botrytis cinerea*. Il s'agit des dicarboxamides (Iprodione) et celle des phénylpyrroles représentée par le fludioxonil. Ces deux familles interfèrent avec la signalisation osmotique probablement via une histidine kinase (FILLINGER *et al.*, 2012).

La famille des anilino pyrimidine Pyriméthanil est utilisée aussi comme anti-botrytis. Des études suggèrent que cette famille inhibe la biosynthèse de la méthionine (FRITZ *et al*.,2003).

### 4- Mécanisme de résistance

La résistance à un fongicide peut être due à plusieurs mécanismes de résistance :

#### 4-1-La modification de la cible

Est due à une mutation ou un polymorphisme provoquant le changement de la structure de la protéine cible du fongicide. Elle modifie l'affinité du fongicide pour celle-ci.

### 4-2-La surexpression de la cible

Ce mécanisme engendre une production massive de la cible, ce qui nécessite une dose plus importante de fongicide pour inhiber son activité.

### 4-3-Modification du transport

Il s'agit soit une pénétration réduite, c'est-à-dire le fongicide pénètre dans la cellule à des doses insuffisantes pour inhiber la cible, soit d'une excrétion accrue impliquant des transporteurs membranaires. La surexpression de ce(s) transporteur(s) non sélectif(s) conduit à une sensibilité réduite à des molécules très variées appelée également multi drogue-résistance (MDR).

### 4-4-Le contournement par une voie alternative ou un système secondaire

Est mis en place pour remplacer le système principale qui est enrayé par le fongicide.

### 4-5-La métabolisation

Ce mécanisme permet de métaboliser la matière active en des métabolites moins actifs. Il implique trois superfamilles d'enzymes : des hydrolases, des glutathion-S-transférases et des mono oxygénases à cytochromes P450.

## 5-Les mesures prophylactiques

La prophylaxie représente un ensemble de mesures visant à réduire l'installation et la propagation de l'organisme pathogène. Ces mesures prophylactiques occupent une place importante dans la lutte contre les maladies fongiques. Elles exigent un contrôle de la température, de l'humidité relative et, dans le cas des cultures annuelles, cela implique également la rotation des cultures et des semis sains. Dans le cas concret de la lutte contre la pourriture grise, les mesures suivantes sont conseillées :

- Eliminer les feuilles sénescents et les organes infectés des parcelles et des serres. Le but de cette opération est de diminuer les sources possibles d'inocula primaires (**DECOGNET *et al.*, 2010**). Le retrait des feuilles sénescents dans les serres peut diminuer le nombre des lésions et la mort des plantes d'environ 50% (**ELAD *et al.*, 2004**).
- Augmenter l'aération et l'ensoleillement des grappes des tomates et des vignes par effeuillage (**DECOGNET *et al.*, 2010**) et tailles régulières. Réduire ainsi la densité des plantes diminue les zones de confinement qui entraîneraient l'augmentation de l'humidité relative autour des grappes dans les serres.
- Fertiliser avec modération permet également de réduire le développement de l'organisme pathogène. Plusieurs études ont démontré l'efficacité de ces méthodes

## Chapitre 3 : Les méthodes de lutte phytosanitaires

---

(**DAUGAARD et al., 2003**). Une diminution d'apport en nitrates et une addition de potassium dans le fertilisant réduit significativement la maladie de la pourriture grise causée par *Botrytis cinerea* de 27-30%, tandis que l'ajout de calcium réduit l'incidence de la maladie de 35 à 50%.

**PARTIE**  
**EXPERIMENTALE**

# Chapitre 1 : Matériels et méthode

---

Notre travail a été réalisé au niveau de laboratoire pédagogique en commun de l'université MOULOUD MAMMARI de Tizi-Ouzou, durant la période allant du mois de Mars au mois de juillet de l'année 2017/2018.

## 1-Matériels

### 1-1-Les souches fongiques et bactériennes :

Les souches fongiques utilisées dans cette étude appartiennent à trois genre de moisissures *Aspergillus niger*, *Botrytis cineria* et *Penicillium* sp., et pour les bactéries sont : *Bacillus* sp., et *Pseudomonas* sp. .

Les trois champignons et les souches bactériennes d'année 2015/2016 ont été fournis par Monsieur OUELHADJ.A.

### 1-2-Milieus de culture

- Gélose de sabouraud : Institut Pasteur. Algérie
- Gélose Mueller-Hinton (gélose MH) :Conda Pronadisa. Espagne
- Gélose nutritif (GN)
- Bouillon infusion cœur-cerveille (BHIB) : Himedia. Inde

### 1-3-Solutions et réactifs

- Alcool : Sigma Aldrich. Allemagne
- Eau distillée ;
- Fushine : Fluka Analytical. Allemagne
- Violet de Gentiane : Sigma Aldrich. Allemagne
- Huile à immersion :Biochem Chemopharma. France
- Solution de Lugol : Biochem Chemopharma. Québec
- Rouge de méthyle (RM) : Sigma Aldrich. Allemagne

### 1-4-Appareillage

- Microscope optique : Hondwetzlar. Allemagne.
- Spectrophotomètre: Vis-7220G. Biotech Engineering.Management CO.LTD (UK).
- Etuve : BINDER. Allemagne.
- Balance de précision : KERN 770. Allemagne.
- Autoclave : WEBECO. Allemagne.
- Bain Marie : MEMMERT. Allemagne
- Agitateur à barreau magnétique non chauffant : GERHARDT. Allemagne.

# Chapitre 1 : Matériels et méthode

---

- Réfrigérateur : ENIEM. Algérie.)

## 2-Méthode

### 2-1-Ensemencement

Dans le BHIB on a repiqué les souches bactériennes pour les reviviez pendant 24 h à 37°C après 24h de revivication, on ensemence une quantité de BHIB contenant les souches bactériennes dans le milieu GN et on l'incube une autre fois dans 37°C durant 24h.

### 2-2-Examen macroscopique

L'aspect des colonies est observé après culture pendant 24 heures à 37 °C sur le milieu GN. L'observation de l'aspect macroscopique des colonies permet d'effectuer une première caractérisation, avec une orientation possible des résultats au cours de l'identification.

Dans notre cas, l'étude macroscopique a été réalisée dans le but d'assurer la pureté de nos ensemencements le fait qu'ils sont déjà identifiés, en tenant compte de : La forme des colonies : rondes, irrégulières,...etc. La taille par la mesure du diamètre (punctiformes ou non punctiformes), La chromogénèse ( couleur de la colonie.), l'élévation ( convexe, concave, plate), l'opacité ( opaque, translucide ou transparente) et la surface ( lisse, rugueuse, sèche...etc).

### 2-2-Examen microscopique

A partir des deux souches pures, une toute petite quantité de bactéries a été prélevée pour effectuer l'observation microscopique des caractères morphologiques des cellules. Cette étude nous a permis de distinguer entre les différentes espèces bactériennes par rapport à l'agencement et la forme de leurs cellules.

Pour vérifier la pureté des isolats et s'orienter dans l'identification nous avons utilisé la coloration de Gram.

La coloration de Gram est un aspect important et essentiel pour l'identification d'une bactérie isolée et la vérification de la pureté de l'isolat. A partir d'une colonie de 24h, un frottis est fixé à la chaleur puis recouvert par le violet de Gentiane pendant une minute, ensuite il est éliminé par l'ajout du Lugol pendant une minute. Le frottis est ensuite décoloré avec de l'éthanol jusqu'à ce que le colorant cesse de s'échapper librement du frottis. A ce stade, les cellules Gram négatives seront incolores et les cellules Gram positives violettes.

Ensuite, le frottis est soumis à une contre coloration de 30 secondes à la fuchsine, pour colorer les cellules Gram négative présentes. Après un bref rinçage, le frottis est séché puis examiné, consécutivement, à l'objectif 40X et à immersion 100 X (SINGLETON, 2005).

# Chapitre 1 : Matériels et méthode

---

## **2-3-Préparation de l'inoculum**

Les tests antifongiques doivent être réalisés à partir des cultures jeunes de (18 à 24heures) pour les bactéries, et (4 à 5jours) pour les champignons.

Des repiquages ont été réalisé dans des boites de pétri contenant la gélose nutritive(GN), incubé à 37 °C pendant 24heures pour les bactéries, et dans des boites de pétri contenant le milieu sabouraud, incubé à 28 °C pendant 4 à 5 jours pour les champignons.

## **2-4-Préparation de la suspension bactérienne**

A partir des cultures jeunes, on prélève 3 à 5 colonies de bactéries et de champignons qu'on va mettre dans un tube contenant l'eau physiologique stérile. On agite pendant quelques secondes. La standardisation de la suspension bactérienne à  $10^7$  UFC /ml, est réalisée à l'aide d'un spectrophotomètre réglé sur une longueur d'onde de 620nm. Selon Mac Farland, on admet une DO comprise entre 0,08 et 0,1 correspond à une concentration de  $10^7$  à  $10^8$  germes/ml, et la standardisation des champignons  $10^6$  UFC / ml et réalisée avec la cellule de malacez sous le microscope photonique à grossissement x40.

## **2-5-Tests d'activités antifongiques**

Les tests d'antagonisme fongique ont été réalisés sur des milieux de cultures solides (Sabouraud) ; en utilisant la méthode des disques de gélose décrite par Patel et Brown (1969). Cette méthode permet le contact direct entre les champignons et les bactéries. Des disques fongiques de 7mm de diamètre provenant d'une jeune culture de 5 jours, ont été déposés au centre des boites gélosées. Trois disques bactériens du même diamètre provenant d'une culture de 24h ont été déposés autour de chaque disque fongique à une distance égale environ 2 cm.

Des témoins négatifs de champignons ont été réalisés en déposant un disque de chaque champignons au centre des boites contenant le milieu sabouraud.

Cette confrontation des bactéries avec les champignons cryptogamiques est suivit chaque deux jours pendant une semaine (jusqu'à que le développement des témoins négatifs des champignons a atteint son maximum dans la boite) à 28°C.

Les observations ont portées sur l'existence ou l'absence d'une inhibition de la croissance mycélienne. Cette dernière a été estimée par la mesure du diamètre moyen de la colonie fongique entourée des disques bactériens et est comparée au diamètre du témoin ne contenant que le disque fongique.

# Chapitre 1 : Matériels et méthode

---

## 2-6-Recherche d'une substance inhibitrice volatile

La recherche d'une substance inhibitrice volatile a été réalisée par l'utilisation de boîtes de Pétri contenant une couche de gélose dans le fond de la boîte et une couche de gélose sur le couvercle : Le champignon est ensemencé dans le fond de la boîte sur le milieu sabouraud. La bactérie est ensemencée dans la boîte contenant le milieu MH sur le couvercle. Les boîtes témoins ne sont pas ensemencées avec la bactérie.

## 2-7-Test d'antagonisme *in vivo*

Le test d'antagonisme *in vivo* a été effectué en testant l'activité de *Bacillus* sp., et *Pseudomonas* sp., sur les piments infectés par *Botrytis cinerea* agent de la « pourriture grise ». Ce champignon possède un large spectre d'action et infecte les feuilles et les fruits de nombreuses plantes (ADAM, 2008).

## 2-8-Préparation des plantes de piment

On a prit douze plantes de même taille

- **Les étapes suivies pour le test**

Préparation des témoins : trois plantes de piment en été misent dans un pot ne contient ni champignon, ni bactérie.

Trois autre plantes ont été contaminées par le champignon *Botrytis cinerea* au niveau des feuilles, provenant d'une culture de cinq jours.

Pulvérisation : la pulvérisation a été effectuée en prenant six nouvelles plantes contaminés par le champignon *Botrytis*, ensuite chacune est inoculée de la suspension bactérienne standardisée à l'aide d'une seringue dont trois par *Bacillus* sp., et trois restantes par *Pseudomonas* sp.,.

Les observations ont portées sur l'existence ou l'absence de la croissance mycélienne au niveau des feuilles pulvérisées en comparant avec les feuilles contaminées et les témoins négatifs, pendant 20 jours.

## 2-9-Analyse statistique

L'analyse statistique de taux d'inhibition a été réalisée par le logiciel EXCEL, en calculant la moyenne et l'écart-type.

### I-Résultats

#### 1-Critères morphologiques

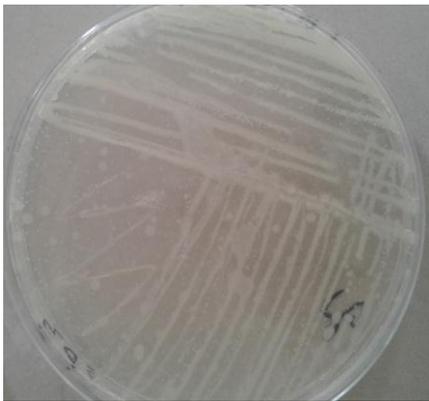
##### 1-1-Examen macroscopique

La culture de deux souches cultivées sur les boîtes de Pétri observées à l'œil nu, qui y a pour but de caractériser la forme, la taille, la couleur, l'opacité, le contour, le relief, ainsi que la surface des colonies.

Les critères morphologiques des deux souches bactériennes cultivées sur milieu gélose nutritive (GN) sont représentés dans le **tableau VI**.

**Tableau VI:** Résultats de l'examen macroscopique des souches bactériennes utilisés sur milieu GN à 37 °C pendant 24h.

Bactéries	Forme	Conteur	Relief	Taille	Surface	Couleur	Opacité
<i>Pseudomonas</i> <b>sp</b>	Bombe	irrégulier		grande	Lisse brillante	verte	opaque
<i>Bacillus</i> <b>sp</b>	irréguliere	irrégulier	Légèrement convexe	petite	Lisse brillante	Blanche jaunâtre	Opaque



**Figure 11 :** *Bacillus* sp., cultivé sur milieu GN



**Figure 12:** *Pseudomonas* sp., cultivé sur milieu GN

## Chapitre 2 : Résultats et discussion

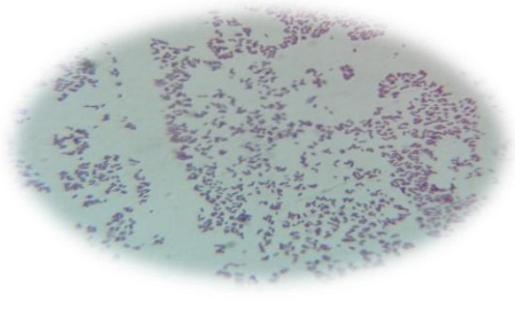
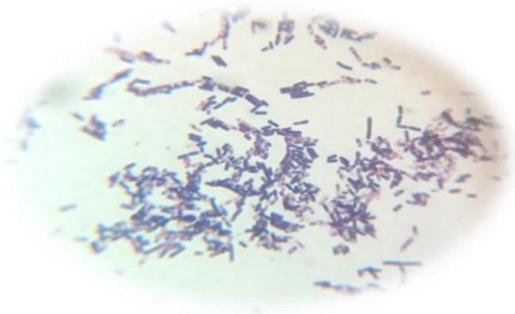
### 1-2-Examen microscopique

L'étude microscopique est basée sur la coloration de Gram, Cette technique nous a permis de distinguer entre bactéries Gram négatifs et des bactéries Gram positif qui apparaissent sous deux formes. Cette observation a montré que la souche 1 qui représente la bactérie *Pseudomonas* sp., apparue sous forme des petits bacilles roses. Elles possèdent des parois à Gram négatif. Chez les bactéries à Gram négatif, l'alcool mis au contact de cellules colorées, solubilise les lipides de leur paroi. Ces derniers sont alors perdus et la paroi devient poreuse, puis la Fushine va occuper la place des phospholipides solubilisés et donne une couleur rose.

La souche 2 représentée par la bactérie *Bacillus* sp., est un long bacille de forme régulière et souvent en courte chaîne. C'est un bacille Gram positif qui est mobile, aéroanaérobie facultatif et qui forme des spores non déformantes. Les *Bacillus* sp., se développent sur des géloses ordinaires.

Les résultats de l'examen microscopique sont illustrés dans le **tableau**.

**Tableau VII** : résultats de l'examen microscopique des souches bactériennes

Souches	Coloration de Gram			
	Forme	Gram	Agencement	Aspect microscopique
<i>Pseudomonas</i> sp	Petits bacilles	Négatif	Isoles :Diplobacilles	
<i>Bacillus</i> sp	Gros bacilles	Positif	En chaînette	

## Chapitre 2 : Résultats et discussion

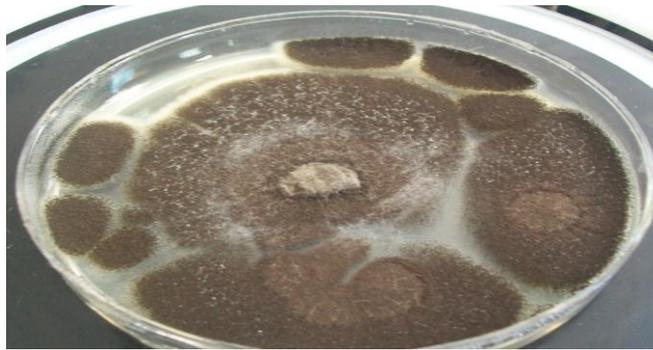
--	--	--	--	--

### **2-*Aspergillus niger***

#### **2-1-Morphologie macroscopique**

Ce champignon pousse rapidement (2-3 jours) sur les milieux de culture classiques (géloses au malt et Sabouraud). La température optimale de croissance varie généralement entre 25 et 30°C, mais cette espèce peut se développer jusqu'à 42°C.

Les colonies d'*Aspergillus niger* sont granuleuses, blanches au début, puis jaunes et, à maturité, elles deviennent noires. Le revers des colonies est incolore ou jaune pâle.

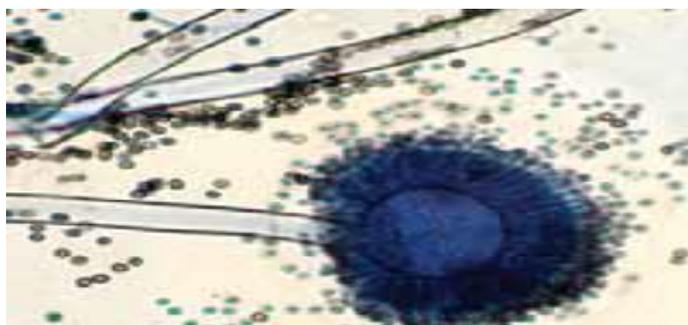


**Figure13 :** *Aspergillus niger* cultivé sur milieu sabouraud

#### **2-2-Morphologie microscopique**

Les têtes conidiennes, bisériées, radiées, sont disposées en plusieurs colonnes brunâtres ou noires.

Les phialides sont portées par des métules brunâtres, de dimensions variables. Les conidies sont habituellement globuleuses, parfois légèrement aplaties brunes, échinulées à très verruqueuses.

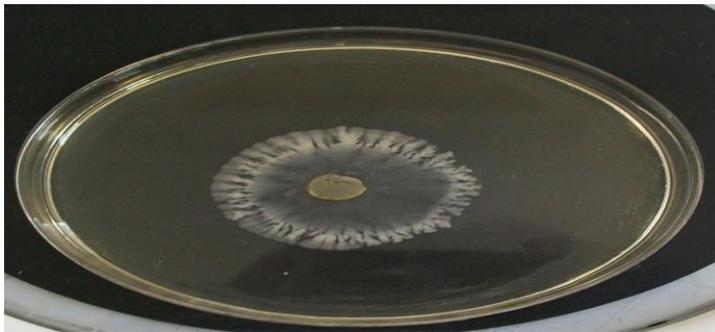


**Figure 14 :** L'aspect microscopique d'*Aspergillus* sous microscope photonique (G × 40)

### 3-*Penicillium* sp.

#### 3-1-Morphologie macroscopique

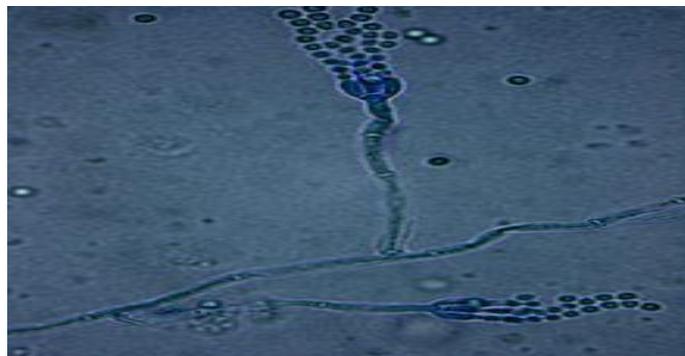
Après 2 jours d'incubation, on observe des petites colonies plates, formées de courts filaments aériens, habituellement blancs. Après 3-4 jours d'incubation, la sporulation va conférer aux colonies leur teinte, le plus souvent dans les tons vert, vert bleu, vert-gris, vert-jaune, gris-bleu mais aussi, pour certaines espèces, jaune, orange, chamois, rose, ou rouge.



**Figure 15 :** *Penicillium* sp cultivé sur milieu sabouraud

#### 3-2-Morphologie microscopique

Le thalle, formé de filaments mycéliens septés et hyalins, porte des conidiophores lisses ou granuleux, simples ou ramifiés qui se terminent par un pécicille. Les conidiospores peuvent être isolés, groupés en faisceaux lâches ou agrégés en corémies bien individualisés



**Figure 16 :** L'aspect microscopique de genre *Penicillium* sp., sous microscope photonique (G × 40)

### 4-*Botrytis cinerea*

#### 4-1-Morphologie macroscopique

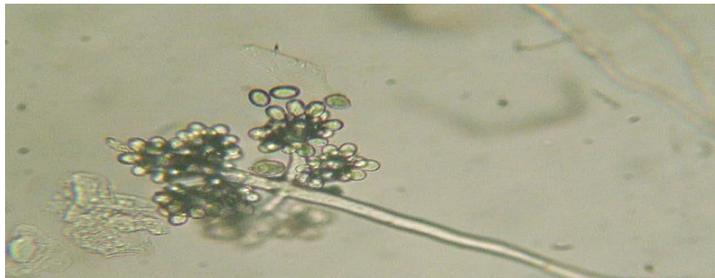
L'aspect macroscopique de *Botrytis cinerea* est présenté par une colonie de couleur brunâtre ayant un développement rasé sur toute la boîte. Les conidiophores dressés grisâtres (gris brunâtre ou gris cendré) présentent des ramifications à leur sommet



**Figure17:** *Botrytis* sur milieu sabouraud

#### 4-2-Morphologie microscopique

Les macroconidies sont ovoïdes contrairement aux micro-conidies qui sont sphériques et de petite taille.



**Figure18 :** L'aspect microscopique de genre de *Botrytis cinerea* à Gx 40 .

### 5-Confrontation du champignon et de la bactérie en boîte de Pétri

Elle permet d'étudier l'activité antifongique des bactéries testée (*Bacillus* sp., et *Pseudomonas* sp.) sur milieu sabouraud envers trois champignons connus pour leur pouvoir phytopathogène : *Aspergillus niger*, *Botrytis cinerea* et *Penicillium* sp.

L'action inhibitrice des bactéries se manifeste par l'apparition d'une zone d'inhibition de la croissance du champignon autour de la colonie bactérienne. Cette zone d'inhibition varie selon l'espèce fongique et la souche bactérienne. Pour chaque confrontation nous avons calculé le

## Chapitre 2 : Résultats et discussion

pourcentage d'inhibition exercé par ces bactéries par la formule de (ALBUQUERQUE, 2006) :

$$I (\%) = \frac{Dt - De}{Dt} \times 100$$

**I (%)** : Inhibition de la croissance fongique en pourcentage

**Dt (mm)** : diamètre de la croissance fongique dans la boîte témoin

**De (mm)** : diamètre de la croissance fongique dans la boîte

Le taux d'inhibition estimé par différentes confrontations sont présentés dans le tableau suivant.

**Tableau VIII:** Taux d'inhibition (%) de la croissance mycélienne (moyenne  $\pm$  écart type)

bactéries champignons	Taux d'inhibition (moyenne $\pm$ écart type )		
	<i>Aspergillus niger</i>	<i>Botrytis cinerea</i>	<i>Penicillium sp</i>
<i>Pseudomonas sp</i>	43 $\pm$ 3,2	66 $\pm$ 3	56 $\pm$ 1,5
<i>Bacillus sp</i>	00 $\pm$ 00	66 $\pm$ 3,5	83 $\pm$ 2,2

La souche utilisée *Pseudomonas sp.*, a une action inhibitrice de la croissance ( $\geq 40\%$ ) sur les trois champignons phytopathogènes par contre la souche *Bacillus sp* inhibe que la croissance de deux champignons phytopathogènes (*Botrytis cinerea* et *Penicillium sp.*).

### 5-1-Action sur *Aspergillus niger*

L'examen des résultats de l'effet des deux souches bactériennes sur le taux de croissance d'*Aspergillus niger* est comme le présentent les photos :

- *Pseudomonas sp.*, prouve que c'est un bon antagoniste selon les zones d'inhibitions formés avec un taux d'inhibition de 43%  $\pm$  0,32
- *Bacillus sp.*, prouve que c'est un agoniste selon les zones d'inhibitions qui ne sont pas formés.



**Figure 19 :** *Aspergillus niger*  
Témoin négatif



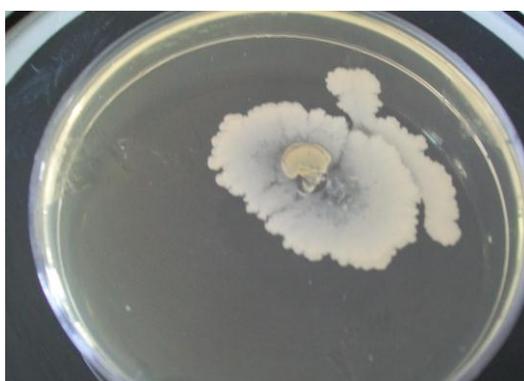
**Figure 20 :** Effet antagoniste de  
*Bacillus* sp., sur *Aspergillus niger*



**Figure 21 :** Effet antagoniste de  
*Pseudomonas* sp., sur l'*Aspergillus niger*

### 5-2-Action sur *Botrytis cinerea*

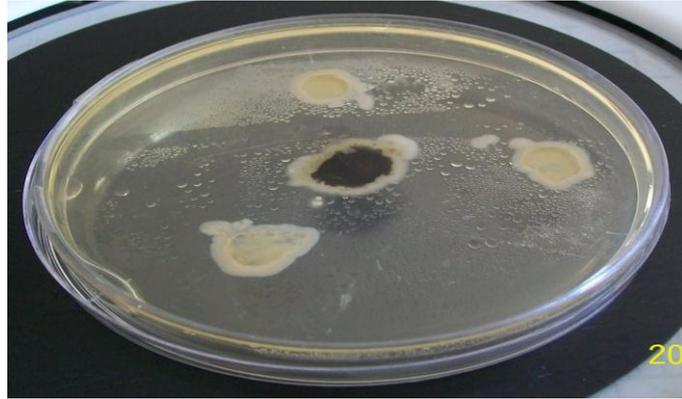
L'action inhibitrice des souches bactériennes sur *Botrytis cinerea* présente des résultats encourageants, il s'agit de *Bacillus* sp et *Pseudomonas* sp avec un taux d'inhibition de croissance mycélium de  $66\% \pm 0,30$



**Figure 22 :** *Botrytis cinerea*  
Témoin négatif



**Figure 23 :** Effet antagoniste de  
*Bacillus* sp., sur *Botrytis cinerea*



**Figure 24** : Effet antagoniste de *Pseudomonas* sp., sur *Botrytis cinerea*

### 5-3- Action sur *Penicillium* sp.

Le pourcentage d'inhibition le plus élevé de la croissance mycélienne de *Penicillium* sp., obtenue avec *Bacillus* sp., est de  $83 \pm 2,28$  alors que pour *Pseudomonas* sp., a présenté un pourcentage moyen d'environ  $56 \pm 1,52$  % comme les photos représentent.



**Figure 25** : *Penicillium* sp.,  
Témoin négatif



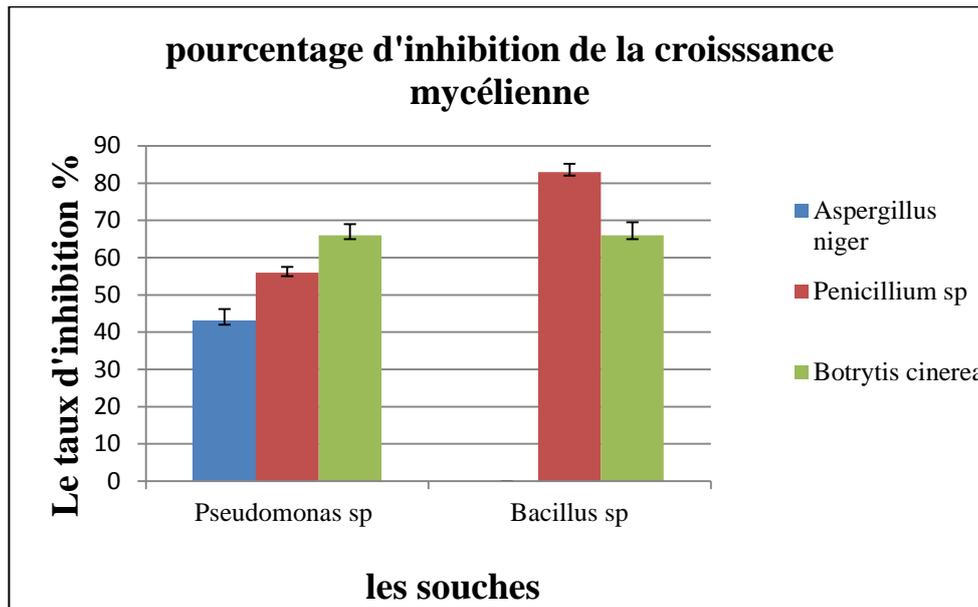
**Figure 26** : Effet antagoniste de *Bacillus* sp., sur *Penicillium* sp.



**Figure 27** : Effet antagoniste de *Pseudomonas* sp., sur *Penicillium* sp.

## Chapitre 2 : Résultats et discussion

Les valeurs de **tableau VIII** nous ont permis de réaliser le diagramme de la (moyenne  $\pm$ écart type)



**Figure 28** : Diagramme représentant les pourcentages d'inhibition de la croissance mycélienne par les bactéries.

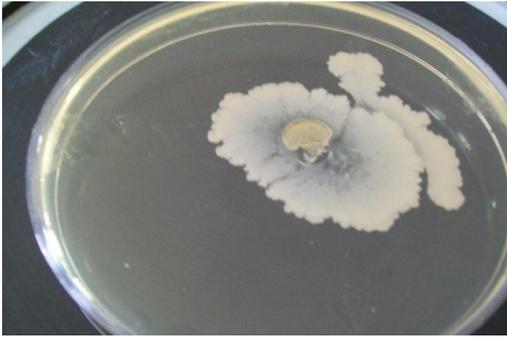
### 6-Activité antifongique des bactéries par les composés volatils :

Cette technique est utilisée pour la mise en évidence des substances volatiles chez les souches *Pseudomonas sp.*, et *Bacillus sp.*, après 10 jours de confrontation, les résultats obtenus nous permettent de calculer le pourcentage d'inhibition de la croissance mycelienne par les composés volatils à partir de la formule décrite par Albuquerque (2006). Les résultats sont présentés dans le **tableau suivant** :

**Tableau IX**: Taux d'inhibition (%) de la croissance mycélienne par les composés volatils (moyenne  $\pm$ écart type)

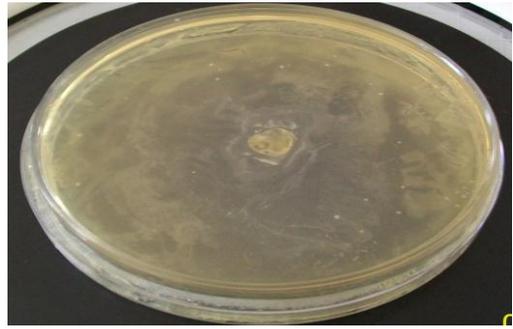
Bactéries Champions	Taux d'inhibition % ( moyenne $\pm$ écart type)		
	<i>Aspergillus Niger</i>	<i>Botrytis Cinerea</i>	<i>Penicillium sp.</i>
<i>Pseudomonas sp.</i>	50 $\pm$ 1,5	10 $\pm$ 1,0	60 $\pm$ 1,0
<i>Bacillus sp.</i>	61 $\pm$ 0,9	87 $\pm$ 1	80 $\pm$ 1,10

L'antagonisme fongique produit par les substances volatiles est retrouvé chez la bactérie *Pseudomonas sp.*, qui a montré une inhibition importante de la croissance de *Botrytis cinerea* avec un taux estimé à 50 %, et pour *Bacillus sp.*, l'effet d'inhibition est aussi remarquable allant de 61 jusqu'à 87% .

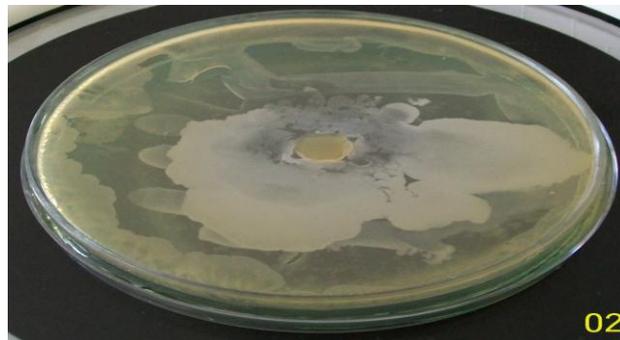


**Figure 29 :** *Botrytis cinerea*

Témoin négatif



**Figure 30 :** Effet antagoniste de *Bacillus* sp., sur *Botrytis cinerea* après 15 jours d'incubation



**Figure 31:** Effet antagoniste de *Pseudomonas* sp., sur *Botrytis cinerea* après 15 jours d'incubation



**Figure 32:** *Aspergillus niger*  
Témoin négatif



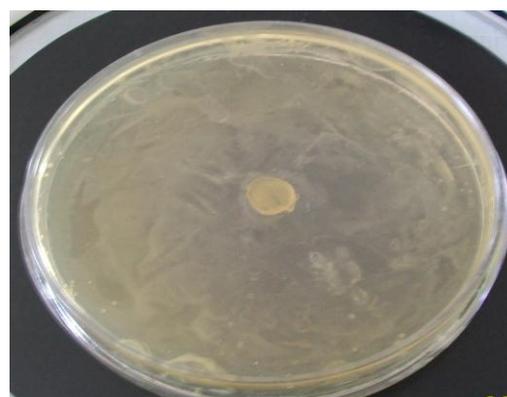
**Figure 33 :** Effet antagoniste de *Bacillus* sp., sur l'*Aspergillus niger* après un temps d'incubation d'environ 15 jours



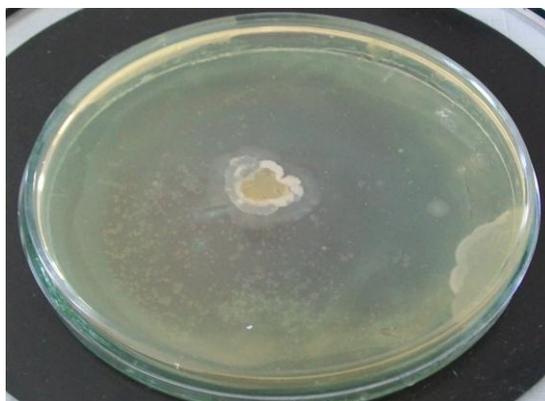
**Figure 34 :** Effet antagoniste de *Pseudomonas* sp., sur *l'Aspergillus niger* après l'incubation après 15 jours d'incubation



**Figure 35 :** *Penicillium* sp  
Témoin négatif



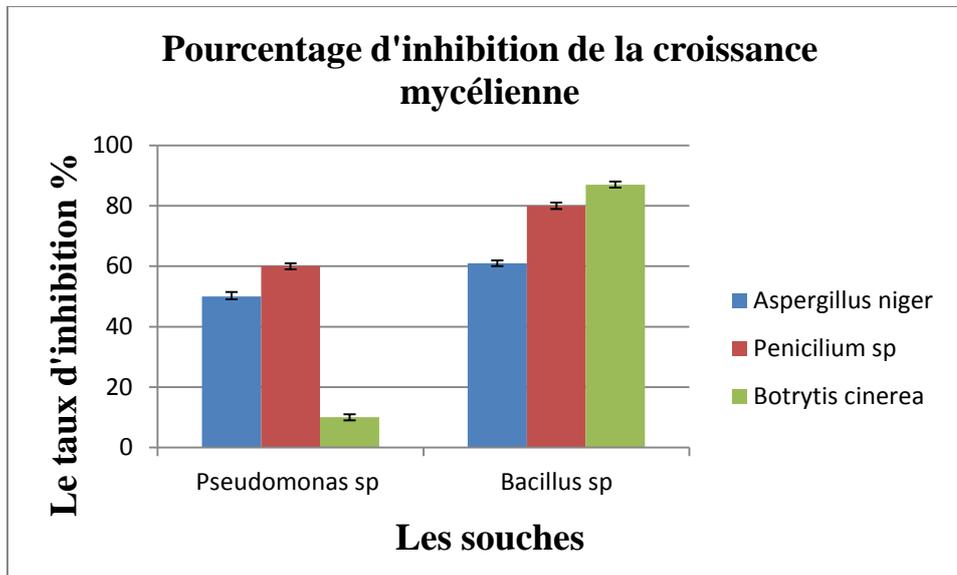
**Figure 36 :** Effet antagoniste de *Bacillus* sp., sur *Penicillium* sp., après 15 jours d'incubation



**Figure 37 :** Effet antagonite de *Pseudomonas* sp., sur *Penicillium* sp., après 15 jours d'incubation

## Chapitre 2 : Résultats et discussion

Les valeurs de **tableau IX** nous ont permis de réaliser le diagramme de la (moyenne  $\pm$ écart type)



**Figure 38 :** Diagramme représentant les pourcentages d’inhibition de la croissance mycélium d’*Aspergillus* ; *Botrytis* et *Penicillium sp.*, en confrontation indirecte avec les bactéries antagonistes.

Les pourcentages d’inhibitions des souches bactériennes varient entre 10 et 87 % ceci montre que l’action des composés volatils sur la croissance des champignons est très importante comme les confrontations directes.

Plusieurs travaux ont démontré que les souches bactériennes non antagonistes sur boîtes (in vitro) sont généralement inactives aussi *in vivo*. Il est donc préférable de passer par des tests *in vitro*, et cela malgré les limites de ces derniers, pour le contrôle in planta (INAM-UL-HAQ *et al.*, 2003). Sur la base de cette hypothèse et suite à nos différents résultats, nous avons choisi de tester pour la suite de notre travail les deux souches bactériennes par les champignons qui porte de bon résultat in vitro qu’il s’agit de *Botrytis cinerea*.

### 7-Evaluation de l'activité antifongique *in vivo*

Pour réaliser ce test on a traité les (six) plantules de piment par pulvérisation avec une suspension bactérienne : (trois) plantules avec *Bacillus* sp., et les (trois) autres avec *Pseudomonas* sp..

Ce traitement des plantules a montré la capacité de ces deux dernières à protéger les plantes de piments pendant l'entreposage, des pourritures occasionnées par *Botrytis cinerea*.



**Figure 39** : La plante du piment traitée par le pathogène *Botrytis cinerea* Témoin positif



**Figure 40** : La plante du piment sans traitement  
Témoin négatif

Après un mois de teste, les résultats *in vivo* ont montrés un développement ordinaire de la plante avec une sécheresse au niveau de quelques feuilles environ 4 sur 12 dans le témoin

## Chapitre 2 : Résultats et discussion

---

positif qui porte le champignon *Botrytis cinerea*, or que au niveau de témoin négatif les feuilles sont saine et en bonne état.



**Figure 41 :** Le devenir des plantes du piments infectées par *Botrytis cinerea* et pulvérisées par *Pseudomonas* sp., après 20 jours d'incubation



**Figure 42:** Le devenir des plantes du piment infectées par *Botrytis cinerea* et Pulvérisées par *Bacillus* sp., après 20 jours d'incubation

## Chapitre 2 : Résultats et discussion

---

Par contre au niveau des feuilles infectées par la moisissure pulvérisées par *Pseudomonas* sp., et *Bacillus* sp., on remarque que le nombre des feuilles malades est moins par rapport au témoin positif et le nombre des feuilles est plus aussi dont on a commencé par quinze(15) à dix-sept (17) feuilles et après un mois la taille des plantes est augmenté jusqu'à 1cm de plus et le nombre des feuilles est arrivé jusqu'à vingt (20) feuilles .

### II-Discission

L'agriculture biologique a été adoptée comme solution alternative à l'agriculture intensive dans le but de diminuer les risques liés à l'usage des pesticides. Il s'agit d'une politique agraire qui exclut l'utilisation des produits phytosanitaire chimique et utilise des traitements naturels dits « biopesticides » (COLEACP, 2011).

Dans notre travail, l'isolement des bactéries antagonistes qu'on les a eu par Mr OUELHADJ.A a été réalisé à partir de la rhizosphère. Ce biotope a été choisi car il se caractérise par un accroissement considérable des populations microbiennes suite à l'abondance des substrats énergétiques. KHAN (1982) et DAVET (1996) ont rapporté que les bactéries sont plus abondantes dans la rhizosphère que dans le sol.

Le genre *Bacillus* par exemple appartient au groupe de rhizobactéries promotrice de la croissance des plantes largement utilisées en agriculture comme agent naturels de bio contrôle (McSPADDEN-GARDNER, 2004).

L'abondance et l'activité des micro-organismes du sol sont influencées par de nombreux facteurs, notamment les facteurs environnementaux. Cependant, la matière organique qui constitue une source de carbone pour les populations microbiennes du sol influence énormément sur la composition de cette microflore. La diversité des microorganismes rhizosphériques de différentes espèces végétales peut être due à la variation des sources de carbone exsudé par ces plantes (GRAYSTON *et al.*, 1998).

Le teste d'antagonisme effectué dans le présent travail, sur sabouraud, au cour de contact direct a permis de sélectionner des isolats développant une activité antifongique vis-à-vis de certaine moisissures phytopathogène en l'occurrence : *Aspergillus niger*, *Botrytis cinerea* et *Penicillium* sp.

Plusieurs études ont décrit des effets antifongiques *in vitro*, des souches de *Bacillus* sp., vis-à vis moisissures phytopathogène (SCHIPPERS et al.,1992,JONGSIK et KYUNG,2000 ;GONG et al.,2006 ;ONGENA et al.,2007).

La souche *Bacillus* sp., avec un taux d'inhibition de 83% et 66% peut êtres un bon antagoniste pour *Penicillium* sp., et *Botrytis cinerea*, et l'un des mécanismes par le quels les *Bacillus*

## Chapitre 2 : Résultats et discussion

---

exercer un effet antifongique est le parasitisme par dégradation des membranes phytopathogènes *b. Licheniformis* (TRACHUCK *et al.*,1996) et *b.Cerculans* (WATANABE *et al.*, 1990) produisent l'enzyme chitinase qui dégrade la chitine .

Grace à cette habilité à dégrader la chitine composant majeur dans la structure des membranes cellulaires des phytopathogènes (SOMEYA *et al.*, 2004), ces enzymes chitinolytiques sont considérés importantes dans le contrôle biologique des pathogènes du sol (SINGH *et al.*,1999).

On peut supposé aussi que la souche *pseudomonas* sp., avec environ 56%et 66% peut représenter comme un bon antagoniste. VANDENBERGH *et al.*(1983) et RAMAMOORTHY *et al.*(2002) ont établi que *Pseudomonas fluorescens* stimulait les mécanismes de défenses des plantes en améliorant leurs résistance à différents phytopathogènes .

Pour le contact indirecte, l'utilisation de boîtes contenant une couche de sabouraud dans le fond de la boîte et une couche de gélose sur le couvercle nous a permet de mettre en évidence la production de substance volatile par les souches *Bacillus* sp., et *Pseudomonas* sp., avec des taux d'inhibitions varies entre 61% à 80% pour *Bacillus* sp., et 50% à 60% pour *Pseudomonas* sp., donc les deux bactéries ont le même effet sur les trois champignons, en produisant les composés volatils. Seules ces substances produites par la bactérie pourront dans cet essai provoquer une inhibition de la croissance du champignon. D'après les résultats qu'on a obtenus à la suite de cette expérience, Il ressort que, malgré l'absence d'un contact direct entre les champignons testés et les souches bactériennes, ces bactéries ont pu exercer une activité inhibitrice sur le développement des champignons phytopathogènes. Ces résultats sont plus importants à ceux obtenu par BOUNOUA (2008) qui a montré la capacité des bactéries de genre *Bacillus* à réduire la croissance de *F.oxysporum* par la production des composés volatiles. De même LOUNACI et ATHMANI-GUEMOURI (2014) ont mis en évidence la production d'une substance volatile par la souche *Paenibacillus polymyxa*. Les composés volatils tels que l'ammoniac et le cyanure d'hydrogène sont produits par un grand nombre de rhizobactéries et jouent un grand rôle dans le biocontrôle (BRIMECOMBLE *et al.*, 2001). ALABOUVETTE *et al.* (1993) ont démontré que l'efficacité d'un agent de contrôle biologique n'était pas due à un seul mécanisme mais une combinaison, de différents modes d'action.

## Chapitre 2 : Résultats et discussion

---

*In vivo*, les plantes de piments soit les témoins négatifs où les échantillons infectés par *Botrytis cinerea* et pulvérisés par *Bacillus* sp., et *Pseudomonas* sp., sont poussés de plus et l'effet de champignon sur ces feuilles est presque négligeable.

La finalité de la bactérisation est d'augmenter le rendement des cultures. Seules certaines souches semblent présenter cette capacité, elles ont été appelées « Plant Growth Promoting Rhizobacteria » (PGPR). L'augmentation de rendement d'une culture bactérisée résulte de deux effets bénéfiques principaux : la stimulation de croissance des plantes et la protection des plantes contre les maladies d'origine tellurique (LEMANCEAU, 1992).

BOSSIS *et al.* (2000) ont rapporté que les bactéries appartenant aux espèces de *Pseudomonas fluorescens* présentent un intérêt potentiel pour l'environnement. Certaines améliorent la croissance et la santé des plantes, et contribuent donc à réduire l'utilisation d'intrants de synthèse en agriculture, ces résultats concordent avec le nôtre.

En effet, Plusieurs espèces microbiennes ont montré leur efficacité dans la promotion de la croissance et la protection des plantes de piment contre les différents ennemis de cultures.

L'effet *in vitro* été confirmé par le test *in vivo*. En effet, nous pouvons dire que l'application foliaire de la souche antagoniste sur les feuilles de piment en présence de l'agent pathogène a abouti à l'absence et/ou la réduction des symptômes de la maladie.

Les essais de lutte biologique à l'aide de ses souches, ont montré qu'il était possible de limiter l'incidence du *Botrytis cinerea*, bien que le niveau de protection ne soit assez important.

Néanmoins, l'utilisation de ce traitement biologique permet de maintenir la maladie à un seuil acceptable, d'autant plus que les mesures prophylactiques préconisées seront effectivement mises en pratique.

D'autres travaux ont permis de démontrer l'importance de l'action inhibitrice exercée par des souches de *Pseudomonas* sur *Fusariose* du pois chiche (INAM-UL-HAQ *et al.*, 2003).

UPPAL *et al.* (2008) ont noté une réduction significative de l'incidence de la verticilliose sur la culture de la pomme de terre par des souches de *Pseudomonas* sp.

D'autre part, AHMED IDRIS *et al.* (2007) et ZHANG *et al.* (2008) ont signalés que des enzymes du *Bacillus* sp., auraient un rôle dans la lyse hyphale de certains champignons phytopathogènes tels que *Fusarium-oxysporum*, *Rhizoctonia-solani*, *Pythiumultimum* et *Alternaria-solani*.

Dans la majorité des travaux relatifs à l'utilisations de *Pseudomonas* sp., et *Bacillus* sp., la présélection des souches repose en grande partie sur l'activité de l'antagonisme *in vitro*.

## Chapitre 2 : Résultats et discussion

---

Cependant, la corrélation entre les potentialités exhibées *in vitro* et les niveaux des actions de bio contrôle ou de bio stimulation de la croissance végétale, n'est pas toujours évidente (**TOUA, 1996 ; BENCHAABAN *et al.*, 2000**).

Donc, malgré les bon résultats obtenu par *Bacillus* sp., et *Pseudomonas* sp., une certaine différence existe entre les résultats *in vitro* et *in vivo* .

Cette différence de comportement antagoniste des souches bactériennes *in vitro* et *in vivo* à été également signalé par **Mercado-Blanco *et al.* (2004)**, qui ont montré l'absence de corrélation entre le traitement des plantes d'olivier infectés par *V. dahliae* et les essais *in vitro* en présence de *Pseudomonas* sp.

Ces résultats rejoignent ceux de **BURR *et al.* (1978)** qui ont observé que l'effet antagoniste exprimé *in vitro* n'est pas toujours le même dans le sol.

La diminution de l'effet antagoniste par rapport aux confrontation *in vitro* , pourrai s'expliqué par la concentration des nutriments dans la rhizosphère qui diffère du milieu de culture, effectuant ainsi la production de métabolites secondaires nécessitant un certain nombre de carbone (**ELAD et BAKER,1985**).

La variation des niveaux des sources de carbone dans la rhizosphère pourrait êtres une des raisons de la variation des résultats *in vitro* et *in vivo* concernant les mêmes isolats bactériens (**LYNCH, 1999**).

Les mécanismes qui régissent les interactions plante-bactérie-champignon sont complexe, donc il est primordial de ne pas considérer la maladie seulement comme une relation entre la plante hôte et le parasite, mais de tenir compte aussi des organismes non pathogènes de phyllo plant et ou de la rhizosphère. L'équilibre entre ces trois éléments dépend des conditions extérieurs, tel que le climat et la nature de sol (**BORA et OZACTAN, 1998**).

Les essaie effectués *in vitro* et *in vivo* nous en permet de mettre en évidence des effets antagonistes de quelques souches bactériennes. Ces effets antagonistes non négligeables pourraient s'ajouter autres méthodes de lutte chimiques ou génétiques.

Selon **HENNI (1987)** et **OMAR *et al.*,(2006)**, il serait intéressant de combiner la lutte biologique avec lutte chimique à moindre dose , et les testes qu'on a développés peuvent servir de base à la mise en évidence de propriété antibiotiques des *Bacillus* et *Pseudomonas*.

La mise au point d'autre teste permettra de révéler d'autre aspect de l'activité antagoniste des souches bactériennes et de recherche des espèces plus efficaces afin de les utiliser dans la lutte contre les maladies telluriques. Récemment, le mécanisme l'ISR (Induced systemic

## Chapitre 2 : Résultats et discussion

---

résistance) est mis en évidence, en rapport avec la lutte biologique, Il s'agit de la stimulation des mécanismes de défense chez la plante contre les agents pathogènes (**RYU *et al.*, 2004**).

En fin bien qu'il s'agisse d'un domaine de recherche assez récent par rapport à la lutte chimique, nous pensons que des possibilités de lutte biologique s'étendront aux différents types de cultures et espèce végétales, d'ailleurs plusieurs auteurs (**AKKOPRU et DEMIR, 2005 ; HE *et al.* , 2006**) , estime qu'elle sera appelée dans un temps proche à jouer le rôle d'un fongicide .

## Conclusion et perspectives

---

Dans le cadre de notre travail, nous sommes intéressées à l'observation de l'efficacité ou non de deux agents antagonistes appartenant à l'espèce *Pseudomonas* sp., et *Bacillus* sp., isolées à partir des rhizosphères de l'ail et l'origanum vis-à-vis de trois champignons (*Botrytis cinerea*, *Aspergillus niger* et *Penicillium* sp.).

L'effet de l'activité antagoniste des deux souches contre les trois champignons phytopathogènes a été étudié selon la méthode de confrontation directe et la méthode indirecte. Les résultats de la confrontation directe en utilisant *Bacillus* sp., comme agent antagoniste, montrent un pourcentage d'inhibition varie de 66% à 83% selon les espèces phyto-pathogènes testées, et 61% à 80% dans le contact indirect. Cependant, la confrontation directe de *Bacillus* sp., et *Aspergillus niger* n'a donné aucun effet inhibiteur, par contre l'action des composés volatiles sur ce champignon a empêché sa croissance avec un taux d'inhibition de 61%, il en est ressorti que la méthode la plus efficace pour *Bacillus* sur la croissance des champignons était la méthode indirecte par l'action des composés volatiles. Et pour *Pseudomonas* sp., l'étude a montré que lui aussi porte un taux d'inhibition varie de 43% à 56% dans le contact direct et un effet plus dans le contact indirect avec 50% à 60% qui montre encore une fois l'efficacité de la méthode indirecte.

Ces résultats confirment l'importance des molécules produites par ces deux souches dans l'amélioration de la croissance des plantes et le contrôle des pathogènes fongiques. L'utilisation de ces micro-organismes constitue une alternative biologique à l'emploi de produit chimique, essentielle à une agriculture saine et durable dans un souci de protection de l'environnement.

On perspective pour cette étude, il est recommandé :

- L'observation de l'efficacité de l'activité fongique de deux agents antagonistes vis-à-vis les trois souches fongiques a montré que les deux bactéries possèdent une activité antifongique au moins sur l'un de ces champignons.
- L'activité antifongique révélée que la confrontation directe peut engendrer la synthèse des substances inhibitrices de la croissance mycéliennes.
- Malgré l'absence d'un contact direct entre les pathogènes et les souches antagonistes dans le cas de confrontation indirecte, on remarque une diminution de la croissance des mycètes en comparant au témoin négatif.
- Purifier les molécules antifongiques produites par ces isolats et déterminer leur structure.

## Conclusion et perspectives

---

- L'utilisation de *Pseudomonas* sp., et *Bacillus* sp., a montré qu'il était possible de limiter l'incidence du *Botrytis cinerea* ; néanmoins l'utilisation de ce traitement permet de garder la maladie a un seuil acceptable en assurant la croissance des plantes de piments. Afin d'améliorer les niveaux de protection par un agent de bio contrôle, une stratégie consiste à combiner plusieurs micro-organismes. Les combinaisons peuvent être faites en associant, soit des souches de la même espèce, soit de plusieurs espèces différentes.
- La mise en point d'autres testes permettra de révéler d'autres aspects de l'activité antagonistes des souches bactériennes et de recherche des espèces plus efficace afin de les utiliser dans la lutte des maladies telluriques.
- Evaluer l'efficacité de ces agents de lutte biologique potentiels sur une grande échelle (en serre puis en champ).

# Références

- **ADAM A. (2008).** Elicitation de la résistance systémique induite chez la tomate et le concombre et activation de la voie de la lipoxygénase par des rhizobactéries non-pathogènes, Thèse de Doctorat, Université de Liège, Belgique.
- **AHMED IDRIS H., LABUSCHAGNE N., KORSTEN N.(2007).** Screening rhizobacteria for biological control of Fusarium root and crown rot of sorghum in Ethiopia. *Biological control*, 40, pp. 97-106.
- **AIMANIANDA V., BAYRY J., BOZZA S., KNIEMEYER O., PERRUCCIO K., ELLURU S.R., CLAVAUD C., PARIS S., BRAKHAGE A.A., KAVERI S.V., ROMANI L. and LATGE J.-P.( 2009).** Surface hydrophobin prevents immune recognition of airborne fungal spores. *Nature*, 460:1117–1123.
- **AJOUZ S. (2009)** - Estimation du potentiel de résistance de *Botrytis cinerea* à des biofongicides. Thèse Doctorat. Univ. D'Avignon et des Pays de Vaucluse, 213 p.
- **AKKOPRU A., DEMIR S. (2005).** Biological control of Fusarium wilts in tomato caused by Fusarium oxysporum f.sp. lycopersici by AMF Glomus intraradices and some Rhizobacteria. *J. Phytopathology*, 153, pp. 544-550.
- **ALABOUVETTE C., ROUXEL F., LOUVET J. (1980).** Recherche sur la résistance des sols aux maladies. VII. Etude comparative de la germination des chlamydospores de *Fusariumoxysporum* et *Fusariumsolani* au contact de sol résistant et sensible aux fusarioses vasculaires. *Annales de phytopathologie*, 12: 21-30.
- **ALBUQUERQUE C.C., CAMARA T.R., MARIAN R.D., WILLADINO L., MARCELLINO C., ULISSES C.(2006).** Antimicrobial action of the essential oil of *Lippiagracilis*Schauer. *Brazilian Archives of Biologie Archives of Biologie and Technology*. 49: 527-535.
- **ANOFEL.** Aspergilloses. Cours de l'Université Médicale Virtuelle Francophone, 2010-2011.
- **ASGHAR H.N., ZAHIR Z.A., ARSHAD M. (2004).** Screening rhizobacteria for improving the growth, yield and oil content of canola (*Brassica napus* L.). *Aust. J. Res.*, 55, pp. 187-194.
- **BAARLEN P., LEGENDRE L., and KAN J. ( 2004).** Plant defence compounds against *Botrytis* infection, p. 143-161, in: *Botrytis: biology, pathology and control*. Y.
- **BEEVER, R.&P.WEEDS,(2007)** Taxonomy and Genetic Variation of *Botrytis* and *Botryotinia*.In: *Botrytis: Biology, Pathology and Control*.

- **BENCHAABANE M., BAKOUR R., TOUA D., BOUTEKRABT A. (2000).** Mise en evidence de l'effet antagoniste de *Pseudomonas Fluorescent* vis-à-vis de la *Fusariose* vasculaire de la tomate. Bull OEPP/EPPO, 30, pp.243-246.
- **BITTON, B ., BRETON, A ., FEVRE, M ., GAUTHIER, S ., GUY,PH .LARPENT,J.P.,REYMOND, P ., SANGLIER, J.J ., VAYSSIER, Y., VEAU, P.** Moisissures utiles et nuisibles, importance industrielle, 2e Ed. Masson (Paris), 1990. P : 442.
- **BLOEMBERG G. and LUGTENBERG B. (2001).** Molecular basis of plant growth promotion and biocontrol by rhizobacteria. *Cur. Opin. Plant Biol.* **4**: 343-350.
- **BORA, T., OZAKTAN, H. (1998).** Biological control of plant diseases. Izmir, Turkey, Prizma press, 205.
- **BOSSIS E., LEMANCEAU P., LATOUR X., GARDAN L. (2000).** The taxonomy of *Pseudomonas fluorescens* and *Pseudomonas putida*: current status and need for revision. *Agronomie* .20: 51-63.
- **BOTTONE EJ. (2010).** *Bacillus cereus, a Volatile Human Pathogen. Clinical Microbiology Reviews* **23**:382-+.
- **BOUNOUA MOHAMMED DJELLEL. (2008).** Essais d'utilisation des *Pseudomonas* sp. et *Bacillus* sp. Dans le biocontrôle de *Fusariumoxysporumf. sp. lycopersici* sur tomate et *Verticilliumdahliae* sur l'olivier. Mémoire de Magister. Université d'ORAN, Algérie.
- **BRIMECOMBE M.J., ELIEJ D., LYNCH, J. M.(2001).** The effect of root exudates on rhizosphere microbial populations. In: Pinton, R., Varanini.,Nannipieri, P. Ed. The rhizosphere.Mecel Dekker, New York.
- **BRODBENT P., BAKER K.F., WATERWORTH Y. (1971).** Bacteriaand actinomycetes antagonistic to fungal root pathogen in Aystralian soils. Australian journal of Biological Sciences, 24, pp. 925-944.
- **BULL C.T.,M.L WADSWORTH .,K.N SORENSEN., J.Y TAKEMOTO .,R.K AUSTIN ., J.L SMILANICK.(1998)** .Syringomyci E Produced by Biological Control Agents Controls Green Mold on Lemons. *BiologicalControl***12**: 89-95.
- **BUNSTER L.,N.J FOKKEMA et B SCHIPPERS. (1989)** .Effect Of Surface-Active *Pseudomonas* spp.On Leaf Wettability. *Applied And Environmental Microbiology* **55**:1340-1345.

- **BURGI G., LEMIALE V., BAGNULO H. BODEGA E. And AZOULAY E. (2010).** Invasive pulmonary aspergillosis in a hematooncological patient in the intensive care units. *Medicina Intensiva*,34 :459–466.
- **BURR T.J., SCHROTH M.N., SUSLOW T.V.(1978).** Increased potato yields by treatment of seed pieces with specific strains of *Pseudomonas Fluorescens* and *P. putida*. *Phytopathol*, 68, pp.1377-1383.
- **CEUPPENS S, VAN DE WIELE T, RAJKOVIC A, FERRER –CABACERAN T, HEYNDRICKX M, BOON N et UYTENDAELE M .(2012).** Impact of intestinal microbiota and gastrointestinal conditions on the in vitro survival and growth of *Bacillus cereus*. *International Journal Food Microbiol* **155**: 241-246.
- **CHAKER H.( 2012 ).**Régulation de l'adaptation de la bactérie *Pseudomonas aeruginosa* a son hôte : implication des métabolites du tryptophane.
- **CHAMPION R.( 1997) -** Identifier les champignons transmis par les semences. Ed.Editions Quae, France, 398 .
- **CILINDRES C., A.J.Cas CASRTO; CLEMONT P.JEANR. MARCHAL. (2007)** .Influence of *Botrytis cinerea* Infection on Champagne wine proteins (characterized by two-dimensional electrophoresis/immunodetection) and wine foaming properties. *Food Chemistry***103**:139-149.
- **CLAVE D.( 2011).** Fiche technique bactériologie *Pseudomonas aeruginosa* centre toulousain pour le contrôle de qualité en biologie clinique.
- **CLEMONS G.P et H.D SISLER.(1971).**Localization of the site of action of a fungitoxic benomyl derivative. *Pesticide Biochemistry and Physiology***1**:32--43.
- **COLEACP. (2011).** Lutte biologique et protection intégrée. *Source: pip.coleacp.org/files/documents/COLEACP\_Manuel\_10\_FR.pdf.*
- **COLEY-SMITH J.R., and COOKE R.C.( 1971).** Survival and germination of fungal sclerotia. *Annual Review of Phytopathology* 9: 65-92.
- **CORNELIA LASS-FLORL.** The changing face of epidemiology of invasive fungal disease in Europe. *Mycoses*, 52 :197–205, 2008.
- **CORNET, M., FLEURY, L., MASLO, C., BERNARD, J.F. and BRUCKER ,G.** Epidemiology of invasive aspergillosis in france : a six-year multicentric survey in the greater paris area. *Journal of Hospital Infection*, 51 :288–296, 2002.
- **CUTTING SM (2011)** *Bacillus probiotics. Food Microbiology* **28**: 214-220.

- **DAVET P. (1996).** Vie microbienne du sol et production végétale. Institut National de la Recherche Agronomique. Paris. P. 52-57.
- **DAUGAARD H., L SORENSEN , L SORENSEN et B LOSCHENKOHL .(2003)** .Effect of plant spacing, nitrogen fertilisation, post---harvest defoliation and finger harrowing in the control of *Botrytis cinerea* pers. In strawberry. *European Journal of Horticultural Science* **68**: 77-82.
- **DAVIDSE L.C.(1973)** .Antimitotic activity of methyl benzimidazol-2-yl carbamate (MBC) in *Aspergillus nidulans*. *Pesticide Biochemistry and Physiology* **3**: 317-325.
- **DECOGNET V., RAVETTI F.,C MARTIN et A NICOT.(2010).**Improved leaf pruning reduces development of stem cankers caused by grey mould in greenhouse tomatoes. *Agronomy for Sustainable Development* **30**: 465-472.
- **DELAGE N., d'HARLINGUE A ., COLONNA B., CECCALDI ., BOMPEIX G.(2003).** Occurrence of mycotoxins in fruit juices and wines. *Food control*. 14, 225-227.
- **DELARRAS C., 2007.** Microbiologie pratique pour le laboratoire d'analyse de contrôle sanitaire. Médicale international et TEC et DOC, Paris. PP. 112-140.
- **DENNING, D.W.Invasive aspergillosis.(1998).** *Clinical Infectious Diseases*, 26:781–805.
- **DESOUBEAUT G and CHANDENIER. (2010).** *Aspergillus* et maladies aspergillaires. *Feuillets de Biologie*, 51(293):53–63.
- **DEYTIEUX –BELLEAU C, GENY L, ROUDET J, et al.( 2009).** Grape berry skin features related to ontogenic resistance to *Botrytis cinerea*. *European Journal of Plant Pathology*, 125, pp. 551–563.
- **DOSS, R.P., POTTER, S.W., ChASTAGNER, G.A. and CHRISTIAN, J.K.,(1993)**Adhesionof Nongerminated *Botrytis cinerea* Conidia to Several Substrata. *Applied and Environmental Microbiology* **59**:1786-1791.
- **DOSS, R. P., S.W.POTTER,A.H. SOELDNER, J.K. CHRISTIAN & L. E. FUKUNAGA,(1995)** Adhesion of Germlings of *Botrytis cinerea*. *Applied and Environmental Microbiology* **61**: 260-265.
- **DROBNEIWSKI FA. (1993).** *BACILLUS-CEREUS AND RELATED SPECIES.* *Clinical Microbiology Reviews* **6**: 324-338.

- **DROBY S., WISNIEWSKI M., MACARISIN D., and WILSON C. (2009).** Twenty years of postharvest biocontrol research: is it time for a new paradigm? *Postharvest Biology and Technology* 52: 137-145.
- **DUBOS B. (2002).** *Maladies cryptogamiques de la vigne.* 174 pages, Ed. Féret, Bordeaux
- **ELAD YIGAL, 2007.** *Botrytis Biology pathology and control: botrytis spp. and diseases they cause in agricultural systems – an introduction.* The Volcani Center, Bet Dagan, Israel:, pp. 1-6.
- **ELAD Y et A STEWART. (2004)** .Microbial Control of *Botrytis* spp. In: *Botrytis: Biology, Pathology and Control.* Y.
- **ELAD, Y ., BAKER, R.(1985).** The role of competition for iron and carbon in suppression of clamydospores germination of *Fusarium* spp. by *Pseudomonas* spp. *Phytopathology*, 75,pp.1053-1059.
- **ELAD Yet H VOLPIN. (1993).** Reduced Development of Grey Mould (*Botrytis cinerea*) in Bean and Tomato Plants by Calcium Nutrition. *Journal of Phytopathology* 139:146-156.
- **ELAD B.,WILLIAMSON P., TUDZYNSKI and N. DELEN eds. KLUWER ACADEMIC PUBLISHERS, DORDRECHT, THE NETHERLANDS .BUNSTER L., FOKKEMA N.J., and SCHIPPERS B. (1989).** Effect of surface-active *Pseudomonas* spp. on leaf wettability. *Applied and Environmental Microbiology* 55: 1340-1345.
- **ELIZABETH A.B.E., HANDELSMAN J. (1999).** Biocontrol of plant diseases: a (Gram) positive perspective. *Febs Microbiol. Letters*, 171, pp. 1-9.
- **ELMER P. A. G., REGLINSKI T. ( 2006).** Bio suppression of *Botrytis cinerea* in grapes. *Plant Pathology.* 55, 155-177.
- **FAILLE A.(2010).** identification de composes naturels contre *Saprolegnia* sp un champignon pathogene en Aquaculture. arianne faille
- **FILALI A., OUAMMI L., BETBEDER A.M., BAUDRIMONT I., SOULAYMANI R.,BENAYADA A., CREPPY E.E.( 2001).** Ochratoxin A in beverages from Morocco: apreliminary survey. *Food and Additives Contaminant.* 18, 565-568.
- **FILLINGER, S., J. AMSELEM, F. ARTIGUENAVE, A. BILLAUT, M. CHOQUER, A. COULOUX, C. CUOMO, MB. DICKMAN, E.FOURNIER, A.**

- GIOTI, C. GIRAUD, C. KODIRA, L. KOHN, F. LEGEAI, C. LEVIS, E. MAUCELI, C. POMIER JM. PRADIER, E. QUEVILLON, J. ROLLINS, B. SAUGURENS, A. SIMON, M. VIAUD, J. WEISSENBACH, P. WINCHER and MH. LEBRUN. 2007.** The genome projects of the plant pathogenic fungi *Botrytis cinerea* and *Sclerotinia Sclerotiorum*. *Macromolecules of grape and wines*. Edited by Jeandet P., C. Clément and A. Conreux. Lavoisier London, Paris, New York. 125-133.
- **FILLINGER S, LEROUX P, AUCLAIR C, BARREAU C, AL HAJJ C & DEBIEE D, 2008.** Genetic analysis of fenhexamid-resistant field isolates of the phytopathogenic fungus *Botrytis cinerea*. *Antimicrob Agents Chemother* 52, 3933–3940.
  - **FILLINGER S., S AJOUZ, P.C. NICOT, P. LEROUX et M. BARDIN. (2012).** Functional and Structural Comparison of Pyrrolnitrin- and Iprodione-Induced Modifications in the Class III Histidine-Kinase Bos1 Of *Botrytis cinerea*. *PLoS ONE* 7:e42520.
  - **FLORET D. (2009).** Immunization: process of elaborating guidelines and their evolution in France. *Ann Pharm Fr* 67, 219-223.
  - **FRITZ R., C LANEN, F CHAPELAND --LECLERC et LEROUX. (2003).** Effect of the anilinopyrimidine fungicide pyrimethanil on the cystathionine  $\text{O}^6$ -lyase of *Botrytis cinerea*. *Pesticide Biochemistry and Physiology* 77:54-65.
  - **GABRILOTTI C, MONCHIERO M, NEGRE M, SPADARO D et GULLINO ML. (2009).** Effectiveness of control strategies against *Botrytis cinerea* in vineyard and evaluation of the residual fungicide concentrations. *Journal of Environmental Science and Health Part B* 44(4): 389-396
  - **GACEM M. A. (2011).** Contribution à l'étude de l'activité antifongique et antimycotoxigène des extraits méthanolique et aqueux des graines de *Citrullus colocynthis* sur la croissance de quelque moisissure d'altération de blé tendre stocké. *Memoire de Magister en biologie, Université Kasdi Merbah, Ouargla.*
  - **GLUPEZYNSKI, Y VAN LAETHEM, F JACOBS, P LEBECQUE, A MALFROOT, P M TULKENS, F VAN BAMBEKE. 2007.** *Pseudomonas aeruginosa* : résistance et options thérapeutique à l'aube du deuxième millénaire. *ANTIBIOTIQUES*. 189-198

- **GRAF, K., MOHAMMAD KHANI, S., E OTT., MATTNER, F., GASTMEIER, P.,SOHR, D., ZIESING, S.and CHABERNY ,I.F.(2011).** Five-years surveillance of invasive aspergillosis in a university hospital.*BioMed Central Infectious Diseases*, 11:163
- **GRAYSTON S., WANG S., CAMPBELL C.D ., EDWARDS A.C. (1998).** Selective influence of plant species on microbial diversity in the rhizosphere. *Soil Bio. Biochem.* 30 : 369- 378.
- **GUINEBRETIER MH, THOMPSON FL, SOROKIN A, et al. (2008)** .Ecological diversification in the *Bacillus cereus* Group. *Environmental Microbiology* **10**: 851-865.
- **GUINEBRETIER MH, AUGER S, GALLERON N, et al. (2012).** *Bacillus cytotoxicus* sp. nov. is a new thermotolerant species of the *Bacillus cereus* group occasionally associated with food poisoning. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiol* **17**: 17.
- **HE L., CHEN W., LIU Y.( 2006).** Production and partial characterization of bacteriocin- like peptides by *Bacillus licheniformis* ZJU12. *Microbiological Research*, 161, pp. 321-326.
- **HENNI J.( 1987).** Evaluation de l'efficacité de certains champignons antagonistes vis-à-vis de *Verticillium dahlia*. *Crypt. Mycol*, 8, pp. 203-207.
- **HIGHLY T. L. et RIRARD J.(1988).** – Antagonism of *Trichoderma* spp. And *Gliocladium virens* against wood decay fungi. *Sonder druckaus: Material and Organismen* 23. Bd. 1988 Heft 3.
- **HMOUNI A.R, MASSOUI M. et DOUIRA A. M.( 1999)** . - Etude de l'activitéantagoniste de *Trichoderma* spp .et de *Gliocladium* spp. A l'égard de *Botrytis cinerea* agent causal de la pourriture grise de la tomate. *Al Awamia*, 99. 75-92.
- **HOFTE M and de VOS P.( 2006).** Plant pathogenic *Pseudomonas* species. In: *Plant-associated bacteria*. Part. 3, Gnanamanickam, S.S. (Eds). Springer, Netherlands, pp. 507-533
- **HOLLOWAY B. 1992.** *Pseudomonas* in the late twentieth century. In: *Pseudomonas, Molecular Biology and Biotechnology* (E Galli, S Silver, B Witholt,eds), Am Soc Microbiol, Washington, DC, 1-8.
- **HOLZ G.** *Botrytis Biology pathology and control: The ecology of botrytis on plant surfaces*. The Volcani Center, Bet Dagan, Israel: **Elad Yigal, 2007**, pp. 9-24

- **HOUNG H.A., DUC L.H., CUTTING S.M.( 2005).** *The use of bacterial spore formers as probiotics. Fems Microbiology Reviews* 29, 813-835.
- **HOWARD R.J.,J.A GARLAND et W.L.SEAMAN .(1994).**Diseases and Pests of Vegetable Crops in Canada.*The Canadian Phytopathological Society and the Entomological Society of Canada:*590.
- **INAM-ULMHAQ M., JAVED N., AHMAD R., REHMAN A. (2003).** Evaluation of different strains of *Pseudomonas fluorescens* for the biocontrol of *Fusarium* wilt of chickpea. *Pakistan Journal of Plant Pathology*, 2(1), 65-74.
- **IZALLALLEN M.(1997) .** Production des sidérophores chez le Rhizobium et leur rôle dans l'inhibition de certains champignons phytopathogènes. Thèse Doctorat, 84p.
- **JARVIS, W.R. (1992).** Managing diseases in greenhouse crops. American Phytopathological Society, St Paul, MN, p. 288.
  
- **JENSEN GB, HANSAN BM, EILENBERG J et MAHILLON J.(2003) .**The hidden lifestyles of *Bacillus cereus* and relatives. *Environmental Microbiology* 5: 631-640.
- **JOHN M. WHIPPS.(2001).** *Journal of Experimental Botany*, Volume 52, 487–51
- **KHAN MOHAMED Z.(1982).**Physiological and antagonistic activities of Streptomycetes in rhizosphere of some plants. *Egypt. Journal of Phytopathology*. 14 :121-128.
- **KIPNIS E., SAWA T., WIENER-KRONISH J.(2006).** Targeting mechanisms of *Pseudomonas aeruginosa* pathogenesis. *Médecine et maladies infectieuses* 36:78-91.
- **KOTIRANTA A, LOUNATMAA K et HAAPASALO M. (2000) .**Epidemiology and pathogenesis of *Bacillus cereus* infections. *Microbes and Infection* 2: 189-198.
- **KRETSCHMER M., H. H. KASSEMYER, and M. HAHN. (2007).** Age-dependent grey mould susceptibility and tissue specific defence gene activation of grapevine berry skins after infection by *Botrytis cinerea*. *Journal of Phytopathology* 155 (5):258-263.
- **LAMONT I L., MARTIN L W. (2003).** Identification and characterization of novel pyoverdine synthesis genes in *Pseudomonas aeruginosa*. *Microbiology* 149:833-842.
- **LARPENT J-P., LARPENT –GOURAUD M.( 1990)-** Mémento technique de microbiologie :Microorganismes eucaryotes et procaryotes, Structure, Métabolisme, Systématique,Applications industrielles, Milieux de culture et réactifs. 2ème édition, Tec & Doc,Lavoisier, Paris, 417p.

- **LATGE J.P.** *Aspergillus fumigatus* and aspergillosis. *Clinical Microbiology Reviews*,12(2) :310–350, 1999.
- **LECHNER S, MAYR R, FRANCIS KP, et al. (1998)** .*Bacillus weihenstephanensis* sp. nov. is a new psychrotolerant species of the *Bacillus cereus* group. *International Journal of Systematic Bacteriology* **48**: 1373-1382
- **LECLERC H.( 2002)**. Presse therm climat bacteriologie de pseudomonas aeruginosa, Société française d'hydrologie et de climatologie médicales.
- **LEMANCEAU, P. (1992)**. Beneficial effects of rhizobacteria on plants: exemple of fluorescent *Pseudomonas*. *Agronomie*, **12**: 413-437...
- **LEQUETTE Y., GARENAUX E, TAUVERON G, et al. (2011)**. Role Played by Exosporium Glycoproteins in the Surface Properties of *Bacillus cereus* Spores and in Their Adhesion to Stainless Steel. *Applied and Environmental Microbiology* **77**: 4905-4911.
- **LEROUX P.R .,FRITZ D.,DEBIEU C.,ALBERTINI C.,LANEN J.BACH M GREDT & F.CHAPELAND .(2002)**. Mechanisms of resistance to fungicides in field strains of *Botrytis cinerea*. *Pest Management Science***58**: 876-888.
- **LESNE R R.(2002)**. presse therm climat pathogénicié de Pseudomonas aeruginosa En dehors de la mucoviscidose .
- **LOGAN NA (2012)** *Bacillus and relatives in foodborne illness. Journal of Applied Microbiology* **112**: 417-429..
- **LOPEZ DE CERAIN A., GONZALEZ- PENAS E., JIMENEZ A.M., BELLO J. (2002)**.Contribution to the study of ochratoxin A in Spanish wines. *Food and Additives Contaminants*. 19, 1058 –1064.
- **LOUNACI L ; ATHMANI-GUEMOURI S.(2014)**. Action de *Paenibacillus-polymyxa* SGK2 sur quelques champignons de la fusariose du blé dur (*Triticum durum*) en Algérie. *Algerian Journal of Natural Products*. 2: 35-42
- **LYNCH J.M.(1990)**. Some consequences of microbial rhizosphere competence for plant and soil. In: The Rhizosphere. Lynch, J.M. Ed. Wiley, New-york, pp . 1-10.
- **MAGNIN-ROBERT M TROTEL-AZIZ P QUANTINE et D BIAGIANTI S et AZIZ A. (2007)**. Biological control of *Botrytis cinerea* by selected grapevine-associated bacteria and stimulation of chitinase and  $\beta$ -1,3 glucanase activities under field conditions. *European Journal of Plant Pathology* 118(1): 43-57

- **MARGULIS L, JORGENSEN JZ, DOLAN S, K R, RAINEY FA & LO SC. (1998).** The Arthromitus stage of *Bacillus cereus*: Intestinal symbionts of animals. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **95**: 1236-1241.
- **MARTINEZ F., DUBOS et M. FERMAUD 2005:** The role of saprophy and virulence in the populations dynamics of *B. cerea* in vineyard phytopathology .95:692-700. In: Assignation de différents modes de vie au vignoble a certains entités génétiques du champignons phytopathologique *Botrytis cinerea* .Rapport d'activité 2004-2005 *Institut National de la Recherche Agronomique* , Bordeaux-Aquitaine. 56
- **MASIH et, SLEZACK-DESCHAUMES S, MARMARAS I, BARKA EA, VERNET C, ADHOLEY A et PAUL B.(2001).** Characterisation of the yeast *Pichia membranifaciens* and its possible use in the biological control of *Botrytis cinerea*, causing the grey mould disease of grapevine. *FEMS Microbiology Letters* 202(2): 227-232
- **McSpadden-Gardener, B.B. (2004)** Ecology of *Bacillus* and *Paenibacillus* spp. in agricultural systems. *Phytopathology*. 94: 1252-1258.
- **MELINP., I. SUNDH S. HAKANSSON & J Schnürer,(2007).** Biological preservation of plant derived animal feed with antifungal micro-organisms:safety and formulation aspects. *BiotechnolLett***29**: 1147-1154.
- **MERCADO-BLANCO J., RODRIGUEZ-JURADO D., HERVAS A., JIMENEY-DIAZ, R.M.( 2004).** Suppression of Verticilium wilt in olive planting stocks by root-associated *fluorescent Pseudomonas* spp., *Biological control*, 30, pp.474-486.
- **MESAROS N., P NORDMANN., P PLESIAT., M ROUSSEL-DELVALLEZ., J VAN ELDERE., YWEISS C .(2002).**La résistance bactérienne : nouvelle guerre froide. *Le médecin du Québec* 37, (3) :41 49.
- **MESAROS N., P NORDMANN., P PLESIAT., M ROUSSEL-DELVALLEZ., J VAN ELDERE., Y GLUPEZYNSKI., Y VAN LAETHEM., F JACOBS., P LEBECQUE., A MALFROOT., P M TULKENS., F VAN BAMBEKE.(2007).** *Pseudomonas aeruginosa* : résistance et options thérapeutique à l'aube du deuxième millénaire. *ANTIBIOTIQUES*. P.189-198.

- **MESAROS N., P NORDMANN., P PLESIAT., M ROUSSEL-DELVALLEZ., J VAN ELDERE., Y MULVEY M R., A E SIMOR.(2009).**Antimicrobial resistance in hospitals :How concerned should we be ? *Canadian Medical Association Journal* 180(4) :408-415.
- **MEYER J.M., ABDELLAH M.A.(1978).** The fluorescent pigment of *Pseudomonas Fluorescens* biosynthesis, purification and physicochemical properties. *J. Gen. Microbiol*, 107, pp.412-417.
- **MEZAACHE S. (2012).** localisation des déterminants de la suppression de quelques souches de *pseudomonas* isolées de la rhizosphère de la pomme de terre.
- **MILLER J.D., TRENHOLM H.L. (1994).** Mycotoxins In Grain/ Compounds Other Than Aflatoxin. 5, 261-263.
- **MOAYEDI G. et MOSTOWFEIZADETH-GHALAMAFARSA R.(2010)–** Antagonistic Activities of *Trichoderma* spp. on Phytophthora Root Rot of Sugar Beet . 29 (1-2).
- **MOCK M & FOUET A. (2001).** ANTHRAX. *Annual Review of Microbiology* 55: 647-671.
- **MOLS M & ABEE T. (2011)** *Bacillus cereus* responses to acid stress. *Environmental Microbiology* 13: 2835-2843.
- **MOURIA B. , OUAZZANI-TOUHAMI A. , et DOUIRA A.( 2013) .** Effet du compost de *Trichoderma harzianum* sur la suppression de la verticilliose de la tomate. *Journal of Applied Biosciences*, 70 : 5531–5543.
- **MULVEY M R., A E SIMOR.(2009).**Antimicrobial resistance in hospitals :How concerned should we be ? *Canadian Medical Association Journal* 180(4) :408-415.
- **NAKAMURA LK. (1998).** *Bacillus pseudomycooides* sp. nov. *International Journal of Systematic Bacteriology* 48: 1031-1035.
- **OMAR I., O’NEILL T.M., ROSSALL S. (2006).** Biological control of *Fusarium* crown and root of tomato with antagonistic bacteria and integrated control when combined with the fungicide carbendazim. *Plant Pathology*, 55,pp. 92-99.
- **ONGENA M., Jacques P. (2008).** *Bacillus* lipopeptides: versatile weapons for plant disease biocontrol. *Trends Microbiol.* 16:115–125
- **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.

- **OTTENEDER H., MAJERUS P. (2000).** Occurrence of ochratoxin A in wines: influence of the type of wine and its geographical origin. *Food and Additives Contaminants.* 17, 793-798.
- **PALLERONI N.( 1984).** Manual of Systematic Bacteriology. USA, pp. 141–171.
- **PALLERONI, N.J., 1984.** Genus I. *Pseudomonas* Migula 1894. In: Krieg, N.R., Holt, J.G.(Eds.), *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*, vol. I.Williams and Wilkins Co, Baltimore, USA, pp. 141–171.
- **PARIS, S., DEBEAUPUIS, J.P., CRAMERI, R., CAREY,M., FRANCK CHARLES,PREVOST, M.C., SCHMITT, C., PHILIPPE, B.and LATGE, J.P.** Conidial hydrophobins of *Aspergillus fumigatus*. *Applied and Environmental Microbiology*, 69:1581 1588, 2003.
- **PEREZ S., PATTERSON T.F.(2002).**Antifungale resistance in pathogenic fungi. *Clin. Infect. Dis.* 35: 1073-80.
- **PIER, G.B. and RAMPHAL, R. (2005)** *Pseudomonas aeruginosa*. In: Mandell, G.L., Bennett, J.E. and Dolin, R., Eds., *Mandell, Douglas and Bennett's Principles and Practice of Infectious Disease*, 6th Edition, Churchill Livingstone, New York, 2587-2615
- **PLESIAT P. (2011).** GDR *Pseudomonas* centre national de la recherche scientifique
- **POOLE K.(2004).**Efflux-mediated multiresistance in Gram-negative bacteria. *Clin Microbiol Infect.*2004Jan; 10(1):126.
- **PRESCOTT L. M., HARLEY J. P., KLEIN D. A. (2003).** *Microbiologie*. 2<sup>e</sup> éd : De Boeck .France, 671.
- **QUATRESSOUS N.( 2011).** Aspergillose humaine. Épidémiologie, diagnostic biologique, contrôle. Thèse de Doctorat, Université de Limoges, Limoges.
- **RAMAMOORTHY V.,RAGUCHANDER T.,SAMIYAPPEN R.(2002).** Induction of defense-related proteins in tomato roots treated with *Pseudomonas fluorescens* Pf1 and *Fusarium oxysporum* f. sp. lycopersici. *Plant soil*, 239,55-68.
- **REBOUX G., BELLANGER A., ROUSSEL S., GRENOUILLET F., et MILLION L.( 2010).**.- Pollution atmosphérique, Moisissures et habitat : risques pour la santé et espèces impliquées,*Revue française d'allergologie* 50 : 611–620.

- **RIBAUD, P., CHASTANG, C., LATGE, J.P., BAFFROY-LAFFITE, L., PARQUET, N., DEVERGIE, A., ESPEROU, H., SELIMI, F., ROCHA, V., DEROUIN, F., SOCIE, G. and GLUCKMAN, E.** Survival and prognostic factors of invasive aspergillosis after allogeneic bone marrow transplantation. *Clinical Infectious Diseases*, 28(2):322–330, 1999.
- **RYU, C.M., FARAG, M.A., HU, C.H., REDDY, M.S., PARE, P.W. and KLOEPPER, J.W., 2003 a.** Volatiles produced by PGPR elicit plant growth promotion and induced resistance in Arabidopsis, Proceedings of the Sixth International Workshop on Plant Growth Promoting Rhizobacteria 2003, . 436–443.
- **SINGH P.P., SHIN Y.C., PARK C.S., CHUNG Y.R. (1999).** Biological control of *Fusarium* wilt of cucumber by chitinolytic bacteria. *Phytopatology*, 89, 92-99.
- **SOMEYA N., NUMATA S., NAKAJIMA M., HASEBE A., AKUTSU K. (2004).** Influence of rice isolated bacteria on chitinase production by the biocontrol bacteria *Serratia marcescens* strain B-2 and the genetically modified rice epiphytic bacteria. *J. Gen. Plant. Pathol.*, 70, 371-375.
- **SOULEY LIE MOUSTAPHA F S. (2002).** Sensibilité et évolution de la résistance de *Pseudomonas aeruginosa* aux antibiotiques à l'hôpital du point G. Université de BAMAKO Thèse présentée pour obtenir le grade de docteur en pharmacie. 95.
- **STOVER CK., PHAM XQ., ERWIN AL., MIZOGUCHI SD., WARRENER P., HICKEY MJ et al. (2000).** Complete genome sequence of *Pseudomonas aeruginosa* PA01, an opportunistic pathogen. *Nature*; 406(6799) : 959-64.
- **SOUFIANE B. (1998 )**.- Isolement à partir de la rhizosphère des conifères de bactéries et d'actinomycètes antagonistes aux champignons phytopathogènes. Maître ès science (M. Sc.). Univ. Laval, 69.
- **SCHUSTER E., DUNN-COLEMAN N., FRISVAD J C., VAN DIJCK P. W.M. (2002).** On the safety of *Aspergillus niger* – a review. *Appl Microbiol Biotechnol* 59, 426–435.
- **STEINBACH, W.J., STEVENS, D.A., DENNING, D.W. and MOSS, R.B.** Advances against aspergillosis. *Clinical Infectious Diseases*, 37(3) :155–156, 2003.
- **STAATS M., P. VAN BAARLEN and T. A. L. VAN KAM. 2005.** Molecular phylogeny of the plants pathogenic Genus *Botrytis* and the Evolution of Host Specificity. *Molecular Biology and Evolution*. 22 (2):333-340.

- **SCHNEPF, H. E., K. TOMCZAK, J. P. ORTEGA, and H. R. WHITELEY. 1990.** Specificity-determining regions of a lepidopteran-specific insecticidal pro-teïn produced by *Bacillus thuringiensis*. *J. Biological Chemistry*. 265:20923–20930
- **SCHNEPF, E., N. CRICKMORE, J. VAN RIE, D. LERECLUS, J. BAUMETAL., 1998.** *Bacillus thuringiensis* and its pesticidal crystal proteins. *Microbiol. Molecular Biology. Rev.*62:775–806.
- **TOUA D. (1996).** Essais d'utilisation de *Pseudomonas Fluorescent* dans le biocontrôle de *Fusarium oxysporum* et de *Verticillium dahliae* et dans la promotion de la croissance végétale. Thèse Magister . INA, El Harrach, Alger, 138.
- **TOURRASE NJ, HELGASON E, KLEVAN A, et al. (2011)** .Extended and global phylogenetic view of the *Bacillus cereus* group population by combination of MLST, AFLP, and MLEE genotyping data. *Food Microbiology* **28**: 236-244
- **TRACHUK L.A.,REVINA L.P.,SHEMYAKAINA T.M.,CHESTUKINA G.G.,STEPANOVE V.M.(1996).**Chitinase of bacillus licheniformis B-6839: isolation and properties.*Can.J.Microbiol.*,42,pp.307-315.
- **TROTEL-AZIZ P, COUDERCHET M, BIAGIANTI S et AZIZ A (2008).** Characterization of new bacterial biocontrol agents *Acinetobacter*, *Bacillus*, *Pantoea* and *Pseudomonas* spp. mediating grapevine resistance against *Botrytis cinerea*. *Environmental and Experimental Botany* 64(1): 21–32
- **TRONSMOA Y et STAAS J., 1980** - Biological control of *Botrytis cinerea* on apple. *Plant Disease*, 64:1009.
- **TULKENS., F VAN BAMBEKE.(2007).** *Pseudomonas aeruginosa* : résistance et options thérapeutique à l'aube du deuxième millénaire. *ANTIBIOTIQUES*. P.189-198
- **TABUC C.** Flore Fongique De Différents Substrats Et Conditions Optimales De Production Des Mycotoxines.(2007). Thèse De Doctorat D'université: Pathologie, Mycologie, Génétique Et Nutrition. Toulouse:L'institut National Poly Technique Et De L'université De Bucarest. France. 190.
- **UPPAL,A.K, EL-HADRAMI,A., ADAM,L. R., TENUTA,M., DAAYF, F.,2008.** Biological control of potato *Verticillium* wilt under controlled and field condition using selected bacterial antagonists and plant extract. *Biological control*, 44,pp. 90-100.

- **UYTTENDAELE. M.(2012)** Impact of intestinal microbiota and gastrointestinal conditions on the in vitro survival and growth of *Bacillus cereus*. *International Journal Food Microbiology* **155**: 241-246.
- **VANDENBERGH P.A.,GONZALEZ C.F.,WRIGHT A.M.,KUNKA B.S.(1983).**Iron.chelating compounds produced by soil pseudomonads : correction with fungal growth inhibition *Applied and Environmental Microbiology.*,46,pp.128-132.
- **VAN DER HEIJDEN M.G.A., BARDGETT R.D. and VAN STRAALEN N.M.( 2008).** The unseen majority: soil microbes as drivers of plant diversity and productivity in terrestrial ecosystems. *Ecology Letters.* **11**: 296-310.
- **VASIL M L.(1986).** Pseudomonas aeruginosa: biology, mechanisms of virulence, epidemiology. *JPediatr* 108, 800-805.
- **VAUBOURDOLLE M., 2007.** Infectiologie. 3e Ed, LE MONITEUR INTERNAT,Paris. p 436.
- **VERKLEY G.J.M., DA SILVA M., WICKLOW D.T. et CROUS P.W., 2004** Paraconiothyrium, a new genus to accommodate the mycoparasite *Coniothyrium minitans*, anamorphs of *Paraphaeosphaeria*, and four new species. *Studies in mycology*, 50: 323–335.
- **VILAIN S, LUO Y, HILDRETH MB & BROZEL VS. (2006).** Analysis of the life cycle of the soil saprophyte *Bacillus cereus* in liquid soil extract and in soil. *Applied and Environmental Microbiology* **72**: 4970- 4977.
- **VISCA P., IMPERI F., LAMONT I L.(2007).** Pyoverdine siderophores: from biogenesis to biosignificance. *Trends Microbiol.* 15: 22–30.
- **Walker, A.-S., A.I.Gautier, J.Confais,D.Martinho,M.Viaud,P.Le Pecheur,J.Dupont & E.Fournier, (2011)** Botrytis pseudocinerea, a New Cryptic Species Causing Gray Mold in FrenchVineyards in Sympatry with Botrytis cinerea. *Phytopathology* **101**:1433-1445.
- **Walker,A.-S.,A.Micoud,F.Rémuson,J.Grosman,M.Gred & P.Leroux,(2013)** French vineyards provide information that opens ways for effective resistance management of Botrytis cinerea (grey mould). *Pest Management Science* **69**: 667-678.

- **WEISS C .(2002).** La résistance bactérienne : nouvelle guerre froide. *Le médecin du Québec* 37, (3) :41-49.
- **WILLIAMSON, B., B.TUDZYNSKI, P.TUDZYNSKI & J.VAN KAN, (2007)** Botrytis cinerea: the Cause of grey mould disease. *Mol Plant Pathol* 8: 561---580.
- **WILLIAMSON, C. E., H. J. DE LANGE,AND D. M. LEECH. (2007).** Do zooplankton contribute to an ultraviolet clear-water phase in lakes? *Limnol. Oceanogr.*52:662–667.
- **YAMAGUCHI,I.& M.FUJIMURA,(2005)**Recent Topics on Action Mechanisms of Fungicides.*Journal of Pesticide Science* 30: 67-74.
- **YOBREGAT., O.** Les fiches pratiques La production de plante la vigne en pépinières .Institut français de la vigne et du vin de Midi-Pyrenees.France.Sp6.
- **YOUNG, R.C.,BENETT, J.E.,VOGEL, C.L., CARBONE, P.P. and DEVITA,V.T.** Aspergillosis – the spectrum of the disease in 98 patients. *Medicine*, 49(2) :147–173, 1970.
- **ZHANG S., RAZA W., YANG X., HU L., HUANG Q., XU Y., LIU X., RAN , W., SHEN Q.(2008).** Control of *Fusarium* wilt disease of cucumber plants with the application of a bioorganic fertilizer. *Biologgy and Fertility of Soils*, 44,pp. 296-304.

Rferences via le web:

- <https://www.iriisphytoprotection.qc.ca/Fiche/Champignon?imageId=8229>
- <https://www.alamyimages.fr/photo-image-la-moisissure-grise-botrytis-cinerea-developpe-sur-piments-recoltes-99931391.html>
- <http://ephytia.inra.fr/fr/C/8072/Courgette-courges-Principaux-symptomes>



# ANNEXE

## **Annexe 1**

### **Composition des solutions et milieux de culture utilisés**

- **Eau physiologique stérile (composition en g/l)**

Chlorure de sodium (NaCl) .....9 g.

Eau distillée .....1000 ml.

pH = 7.

stérilisation à 120 °C/15 min.

- **Gélose nutritive (composition en g/l).Extrait de viande 1,0g**

Extrait de levure .....2,0 g

Peptone ..... 5,0 g

Chlorure de sodium .....5,0 g

Agar .....15,0 g

Eau distillée .....1000 ml

pH =7,4

- **Gélose Mueller Hinton (composition en g/l)**

Extrait de viande .....3 g

Amidon .....1,5 g

Hydrolysate acide de caséine .....17,5 g

Agar .....18 g

Eau distillée .....1000 ml

pH = 7,4

- **Milieu SABOUREAUD**

Peptone .....10 g

Agar .....20 g

Glucose .....20 g

Eau distillée .....1 000 ml

pH = 7,0

pH=8, pH=11 pour l'étude de l'effet de Ph sur l'activité antifongique

- **Bouillon nutritif :**

Peptone .....15g  
 Extrait de .....5g  
 NaCl.....5g  
 Eau distillée .....1000ml

pH= 7

**Annexe 2**

**A/ Résultats des diamètres d'inhibition en mm (moyenne ± écart type) de la croissance mycélienne par confrontation directe.**

bactéries champignons	Taux d'inhibition (moyenne ± écart type )		
	<i>Aspergillus niger</i>	<i>Botrytis cinerea</i>	<i>Penicillium sp</i>
<i>Pseudomonas sp</i>	43 ± 3,2	66 ± 3	56 ± 1,5
<i>Bacillus sp</i>	00 ± 00	66 ± 3,5	83 ± 2,2

**B/Résultats des diamètres d'inhibition en mm ((moyenne ± écart type) de la croissance mycélienne par confrontation indirect.**

Bactéries Champions	Taus d'inhibition % ( moyenne± écart type)		
	<i>Aspergillus Niger</i>	<i>Botrytis Cinerea</i>	<i>Penicillium sp</i>
<i>Pseudomonas sp</i>	50 ±1,5	10 ± 1,0	60 ± 1,0
<i>Bacillus sp</i>	61 ± 0,9	87 ± 1	80 ± 1,10