

الجمهورية الجزائرية الديمقراطية الشعبية

République Algérienne Démocratique et Populaire

وزارة التعليم العالي والبحث العلمي

Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique
Centre Universitaire Salhi Ahmed – NAAMA
Institut des Sciences et de Technologie
Département des Sciences de la Nature et de la Vie



En vue de l'obtention du diplôme de MASTER Académique

En : science biologique

Spécialité : MICROBIOLOGIE APPLIQUEE

Présenté Par : *M^{elle}*. BOUSSAG Norelhouda

M^{elle}. BOUZAR Khadidja

Intitulé

Essais de lutte biologique contre la fusariose et la pourriture grise de la tomate
***Solanum lycopersicum* par trois souches de *Bacillus subtilis* et deux**
huiles essentielles *Ammoides verticillata* et *Artemisia judaica* dans la région de
Ain Sefra -wilaya de Naama-

Soutenu, devant le jury composé de :

Président	M. SEDDIKI Sidi Mohammed	M.C.A	Centre Universitaire Salhi Ahmed – NAAMA
Encadreur	M.KEBDANI Mohamed	M.C.B	Centre Universitaire Salhi Ahmed – NAAMA
Co-encadreur	M.GHERIB Mohammed	M.C.A	Centre Universitaire Salhi Ahmed – NAAMA
Examineur	M. AMROUCHE Abdelilah	Professeur	Centre Universitaire Salhi Ahmed – NAAMA

Session : Juillet 2021
Promotion : 2020/2021

REMERCIEMENTS

Avant tout propos, nos remerciements infinis sont adressés à Dieu le tout puissant et miséricordieux de nous 'avoir donné la force et le courage de mener ce travail à terme.

Nous tenons tout d'abord à exprimer notre éternelle et profonde gratitude à nos chers parents pour leur aide précieux, leur dévouement et leurs encouragements.

Nous adressons nos sincères remerciements à notre promoteur Mr. Kébdani Mohammed qui a dirigé ce travail avec une grande rigueur scientifique, et notre co-promoteur Mr. Gherib Mohammed pour leurs confiance, leurs soutien, leurs conseils avisés et leurs échanges d'idées qui nous ont permis d'effectuer notre travail dans les meilleures conditions.

Nous remercions les membres du jury, Mr Amrouche et Mr Seddiki chacun de sa manière, d'évaluer et juger notre travail, qu'ils trouvent ici l'expression de nos respectueuses reconnaissances.

De même, nous tenons à exprimer nos sincères remerciements à tous nos enseignants du centre universitaire.

Et à toute l'équipe du laboratoire de centre universitaire de Naama « Salhi Ahmed » pour leur accueil, leur sympathie et leurs pensées d'encouragement en tout temps.

Nous remercions à toute nos promotion de qui nous ont poussés et Enfin, merci à toutes les personnes qui nous ont aidé de près ou de loin.



Dédicace

Je dédie ce travail, à tous ceux qui me sont chers.

À ma chère maman: qui m'a donné la vie.

*A mon père : qui s'est sacrifié pour mon bonheur et ma
réussite.*

A ma grande mère

*Que Dieu tout puissant préserve vos sourires et vous
assure une bonne santé et une longue vie.*

A mes chers sœurs : Karima, Fatna, Asma, Sarra.

A mon cher frère : Abd El Nour.

*A mes chers amies : Nassima, Hanane, Mounira, Karima,
Amina, Djawida.*

Et aussi mon binôme Nor El Houda et sa famille

« Boussag »

KHADIDJA

Dédicace

Je dédie ce travail

A mes chers parents,

En guise de gratitude pour tout leur

sacrifice, soutien, confiance, compréhension et amour.

*Vous êtes les êtres les plus chères à mon cœur, aucun mot
ne pourra exprimer ma gratitude et mon estime pour vous.*

A ma très chère sœur.

A mon frère.

A tous mes vrais amis : Hanane, Mounira, Karima,

Amina, Djawida.

Et aussi mon binôme Khadidja.

NOR EL HOUDA

Abstract

The aim of this work was to evaluate the antifungal potential of three strains of *Bacillus subtilis* species (BM14, B2C, S2DSP) and essential oils of *Ammiodas verticillata* and *Artemisia judaica* in the context of biological control of fungi causing Fusarium head blight and grey mould of tomato.

The study of antagonistic activity showed that *Bacillus subtilis* strains have capacities to reduce or inhibit the mycelial growth of phytopathogenic fungi by different means, with percentages of inhibition varying from 10.77% and 85.42%.

Concerning the evaluation of the antifungal activity of essential oils, we have obtained very encouraging results. In particular, by the essential oil *Ammiodas verticillata* which has an effective activity at low concentrations.

The MIC of the essential oil of *Ammiodas verticillata* was approximately 0.25µl/ml for the three treated fungi, while that of *Artemisia judaica* was 0.5 µl/ml against *Botrytis cinerea*, 2 µl/ml for *Fusarium oxysporum* and 4 µl/ml with *Fusarium solani*.

The results obtained show that in the setting up of a possible control strategy, we would have the possibility to use these strains and essential oils as bio-fungicides against pathogenic fungi of tomato.

Keywords: *Bacillus subtilis*, *Ammiodas verticillata*, *Artemisia judaica*, MIC, essential oil, antifungal activity, biological control.

ملخص

الهدف من هذا العمل هو تقييم الإمكانيات المضادة للفطريات لثلاث سلالات من الأنواع *Bacillus subtilis* (BM14, B2C, S2DSP) والزيوت الأساسية *Artemisia judaica* و *Ammiodas verticillata* في سياق مكافحة البيولوجية ضد الفطريات المسببة للفيوزاريوم والعفن الرمادي للطماطم. أظهرت دراسة نشاط المضاد أن سلالات *Bacillus subtilis* لها القدرة على تقليل أو تثبيط نمو الفطريات الممرضة للنبات، مع نسب من المثبطات تتراوح بشكل عام بين 10.77% إلى 85.42%. فيما يتعلق بتقييم النشاط المضاد للفطريات للزيوت الأساسية، تحصلنا على نتائج مشجعة للغاية. على وجه الخصوص عن طريق الزيت الأساسي *Ammiodas verticillata* الذي كان له نشاط قوي بتركيزات منخفضة. كان الحد الأدنى لتركيز الزيت الأساسي *Ammiodas verticillata* حوالي 0.25 ميكرو لتر / مل للفطريات الثلاثة المعالجة بينما كان *Artemisia judaica* 0.5 ميكرو لتر / مل ضد *Botrytis cinerea*، 2 ميكرو لتر / مل ضد *Fusarium solani* و 4 ميكرو لتر / مل ضد *Fusarium oxysporum*. تظهر النتائج التي تم الحصول عليها أنه عند وضع استراتيجية تحكم، سنكون قادرين على استخدام هذه السلالات والزيوت الأساسية كمبيدات حيوية ضد فطريات الطماطم المسببة للأمراض.

الكلمات المفتاحية: *Bacillus subtilis*، *Ammiodas verticillata*، *Artemisia judaica*، CMI،

الزيوت الأساسية، النشاط المضاد للفطريات، مكافحة البيولوجية.

Résumé

Le but de ce travail était d'évaluer les potentialités antifongiques de trois souches de l'espèce *Bacillus subtilis* (BM14, B2C, S2DSP) et des huiles essentielles d'*Ammiodas verticillata* et d'*Artemisia judaica* dans le cadre de lutte biologique contre les moisissures causales de la fusariose et la pourriture grise de la tomate.

L'étude de l'activité antagoniste a montré que les souches de *Bacillus subtilis* ont des capacités à réduire ou inhiber la croissance mycélienne des champignons phytopathogènes par différents moyens, avec des pourcentages d'inhibitions qui varient en général entre 10.77% à 85.42%.

Concernant l'évaluation de l'activité antifongique des huiles essentielles, Nous avons obtenus des résultats très encourageants. Notamment par l'huile essentielle d'*Ammiodas verticillata* qui possède une activité puissante à de faibles concentrations.

La CMI de l'huile essentielle d' *Ammiodas verticillata* était autour de 0.25µl/ml pour les trois champignons traités alors que celle d'*Artemisia judaica* était de 0.5 µl/ml contre *Botrytis cinerea*, de 2 µl/ml contre *Fusarium oxysporum* et de 4 µl/ml contre *Fusarium solani*.

Les résultats obtenus montrent que lors de la mise en place d'une stratégie de lutte éventuel nous aurions la possibilité d'utiliser ces souches et ces huiles essentielles comme des bio-fongicides contre les champignons pathogènes de la tomate.

Mots clés : *Bacillus subtilis*, *Ammiodas verticillata*, *Artemisia judaica*, CMI, l'huile essentielle, activité antifongique, lutte biologique.

Liste d'abréviation

µl : Microlitre

µl/ml : Microlitre par millilitre

CG/SM : Chromatographie en phase gazeuse couplé par la spectrométrie de masse

cm : centimètre

CMI : Concentration minimale inhibitrice

CO₂ : dioxyde de carbone

CPG : Chromatographie en phase gazeuse

CPG/SM : chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse

D.O : Densité Optique

DMSO : Diméthyl Sulfoxide

g : gramme

GN : Gélose Nutritive

HE : Huile Essentielle

I% : Pourcentage d'inhibition

min : minute

NCBI : National Center for Biotechnology Information.

PCR : Polymerase Chain Reaction

PDA : Pomme de terre dextrose agar

PDAac : Pomme de terre dextrose agar avec l'acide lactique

rpm : rotation par minute

t/h : tonne/hectare

UFC/ml : Unité formant colonie par millilitre

SPSS: Statistical Package for the Social Sciences

Listes des figures

N°	TITRE	PAGE
01	Tomate <i>solanum lycopersicum</i>	5
02	Cycle de vie d'un plant de tomate	7
03	Culture de <i>Fusarium oxysporum</i> sur milieu PDA	10
04	Microconidies asymétriques, légèrement incurvées, disposées en amas à l'extrémité de monophialides solitaire	10
05	Cycle de vie de <i>Fusarium oxysporum</i>	12
06	Symptômes de fusariose	13
07	Cycle général de la maladie flétrissement vasculaire causée par <i>F. oxysporum</i> chez la tomate	13
08	Culture de <i>Fusarium solani</i> sur milieu sabouraud	14
09	Microconidies oblongues ,en têtes ,à l'extrémité de monophialides (1 objectif x20) .nombreuses chlamydospores disposées en courtes chaines et macroconidies en fuseau (2 ,objectif x 40)	15
10	Les symptômes de fusariose	16
11	Cycle infectieux de <i>Fusarium solani</i>	16
12	La culture d'une souche de <i>Botrytis cinerea</i> sur un milieu PDA	17
13	Observation de <i>Botrytis cinerea</i> (forme asexuée) au microscope optique	18
14	Symptômes de la pourriture grise sur tomate	19
15	Cycle de développement (production asexuée) de <i>Botrytis cinerea</i> sur différentes	20
16	Photographie de l'observation microscopique de <i>Bacillus subtilis</i>	24
17	Appareillage utilisé pour l'hydrodistillation de l'huile	30
18	Photo d' <i>Ammoïdes verticillata</i>	31
19	Photo d' <i>Artemisia judaica</i>	33
20	Situation géographique de lieu des prélèvements	38
21	Photos des serres examinées	39
22	Photo représenté le mini- serre	41

23	Photos représentent les étapes de l'étude du pouvoir pathogène	43
24	Photos représentent l'étape de ré-isolement	44
25	Schéma représente la méthode directe	46
26	Photos représentent la manipulation de méthode directe.	46
27	Schéma représente la méthode indirecte.	47
28	Photos représentent la manipulation de méthode indirecte.	47
29	Schéma représente la méthode de filtra	48
30	Photos représentent les différentes étapes de la méthode de filtra	49
31	Situation géographique des lieux des prélèvements	50
32	Montage de type Clevenger	51
33	Photos représentent la préparation des plantes	52
34	Photos représentant le poids d'huile	52
35	Evaluation de l'activité antifongique par la méthode de diffusion.	53
36	Photos représentent le produit phytosanitaire	54
37	Différentes étapes de méthodes de mesure de CMI.	55
38	Symptômes observé de la pourriture grise	58
39	Symptômes observé de La fusariose	59
40	Résultats d'isolement	60
41	Résultats de purification	60
42	Suivi de l'évolution des symptômes sur les plantules inoculées	65
43	Résultats du ré-isolement	65
44	Aspects macroscopique et microscopique des isolats(X40)	67
45	Taux d'inhibitions de la croissance mycélienne de <i>Fusarium oxysporum</i> obtenus par les différentes souches	69

46	Activité antagoniste par confrontation directe des bactéries vis-à-vis <i>Fusarium oxysporum</i>	69
47	Taux d'inhibitions de la croissance mycélienne de <i>Fusarium solani</i> obtenus par les différentes souches	70
48	Activité antagoniste par confrontation directe des bactéries vis-à-vis <i>Fusarium solani</i>	71
49	Taux d'inhibitions de la croissance mycélienne de <i>Botrytis cinerea</i> obtenus par les différentes souches	72
50	Activité antagoniste par confrontation directe des bactéries vis-à-vis <i>Botrytis cinerea</i>	72
51	Taux d'inhibitions de la croissance mycélienne de <i>Fusarium oxysporum</i> obtenus par les différentes souches	74
52	Activité antagoniste par confrontation indirecte des bactéries vis-à-vis <i>Fusarium oxysporum</i>	74
53	Taux d'inhibitions de la croissance mycélienne de <i>Fusarium solani</i> obtenus par les différentes souches	75
54	Activité antagoniste par confrontation indirecte des bactéries vis-à-vis <i>Fusarium solani</i>	75
55	Taux d'inhibitions de la croissance mycélienne de <i>Botrytis cinerea</i> obtenus par les différentes souches	76
56	Activité antagoniste par confrontation indirecte des bactéries antagonistes vis-à-vis <i>Botrytis cinerea</i>	77
57	Taux d'inhibitions de la croissance mycélienne de <i>Fusarium oxysporum</i> obtenus par les différentes souches.	78
58	Taux d'inhibitions de la croissance mycélienne de <i>Fusarium solani</i> obtenus par les différentes souches.	79
59	Taux d'inhibitions de la croissance mycélienne de <i>Botrytis cinerea</i> obtenus par les différentes souches.	80
60	Effet des 03 souches de <i>Bacillus subtilis</i> sur le champignon de <i>Fusarium oxysporum</i> en confrontation directe (objectif x40)	80

61	Effet des 03 souches de <i>Bacillus subtilis</i> sur le champignon de <i>Fusarium oxysporum</i> en confrontation indirecte (objectif x40)	81
62	Effet des 03 souches de <i>Bacillus subtilis</i> sur le champignon de <i>Fusarium solani</i> en confrontation directe (objectif x40)	81
63	Effet des 03 souches de <i>Bacillus subtilis</i> sur le champignon de <i>Fusarium solani</i> en confrontation indirecte (objectif x40)	81
64	Effet des 03 souches de <i>Bacillus subtilis</i> sur le champignon de <i>Botrytis cinerea</i> en confrontation directe (objectif x40)	82
65	Effet des 03 souches de <i>Bacillus subtilis</i> sur le champignon de <i>Botrytis cinerea</i> en confrontation indirecte (objectif x40)	82
66	Huiles essentielle de <i>Artemisia judaica</i> A et <i>Ammoides verticillata</i> B	85
67	Résultats de méthode de diffusion	87
68	Résultats de tests de fongicide	89
69	Taux d'inhibitions de la croissance mycélienne de <i>Botrytis cinerea</i> obtenus par les différentes concentrations.	93
70	Aspect macroscopique de colonie testée de <i>Botrytis cinerea</i> par la concentration qui correspond à la CMI d'HE d' <i>Ammoides verticillata</i> après 7 jours d'incubation	93
71	Taux d'inhibitions de la croissance mycélienne de <i>Fusarium oxysporum</i> par les différentes concentrations.	94
72	Aspect macroscopique de colonie testée de <i>Fusarium oxysporum</i> par la concentration qui correspond à la CMI d'HE d' <i>Ammoides verticillata</i> après 7 jours d'incubation.	95
73	Taux d'inhibitions de la croissance mycélienne de <i>Fusarium solani</i> par les différentes concentrations.	96
74	Aspect macroscopique de colonie testée de <i>Fusarium solani</i> par la concentration qui correspond à la CMI d'HE d' <i>Ammoides verticillata</i> après 7 jours d'incubation	96

75	Taux d'inhibitions de la croissance mycélienne de <i>Botrytis cinerea</i> obtenus par les différentes concentrations	99
76	Aspect macroscopique de colonie testée de <i>Botrytis cinerea</i> par la concentration de CMI d'HE d' <i>Artemisia judaica</i> après 7 jours d'incubation	100
77	Taux d'inhibitions de la croissance mycélienne de <i>Fusarium oxysporum</i> obtenus par les différentes concentrations	101
78	Aspect macroscopique de colonie testée de <i>Fusarium oxysporum</i> par concentration de CMI d'HE d' <i>Artemisia judaica</i> après 7 jours d'incubation	101
79	Taux d'inhibitions de la croissance mycélienne de <i>Fusarium solani</i> obtenus par les différentes concentrations	102
80	Aspect macroscopique de colonie testée de <i>Fusarium solani</i> par la concentration de CMI d'HE d' <i>Artemisia judaica</i> après 7 jours d'incubation	103

Liste des tableaux

N°	TITRE	PAGE
01	Les principales maladies fongiques de la tomate	8
02	Principaux composés des huiles essentielles et leurs activités biologiques	28
03	Compositions chimiques majeures d'huile essentielle d' <i>Ammoides verticillata</i>	32
04	Compositions chimiques majeures d'huile essentielle d' <i>Artemisia judaica</i>	34
05	Résultat du traitement des séquences des souches bactériennes (B2C- S2DSP-BM14) obtenues après la technique de PCR16S par l'outil BLAST du NCBI	45
06	Les différentes concentrations des huiles	55
07	Résultats d'identification	62
08	Moyennes de la croissance mycélienne et les taux d'inhibitions (%) de <i>Fusarium oxysporum</i> après confrontation directe avec les bactéries antagonistes	69
09	Moyennes de la croissance mycélienne et les taux d'inhibitions de <i>Fusarium solani</i> après confrontation directe avec les bactéries antagonistes	70
10	Moyennes de la croissance mycélienne et les taux d'inhibitions (%) de <i>Botrytis cinerea</i> après confrontation directe avec les bactéries antagonistes	71
11	Moyennes de la croissance mycélienne et les taux d'inhibitions de <i>Fusarium oxysporum</i> après confrontation indirecte avec les bactéries antagonistes	73
12	Moyennes de la croissance mycélienne et leur taux d'inhibitions de <i>Fusarium solani</i> en confrontation indirecte avec les bactéries antagonistes	75
13	Moyennes de la croissance mycélienne et leur taux d'inhibitions <i>Botrytis cinerea</i> en confrontation indirecte avec les bactéries antagonistes	76
14	Moyennes de la croissance mycélienne et les taux d'inhibitions (%) de <i>Fusarium oxysporum</i> par les bactéries antagonistes avec la méthode du filtrat	78
15	Moyennes de la croissance mycélienne et les taux d'inhibitions (%) de <i>Fusarium solani</i> par les bactéries antagonistes avec la méthode du filtrat	78
16	Moyennes de la croissance mycélienne et les taux d'inhibitions (%) de <i>Botrytis cinerea</i> par les bactéries antagonistes avec la méthode du filtrat	79
17	Caractères organoleptiques des huiles essentielles étudiées	85
18	Rendement calculé en (%) pour les deux espèces étudiées	86
19	Traitement statistique des résultats de <i>Botrytis cinerea</i>	91
20	Traitement statistique des résultats de <i>Fusarium oxysporum</i>	91
21	Traitement statistique des résultats de <i>Fusarium solani</i> .	91
22	Croissance mycélienne et le taux d'inhibition de champignon <i>Botrytis cinerea</i> (par rapport aux témoins) en présence de différentes concentrations de huile essentielle d' <i>Ammoides verticillata</i> pendant les 07 jours d'incubation	92
23	Croissance mycélienne et le taux d'inhibition de champignon <i>Fusarium oxysporum</i> (par rapport aux témoins) en présence de différentes concentrations de huile essentielle d' <i>Ammoides verticillata</i> pendant les 07 jours d'incubation	94

24	Croissance mycélienne et le taux d'inhibition de champignon <i>Fusarium solani</i> (par rapport aux témoins) en présence de différentes concentrations de huile essentielle d' <i>Ammoides verticillata</i> pendant les 07 jours d'incubation	95
25	Traitement statistique des résultats de <i>Botrytis cinerea</i> .	97
26	Traitement statistique des résultats de <i>Fusarium oxysporum</i> .	97
27	Traitement statistique des résultats de <i>Fusarium solani</i>	98
28	Croissance mycélienne et le taux d'inhibition des champignon <i>Botrytis cinerea</i> (par rapport aux témoins) en présence de différentes concentrations de huile essentielle d' <i>Artemisia judaica</i> pendant les différentes durée d'incubation	99
29	Croissance mycélienne et le taux d'inhibition de champignon <i>Fusarium oxysporum</i> (par rapport aux témoins) en présences de différente concentrations de huile essentielle d' <i>Artemisia judaica</i> pendant les différentes durée d'incubation	100
30	Croissance mycélienne et le taux d'inhibition de champignon <i>Fusarium solani</i> (parrapport aux témoins) en présence de différentes concentrations de huile essentielle d' <i>Artemisia judaica</i> pendant les différentes durée d'incubation	102

Remerciement

Dédicace

Abstract

ملخص

Résumé

Liste d'abréviation

Liste des figures

Liste des tableaux

Table des matières

Introduction Générale.....	1
Partie bibliographique.....	3
I) Phytopathologie d'origine fongique de la tomate	4
I.1. Généralités sur la Tomate (<i>Solanum lycopersicum</i>).....	4
I.2 .Nomenclature et Classification.....	4
I. 3 .Description de plante.....	4
I.4. Cycle biologique de la tomate.....	5
I.4.1) Germination	5
I.4.2) Croissance.....	6
I.4.3) Floraison	6
I.4.4) Fructification et nouaison des fleurs.....	6
I .4.5) Maturation du fruit.....	6
I.5.Importance économique et production de la tomate.....	7
I.5.1 .Production mondiale de la tomate.....	7

I.5.2. Production nationale de la tomate	7
I.6. Les maladies de la tomate	8
I.6.1. La fusariose.....	9
I.6.1.1. <i>Fusarium oxysporum</i> agent du flétrissement vasculaire	9
a) Caractères cultureux.....	9
b) Caractères morphologique	10
c) Classification.....	10
d) Cycle de vie de <i>Fusarium oxysporum</i>	11
e) Symptômes de la maladie du flétrissement vasculaire	12
f) Cycle général de la maladie	13
I.6.1.2. <i>Fusarium solani</i> agent de la pourriture racinaire.....	13
a) Caractères cultureux	14
b) Caractères morphologique.....	14
c) Classification.....	15
d) Symptômes de la maladie	15
e) Cycle infectieux	16
I.6.2. La pourriture grise	17
I.6.2.1. <i>Botrytis cinerea</i> agent la pourriture grise	17
a) Caractères cultureux	17
b) Caractères morphologique	17
c) Classification.....	18
d) Symptômes de la maladie	18
e) Cycle de développement	19
I.7) Les moyennes de lutte	20

1) La lutte physique	20
2) Lutte génétique.....	20
3) La lutte chimique	21
4) Lutte biologique	21
II) Présentation des deux agents de lutte biologique proposés pour la lutte contre la fusariose et la pourriture grise de la tomate	22
1) Agent antagoniste : La bactérie <i>Bacillus subtilis</i>	22
➤ Genre <i>Bacillus</i>	22
a) Caractères généraux	22
b) Caractères métaboliques.....	22
c) Effets bénéfiques des bactéries du genre <i>Bacillus</i>	23
d) Ecologie.....	23
➤ L'espèce <i>Bacillus subtilis</i>	24
a) Présentation de <i>Bacillus subtilis</i>	24
b) Classification de <i>Bacillus subtilis</i>	24
c) Intérêt de <i>Bacillus subtilis</i>	25
d) Métabolites de <i>Bacillus subtilis</i>	25
2) Les huiles essentielles	26
a) Généralités	26
b) Définition	26
c) Caractéristiques des huiles essentielles	26
➤ Composition chimique des huiles essentielles.....	27
➤ Variabilité de la composition	27
➤ Propriétés physiques	27
➤ Activités biologiques	28

d) Méthodes d'extraction des huiles essentielles	28
1) Extraction par enfleurage	29
2) Extraction au CO ₂ supercritique.....	29
3) Extraction par micro-ondes	29
4) Extraction aux solvants organiques	29
5) L'hydrodiffusion /Entraînement à la vapeur d'eau.....	29
6) Hydrodistillation	30
e) Les plantes étudiées.....	30
❖ <i>Ammoides verticillata</i>	30
1) Présentation de la plante.....	30
2) Nomenclature	30
3) Description botanique.....	31
4) Classification.....	31
5) Composition chimique	32
6) Propriétés thérapeutiques d' <i>Ammoides verticillata</i>	32
❖ <i>Artemisia judaica</i>	32
1) Présentation de la plante	32
2) Nomenclature.....	33
3) Description botanique	33
4) Classification.....	33
5) Composition chimique.....	34
6) Propriétés thérapeutiques d' <i>Artemisia judaica</i>	34
Partie expérimentale	36
I.1.1. Prospection et échantillonnage	37

1) Présentation de zone d'étude	37
2) Prospection des symptômes et prélèvement des échantillons	38
I.1.2. Isolement et identification des germes phytopathogène causales des maladies les plus virulentes dans la région d'étude	39
1) Isolement de l'agent pathogène	39
➤ Désinfection de la surface.....	39
➤ Méthode direct.....	39
➤ Méthode indirect.....	39
2) Purification des isolats.....	40
3) Identification des agents phytopathogènes	40
a) Aspect macroscopique	40
b) Aspect microscopique	40
4) Etude du pouvoir pathogène.....	41
a) Préparation le mini- serre de tomate	41
• Préparation des pots	42
• Préparation des suspensions fongiques.....	42
• Inoculation des plantes	42
• Ré-isolement des champignons.....	43
I.1.3) Essais de lutte biologique	44
➤ Etude du potentiel antagoniste de trois souches de <i>Bacillus subtilis</i> contre les agents causals de la fusariose et la pourriture grise	44
1) Présentation des souches de <i>Bacillus subtilis</i>	44
2) Méthode de Confrontation directe	45
3) Méthode de confrontation indirecte	46
4) Méthode de filtrat.....	47

1) Préparation des filtrats	47
2) Evaluation de l'action du filtrat sur la croissance mycélienne.....	48
➤ Observation microscopique.....	49
I.1.4) Evaluation de l'activité antifongiques de deux huiles essentielles de <i>Ammoides verticillata</i> et <i>Artemisia judaica</i>	49
1) Matériel végétal	49
2) Récolte de matériel végétal	49
3) Préparation des échantillons	50
4) Extraction de l'huile essentielle.....	50
5) Calcul le rendement des huiles essentielles	52
6) Méthodes d'évaluation de l'activité antifongique	53
a) Méthode de diffusion de disque dans un milieu gélosé	53
➤ Préparation de suspension fongique.....	53
b) Méthode de la concentration minimale inhibitrice (CMI).....	54
➤ Préparation des concentrations des huiles.....	54
Résultats et Discussions.....	56
I) Prospection et échantillonnage.....	57
1) Prospection des symptômes et prélèvement des échantillons.....	57
2) Isolement des moisissures responsables de la fusariose et la pourriture grise de la tomate	60
➤ Résultats de la purification.....	60
➤ Identification des agents phytopathogène.....	61
➤ Confirmation de pouvoir pathogène.....	64
II) Essais de lutte biologique.....	68

1) Etude du potentiel antagoniste de trois souches de <i>Bacillus subtilis</i> contre les agents causals de la fusariose et la pourriture grise	68
➤ Activités antagonistes par confrontation directe en boîte de Pétri.....	68
➤ Activités antagonistes par confrontation indirecte.....	73
➤ Méthode de filtra.....	77
➤ Observation microscopique de agent pathogène vis-à-vis l'agent antagoniste	80
2) Evaluation de l'activité antifongiques de deux huiles essentielles de <i>Ammoides verticillata</i> et <i>Artemisia judaica</i>	85
➤ Extraction de l'huile essentielle	85
1) Propriétés organoleptiques des huiles essentielles extraites.....	85
2) Rendement des huiles essentielles.....	86
3) Evaluation de l'activité antifongique	86
➤ Méthode de diffusion.....	86
➤ Détermination des concentrations minimales inhibitrices (CMI) des deux huiles essentielles utilisées	90
❖ Cas d'HE d' <i>Ammoides verticillata</i>	91
❖ Cas d'HE d' <i>Artemisia judaica</i>	97
Conclusion générale.....	105
Références bibliographiques.....	108
Annexe	



Introduction Générale

La tomate fait partie de la grande famille des solanacées tout comme la pomme de terre, l'aubergine, le poivron et le piment. Elle est adaptée à des conditions de culture très variées et est destinée à la consommation en frais ou à la transformation industrielle (**Causse et al., 2000**), selon la **FAO (2013)** plus de 170 pays produisent de la tomate ce qui en fait le premier légume cultivé dans le monde avec environ 160 millions de tonnes produites en **2013**.

En Algérie, la culture de la tomate occupe une place privilégiée dans le secteur socio-économique et aussi est l'une des cultures prioritaires avec une superficie totale avoisinant les 22646 hectares (**FAO, 2014**). Bien qu'estimée à 1065609 tonnes et 47.05 t/ha, la production reste inférieure comparée aux autres pays du pourtour méditerranéen, cela est dû en partie à des maladies cryptogamiques telles que la fusariose et la pourriture grise... etc.

Les champignons sont les principaux microorganismes responsables de pertes en agriculture (**kacemi et al, 2017**). D'après la (**FAO, 1999**), les maladies phytopathogènes réduisent de 12 à 14% la production agricole mondiale, 70% des dommages étant d'origine fongique (**Aouar, 2012**). Ces maladies sont contrôlées souvent des traitements chimiques tels que les fongicides. Or, ces derniers constituent un véritable danger pour la santé humaine et l'environnement (**kacemi et al., 2017**).


La lutte biologique offre une alternative prometteuse pour suppléer ou compléter les méthodes conventionnelles de lutte contre les maladies des plantes. En effet le recours aux agents de lutte biologique semble peu nocif pour l'environnement et leurs modes d'action complexes devraient réduire les risques d'apparition de résistances (**Duffy et al., 2003**).

Plusieurs travaux ont été entrepris pour la sélection des antagonistes aux microorganismes phytopathogènes. Ainsi que les biomolécules issues des plantes aromatiques comme les huiles essentielles ayant la possibilité de lutter contre ces germes phytopathogènes.

Les bactéries appartenant au genre *Bacillus* sont fréquemment utilisées dans le processus de la lutte. Elles réduisent et ou d'inhibent la croissance et le développement des champignons phytopathogènes (**Saidi et al ., 2009**). Aussi les huiles essentielles ont des propriétés biologiques très variées telles que l'activité antifongique qui pourrait constituer un moyen de lutte biologique contre les champignons phytopathogènes se qui leur qualifier d'être dans un éventuel programme de lutte biologique pour réduite les pertes économique de culture de tomate.

Notre travail comporte essentiellement deux parties :

- ❖ L'isolement et l'identification des champignons causals de la fusariose et la pourriture grise de la tomate et l'étude de leur pouvoir pathogène.
- ❖ L'évaluation des potentialités antifongiques de trois souches bactériennes de *Bacillus subtilis* et de deux huiles essentielles de deux plantes (*Ammoides verticillata* et *Artemisia judaica*) contre les champignons isolés et identifiés.



Partie
Bibliographique

I) Phytopathologie d'origine fongique de la tomate

I.1 Généralités sur la Tomate (*Solanum lycopersicum*)

Le mot « tomate » dérive du suffixe « tomatl » ou des mots « tomates » ou « miltomates » dans le langage nahuatl (**Daunay et al., 2008**) qui était les indigènes l'appelaient « Tomati », ce nom provient d'un nom Aztèque « Zitomate » (**Boutoumou & Boumaza, 2016**).

La tomate (*Solanum lycopersicum*) est cultivée dans de nombreux pays du monde (170 selon **la FAO, 2010**) et sous divers climats, y compris dans des régions relativement froides, grâce au développement des cultures sous abri. La production de tomate connaît deux grandes filières : la tomate pour la consommation fraîche (tomate maraichère) d'une part et la tomate destinée à la transformation et la conserve (tomate industrielle) d'autre part.

I.2 Nomenclature et Classification

En 1753. Linné avait inclus la tomate dans le genre *Solanum*, en la nommant *Solanum lycopersicum* mais Philippe Miller (1754, 1768) la renomma *Lycopersicon esculentum*, en créant le genre *Lycopersicon* qui regroupait les différentes espèces de tomate. Le terme gréco-latin « *Lycopersicon* » signifie « pêche de loup » et le mot latin « *esculentum* » signifie « comestible ».

La taxonomie selon **Benton** en **2007** placé la tomate au sein du genre *Solanum*, section *Lycopersicon* qui appartient à la classification suivante :

Règne :Plantae.

Division :Magnoliophyta.

Classe :Magnoliopsida

Ordre :Solonales.

Famille :Solanaceae.

Genre : *Solanum*

Espèce : *Solanum lycopersicum*

I. 3 Description de plante

La tomate est une plante herbacée vivace, ce qui signifie qu'elle peut vivre plusieurs années, elle est cultivé dans les régions à climat chaud, mais peut également être plantée dans une serre en hiver (**Possada, 2016**), c'est une plante a système racinaire puissant, très ramifié à tendance fasciculée et des tiges qui disposent de deux types de poils blanchâtres : des poils simples et des poils glanduleux. Elles portent des feuilles composées de 5 à 7 folioles principales et des fleurs

en formule florale suivante : 5 sépales + 5 pétales + 5 étamines + 2 carpelles. Son fruits est une baie plus ou moins grosse, avec épiderme lisse brillant de forme variable (sphérique, oblongue, allongée), et de couleurs variées (blanches, rose, rouge, jaune, orange, verte, noire) selon les variétés (Bénard, 2009 ; Bouzaata, 2016), à graines très nombreuses, réparties dans des loges remplies de gel, en forme de rein ou de poire, poilues, beiges (Bouzaata, 2016).

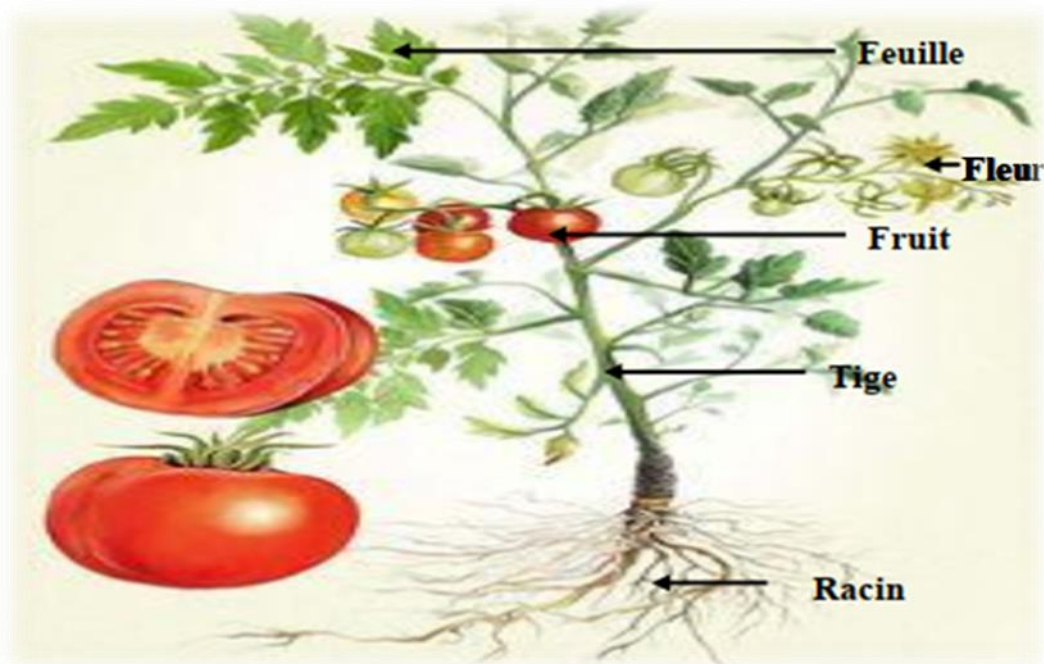


Figure 01: Tomate *solanum lycopersicum*.

(<http://tomatosphere.parlonssciences.ca/Portals/5/Learning-Strategies/FR/3-Org-de>)

I.4 Cycle biologique de la tomate

La tomate est une plante de climat tempéré chaud. Sa température optimale de croissance se situe entre 15 °C (la nuit) et 25 °C (le jour). Elle craint le gel et ne supporte pas les températures inférieures à + 2 °C. La durée du cycle végétatif complet de la tomate est de 4 à 6 mois après le semis (Benton, 2008) ; définie par les stades suivants :

I.4.1) Germination : A température ambiante comprise entre 18 et 24°C, la levée s'effectue au bout de 6 à 8 jours. Au-dessus du sol apparaissent la tigelle et deux feuilles cotylédonaire simples et opposées. Dans le sol, la radicule possède un manchon de poils absorbants bien visibles (Naika et al., 2005).

I.4.2) Croissance : La croissance est l'augmentation de dimension d'une végétale. Selon **(Chougar, 2012)** la croissance de la plante de tomate se déroule en deux phases et en deux milieux différents :

***En pépinière :** de la levée jusqu'au stade six (06) feuilles, on remarque l'apparition des racines non fonctionnelles et des pré-feuilles.

***En plein champ :** après l'apparition des feuilles à photosynthèse et des racines fonctionnelles, les plantes continuent leur croissance. La tige s'épaissit et augmente le nombre de feuilles.

I.4.3) Floraison : C'est le développement des ébauches florales par transformation du méristème apical de l'état végétatif à l'état reproducteur **(Chougar, 2012)**. A un certain moment de sa croissance (qui dure environ un mois), la tomate entre en parallèle avec la mise à fleur, ces fleurs étaient auparavant des boutons floraux. La floraison dépend de la température et des besoins en éléments nutritifs de la plante. Elle ne peut fleurir que si la plante reçoit de la lumière pendant une durée qui lui est propre en plus d'un rapport équilibre en sève **(Sawadogo, 2013)**.

I.4.4) Fructification et nouaison des fleurs : La nouaison est l'ensemble de la gamétogenèse, la pollinisation, la croissance du tube pollinique, la fécondation des ovules et le développement des fruits. Une température optimale de 13° à 15°C est nécessaire pour la nouaison. Les nuits chaudes à 22°C défavorisent la nouaison.

I.4.5) Maturation du fruit : La maturation du fruit se caractérise par le grossissement du fruit, le changement de couleur du vert au rouge. Elle dépend de la variété **(Sawadogo, 2013)**. Selon **Rey & Costes (1965)**, la lumière intense permet la synthèse active de matière organique qui est transportée rapidement vers les fruits en croissance, sous une température optimale de 18°C la nuit et 21°C le jour.

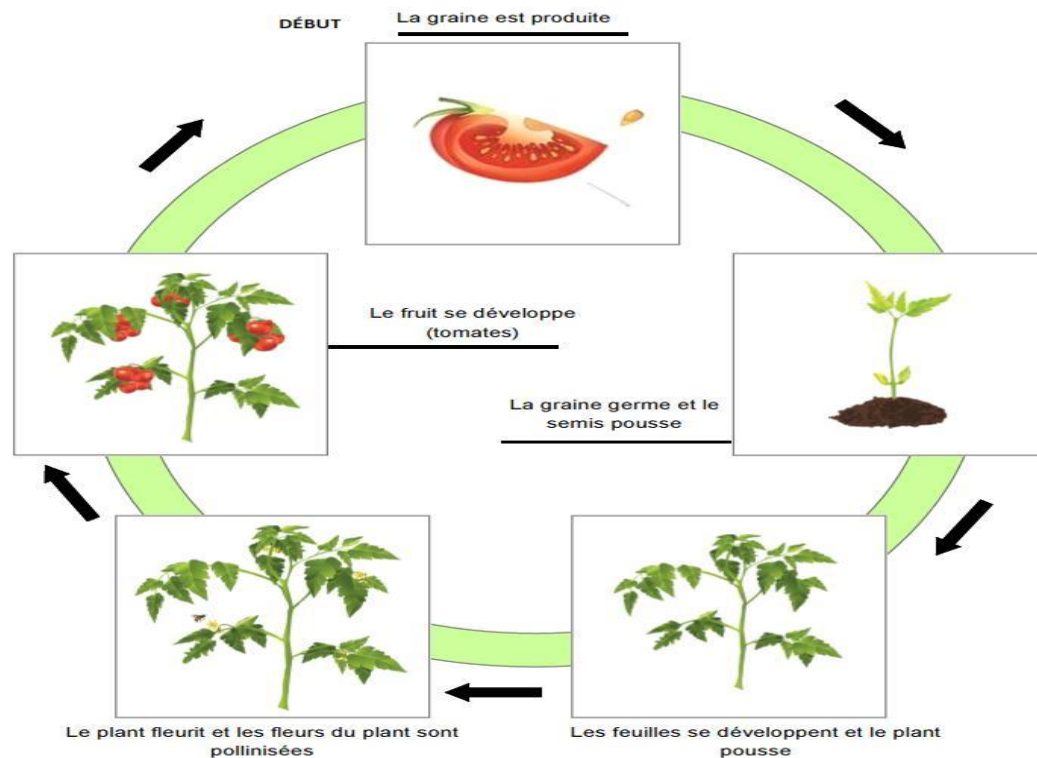


Figure 02: Cycle de vie d'un plant de tomate.

(www.amfb.eu/Publications/2015/Pourriture-grise.pdf)

I.5.Importance économique et production de la tomate

I.5.1 .Production mondiale de la tomate

Les principales régions de production sont situées dans des zones tempérées. Cependant, la majeure partie de cette production est basée dans l'hémisphère Nord. La production mondiale de la tomate est passée de 131.295.264 tonnes en 2006 à 170.750.767 tonnes en 2014 faisant de la tomate le premier légume en termes de volume de production devant la pastèque et le chou (Faostat, 2017). La superficie totale allouée à sa culture était supérieure à 5 millions d'hectares en 2014. Soixante pour cent de la production mondiale est assurée par les cinq plus grands producteurs qui sont la Chine (30,7%), l'Inde (11,1%), les Etats Unis (7,7%), la Turquie (7,2%) et l'Egypte (5,2%). L'Afrique avec l'Egypte représente seulement 12% de la production mondiale (Faostat, 2017). Ces chiffres ne tiennent compte que de la production commercialisée, et n'incluent pas les productions familiales qui sont non négligeables dans certaines régions (Son, 2018).

I.5.2. Production nationale de la tomate

La tomate en Algérie est en pleine expansion, à la faveur de nombreux programmes mis en place par le Ministère de l’Agriculture et du Développement Rural. Pour son développement de nouvelles techniques de production sont introduites ces dernières années permettant plus de rendement à l’hectare (**Chougar, 2011**).

La tomate est cultivée selon deux modes de production à savoir en culture maraichère et en culture industrielle. La superficie totale réservée est de 32962Ha représentée par 63,06% pour la tomate maraichère et 36,93% pour la tomate industrielle. La tomate représente 7,94% de la superficie totale réservée aux cultures maraichères et industrielles (**Rekibi, 2015**).

I.6. Les maladies de la tomate

Les cultures de tomates peuvent être affectées par diverses attaques de ravageurs (insectes, acariens, nématodes,...etc.) et de maladies cryptogamiques, bactériennes ou virales, par la concurrence de mauvaises herbes et par des accidents de végétation ou des agressions abiotiques, dont l’importance varie selon le type de culture et les conditions climatiques.

Les maladies fongiques sont les principales maladies pathogènes de ces cultures. Ils sont responsables d’épidémies dévastatrices pour les cultures depuis la naissance de l’agriculture (**Martin & Lebrun, 2009**). Les champignons appartenant aux genres *Botrytis*, *Fusarium*, *Phytophthora*, *Colletotrichum*, *Verticillium* et *Alternaria* sont dans les premières lignes des phytopathogènes de la tomate (**Naika et al., 2005 ; Causse et al., 2000 ; Zahir et al., 2009**).

Tableau 01: Les principales maladies fongiques de la tomate (**Naika et al., 2005 ; Causse et al., 2000; Snoussi, 2010 ; Bennouali, 2015**) .

Maladies	Agent pathogène	Symptômes
Alternariose	<i>Alternaria sp</i>	Taches noires de taille variable sur les feuilles avec cercles concentriques sur les fruits.
Anthraxose	<i>Colletotrichum coccodes</i>	Taches plus ou moins circulaires de 1cm avec un centre noirâtre sur les fruits murs.
Fusariose	<i>Fusarium sp</i>	Flétrissement des feuilles peut être lent et brusque. Brunissement des vaisseaux, pourriture des racines.
Mildiou	<i>Phytophthora sp</i>	Maladie très grave, grandes taches brunes sur les feuilles et les tiges.
Pourriture gris	<i>Botrytis cinerea</i>	Provoquant d’un feutrage gris sur les feuilles.

Verticilliose	<i>Verticillium albo-atrum</i>	Jaunissement en forme de V des feuilles de bas en haut suivi d'un flétrissement avec un léger brunissement des vaisseaux après une coupe.
---------------	--------------------------------	---

I.6.1 La fusariose

La fusariose est une maladie causée par des champignons du genre *Fusarium* qui vivent dans le sol, et attaquent de nombreuses plantes (**Ghorri, 2015**). Parmi ce genre de *Fusarium* on trouve les : *Fusarium oxysporum* qui est responsable de le flétrissement vasculaire aussi appelé fusariose vasculaire, et *Fusarium solani* qui est responsable de la pourriture racinaire et des tiges et même des semences (**Leslie & Summerell, 2006**).

I.6.1.1 *Fusarium oxysporum* agent du flétrissement vasculaire

Fusarium oxysporum est un agent vasculaire qui se conserve dans le sol sous forme de chlamydospores et infecte les plantes via les racines qu'elles pénètrent directement ou par des blessures d'origine mécanique ou biologique (percées des racines secondaires, piqûres de nématodes...). Les maladies dues à l'espèce *Fusarium oxysporum* ont largement répandues dans le monde (**Armstrong et al., 1981**). Elles sont dommageables pour de nombreuses plantes maraîchères (tomate, cucurbitacées,...) et ornementales (œillet) (**Emmanuel wicker et al., 2007**).

a) Caractères cultureux

Le *Fusarium oxysporum* C'est un Deutéromycètes qui pousse sur le milieu PDA (Potato Sucrose Agar) à 25°C, La morphologie des colonies sur PDA varie largement, le mycélium peut être floconneux, clairsemée et avec une couleur allant du blanc au violet pale. Certains isolats de *Fusarium oxysporum* produisent habituellement une pigmentation violette foncée ou magenta foncée. D'autres isolats de *Fusarium oxysporum* mutent facilement au pionnotal forme de mycélium «humide » plat avec une apparence jaune ou orange sur PDA (**Leslie & Summerell, 2006**).

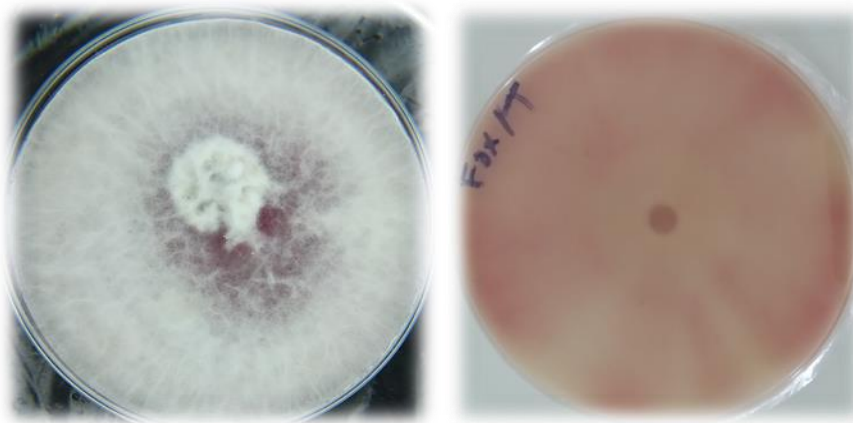


Figure 03: Culture de *Fusarium oxysporum* sur milieu PDA (photo originale).

b) Caractères morphologique

Le *Fusarium oxysporum* est caractérisé par une production abondante de microconidies ellipsoïdales, ayant des dimensions de 4,5-5,5 μm de long et 1,5-2,5 μm de large et des macroconidies de taille variable, n'excédant généralement pas 20 μm de longueur 13-20 μm de long et 2-3 μm de large. Ces spores sont regroupées sous forme de fausses têtes sèches à l'extrémité des microconidiophores allongés, dispersés sur le mycélium aérien (Tivoli, 1988).

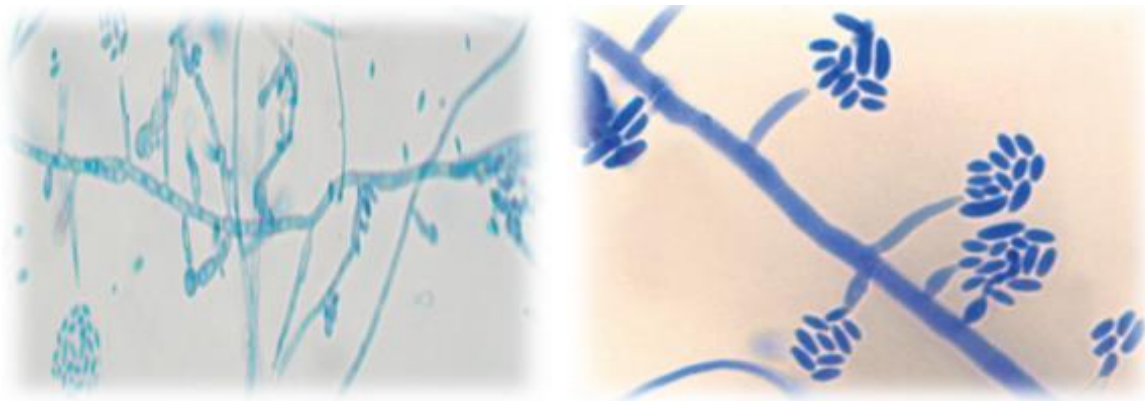


Figure 04: Microconidies asymétriques, légèrement incurvées, disposées en amas à l'extrémité de monophialides solitaires (Chabasse et al., 2002).

c) Classification : (Di Pietro et al., 2003 ; Michielse & Rep, 2009)

Régne : Fungi

Division : Ascomycota

Classe : Hymenoascomycète

Ordre : Hypocreales

Famille: Nectriaceae

Genre: *Fusarium*

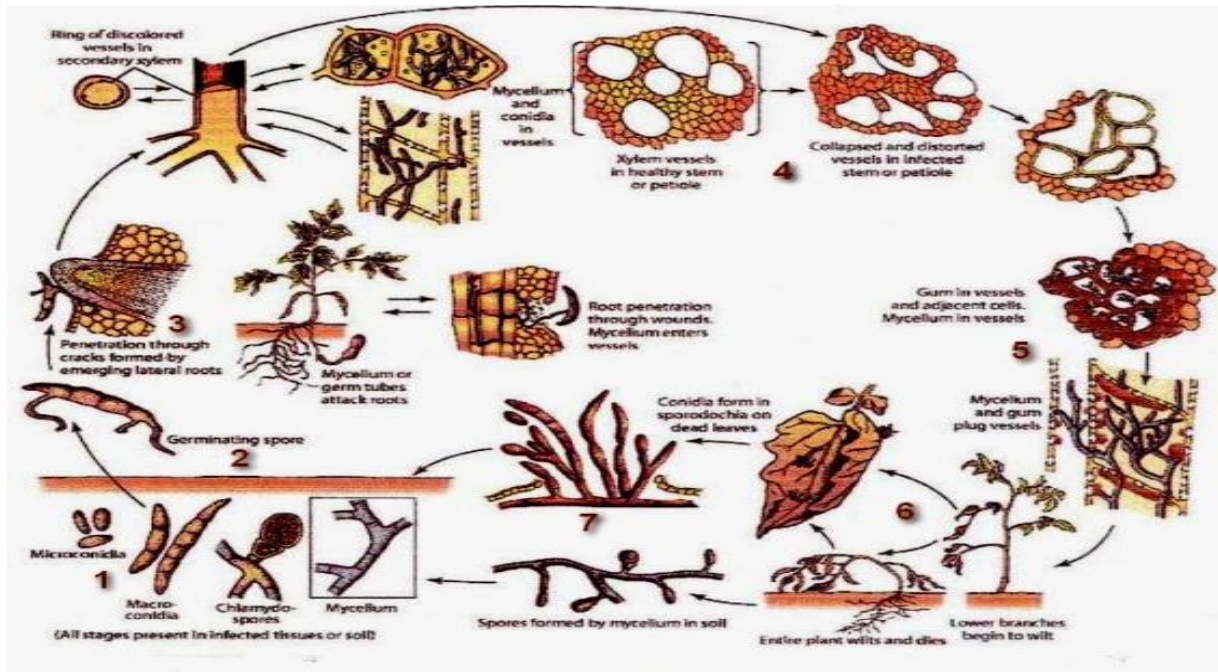
Espèce : *Fusarium oxysporum*

d) Cycle de vie de *Fusarium oxysporum*

Les *Fusarium oxysporum* ne sont pas des parasites obligatoires, en absence de la plante hôte, ils mènent une vie de saprophyte sur des débris végétaux et des matières organiques. Ces champignons persistent dans le sol principalement sous de spores de résistance (chlamydospores) en état de dormance (**Booth, 1971**). En contact de l'hôte et une fois les conditions favorables le cycle se déroule comme suit (**Fig .05**) :

-Les chlamydospores germent et les jeunes filaments pénètrent les racines au niveau des blessures ou des ouvertures naturelles et après le mycélium se ramifie et colonise toutes les cellules avoisinantes (**Smahi, 2013**).

-Les hyphes mycéliens progressent à l'intérieur des puis colonisent le cortex, arrivé au niveau du cylindre central, le parasite s'installe dans les vaisseaux du xylème d' où il se propagera dans la tige par l'intermédiaire des macroconidies aisément véhiculées par la sève dans toutes les parties de la plante (**El Mahjoub, 1979**), à la surface des feuilles, se forment des organes fructifères appelés sporodochies qui produisent des macroconidies qui vont à leur tour contaminer d'autres plantes lorsqu'elles sont transportées par le vent, par l'eau ou bien par l'intermédiaire des insectes (**El Mahjoub, 1979**) .



Figur 05: Cycle de vie de *Fusarium oxysporum* (Alabouvette, 1990).

- 1-Conidies, chlamydospores ou mycélium vivant dans le sol.
- 2-Germination des spores.
- 3-Pénétration du tube germinatif à l'intérieur des racines.
- 4-Invasion des vaisseaux par les conidies et /ou mycélium.
- 5-Production de gomme à l'intérieur des vaisseaux.
- 6-Flétrissement et mort de la plante.
- 7-Sporodochies ou mycélium vivant dans le sol.

e) Symptômes de la maladie du flétrissement vasculaire

Les symptômes de *Fusarium oxysporum* se manifestent en une décoloration de la tige commençant par un léger jaunissement longitudinal sur une portion de celle-ci et évoluant en une bande jaune plus marquée puis en une nécrose beige à marron clair. Les vaisseaux à l'intérieur de la tige brunissent. Il cause également un jaunissement du rachis, d'une foliole et éventuellement de la feuille entière (Arino et al., 2007). Ce champignon provoque un flétrissement rapide (parfois en une journée) des jeunes plantules. Sur les plantes plus âgées, les premiers symptômes visibles sont le flétrissement des feuilles qui se fait progressivement de bas en haut ce qui fait que ceux de la base de la plante sont déjà morts.



Figure 06: Symptômes de fusariose (Si Mohammed, 2017)

- 1) Dessèchement et mort des feuilles, 2) Brunissement longitudinal de la tige
- 3) Brunissement des vaisseaux, 4) Flétrissement et jaunissement des feuilles.

f) Cycle général de la maladie :

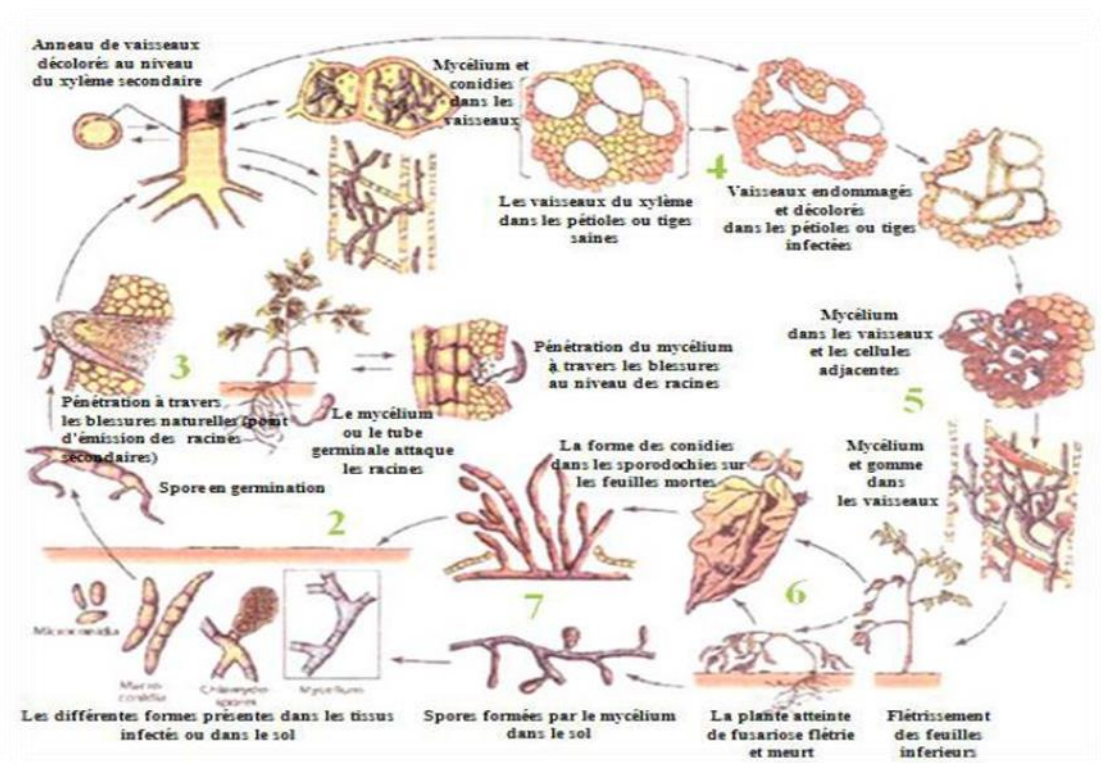


Figure 07: Cycle général de la maladie flétrissement vasculaire causée par *F. oxysporum* chez la tomate (Agris, 2005).

I.6.1.2 *Fusarium solani* agent de la pourriture racinaire

Fusarium solani est un agent pathogène qui cause des maladies sur une gamme vaste et diversifiée de plantes hôtes. Il est connu comme responsable de maladies sur une centaine de genres de plantes où il est souvent associé à des pourritures racinaires. Les hôtes prédominantes sont les cultures maraichères, les légumineuses et les des cucurbitacées (O'donnell, 2000). C'est un champignon ubiquiste tellurique, le plus phytopathogène, il se conserve dans le sol grâce à ses chlamydiospores et au mycélium capable de survivre sur les débris végétaux (Erskine & Bayaa, 1996).

a) Caractères cultureux

Sur milieu de culture, *Fusarium solani* forme des colonies duveteuses ou cotonneuses de couleur blanche à crème avec un revers pâle (Chermette & Bussieras, 1993).

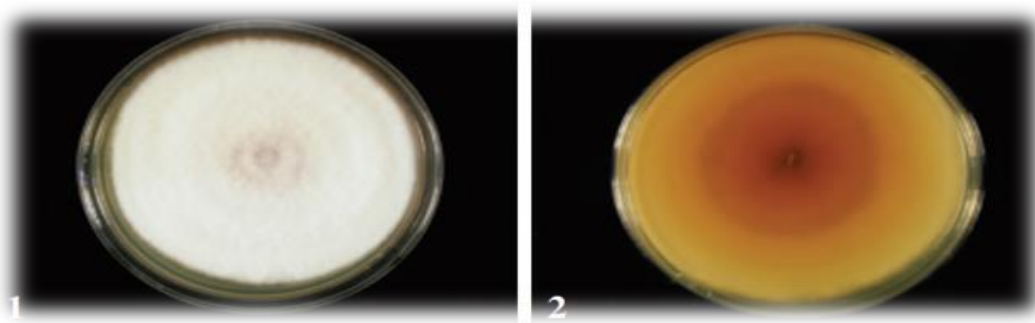


Figure 08 : Culture de *Fusarium solani* sur milieu Sabouraud (Chabasse et al., 2002).

b) Caractères morphologique :

Fusarium solani est caractérisé par la présence de macroconidies fusiformes et cloisonnées. Les conidiophores, parfois très ramifiés, forment sur le thalle des coussinets (sporodochies) et portent des masses de spores. Les phialides, sont plus ou moins allongées, présentent, le plus souvent, un site de bourgeonnement unique (monophialide) situé à l'extrémité d'un col allongé ; ils produisent deux types de conidies :

Des microconidies : uni ou bicellulaires, piriformes, fusiformes, cylindriques ou ovoïdes, isolées, solitaires ou groupées, disposées en verticille.

Des macroconidies : conidies pluricellulaires à cloisons seulement transversales, souvent groupées en paquets. Les macroconidies sont fusiformes, souvent courbées, avec une cellule basale pédicellée, formant un sort de talon plus ou moins visible. Les chlamydiospores, sont parfois présentes, en position terminale ou intercalaire (Roquebert, 1998).

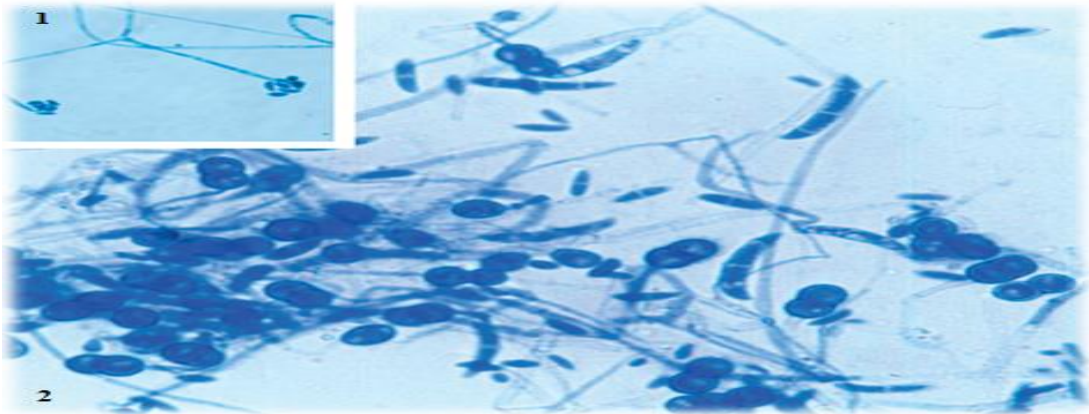


Figure 09 : Microconidies oblongues ,en têtes ,à l'extrémité de monophialides (1 objectif X20) . nombreuses chlamydospores disposées en courtes chaines et macroconidies en fuseau (2 ,objectif x 40) (**Chabasse et al., 2002**).

c) Classification

Les différents études morphologiques et moléculaires actuelle, classifie *Fusarium solani* comme suit :

Règne : Fungi

Division : Ascomycota

Classe : Sordariomycetes

Ordre : Nectriaceae

Genre : *Fusarium*

Espèce : *Fusarium solani*

d) Symptômes de la maladie

Le *Fusarium solani*, est l'un des espèces du genre *Fusarium* les plus importantes du point de vue phytosanitaire. Ce champignon est le responsable de la pourriture racinaire. Cette maladie est caractérisée par un brunissement du pivot suivi d'une dégradation du cylindre central et du cortex des racines et des vaisseaux situés au niveau du pivot et du collet. Le système racinaire devient brun et pourri.

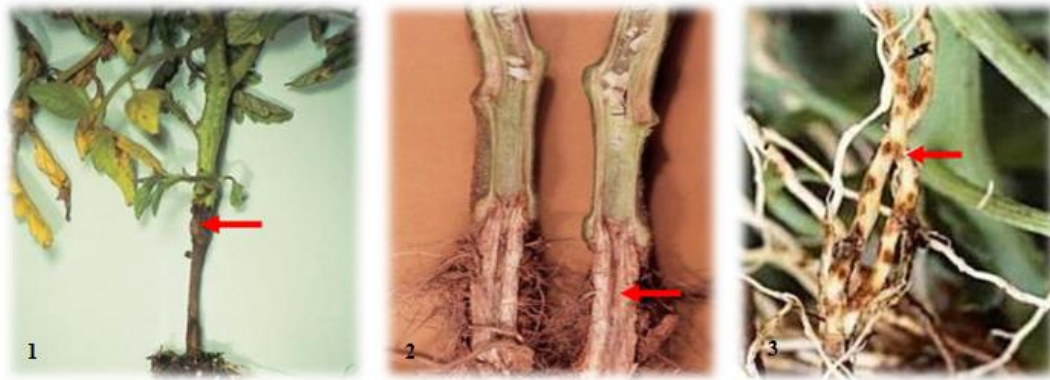


Figure 10 : Les symptômes de fusariose.

- 1) Pourriture du collet (Agrios, 2005), 2) brunissement du pivot (Agrios, 2005),
3) nécrose racinaire (Blancard, 2009)

e) Cycle infectieux

Le cycle infectieux de *Fusarium solani* débute par la germination des chlamydo-spores. En présence d'une racine de tomate, le filament mycélien pénètre le tissu vasculaire de la plante par le biais des blessures ou par les ouvertures naturelles du système racinaire. A ce moment-là, le champignon produit des toxines dans les racines qui seront transportés jusqu'aux feuilles (Roy et al., 1997).

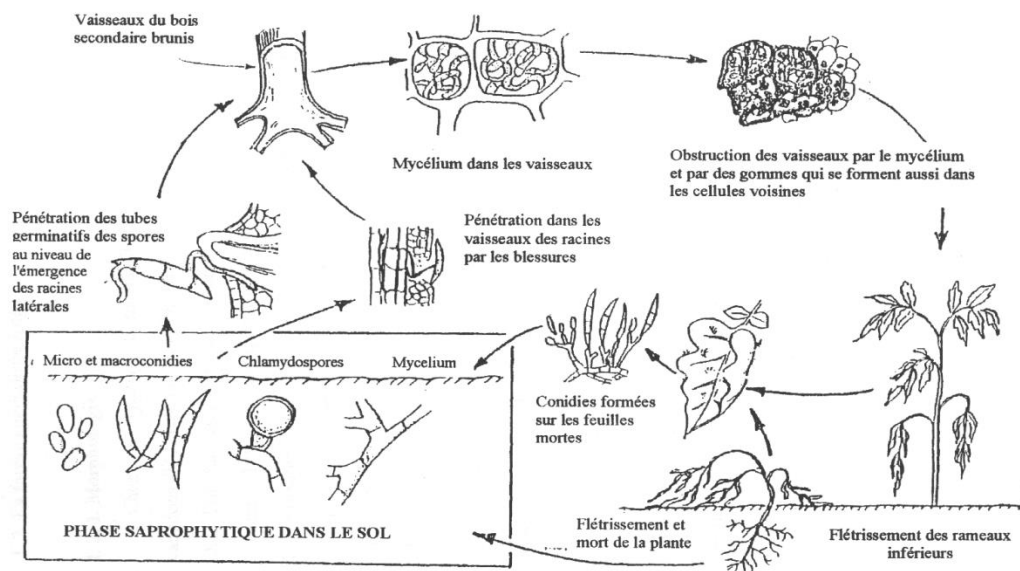


Figure 11 : Cycle infectieux de *Fusarium solani* (Agrios, 1997).

I.6.2 La pourriture grise

La pourriture grise est la 3^{ème} ligne des maladies fongiques, après le mildiou et l'oïdium, en matière de pertes économique associées (Walker, 2013), causée par *Botrytis cinerea*. La pourriture grise de la tomate est l'une des maladies les plus dévastatrices de la tomate cultivée sous serres et les plus dommageables de la tomate à travers le monde et qui provoque des pertes de rendement substantielles (Bouaoud et al., 2018).

I.6.2.1 *Botrytis cinerea* agent la pourriture grise

C'est un agent phytopathogène responsable de la pourriture grise, maladie cryptogamique qui très réponde dans les cultures de tomate. L'étymologie de son nom fait référence directement à sa morphologie : « *Botrytis* » signifiant « en forme de grappe » et indiquant ainsi la morphologie des conidiophores, et « *cinerea* » renvoie à la couleur grise cendrée de la sporulation (Walker, 2013).

a) Caractères cultureux

Botrytis cinerea est caractérisé par un thalle à croissance très rapide, d'abord blanc puis gris à brun noir. La figure 12 montre l'aspect de la culture d'une souche de *Botrytis cinerea* sur le milieu de culture PDA (Pomme de terre, Dextrose, Agar) :

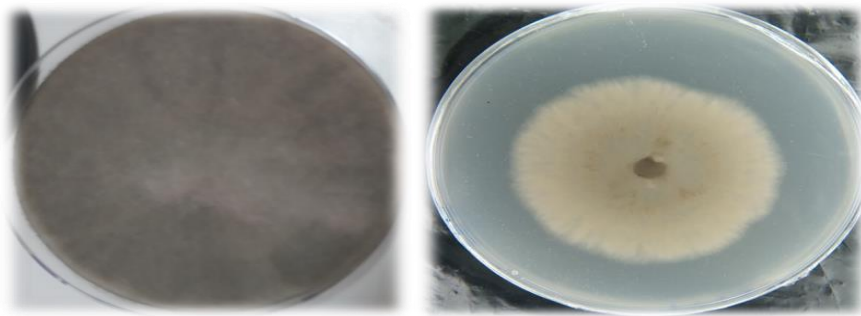


Figure 12 : Culture de *Botrytis cinerea* sur un milieu PDA (photo originale).

b) Caractères morphologique

Le mycélium de *Botrytis cinerea* comprend des filaments articulés, grisâtres ou olivâtres, cylindriques, quelquefois vésiculeux au niveau de la cloison médiane, dont le diamètre varie considérablement suivant les conditions de développement des hyphes. Lorsque le mycélium est au stade de fructification, il produit des touffes de conidiophores grisâtres. Parfois, ce mode de multiplication peut disparaître et laisser place à une prolifération mycélienne blanche qui

correspond à l'élongation d'hyphes grêles, hyalins qui se répandent sous forme de "toile" (Daugaard *et al.*, 2003).



Figure 13 : Observation de *Botrytis cinerea* (forme asexuée) au microscope optique (Elhadi, 2012).

c) Classification : Selon Walker (2013) la classification de *Botrytis cinerea* se présente comme suit :

Règne :Fungi

Division :Ascomycota

Classe :Leotimycetes

Ordre :Helotiales

Famille :Sclerotiniaceae

Genre : *Botrytis*

Espèce : *Botrytis cinerea*

d) Symptômes de la maladie :

Botrytis cinerea est un champignon nécrotrophique de grande adaptabilité à différents environnements et hôtes. Il infecte les parties aériennes de la tomate, où l'infection de tige peut tuer la plante entière (González-Fernández *et al.*, 2004). Il dispose de plusieurs voies pour entrer dans le végétal : les ouvertures naturelles (hydatodes, stomates) ou les blessures au niveau des feuilles, les plaies d'effeuillage sur tige, les sépales des fleurs ou des fruits, qui servent de bases nutritives au champignon (Holz *et al.*, 2004). Pour l'entrée par les plaies d'effeuillage sur cultures de tomates sous serres. Une fois pénétré à l'intérieur des tissus végétaux, *Botrytis cinerea* va lyser les parois végétales par l'intermédiaire d'enzymes pectinolytiques et induire la mort des cellules (Nicot & Baille, 1996). Cette mort cellulaire entraîne l'apparition des différents symptômes de la maladie, que sont observables sur fleurs, fruits, tiges et feuilles et se traduisent généralement par un pourrissement des tissus infectés et par l'apparition de taches

brunes, suivi par l'apparition d'un feutrage gris due à une production importante de spores. Ensuite le pathogène peut contaminer l'ensemble de la plante.



Figure 14 : Symptômes de la pourriture grise sur tomate (1 : source : INRA, 2010 ; 2 : source : INRA, Avignon, France ; 3 : <https://www.bayer-agri.fr>)

e) Cycle de développement

Au cours de son cycle biologique, *Botrytis cinerea* peut produire un mycélium, des spores asexuées ou conidies, des spores sexuées ainsi que des sclérotes. Durant l'hiver, *Botrytis cinerea* se conserve principalement sous forme de sclérotes dans les débris morts de l'hôte et généralement les feuilles tombées au sol.

Les sclérotes, dans des conditions favorables, se développent en apothécies donnant des ascospores. Ces apothécies constituent aussi une forme de dissémination du champignon (Ajouz, 2009). Les sclérotes peuvent également germer pour produire un mycélium à filaments articulés, grisâtres ou olivâtres, cylindriques, quelque fois vésiculeux au niveau de la cloison médiane qui, grâce à ses appressoriums, perforera la cuticule végétale. Par la suite, des conidiospores portant des macroconidies (spores asexuées) se développent. Ils serviront d'inoculum primaire.

Les macroconidies libérées seront propagées par le vent et de la pluie, ce qui sera considéré d'inoculum secondaire. Le mycélium de *Botrytis cinerea* peut aussi se conserver dans les débris de l'hôte durant l'hiver pour produire des conidies et servir d'inoculum primaire quand les conditions deviennent favorables (Williamson et al., 2007).

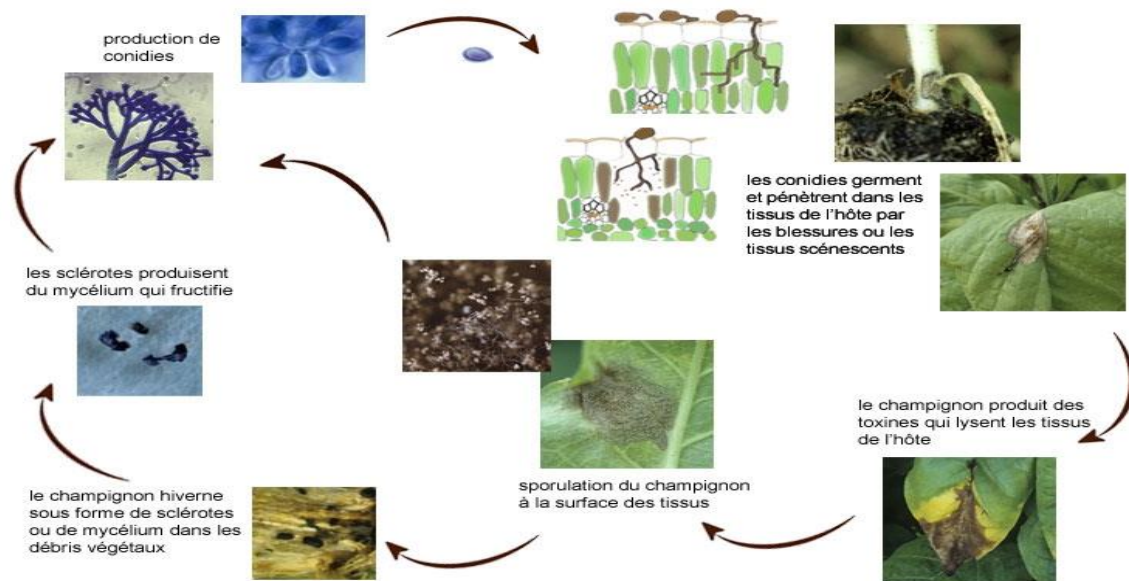


Figure 15 : Cycle de développement (production asexuée) de *Botrytis cinerea* sur différentes cultures (Agrios, 2005).

I.7) Les moyennes de lutte

La lutte contre les maladies des plantes est basée sur différentes méthodes la plupart de ces méthodes de lutte appliquées varient d'une maladie à une autre en fonction du pathogène, le but final de toutes les méthodes utilisées est de combattre les maladies des plantes et alors augmenter et améliorer la quantité de la production agricole (Nasraoui, 2006), ces méthodes sont principalement la lutte chimique, la lutte physique et lutte génétique et la lutte biologique.

1) La lutte physique

Il existe deux types fondamentaux de méthodes en lutte physique qui sont :

-les méthodes actives qui nécessitent de l'énergie au moment de l'application pour détruire ou stresser les phytopathogènes.

-Les méthodes appelées passives procèdent des modifications du milieu.

Ces techniques relèvent de quatre grandes catégories sont les lutte mécanique, lutte thermique, lutte pneumatique et lutte électromagnétique (Vincent et al., 2000).

2) La lutte génétique

Les mécanismes de défenses naturelles sont complexes mais de mieux en mieux connus grâce aux approches génétiques et moléculaires. Il est alors possible d'intervenir à différents

niveaux en appliquant sur les plantes des substances naturelles ou des analogues dont le rôle est de stimuler les réactions de défense vis-à-vis des pathogènes (**Rocher, 2004**).

La résistance vis-à-vis des agents pathogènes représente une solution qui reste une préoccupation constante des sélectionneurs car il est souvent difficile d'associer la haute productivité à la résistance sans compter que certaines résistances se montrent très stables alors que d'autres le sont moins (**Latterot, 1972**).

3) La lutte chimique

La lutte chimique se définit par l'utilisation de fongicides pour détruire affaiblir ou réprimer les champignons phytopathogènes, la plupart de ces fongicides affectent directement les fonctions essentielles, comme par exemple la respiration, la biosynthèse des stérols ou la division cellulaire (**Ajouz, 2009**).

Les fongicides non systémiques sont ceux qui demeurent au niveau du point d'application sur la plante, alors que les fongicides systémiques limite uniquement à une systémie xylémienne ; le produit diffuse de la semence (zone d'application) vers le sol environnant puis est absorbé par les racines au moment de la germination pour migrer vers les parties aériennes (**Rocher, 2004**).

- **Les inconvénients de la lutte chimique**

Les pesticides ont des risques sur la santé humaine par l'accumulation de ces derniers dans la chaîne alimentaire, et donc ils vont être consommés par l'être humain, ils ont un impact sur la pollution des eaux, le sol, la vie de la faune et la flore et aussi la santé des agriculteurs (**Merghid, 2017**).

4) Lutte biologique

La lutte biologique est une alternative prometteuse à la lutte chimique. Elle est basée sur l'utilisation de bactéries, champignons ou levures contre les agents pathogènes. Les produits commerciaux de lutte biologique sont de manière générale peu nombreux sur le marché. D'importants efforts de recherche sont réalisés au niveau international afin d'identifier de nouveaux agents de lutte biologique performants et de permettre leur commercialisation (**Bardin et al., 2004**).

Cette méthode s'agit d'utiliser la biodiversité et les ennemis naturels des espèces nuisibles (**Fernandes, 2005**). La lutte biologique présente un rôle important dans le contrôle des maladies

phytopathogènes. **Emmert & Handelsman (1999)** affirment que la lutte biologique peut être aussi plus efficace dans le contrôle des maladies phytopathogènes que l'utilisation des fongicides chimiques.

- **Les avantages de la lutte biologique**

La lutte biologique présente de nombreux avantages des points de vue environnementaux, sociaux et économiques (**Lefort, 2010**) :

- Plus grande spécificité d'action et efficace où elle est utilisable en serre.
- Moins toxique que les pesticides chimiques où permet de restreindre ou d'éliminer l'utilisation des pesticides chimiques.
- Permet de diminuer les risques d'apparition de résistances aux produits chimiques. Faible coût de développement et pas de délai de traitement avant la récolte.
- Dégradation rapide des biopesticides, diminuant les risques de pollution par rapport à celui induit par les résidus des pesticides dans l'environnement.
- Amélioration de la qualité de vie et de la santé des travailleurs agricole.

II) Présentation des deux agents de lutte biologique proposés pour la lutte contre la fusariose et la pourriture grise de la tomate

Les inconvénients de la lutte chimique et le recours à la protection biologique nécessitent de penser à trouver des solutions alternatives qui permettront de lutter contre les agents phytopathogènes, tout en diminuant l'emploi des produits chimiques.

1) Agent antagoniste : La bactérie *Bacillus subtilis*

- **Genre *Bacillus* ssp**

a) Caractères généraux

Les *Bacillus* forment un genre de bactéries à gram positif. Ces bactéries sont capables de produire des endospores leur permettant de résister à des conditions environnementales défavorables (**Benmati, 2014**). Les cellules bactériennes de ce genre ont une taille large, allant de 0.5 à 2.5 µm x 1.2 à 10 µm. Ce genre est généralement présent dans le sol et les plantes où il a un rôle important dans le cycle du carbone et de l'azote (**Koneman, 2001**).

b) Caractères métaboliques

Les bactéries du genre *Bacillus* peuvent dégrader la plupart de la matière organique animale ou végétale (cellulose, amidon, protéines, hydrocarbures...) par la production d'enzymes extracellulaires (**Chirif, 2014**), sont des bactéries aérobies ou aéro-anaérobies facultatifs, et tirent leur énergie par respiration ou fermentation. Les *Bacillus* sont hétérotrophes, saprophytes et ubiquitaires, il existe des espèces thermophiles, acidophiles, psychrophiles, alcalinophiles (**Bounoua, 2008**).

c) Effets bénéfiques des bactéries du genre *Bacillus*

De nombreuses recherches ont concerné plusieurs espèces du genre *Bacillus* qui sont des habitants communs de la rhizosphère et possèdent une grande activité dans le contrôle biologique des maladies liées au sol. Ces rhizobactéries ont la capacité de produire de nombreux antibiotiques inhibant divers phytopathogènes (**Raaijmakers et al., 2002**).

Les bactéries du genre *Bacillus* sont également capables de produire des enzymes dotés de très forte activité lytique (**Shafi et al., 2017**), sécréter des enzymes hydrolytiques telles que les chitinases, glucanase, protéase et lipases qui peuvent lyser les cellules fongiques ; produire des sidérophores ; stimuler le système de la défense systémique (ISR) chez l'hôte et de produire des substances volatiles. Plusieurs espèces du genre *Bacillus* : *B.amyloliquefaciens*, *B. subtilis*, *B. pasteurii*, *B. cereus*, *B. pumilus*, *B. mycoiides* et *B.sphaericus* provoquent des réductions significatives de l'intensité et la gravité de diverses maladies sur une diversité d'hôtes (**Choudhary & Johri, 2008**).

d) Ecologie

Le microbiologiste **Russe Winogradsky** considère que les *Bacillus* font partie de la flore naturelle du sol. Ils deviennent métaboliquement actifs quand les substrats appropriés pour leur croissance sont disponibles, et forment des spores quand les éléments nutritifs sont épuisés. Ce dernier phénomène est accompagné par la production d'antibiotiques. Puisque la plupart des *Bacillus* peuvent efficacement dégrader une série de biopolymères (protéines, amidon, pectine.....etc), on assume qu'ils jouent un rôle dans les cycles biologiques de carbone, et de l'azote (**Todar, 2003**).

➤ L'espèce *Bacillus subtilis*

a) Présentation de *Bacillus subtilis*

Bacillus subtilis connu aussi comme le bacille du foin ou le bacille de l'herbe, est une bactérie Gram-positif, catalase-positif, c'est surtout une espèce ubiquitaire. Sa longueur varie de 2 à 4 μm et sa largeur de 0,5 à 2 μm . Elle a pour forme cellulaire des bâtonnets droits à bout arrondis. Elle est mobile grâce à une ciliature péritriche (un système de flagelle qui recouvre tous les côtés de la surface d'une bactérie). Elle est aérobic stricte, sa température optimale est de 40 °C trouvée dans le sol. Peut former une endospore dure protectrice (Bridier et al., 2010). C'est une bactérie antagoniste de nombreux champignons pathogènes, utilisée comme moyen de lutte biologique contre ceux-ci dans de nombreuses cultures (Sonenshein, 2001).



Figure 16 : Photographie de l'observation microscopique de *Bacillus subtilis* (Bridier et al., 2010).

b) Classification de *Bacillus subtilis*

Domaine: Bacteria

Phylum: Firmicutes

Classe: Bacilli

Ordre: Bacillales

Famille: Bacillaceae

Genre: *Bacillus*

Espèce: *Bacillus subtilis*

c) Intérêt de *Bacillus subtilis*

Sa capacité à croître rapidement, à atteindre de hautes densités cellulaires et à sécréter un grand nombre de molécules en a fait un outil suscitant l'intérêt des industries agroalimentaires et sanitaires, notamment les antibiotiques. *Bacillus subtilis* est capable de produire des molécules peptidiques issues de la synthèse peptidique non ribosomale NRPS (**Boston, 2001**).

Elle est aussi source d'enzymes industrielles telles les amylases, utilisées dans l'industrie du pain, ou encore des protéases et cellulases, dans l'industrie des détergents. Sa capacité à produire des antibiotiques, comme la bacitracine en fait un organisme d'intérêt également pour l'industrie pharmaceutique (**Kunst et al., 1997**).

d) Métabolites de *Bacillus subtilis*

Les lipopeptides de *Bacillus subtilis* sont synthétisés par voie non ribosomique. Les iturines, les surfactines et fengycines ou plipastatines représentent les trois principales familles de lipopeptides produits par cette espèce (**Bonmatin et al., 2003**).

- **la surfactine**

Les surfactines sont des heptapeptides cycliques reliés par une liaison ester à une chaîne d'acides gras β -hydroxylée dont la longueur varie de 13 à 16 carbones. La surfactine molécule est généralement produite par *Bacillus subtilis* à la fin de la phase exponentielle de croissance. Elle induit le mécanisme de résistance des plantes contre les phytopathogènes par la résistance systémique induite (ISR) (**Vollenbroich et al., 1997a ; Vollenbroich et al., 1997b**). Elle peut aussi être utilisée en bioremédiation pour la dépollution des sols (**Kosarie, 2005 ; Mulligan et al., 2005**).

- **Fengycines ou Plipastatines**

Les plipastatines et les fengycines sont des lipopeptides composés d'un décapeptide. Les fengycines ont été isolées de *Bacillus subtilis* par **Vanittanakom et al., 1986** comme des agents antifongiques.

Les fengycines ont une activité antifongique contre les champignons filamenteux. Elles présentent des propriétés hémolytiques 40 fois moins importantes que celles des surfactines (**Vanittanakom et al., 1986 ; Hbid, 1996 ; Deleu et al., 2005**). Ces molécules agissent en synergie avec les surfactines dans des activités de lutte contre les phytopathogènes (**Sarvas et al., 2004 ; Ongena et al., 2005 ; Ongena et al., 2004 ; Ongena & Jaques, 2000**).

Notamment pour les fergycines et les plipastatines grâce à leur propriété antifongique. On peut envisager d'utiliser ces molécules dans les récoltes et les semis pour une meilleure protection contre d'éventuels phytopathogènes. Des études ont montré que les fergycines sont responsables de l'antagonisme in vitro de plusieurs souches de *Bacillus subtilis* vis-à-vis de champignons phytopatogènes (Sarvas et al., 2004).

2) Les huiles essentielles

a) Généralités

Actuellement, les plantes aromatiques possèdent un atout considérable grâce à la découverte progressive des applications de leurs huiles essentielles (Tchamdja, 1995). Les huiles essentielles et les plantes aromatiques en général sont utilisées pour leurs propriétés médicinales principalement les propriétés anti-inflammatoires, antiseptiques, antivirales, antifongiques, bactéricides, antitoxiques, insecticides, tonifiantes, stimulantes, calmantes, etc. (Nicolas, 1991 ; Mishra & Dubey, 1994).

b) Définition

L'association Française de Normalisation (AFNOR, 2000) définit les huiles essentielles comme étant « des produits obtenus à partir de matières naturelles végétales soit par entraînement à la vapeur d'eau, soit par des procédés mécaniques à partir de l'épicarpe des *Citrus*, soit par distillation sèche. L'huile essentielle ainsi obtenue est séparée de la phase aqueuse par des procédés physiques ». Aussi est définie comme le produit obtenu d'une plante ou certaines parties de celui-ci par hydrodistillation, distillation à la vapeur, distillation sèche ou par un procédé mécanique approprié sans chauffage (par exemple pour les agrumes) (Rubiolo et al., 2010).

c) Caractéristiques des huiles essentielles

➤ Composition chimique des huiles essentielles

Comme toute substance, les huiles essentielles se caractérisent par une composition chimique analysable et très variable. L'étude de la composition chimique est généralement effectuée par chromatographie en phase gazeuse (CPG). Le spectromètre de masse (SM), que l'on associe souvent à la chromatographie (CPG-SM), La résonance magnétique nucléaire (RMN) qui donné principaux composants apparentée :

Les terpènes : sont des hydrocarbures naturels, de structure cyclique ou de chaîne ouverte. Leur particularité structurale la plus importante est la présence dans leur squelette d'unités isoprénique à 5 atomes de carbone (C₅H₈). Conduit à la formation de plus de 20000 molécules terpéniques différents (Gallagher *et al.*, 2010 ; Tholl, 2006).

les monoterpènes : les carbures sont presque toujours présent. Ils peuvent être acyliques (terpinene) ou bicyclique (sabinene), ils constituent parfois plus de 90% de l'huile essentielle (Bruneton, 2009).

Les sesquiterpènes : sont de structures très diverses les carbures, les alcools et les cétones sont les plus fréquents (Bruneton, 2009).

Les composés aromatiques : sont des dérivés de phenylpropane (C₆- C₃) et sont beaucoup moins fréquents que les terpènes. myristicine et safrole (Bakkali *et al.*, 2008).

Les composés d'origines diverses : compte tenu de leur mode d'extraction, les huiles essentielles peuvent renfermer divers composés aliphatiques, généralement de faible masse moléculaires, entraînés lors de l'hydro distillation. Ces produits peuvent être azotes ou soufrés (Inouye & Abe, 2003).

➤ **Variabilité de la composition**

La composition chimique et le rendement en huiles essentielles varient suivant diverses conditions telles que l'environnement, le génotype et l'origine géographique. D'autres facteurs interviennent également tels que la période de récolte, le séchage, lieu de séchage, la contamination par des parasites, des virus et des mauvaises herbes et le choix de la méthode d'extraction. C'est ainsi que l'action des huiles essentielles est le résultat de l'effet combiné de leurs composés actifs et inactifs, ces composés inactifs pourraient influencer la disponibilité biologique des composés actifs et plusieurs composants actifs pourraient avoir un effet synergique (Müller-Riebau, 1997 ; Zygadlo & Juliani, 2003 ; Burt, 2004 ; Bozin *et al.*, 2006 ; Möller, 2008).

➤ **Propriétés physiques**

Liquides à température ambiante, les huiles essentielles sont volatiles, ce qui les différencie des huiles fixes. Elles ne sont que très rarement colorées. Leur densité est en général inférieure à celle de l'eau. Elles ont un indice de réfraction élevé et la plupart dévient la lumière polarisée. Solubles dans les solvants organiques usuels, elles sont liposolubles. Entraînables à la

vapeur d'eau, elles sont très peu solubles dans l'eau ; elles le sont toutefois suffisamment pour communiquer à celle-ci une odeur nette (on parle d'eau aromatique) (**Bruneton, 2008 ; Baser & Buchbauer, 2010**).

➤ **Activités biologiques**

L'action des huiles essentielles est le résultat de l'effet combiné de leurs composés actifs et inactifs, leur efficacité est largement augmentée lorsqu'elles sont diluées (**Bardeau, 2009 et Mohammedi, 2006**).

Tableau 02: Principaux composés des huiles essentielles et leur activités biologiques (**source : Willem, 2002**).

Nom de l'élément biochimique	Activités biologiques
Les acides	Anti-inflammatoires très puissants, agissent en calmants le système nerveux.
Les aldéhydes	Anti-inflammatoires, calmants le système nerveux. Anti-infectieux.
les monoterpènes	Stimulants du système immunitaire, ont des propriétés antiseptiques, antalgiques, peuvent occasionner des brûlures importantes sur la peau donc leur action doit être limitée dans le temps.
Les phénols	Anti-infectieux, action contre les microbes, les champignons les virus et les bactéries.
Les sesquiterpènes	Anti-inflammatoires, anti-allergiques.

d) Méthodes d'extraction des huiles essentielles

La grande diversité des propriétés physico-chimiques de ces composés permet d'utiliser plusieurs techniques d'extraction. Elles seront sélectionnées en fonction de la composition chimique de l'huile essentielle ou de l'organe de la plante à extraire, Les opérations d'extraction solide-liquide regroupent plusieurs méthodes différentes consistant toutes à faire interagir le solvant sur le matériau solide afin de dissoudre ses composants solubles Parmi les méthodes d'extraction, nous citons :

1) Extraction par enfleurage

Le matériel végétal est mis en contact avec des graisses, ces dernières ayant une forte affinité avec les composés odorants, cette méthode peut être réalisée à froid ou à chaud, et on obtient ainsi des absolues de pommade (**Lardry & Haberkorn, 2007**).

2) Extraction au CO₂ supercritique

Est un processus consistant à séparer une composante de l'autre en utilisant les fluides supercritiques au lieu d'un solvant d'extraction, le type de ce solvant : le CO₂ supercritique. Au-delà du point critique (P = 73,8 bars et T = 31,1 °C), le CO₂ possède des propriétés intermédiaires entre celles des liquides et celles des gaz ce qui lui confère un bon pouvoir d'extraction, qui plus est, facilement modulable en jouant sur les conditions de température et de pression (**Pellerin, 2001**).

3) Extraction par micro-ondes

C'est un procédé utilisant les micro-ondes et les solvants transparents aux micro-ondes pour extraire de façon rapide et sélective des produits chimiques de diverses substances (**Paré, 1997**). Le matériel végétal est immergé dans un solvant transparent aux micro-ondes de manière à ce que seul le végétal soit chauffé. Les micro-ondes vont chauffer l'eau présente dans le système glandulaire et vasculaire de la plante, libérant ainsi les produits volatils qui passent dans le solvant (non chauffé). On filtre et on récupère ensuite l'extrait.

4) Extraction aux solvants organiques

Le procédé consiste à épuiser le matériel végétal par un solvant à bas point d'ébullition qui par la suite, sera éliminé par distillation sous pression réduite. L'évaporation du solvant donne un mélange odorant de consistance pâteuse dont l'huile est extraite par l'alcool. (**Sahin et al., 2004**).

5) L'hydrodiffusion /Entraînement à la vapeur d'eau

Cette technique ne met pas en contact direct l'eau et la matière végétale à traiter. La vapeur détruit la structure des cellules végétales, libère les molécules contenues et entraîne les plus volatiles en les séparant du substrat cellulosique. La vapeur, chargée de l'essence de la matière première distillée, se condense dans le serpentin de l'alambic avant d'être récupérée dans un essencier (**Dastmalchi et al., 2008**). Après condensation, l'huile essentielle se sépare du distillat par décantation.

6) Hydrodistillation

Le principe de l'hydrodistillation correspond à une distillation hétérogène d'eau et d'un liquide organique qui met en jeu l'application de deux lois physiques (loi de Dalton et loi de Raoult). Cette méthode consiste à évaporer l'huile essentielle en chauffant un mélange d'eau ou d'autres matériaux comme les solvants avec la plante, suivie par la liquéfaction des vapeurs dans un condenseur, cette dernière étape peut s'effectuer sans ou avec retour d'eau dans le ballon. Le système conçu pour l'opération est appelé Clevenger.

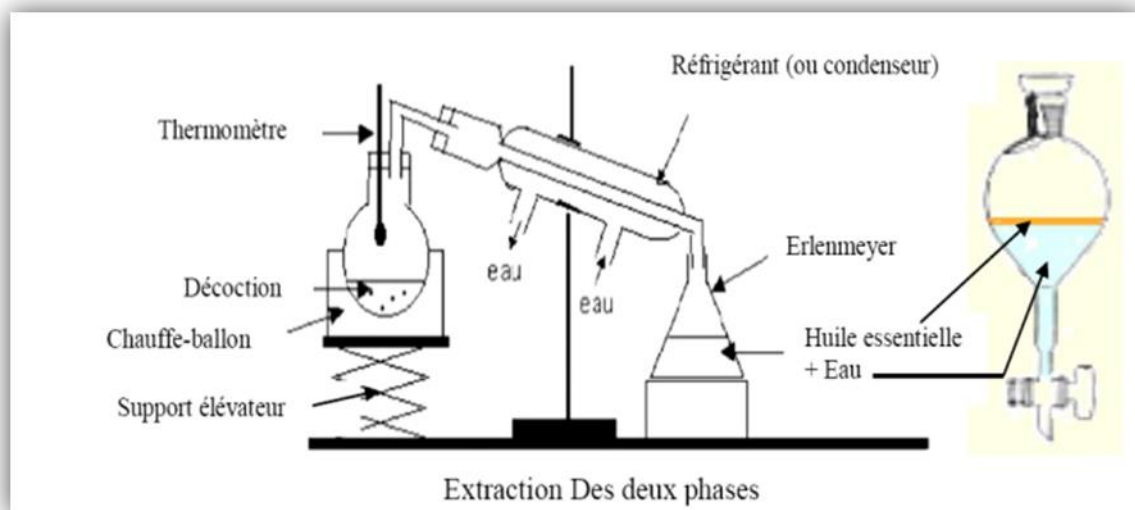


Figure 17 : Appareillage utilisé pour l'hydrodistillation de l'huile (Lagunez, 2007).

e) Les plantes étudiées

L'intérêt des plantes aromatiques n'a pas cessé de croître au cours de ces dernières années. Dans cette étude, nous sommes intéressés à l'espèce *Ammoïdes verticillata* et l'espèce *Artemisia judaïca*. Nous détaillons sa présentation, la description botanique, Nomenclature et sa systématique, la composition chimique, ses propriétés thérapeutiques.

❖ *Ammoïdes verticillata*

1) Présentation de la plante

Ammoïdes verticillata est une plante odorante qui pousse dans le nord de l'Afrique (Maroc, Algérie, Tunisie) ainsi qu'en Asie (Inde, Pakistan, Afghanistan). On la trouve généralement dans les pelouses, les montagnes et dans les forêts (Quezel & Santa, 1963).

2) Nomenclature

Non vernaculaire : Nounkha, Nûnkha (Trabut, 1935 ; Abdelouahid & Bekhechi, 2002).

Non scientifique : *Ptychotis verticillata* (Sijelmassi, 1991).

En français : Ajowan (Bekhechi et al ., 2010).



Figure 18 : Photo d'*Ammoïdes verticillata* (Choukri, 2015).

3) Description botanique

Plante annuelle de 15-35 cm. glaucescente, à racine grêle, pivotante , tige dressée, striée, grêle, à nombreux rameaux étalés , feuilles radicales pennatiséquées, à 3-5 segments très rapprochés, étroits, trifides, fruit petit et ovoïde (Benoît, 2012).

4) Classification

Selon (Quezel & Santa, 1963 et Guinochet & Vilmorin, 1975)

Régne : Plantae

Embranchement : Phanérogames

Classe : Dicotylédones

Ordre : Apiales

Famille : Apiacées

Genre : Ammoides

Espèce : *Ammoïdes verticillata*

5) Composition chimique

Tableau 03: Compositions chimiques majeures d'huile essentielle d'*Ammoïdes verticillata* (Senouci et al., 2020).

<i>Ammoïdes verticillata</i>			
Elément	%	Elément	%
α -Pinene	0.6	γ -Terpinene	9.6
Sabinene	0.1	Myrcene	0.5
Terpinen-4-ol	0.8	Thymol	0.2
p-Cymene	25.2	Carvacrol	33.2
α -Thujene	0.1	α -Humulene	0.1
Limonene	28.1	γ -Muurolene	0.2

6) Propriétés thérapeutiques d'*Ammoïdes verticillata*

Ammoïdes verticillata est une plante qui possède de nombreuses et précieuses propriétés médicinales (Ambasta et al., 1986). Cette plante possède également des propriétés antiallergique, anthelminthique, antivirale (Grosjean, 2004), antibactérienne, antifongique (Abdelouahid & Bekhechi, 2002 ; Laouer et al., 2003 ; Laouer et al, 2008) et hypocholestérolémiant (Agrawala & Pant, 1986).

❖ *Artemisia judaica*

1) Présentation de la plante

Cette Armoise est saharo-arabique. La sous-espèce Sahariensis, propre au Sahara central, abonde dans les lits d'oueds sablonneux. On la rencontre en fait dans de nombreuses régions, même sur sable grossier et gravillons. Mais elle ne pousse pas sur les hauteurs du Plateau (Benchelah et al, 2011). La sous-espèce est endémique au Maroc, Algérie et la Libye.

2) Nomenclature

En français : armoise de judée.

Non vernaculaire : chouhiya.

Nom scientifique : *Artemisia judaica* Lssp. *Sahariensis* (Quezel et santa, 1963).



Figure 19 : Photo d'*Artemisia judaica* (Benmansour, 2016).

3) Description botanique

Cet arbrisseau vivace, très rameux, forme de grosses touffes atteignant 60 à 80 cm de hauteur. Les tiges plus ou moins ligneuses ainsi que les petites feuilles divisées sont densément couvertes d'un duvet argenté, donnant à la plante sa couleur vert bleuté. Les capitules jaune pâle, est bombés, les inflorescences assez grosses, elles fleurissent au début du printemps. Les fruits sont des akènes petits ne dépassant pas 5 mm en taille. Une odeur très agréable se dégage de toute la plante (Benchelah et al., 2011).

4) Classification

Selon (Quezel & Santa, 1963 et Dupont , 2004)

Régne : Plantae

Embranchement : Phanérogames

Classe : Eudicots

Ordre : Astérales

Famille : Astéracées

Genre : *Artemisia*

Espèce : *Artemisia judaica*

5) Composition chimique

Tableau 04: Compositions chimiques majeures d'huile essentielle d'*Artemisia judaica*

(Gherib, 2009).

<i>Artemisia judaica</i>			
Elément	%	Elément	%
α -Pinene	1.8	Myrtenol	2.7
Sabinene	0.6	α -terpinyl ac	5.4
Terpinen-4-ol	1.9	Camphene	1.4
p-Cymene	0.4	Borneol	8.8
α -terpineol	3.9	Bornyl ac	2.3
Linalol	1.8	(E) – Nerolidol	1.8
δ - Terpinene	0.5	Davanone	7.6
		B –eudesmol	2.6

6) Propriétés thérapeutiques d'*Artemisia judaica*

Artemisia judaica jouit en revanche d'une grande réputation sur le plan médicinal. Autrefois, elle faisait l'objet d'un commerce important. L'Armoise de Judée est utilisée en infusion, en décoction ou séchée et réduite en poudre. Elle soulage les troubles de la digestion et sert de vermifuge. Elle est aussi réputée tonique. Son parfum lui vaut d'être ajoutée dans le troisième thé. Elle a des constituants médicinaux importants qui pourraient être utilisés dans la production de médicaments pharmaceutiques.

Al-mustafa & Al-thunibat (2008) ont rapporté que *Artemisia judaica* était parmi les plantes médicinales qui a le potentiel de l'activité antioxydant et utilisés par la population jordanienne comme un agent anti-diabétique traditionnelle.

Abdelgaleil et al., (2008) ; Ketoh et al., (2006) ; Saleh et al., (2006) et Dubey et al., (2000) ont publié de multiples travaux sur *l'Artemisia judaica*. Ils ont montré que les deux composés chimiques pipéritone et trans-cinnamate d'éthyle (principaux constituants d'huile essentielle *d'Artemisia judaica*) possèdent une activité insecticide contre *Callosobruchus maculatus* et une activité antifongique contre les champignons pathogènes pour l'homme et les végétaux.



Partie
Expérimentale

Le présent travail porte sur l'étude de quelques maladies fongiques de tomate présentes dans la wilaya de Naama, ainsi que l'évaluation des potentialités antifongiques de trois souches de *Bacillus subtilis*, et deux huiles essentielles extraites de deux plantes *Ammoides verticillata* et *Artemisia judaica*, contre les champignons causals de la fusariose et la pourriture grise de la tomate. Pour atteindre ces objectifs, notre travail a été effectué en quatre étapes :

I.1.1. Prospection et échantillonnage

1) Présentation de zone d'étude

Moghra « Kalaat Cheikh Bouamama » est une commune d'Ain Sefra située de la wilaya de Naama. Elle est située dans les monts des ksour, partie occidentale de l'Atlas saharien aux confins ouest de l'Algérie, au voisinage de la frontière marocaine. Elle est limitée au nord par le Djebel Cheracher, à l'est par le Djebel Boulerhad et au sud-est par le Djebel El Haimeur. Le Djebel Touzamet la limite au sud. Elle bénéficie d'un bioclimat saharien aride à hiver froid, la fréquence des vents qui soufflent fréquemment du Sud-Ouest au Nord-Est. La température moyenne annuelle est de 16°C (**Fig.20**).

Le présent travail a été réalisé dans une exploitation agricole située à environ de 10 Km de Kalaat Cheikh Bouamama.

Position Géographique de la Zone d'Etude "Kalaat Cheikh Bouamama"

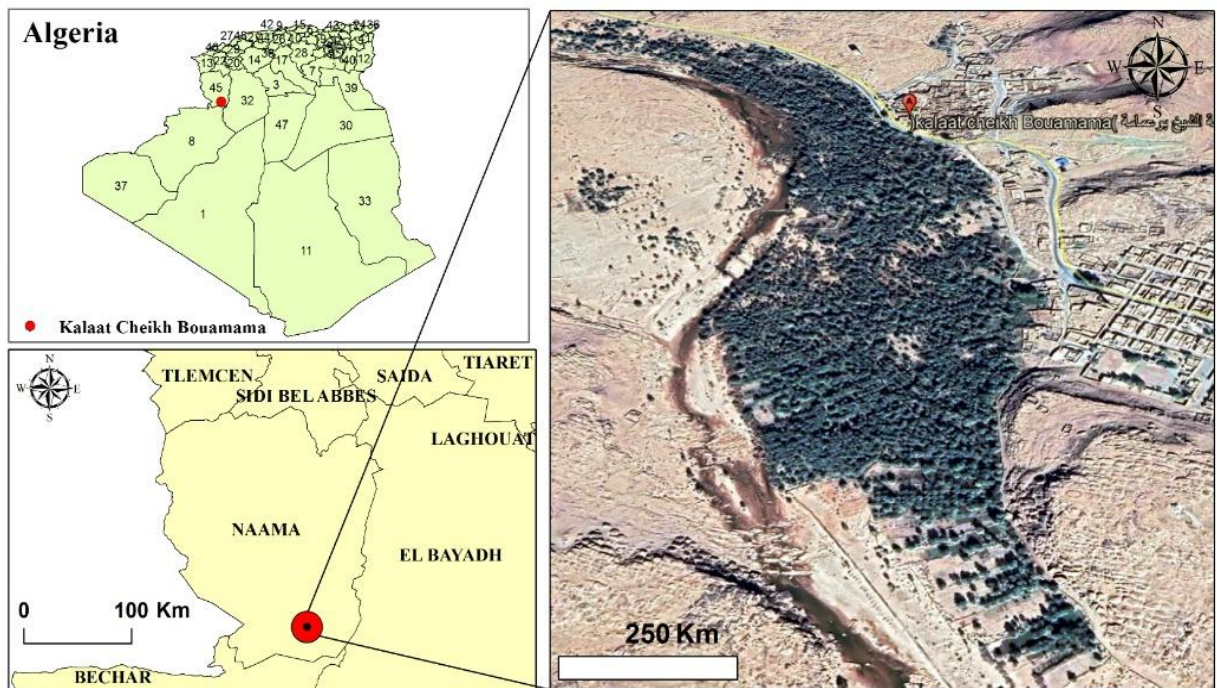


Figure 20: Situation géographique de lieu des prélèvements.

2) Prospection des symptômes et prélèvement des échantillons

La prospection sur terrain ainsi que le prélèvement des échantillons de tomate (*solanum lycopersicum*) ont été effectués à partir de 09 serres, chacune occupant une superficie de 50 m de longueur sur 08 m de largeur (**Fig.21**).

L'examen visuel qui se repose sur l'observation des symptômes caractéristiques des maladies fongiques est complété par des recherches dans la bibliographie qui concerne la phytopathologie d'origine fongique de la tomate, pour confirmer la présence des maladies en question.

Les échantillons prélevés sont acheminés directement au laboratoire afin d'être analysés.

Nous signalons qu'un traitement phytosanitaire à base de VAPCOTOP « thiophanate-méthyl (TM) » a été appliqué plusieurs fois dans les serres examinées.



Figure 21 : Photos des serres examinées.

I.1.2 Isolement et identification des germes phytopathogène causales des maladies les plus virulentes dans la région d'étude

1) Isolement de l'agent pathogène

➤ Désinfection de la surface

Les plantes transportées au laboratoire ont été soumis à une procédure de stérilisation de surface. Au départ, toutes les plantes ont été lavées dans de l'eau du robinet pour éliminer les particules de sol et les débris adhérents. Ceci a été suivi par une désinfection à l'hypochlorite de sodium à 2% pendant 2 minutes, puis rincés 3 fois à l'eau distillée stérile et séchés entre 2 papiers buvard stériles (**Boubacar et al., 2009**).

L'isolement a été effectué par deux méthodes :

➤ Méthode direct

Cette méthode concerne principalement les champignons de la surface. Des fragments découpés à partir des racines, feuilles, tiges de tomates malades ont été ensemencés dans le milieu gélosé PDA (Potato Dextrose Agar) (additionné de l'acide lactique 30%) (**Annexe I**) sur des boîtes de Pétri. Celles-ci sont ensuite fermées hermétiquement à l'aide du papier film et incubées à 25 °C pendant 7 jours (**Koroler & Katan, 1997 ; Oadah et al., 2011**).

➤ Méthode indirect

Cette méthode concerne les champignons de la surface et de la profondeur. A partir de chaque échantillon, on prend 1g des tissus broyés, et on les met dans 9ml d'eau physiologique,

ce qui correspond à la dilution 10^{-1} . Ensuite, 1ml de cette dernière est ajouté à 9ml d'eau physiologique pour avoir la dilution 10^{-2} , afin d'arriver à la concentration 10^{-3} , avant de passer d'une dilution à l'autre il faut bien mélanger les tubes par le vortex.

Des boites de pétri contenant les milieux PDAac, sontensemencées avec 1ml des dilutions. Ensuite on passe à l'incubation à 25 °C pendant 7 jours.

L'ajout de l'acide lactique (30%) à raison de 1ml par flacon (≈ 200 ml) empêche le développement des bactéries.

2) Purification des isolats

La purification a pour but de faciliter l'identification des souches fongiques obtenues. En fait, les colonies développées autour des fragments du végétal ne sont jamais pures et dans la plupart des cas sont associées à d'autres champignons ou bactéries, ce qui nécessite une opération de purification avant toute manipulation. Pour cela, nous avons réalisé des repiquages successifs de manière aseptique à l'aide d'anse de platine. Des explants de culture ne présentant aucune contamination sont choisis dans la zone périphérique de croissance des colonies et redéposés soigneusement dans des boites de Pétri contenant le milieu PDAac.

3) Identification des agents phytopathogènes

Nous avons fait une étude corrélative entre les aspects macroscopiques et microscopiques afin d'arriver aux genres lors de l'identification de nos isolats.

a) Aspect macroscopique

L'étude de l'aspect macroscopique des colonies se base en général sur la forme, la taille et la couleur de celle-ci. La technique utilisée est simple, elle consiste à observer à l'œil nu les boites de Pétri contenant les champignons purifiés. Elle se base essentiellement sur les caractères suivant :

- ✚ La texture de colonie : velouté, laineux, poudreuse.
- ✚ La couleur : du recto et du verso de la boite de pétrie.

b) Aspect microscopique

Technique du scotch : consiste à adhérer à l'aide d'un bout de scotch une fraction mycélienne à partir d'une culture jeune et de la coller sur une lame contenant quelques gouttes de bleu de méthylène. Il convient d'éliminer l'excès de colorant autour du scotch avec une feuille de papier

absorbant. Les observations microscopiques sont effectuées aux grossissements X40 (**Chabasse et al., 2002**).

L'identification microscopique d'un champignon prend en considération caractères suivants :

- a) La forme du mycélium, la présence ou l'absence de cloisons, la couleur et le mode de ramification.
- b) La forme des spores.
- c) La morphologie générale du champignon.

4) Etude du pouvoir pathogène

En 1890, **Robert Koch** publia ce qu'on a appelé depuis les postulats de Koch, servant à déterminer si une maladie donnée est causée par un microbe donné. La pathogénicité d'un microorganisme induit des symptômes sur les organismes sains inoculés. Ceci peut être vérifié par des contaminations artificielles suivi par le ré-isolement du germe à partir des organismes malades.

a) Préparation le mini- serre de tomate

Nous avons réalisé une mini serre à l'aide d'un chariot mobile du laboratoire, entouré d'un plastique transparent, dans lequel nous avons créé les conditions environnementales (la lumier, la temperature , l'humidité) favorables à une croissance optimale des champignons à tester (**Fig.22**).



Figure 22 : Photo représenté le mini- serre.

- **Préparation des pots**

Pour préparer le matériel végétal, des pots sont lavés par l'eau distillée puis désinfectés à l'hypochlorite de sodium. Ils sont ensuite remplis d'un mélange de sol / terreau puis ces derniers ont été bien arrosés, par la suite une fosse a été créée dans le centre des pots.

- **Préparation des suspensions fongiques**

Pour préparer les suspensions fongiques destinées à la réalisation de cette partie. Nous avons utilisé des cultures pures des champignons dans des boites de Pétri contenant le milieu PDA. Le contenu de chaque boîte a été raclé pendant 30 secondes dans 10 ml d'eau physiologie à l'aide d'une pipette pasteur recourbée, puis récupérer par micropipette (**Zaim et al., 2013**).

Puis nous avons déposé 10 µl de la suspension fongique sur la cellule malassez qui permet la détermination de nombre de spores contenus dans un volume précis de l'eau physiologique, les résultats de numérotation sont exprimés en concentration cellulaire c'est-à-dire en nombre de cellules (spores) par millilitre. La numérotation cellulaire est réalisée directement par comptage au microscope optique en calculant le nombre moyen de cellules par rectangle (total des cellules observées dans 5 rectangles divisé par le nombre de rectangles comptés) selon la loi suivant :

$$\text{Nombre de cellules (spores/ml)} = \text{moyenne} * \text{facteur de dilution} / 10^{-5}$$

La concentration de la suspension a été ajustée par dilution avec de l'eau physiologie afin d'obtenir une concentration de 10^6 spores/ml qui s'était révélée suffisante pour provoquer la manifestation des symptômes des maladies fongiques (**Westerlund et al., 1974**).

- **Inoculation des plantes**

Des jeunes plantules saines de tomate de la variété « Varella » ont été utilisées pour confirmer le pouvoir pathogène de nos isolats fongiques (**Fig.23 : a**), dont nous avons procédé à faire un nettoyage de la partie racinaire avant de découper quelques extrémités (à l'ordre du Micromètre) de quelques racines avant le pivot (**Fig.23: b**), et de les mettre pendant 45 minutes dans des tubes en verre qui contiennent les suspensions fongiques préparées au préalable (**Fig.23: c**).

En suite les plantules inoculées ont été transférées dans les pots. Les parties du sol qui entourent les pivots des plantules ont été arrosés par les différentes suspensions fongiques (**Fig.23: d**).

Parallèlement et dans les mêmes conditions les pots de plantules témoins sont pulvérisés avec 10 ml d'eau distillée stérile (kumar & srivastava, 2013) .



Figure 23 : Photos représentent les étapes de l'étude du pouvoir pathogène.

- **Ré-isolement des champignons**

Nous avons fait un suivi quotidien des plantules dans l'attente de l'apparition des symptômes qui correspondent à des maladies fongiques de la tomate.

Afin de confirmer le postulat de kokh et d'assurer que les champignons isolés dans la présente étude sont à l'origine des symptômes apparus, les deux méthodes d'isolement directe et indirecte (décrites précédemment) ont été suivies pour le reisolement des champignons à partir des plantules utilisées (Fig.24).

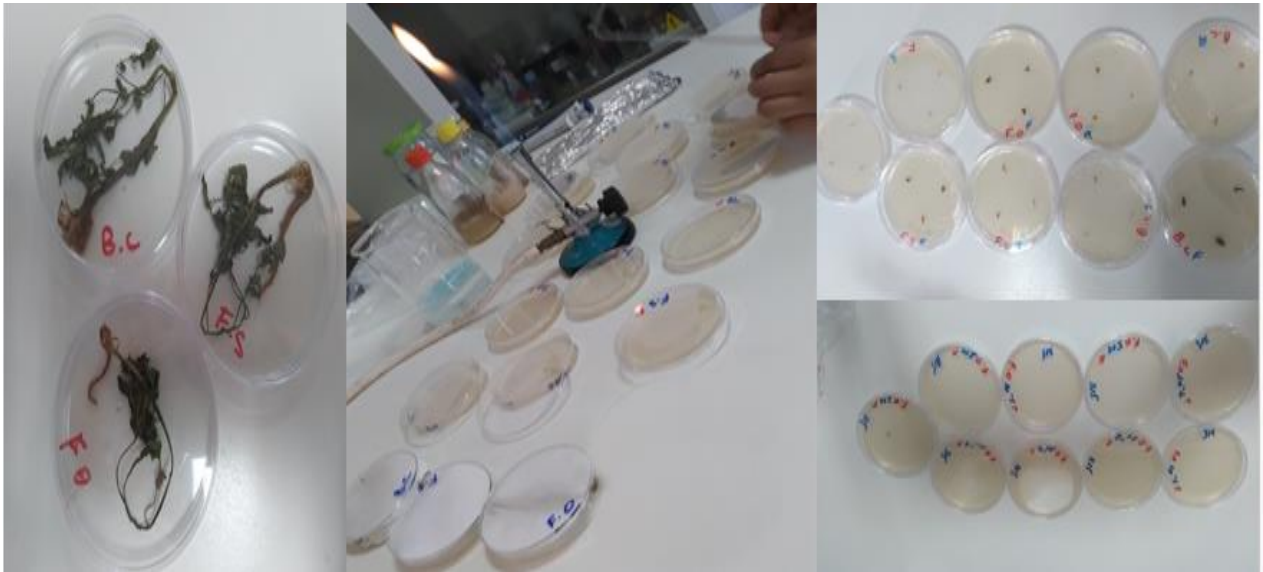


Figure 24: Photos représentent l'étape de ré-isolément.

I.1.3 Essais de lutte biologique

- **Etude du potentiel antagoniste de trois souches de *Bacillus subtilis* contre les agents causals de la fusariose et la pourriture grise**

1) Présentation des souches de *Bacillus subtilis*

Les souches bactériennes (B2C- S2DSP- BM14) nous ont été fournies par le laboratoire d'écologie et gestion d'écosystèmes naturels (Université de Tlemcen), Le tableau ci-dessous illustre leur affiliation à l'espèce *Bacillus subtilis* suite à un traitement de leurs séquences obtenues après la technique de PCR16S par l'outil BLAST du NCBI.

Tableau 05 : Résultat du traitement des séquences des souches bactériennes (B2C- S2DSP- BM14) obtenues après la technique de PCR16S par l'outil BLAST du NCBI.

Strain	Homology (%)	Closest relative	Acc. N.	Phylogenetic group
S6DSP	99	<i>Bacillus pumilus</i>	KJ526885.1	Bacteria; Firmicutes; Bacilli; Bacillales; Bacillaceae; Bacillus; <i>Bacillus cereus</i> group.
S6DSG	99	<i>Bacillus thuringiensis</i>	KJ011876.1	Bacteria; Firmicutes; Bacilli; Bacillales; Bacillaceae; Bacillus; <i>Bacillus cereus</i> group.
S3DSG	100	<i>Bacillus mycoides</i>	EU924505.1	Bacteria; Firmicutes; Bacilli; Bacillales; Bacillaceae; Bacillus; <i>Bacillus cereus</i> group.
S2DSP	99	<i>Bacillus subtilis</i>	KU821696.1	Bacteria; Firmicutes; Bacilli; Bacillales; Bacillaceae; Bacillus; <i>Bacillus cereus</i> group.
S2DSG	99	<i>Bacillus thuringiensis</i>	KJ937088.1	Bacteria; Firmicutes; Bacilli; Bacillales; Bacillaceae; Bacillus; <i>Bacillus cereus</i> group.
BSUBG	99	<i>Bacillus subtilis</i>	JQ361065.1	Bacteria; Firmicutes; Bacilli; Bacillales; Bacillaceae; Bacillus; <i>Bacillus cereus</i> group.
BM5	99	<i>Bacillus subtilis</i>	HM590703.1	Bacteria; Firmicutes; Bacilli; Bacillales; Bacillaceae; Bacillus; <i>Bacillus cereus</i> group.
BM3	99	<i>Bacillus thuringiensis</i>	HM068889.1	Bacteria; Firmicutes; Bacilli; Bacillales; Bacillaceae; Bacillus; <i>Bacillus cereus</i> group.
BM14	100	<i>Bacillus subtilis</i>	KM492825.1	Bacteria; Firmicutes; Bacilli; Bacillales; Bacillaceae; Bacillus; <i>Bacillus cereus</i> group.
BEN13	99	<i>Bacillus thuringiensis</i>	KM280648.1	Bacteria; Firmicutes; Bacilli; Bacillales; Bacillaceae; Bacillus; <i>Bacillus cereus</i> group.
B2C	99	<i>Bacillus subtilis</i>	KM492825.1	Bacteria; Firmicutes; Bacilli; Bacillales; Bacillaceae; Bacillus; <i>Bacillus cereus</i> group.

2) Méthode de Confrontation directe

La confrontation directe (ou test des métabolites diffusibles) est réalisée selon la technique décrite par **Lundberge & Unestan (1971)**, et **Dennis & Webster (1980)**. Cette technique consiste à déposer sur un côté d'une boîte de Pétri contenant de milieu (PDA), une pastille gélosées d'environ 06 mm du champignon qui ont prouvé un pouvoir pathogène et, d'ensemencer le deuxième coté par une suspension bactérienne de *Bacillus subtilis* d'une concentration de 10^{-7} . Les boîtes témoins sont préparer de la même façon mais en absence de l'agent antagoniste (**Fig.25 et 26**). Toutes les expériences effectuées ont été répétées 03 fois. et l'incubation est réalisée à 25°C.

La lecture des résultats consiste à mesurer la distance parcourue le champignon en direction de l'antagonisme bactérien à partir de la 3^{ème} journée.

Le pourcentage d'inhibition est calculé selon (**Wang & Hsio, 2002**) et (**Trivedi & Pandey, 2008**) comme suit:

$$\text{Inhibition(\%)} = (\text{R témoin} - \text{R test}) / \text{R témoin} \times 100$$

Témoin : distance de la croissance radiale max du champignon.

Témoin test : distance radiale de croissance du champignon avec présence de la souche bactérienne.

NB: on peut parler d'inhibition que lorsque (%) inhibition est supérieur à 20%.

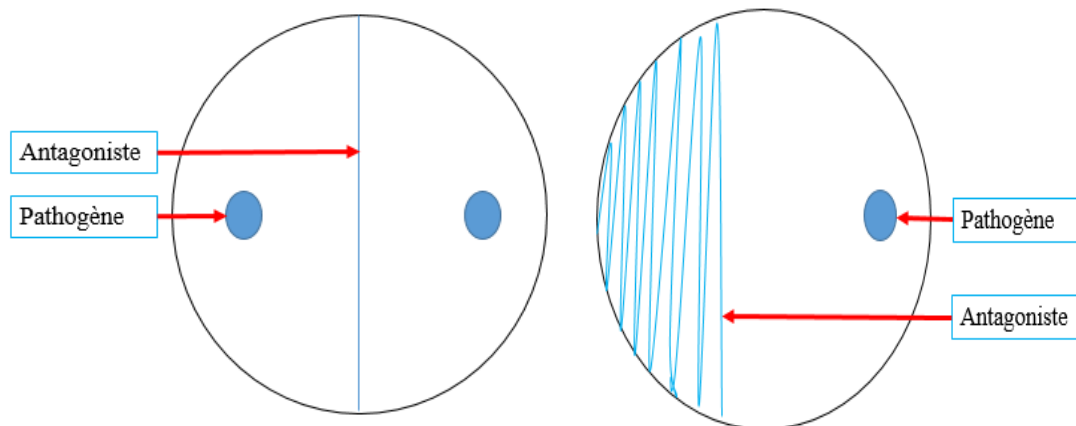


Figure 25: Schéma représente la méthode directe.



Figure 26: Photos représentent la manipulation de méthode directe.

3) Méthode de confrontation indirecte

Le principe utilisé dans cette méthode repose sur la technique décrite par **Comporta (1985)**. Cette technique consiste à confronter indirectement la souche antagoniste avec le champignon phytopathogène et évaluée l'action antagoniste grâce à l'action des substances volatiles sécrétées par l'antagoniste testé. Elle consiste à déposer un disque du champignon qui ont prouvé un pouvoir pathogène de 6 mm de diamètre au centre d'une boîte de Pétri contenant un milieu PDA. Et d'ensemencer la deuxième boîte Pétrie contenant le milieu GN par une suspension bactérienne de *Bacillus subtilis* d'une concentration de 10^{-7} . Les couvercles des deux

boîtes sont retirés et un assemblage est réalisé par superposition des deux boîtes. La jonction entre les deux boîtes est assurée par des couches de parafilm afin d'éviter toute déperdition des substances volatiles (**Fig.27et 28**).

La réalisation du témoin consiste à la superposition des deux boîtes de la même manière mais, celle du milieu GN ne contient pas l'agent antagoniste. Toutes les expériences effectuées ont été répétées 03 fois. L'ensemble des boîtes sont ensuite incubées à 25°C. La lecture des résultats consiste à mesurer les diamètres des différents champignons à partir de la 3^{ème} journée (**Daami-Remadi & El Mahjoub, 2001**) (**Gargouri-Kamoun et al., 2016**).

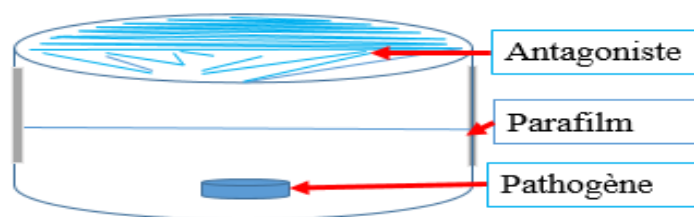


Figure 27: Schéma représente la méthode indirecte.



Figure 28 : Photos représentent la manipulation de méthode indirecte.

4) Méthode de filtrat

1) Préparation des filtrats

Les bactéries ont été cultivées séparément dans des flacons stériles de 250 ml contenant 90 ml de bouillon nutritif sous agitation à 180 tr/min avec à une température de 37°C pendant 48h (**Fig.30: a**), puis 12 ml de chaque culture bactérienne a été mis dans des tube à hémolyse avant de passer à une centrifugation à 3000 rpm pendant 10 min (**Fig.30: b**).

Le surnageant issu de la centrifugation a subi une filtration sur filtre millipore stérile de 0.22 μm de diamètre à l'aide d'une seringue stérile (**Fig.30: c**) (Esaú Ruiz et al., 2016 ; Noor khan et al., 2018).

2) Evaluation de l'action du filtrat sur la croissance mycélienne

L'incorporation du filtrat au milieu PDA est faite à une concentration de 25%, des disques de 06 mm de diamètre sont prélevées à la périphérie des différentes cultures fongiques qui ont prouvé un pouvoir pathogène, puis placés au centre du boite de Pétri contenant le milieu PDA (**Fig.29 et 30 : d**). Le témoin négatif contient le disque du champignon dans un milieu PDA sans filtrat. Toutes les expériences effectuées ont été répétées 03 fois. L'ensemble des boites sont ensuite incubées à 25°C.

La lecture des résultats consiste à mesurer les diamètres des différents champignons à partir de la 3^{ème} journée.

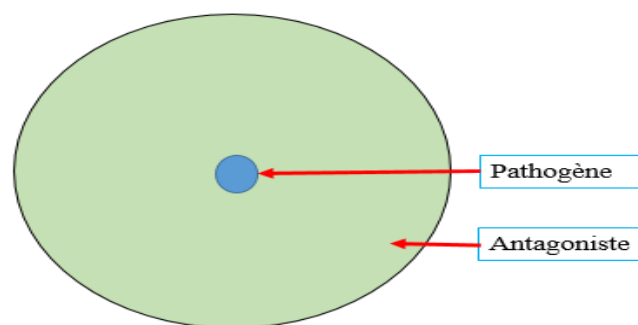


Figure 29 : Schéma représente la méthode de filtra.

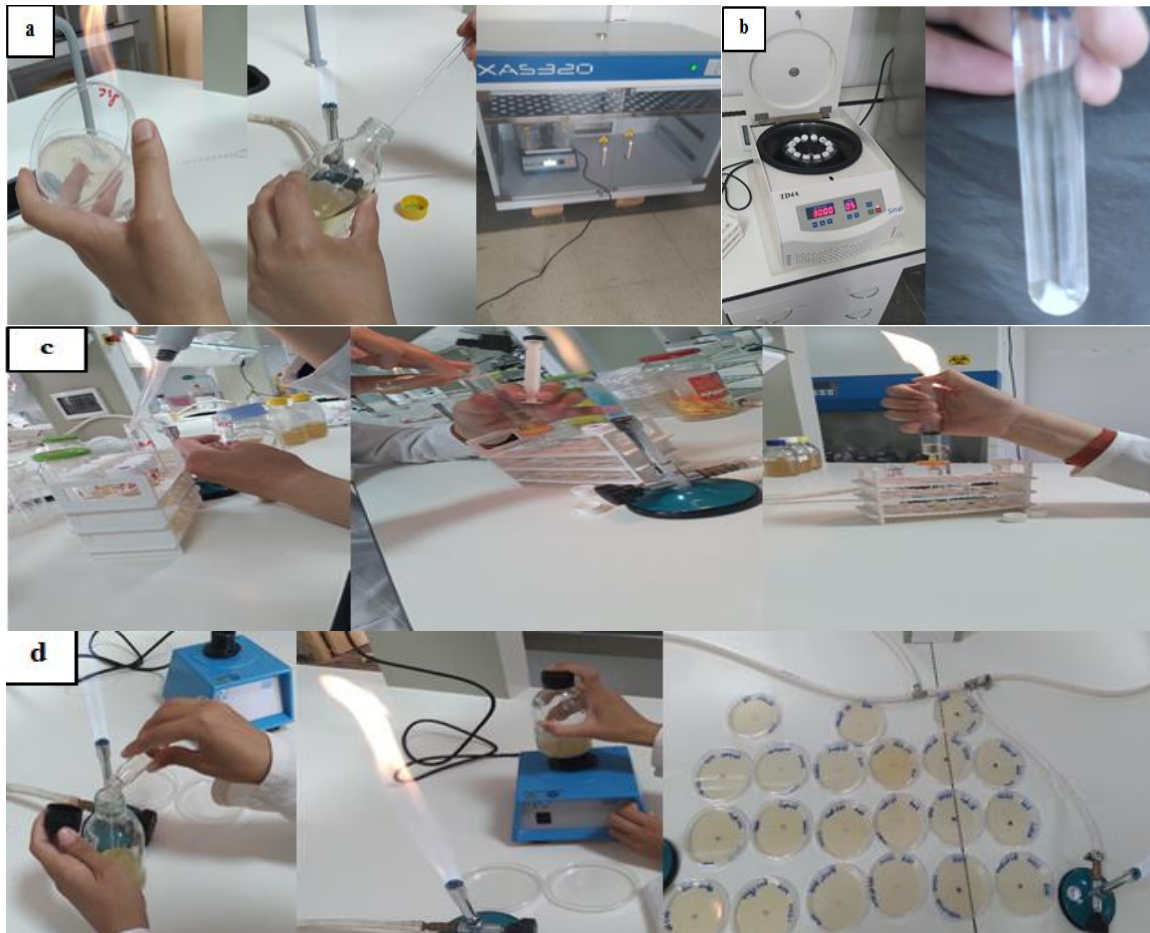


Figure 30: Photos représentent les différentes étapes de la méthode de filtra.

➤ **Observation microscopique :**

Des lames préparées et colorées au bleu de méthylène à partir de la zone de contact entre les agents antagonistes et les agents pathogènes ont été soumises à des observations microscopiques au différent grossissement, afin révéler toute modifications sur les champignons issue de ce contact.

I.1.4 Evaluation de l'activité antifongiques de deux huiles essentielles de *Ammoides verticillata* et *Artemisia judaica*

1) Matériel végétal

Nous avons utilisé la partie aérienne d'*Ammoides verticillata* et *Artemisia judaica* pour extraire leurs huiles essentielles, et tester leurs activités antifongiques sur champignons isolés.

2) Récolte de matériel végétal

Artemisia judaica : la partie aérienne d'*Artemisia judaica* a été récoltée dans la wilaya de Naama le mois d'avril 2021 dans la région d'Ain Sefra : Djebel Aissa.

Djebel Aissa est une montagne culminant à 2236 m d'altitude dans l'ouest de l'Algérie dans la wilaya de Naama. Il est situé à 14 km de la commune de Tiout relevant de la daïra d'Ain Sefra. Le parc national de Djebel Aissa est une zone protégée couvrant la montagne depuis 2003 (Fig.31 : a).

Ammoides verticillata : la partie aérienne d'*Ammoides verticillata* a été récolté dans la wilaya de Tlemcen le mois d'avril 2021 dans la région de Terny.

La commune de Terny Beni Hdiel Située au centre de la wilaya de Tlemcen. Elle est bordée au nord par Mansourah, Tlemcen. Au sud par Sebdou, à l'est par l'oued Lakhdar et à l'Ouest par Sabra (Fig.31: b).



Figure 31: Situation géographique des lieux des prélèvements.

3) Préparation des échantillons

Le matériel végétal récolté est ensuite séché à l'abri de la température et la lumière de soleil pendant huit (08) jours en moyenne. Après l'opération de séchage, le matériel a été conservé dans des sacs en papier.

4) Extraction de l'huile essentielle

La technique utilisée dans la présente étude pour l'extraction de l'huile essentielle est la technique conventionnelle par hydro distillation (water distillation), l'extraction a été faite par un montage de type Clevenger (Fig. 32).



Figure 32: Montage de type Clevenger.

1-Chauffe ballon ,2-Ballon de 01 L, 3-Matériel végétale, 4-Reffrigerant, 5-Entree d'eau,
6-Sortie d'eau, 7-Ampoule à décanter

Le principe de cette méthode consiste à exploiter la volatilité des constituants de l'HE. Le matériel végétal est immergé directement dans l'eau distillée, dont 80 à 100 g de matériel végétal sec est introduit dans un ballon de 01 litres imprégné d'eau distillée, l'ensemble est porté à l'ébullition pendant 2 à 3 heures. Les composés volatils entraînés par la vapeur d'eau dégagée sont condensés au niveau d'un réfrigérant et puis sont récupérées. Après décantation l'huile essentielle obtenue est conservé à une température de 4°C dans des tubes secs (**Bettaieb R. et al. , 2017**).



Figure 33 : Photos représentent la préparation des plantes.

5) Calcul le rendement des huiles essentielles

Le rendement est défini comme étant le rapport entre la masse de l'huile essentielle obtenue et la masse du matériel végétal utilisé, le rendement est exprimé en pourcentage (%) et calculé par la formule suivante :

$$\text{RHE} = (\text{mh}/\text{mv}) * 100$$

RHE = rendement de huile essentielle en %.

mh=masse d'huiles essentielles récupérées en gramme (**g**).

mv= masse d'essai du matériel végétal en gramme (**g**) (Selvakumar et *al.*, 2012).



Figure 34: Photos représentant le poids d'huile.

6) Méthodes d'évaluation de l'activité antifongique

Dans un premier temps nous avons testé les huiles essentielles des deux espèces végétales vis-à-vis des trois champignons par une méthode de diffusion sur disque et dans l'affirmation, nous avons déterminé la concentration minimale CMI en milieu solide .

a) Méthode de diffusion de disque dans un milieu gélosé

➤ Préparation de suspension fongique

Les boîtes contenant les souches fongiques pures sont remplies par 10 ml d'eau physiologique. la suspension sporale par la suite est récupéré par une pipette pasteur recourbé dans des tubes a hémolyses.

La concentration de la suspension a été ajustée par dilution avec de l'eau physiologie afin d'obtenir une concentration de 10^6 qui correspond à une valeur comprise entre 0.12 à 0.16 par colorimètre à une longueur d'onde de λ 560 à 600q (**Fig.35 : a**).

Testes d'huile

Nous avons mélangé 75 μ l d'huile essentielle et 25 μ l de DMSO dans des microtubes (**Fig.35: b**). Sur une boîte de pétri qui contient 15 ml de milieu PDA on a ensemencé en surface 1 ml de suspension fongique avec un écouvillon. L'excédant est éliminé par aspiration (**Fig.35: c**) et après quelques minutes des disques de papier filtre stérile 6 mm de diamètre ont été déposés au centre de la boîte et imbibés par 15 μ l de HE (**Fig.35 : d**), en ce qui concerne la boîte témoin, elle à été inoculée de la même façon et le disque en papier a été imbibé par 15 μ l de DMSO (**Gherib, 2014**).



Figure 35: Evaluation de l'activité antifongique par la méthode de diffusion.

Des disques mycéliens de 06 mm de diamètre prélevés à partir de la périphérie des cultures fongiques obtenues, sont déposés aseptiquement au centre des boîtes de pétri contenant le milieu PDA additionné des différentes concentrations d'huile essentielle avec une répétition pour chaque isolat et chaque concentration (**Fig.37 : b**). Les boîtes de pétri témoins contiennent 15 ml de milieu PDA additionné du Tween 20 (sans huile essentielle).

Les souches testées sont ensuite incubées à 25°C. La mesure de la croissance mycélienne est effectuée à partir du 3^{ème} jour par mesure des deux diamètres perpendiculaires des colonies.

Tableau 06: Les différentes concentrations des huiles.

Huiles essentielles	Les concentrations (µl/ml)					
	<i>Ammoidas verticillata</i>	1	0.5	0.25	0.15	0.1
<i>Artemisia judacia</i>	4	3	2	1	0.5	0.25

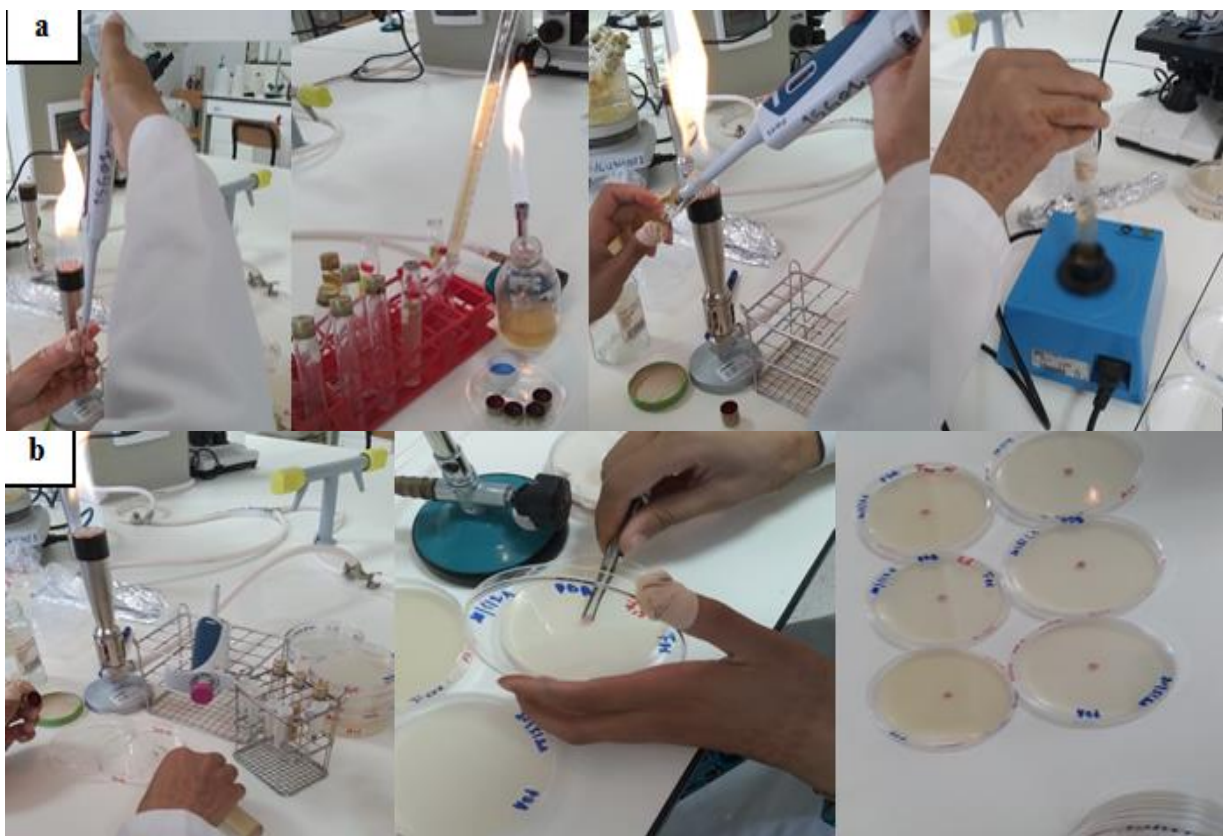


Figure 37 : Différentes étapes de méthodes de mesure de CMI.

➤ **Analyse statistique des données**

Le traitement statistique des résultats obtenus a été effectué à l'aide du logiciel « IBM SPSS ».



Résultats
Et
Discussions

I) Prospection et échantillonnage

1) Prospection des symptômes et prélèvement des échantillons

Au niveau des serres existant à Kalaat Cheikh Bouamama, on a remarqué des symptômes différents qui apparaissent sur différentes parties de la plante de tomate.

Ces symptômes sont présents dans la majorité des serres. Ils sont manifestés au niveau des fruits, feuilles, tiges, racines (**Fig.38 et 39**). Et ils correspondent dans la majorité des cas à ceux des deux maladies la fusariose et la pourriture grise.



Figure 38 : Symptômes observés de la pourriture grise.

1 : l'apparition de taches brunes, **2:** l'apparition d'un feutrage gris **3 :** Pourrissement des tissus infectés



Figure 39 : Symptômes observés de La fusariose.

1 : Dessèchement et mort des feuilles ,**2 :** Brunissement longitudinal de la tige, **3 :** Flétrissement et jaunissement des feuilles.

2) Isolement des moisissures responsables de la fusariose et la pourriture grise de la tomate

A l'issu de l'isolement des agents pathogènes par les deux méthodes (directe et indirecte) sur le milieu PDA, nous avons obtenu des cultures fongiques de différents aspects, (**Fig.40**), à partir desquelles nous avons procédé à faire la purification des aspects qui disposent les caractéristiques phénotypiques des agents responsables des deux maladies la fusariose et la pourriture grise de la tomate et qui sont les plus virulentes dans l'exploitation agricole examinée.

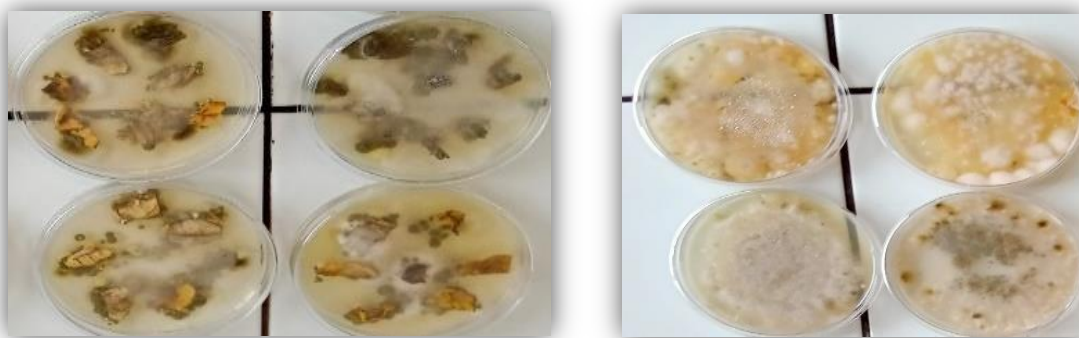


Figure 40 : Résultats d'isolement.

➤ **Résultats de la purification**

Après repiquage successif des germes fongiques ayant les caractéristiques phénotypiques citées précédemment, nous avons abouti aux isolats purs présentés dans la figure suivante :



Figure 41: Résultats de purification.



➤ **Identification des agents phytopathogènes**

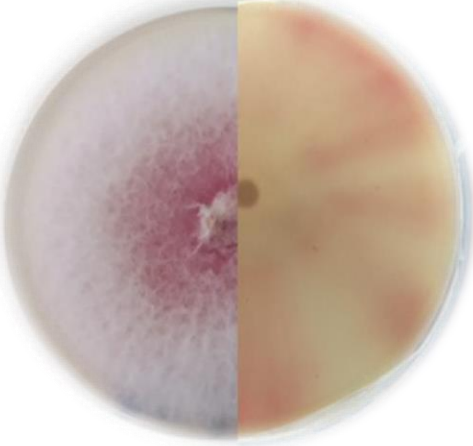


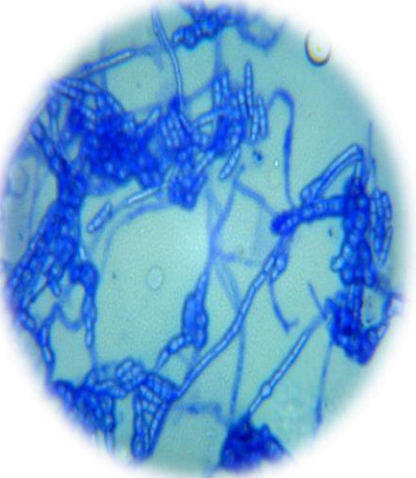
L'étude macroscopique des isolats a révélé une variabilité morphologique au sein de notre collection de souches fongiques obtenues et a permis de dénombrer trois morphotypes : cotonneuses, duveteuse a floconneuse avec une variabilité de pigmentation (blanc, gris, rose clair) (**Tableau 07**).

Les isolats purs obtenus ont été par la suite soumises à une étude microscopique afin d'étudier essentiellement les caractéristiques de leurs mycéliums, macroconidies, micrconidies, phialides, chlamydozspores et aussi la forme, l'enchainement et la taille des spores (**Tableau 07**).

Une étude corrélative entre ces aspects macroscopiques et microscopiques en se basant sur les clés de détermination de (**Chabasse et al., 2002 ; John & Ailsa, 2009**) nous a permis de confirmer l'appartenance de nos isolats fongiques aux espèces suivantes : *Botrytis cinerea*, *Fusarium oxysporum*, *Fusarium solani*.

Tableau 07 : Résultats d'identification.

Le champignon	L'aspect macroscopique		L'aspect microscopique	
	Face/Revers	Description	Observation(X40)	Description
<i>Botrytis cinerea</i>		<ul style="list-style-type: none"> - Croissance très rapide. -Couleur : blanc puis gris à brun noir. 		<ul style="list-style-type: none"> -Conidiophores issus d'hyphes aériens, chacun portant en bout une grappe irrégulière de branches courtes. -Sommets sphériques renflés. -Conidies portées séparément de ces apex, ellipsoïdale.

<p><i>Fusarium oxysporum</i></p>		<ul style="list-style-type: none"> -Aspect : duveteuse à floconneuse. -Croissance : rapide. -Couleur : le mycélium présent des pigmentations blanches, rose. 		<ul style="list-style-type: none"> -Macroconidies sont rares, microconidies, ellipsoïdales unicellulaires. -Chlamydospores sont abondantes et tardives.
<p><i>Fusarium solani</i></p>		<ul style="list-style-type: none"> - Aspect : cotonneuse et duveteuse. -Croissance : rapide. - Couleur : le mycélium présente des pigmentations blanches à crème avec un verso pâle. 		<ul style="list-style-type: none"> -Macroconidies en forme de fuseau asymétrique, microconidies oblongues unicellulaires. - Conidiophores sont simples ou disposés en verticilles, monophialides cylindriques.

Nos résultats qui concernent l'isolement des deux agents responsables de la fusariose et la pourriture grise de tomates sont en accord avec plusieurs études réalisés à l'échelle nationale.

Debbia en 2019 a étudié la caractérisation morphologique des isolats de *Fusarium* spp et identifier cinquante isolats fongiques de *Fusarium oxysporum*. Ces isolats proviennent de plantes de tomate présentant des symptômes de jaunissement et/ ou de flétrissement, collectés à partir de grandes zones de production de la tomate en Algérie. En effet, ces isolats ont présenté des caractères morphologiques macroscopiques (mycélium de couleur blanche, pigment violet) et microscopique (Microconidies, Phialides, Macroconidies, Chlamydozspores).

Benaouali en 2015 a fait un isolement à partir des plantes de tomate de différentes régions de l'ouest algérien (Oran, Mostaganem, Chlef), il a trouvé 27 isolats de *Fusarium oxysporum* après une étude approfondie des caractères macroscopique et microscopique.

Aussi **Aissat en 2008** a identifié plusieurs affections qui sont à l'origine de pertes en rendement ou qui ont altéré la qualité des fruits. Les observations sur le terrain et les résultats des isollements ont abouti à l'identification de champignons responsables de mycoses aériennes sur les différents organes de la tomate. L'observation sous microscope a montré un mycélium cloisonné, et les spores ont disposées sous forme de grappes portées par un conidiophore. Ces caractères microscopiques ont confirmé que l'agent causale est *Botrytis cinerea*.

➤ Confirmation de pouvoir pathogène

Lors de l'étude de la virulence de *Botrytis cinerea*, *Fusarium oxysporum*, *Fusarium solani* nous avons remarqué qu'après 10 jours de l'inoculation les symptômes apparus sur les plantules sont identiques à ceux observées sur les plantes ayant servis d'isolement, en provoquant chez celle-ci de graves lésions de flétrissement (**Fig.42**). Les plantules non inoculées par les champignons (témoins) sont restées intactes.



Figure 42 : Suivi de l'évolution des symptômes sur les plantules inoculées.

Pour confirmer la virulence de nos souches, les plantules présentant des symptômes sont récupérées en vue de faire le ré-isolement et la purification des trois agents pathogènes (**Fig.43**).

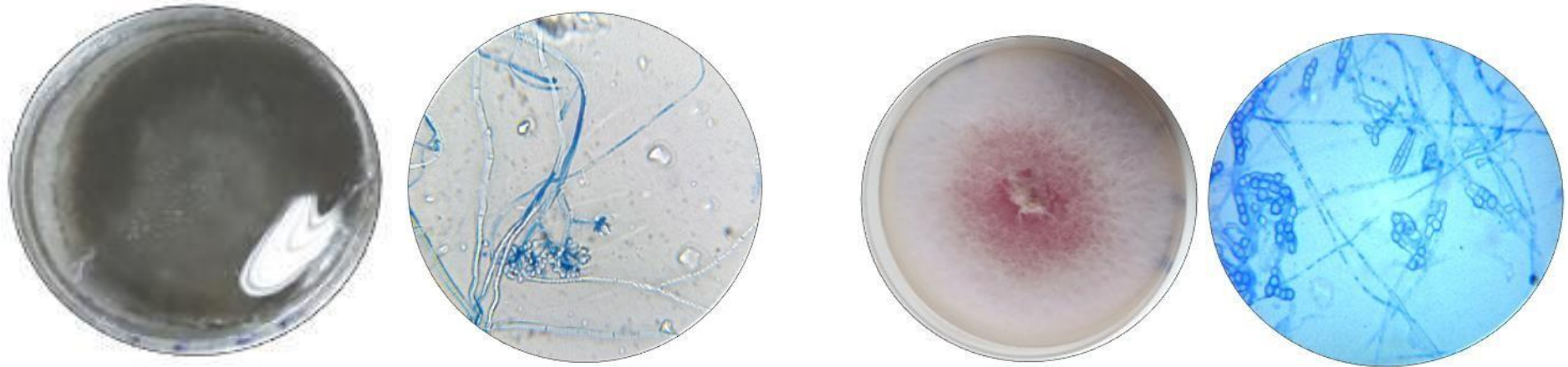


Figure 43: Résultats du ré-isolement.

L'étude des aspects macroscopiques et microscopiques des isolats purs obtenus dans cette partie a montré qu'il existe des ressemblances parfaites entre ces derniers et ceux obtenus lors de l'identification des champignons responsables de la fusariose et la pourriture grise de la tomate à partir des échantillons prélevés de l'exploitation agricole étudiée et par conséquent cela peut leurs affiler aux espèces : *Botrytis cinerea*, *Fusarium oxysporum*, *Fusarium solani*.

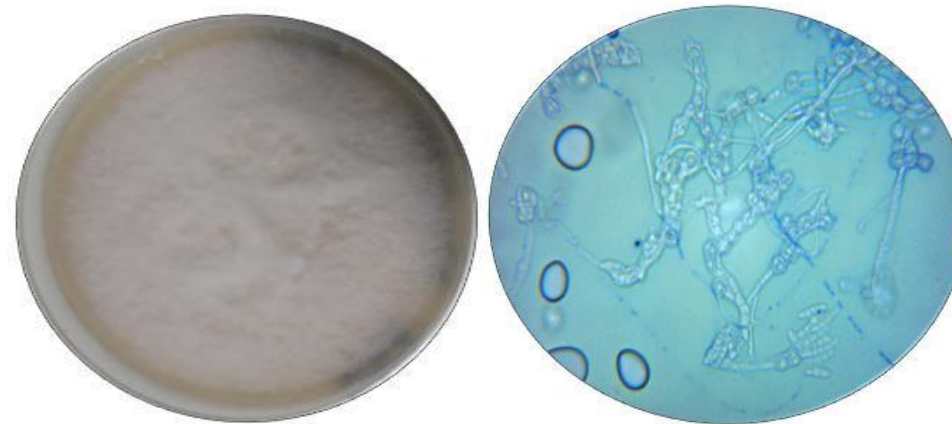
Nous signalons l'absence de tout autre aspect macroscopique dans les boites lors du ré-isolement.

L'étude du pouvoir pathogène, nous a permis de confirmer la pathogénicité des trois souches *Botrytis cinerea*, *Fusarium oxysporum*, *Fusarium solani* isolées à partir de la culture de tomate dans la présente étude.



Botrytis cinerea

Fusarium oxysporum



Fusarium solani

Figure 44 : Aspects macroscopique et microscopique des isolats(X40).

II) Essais de lutte biologique

1) Etude du potentiel antagoniste de trois souches de *Bacillus subtilis* contre les agents causals de la fusariose et la pourriture grise

D'après les résultats du traitement statistique des données, les diamètres de la croissance mycélienne des champignons phytopathogènes obtenus après les différents traitements effectués varient significativement en fonction de la bactérie utilisée et en fonction du temps d'incubation avec des *P* value inférieures à 0.05 pour la totalité des tests effectués.

➤ Activités antagonistes par confrontation directe en boîte de pétri

La méthode utilisée est celle de la confrontation directe sur milieu de culture PDA qui consiste à estimer le potentiel antifongique de chaque bactérie en co-culture avec les champignons à étudier.

Après 03 jours d'incubation, les résultats des tests *in vitro* concernant les activités antagonistes des souches bactériennes de *Bacillus subtilis* (*B2C*, *BM14*, *S2DSP*) montrent des activités antagonistes appréciables vis-à-vis des les souches fongiques phytopathogène *Fusarium oxysporum*, *Fusarium solani*, *Botrytis cinerea*.

La croissance mycélienne du *Fusarium oxysporum* et *Fusarium solani*, *Botrytis cinerea*, était toujours variable en fonction de la souche bactérienne utilisée.

Dans tous les essais, il a été constaté que la croissance mycélienne enregistrée chez les témoins négatifs est nettement supérieure à celle issues des interactions (bactérie/champignon). Aussi, l'estimation des taux d'inhibitions de la croissance mycélienne des agents pathogènes *Fusarium oxysporum*, *Fusarium solani*, *Botrytis cinerea* a montré des intensités inhibitrices qui varient selon les agents antagonistes testés.

A travers les résultats obtenus, tout au long de la période d'incubation, on remarque une faible progression de la croissance mycélienne de *Fusarium oxysporum* (2.56 à 4.90 cm) par rapport au témoin où la croissance était remarquable (4.2 à 7.2 cm) et que les taux d'inhibitions les plus élevés ont été enregistrés par la souche *BM14* 64.06% (**Tableau 08, Fig.45**).

Tableau 08 : Moyennes de la croissance mycélienne et les taux d'inhibitions (%) de *Fusarium oxysporum* après confrontation directe avec les bactéries antagonistes (MC : moyenne de croissance, MTI : moyenne de taux d'inhibition).

CD/FO	B2C		BM14		S2DSP		TEMOIN
Jour	MC	MTI%	MC	MTI%	MC	MTI%	MC
3J	3±0.36	28.57	2.56±0.36	64.06	2.8±0.36	33.33	4.2±0.36
4J	3.53±0.26	37.30	2.83±0.26	49.73	3.5±0.26	37.83	5.63±0.26
7J	4.56±0.49	36.67	4.53±0.49	37.08	4.90±0.49	31.94	7.2±0.49

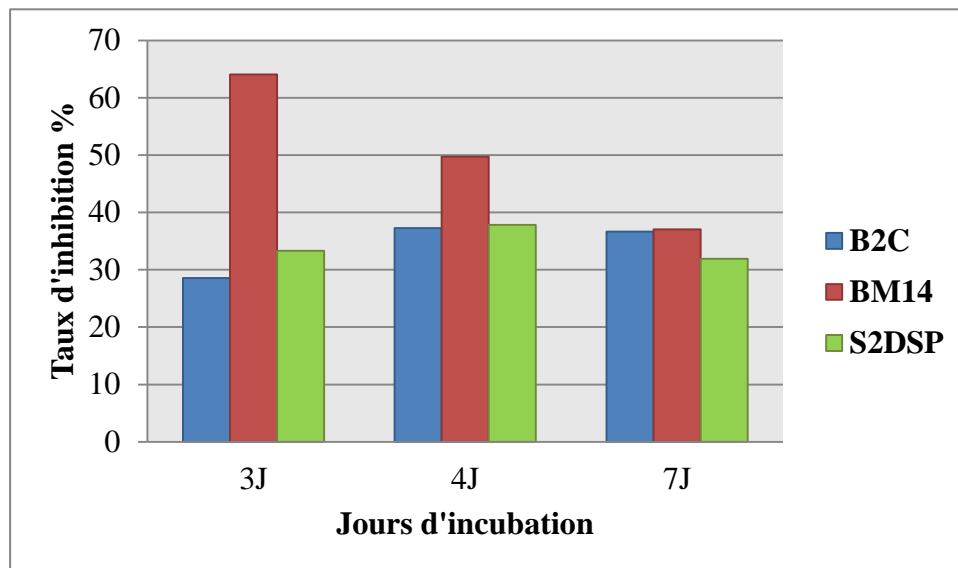


Figure 45 : Taux d'inhibitions de la croissance mycélienne de *Fusarium oxysporum* obtenus par les différentes souches.



Figure 46: Activité antagoniste par confrontation directe des bactéries vis à vis *Fusarium oxysporum*.

Concernant l'interaction de *Fusarium solani* avec toutes les souches bactériennes utilisées nous avons remarqué une très faible progression de la croissance mycélienne (1.30 à 5.46 cm) par rapport au témoin où la croissance était remarquable (3.66 à 7.03 cm), D'où résultent les taux d'inhibitions importants enregistrés et qui varient entre 60.92% et 66.46% pendant la période 3 et 4 jours (Tableau 09, Fig.47).

Tableau 09 : Moyennes de la croissance mycélienne et les taux d'inhibitions de *Fusarium solani* après confrontation directe avec les bactéries antagonistes (MC : moyenne de croissance, MTI : moyenne de taux d'inhibition).

CD/FS	B2C		BM14		S2DSP		TEMOIN
Jour	MC	MTI%	MD	MTI%	MC	MTI%	MC
3J	1.30±0.29	64.48	1.43±0.29	60.92	1.36±0.29	62.84	3.66±0.29
4J	1.63±0.41	66.46	1.80±0.41	62.96	1.63±0.41	66.46	4.86±0.41
7J	3.93±0.30	44.09	4.66±0.30	33.71	5.46±0.30	22.33	7.03±0.30

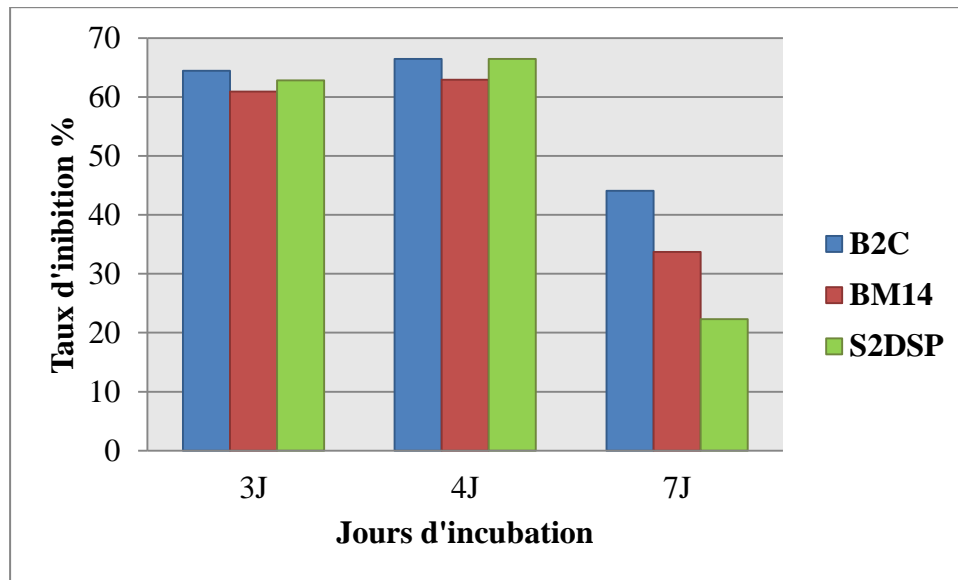


Figure 47 : Taux d'inhibitions de la croissance mycélienne de *Fusarium solani* obtenus par les différentes souches.



Figure 48: Activité antagoniste par confrontation directe des bactéries vis-à-vis *Fusarium solani*.

A travers les résultats obtenus pendant la période d'incubation 3 et 4 jours, on remarque une croissance mycélienne relativement faible de *Botrytis cinerea* allant de 2.76 à 4.33 cm par rapport au témoin dont la croissance était rapide (5.33 à 6.40 cm) et que les taux d'inhibitions différaient pour les trois souches bactériennes de *Bacillus subtilis* (B2C, BM14, S2DSP), car ils ne dépassaient pas 48.21% (Tableau 10, Fig.49).

Tableau 10 : Moyennes de la croissance mycélienne et les taux d'inhibitions (%) de *Botrytis cinerea* après confrontation directe avec les bactéries antagonistes (MC : moyenne de croissance, MTI : moyenne de taux d'inhibition).

CD/BC	B2C		BM14		S2DSP		TEMOIN
Jour	MC	MTI%	MC	MTI%	MC	MTI%	MC
3J	3.16±0.29	40.71	3.83±0.29	28.14	2.76±0.29	48.21	5.33±0.29
4J	3.8±0.35	40.63	4.33±0.35	32.34	3.46±0.35	45.94	6.40±0.35
7J	5.36±0.33	28.82	7.53±0.33	00.00	4.3±0.33	42.90	7.53±0.33

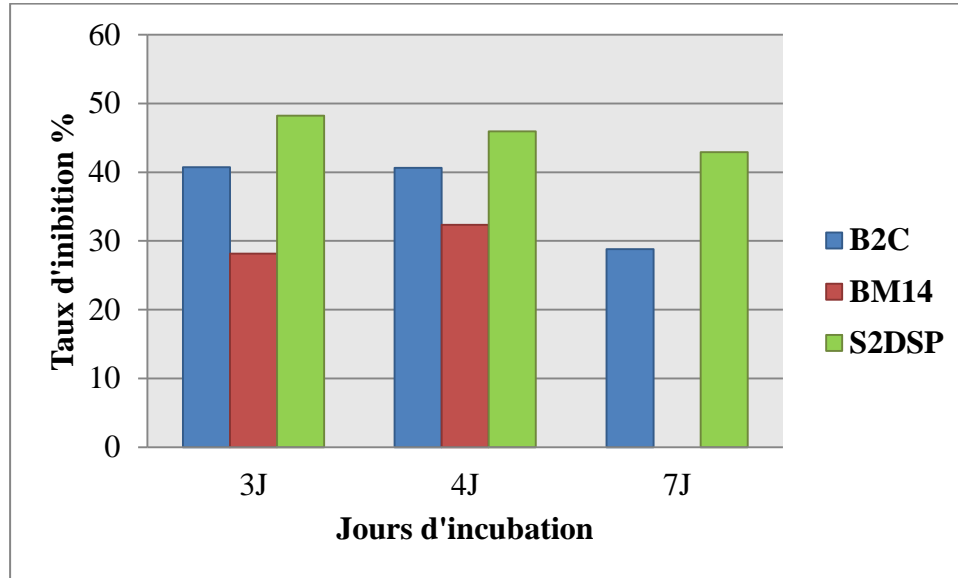


Figure 49 : Taux d'inhibitions de la croissance mycélienne de *Botrytis cinerea* obtenus par les différentes souches.



Figure 50 : Activité antagoniste par confrontation directe des bactéries vis-à-vis *Botrytis cinerea*.

➤ **Activités antagonistes par confrontation indirecte**

Le compartimentage évite le contact entre la gélose supportant la bactérie et la gélose sur laquelle se trouve le champignon et empêche ainsi la diffusion des substances dans le milieu de culture. Seule une substance volatile produite par la bactérie pourra dans cet essai provoquer une inhibition de la croissance du champignon.

D'après les résultats obtenus, on constate que malgré l'absence d'un contact direct entre les champignons testés et les souches bactériennes, certaines de ces dernières ont pu exercer une activité inhibitrice sur le développement des colonies des champignons, notamment les souches bactériennes de *Bacillus subtilis* (B2C, BM14, S2DSP) ceci s'expliquerait par la capacité de ces antagonistes à produire des substances volatiles qui sont capables de limiter ou au moins réduire la croissance des champignons.

Après la période d'incubation, on remarque une action inhibitrice exercée par tous les souches bactériennes testées vis-à-vis de la croissance mycélienne de *Fusarium oxysporum* qui occupe des surfaces varies entre 0.90 à 2.46 cm, ce que correspondre à une inhibition de croissance mycélienne variant entre 69.36% à 85.52% (Fig.51), par rapport au témoin dont la croissance était rapide (environ 3.23 à 8.03 cm) (Tableau 11).

Tableau 11: Moyennes de la croissance mycélienne et les taux d'inhibitions de *Fusarium oxysporum* après confrontation indirecte avec les bactéries antagonistes (MC : moyenne de croissance, MTI : moyenne de taux d'inhibition).

CID/FO	B2C		BM14		S2DSP		TEMOIN
	MC	MTI%	MC	MTI%	MC	MTI%	MC
3J	0.90±0.06	72.14	0.86±0.06	73.38	0.80±0.06	75.23	3.23±0.06
4J	1.03±0.05	84.46	1.06±0.05	84.01	0.96±0.05	85.52	6.63±0.05
7J	2.06±0.12	74.35	1.6±0.12	80.07	2.46±0.12	69.36	8.03±0.12

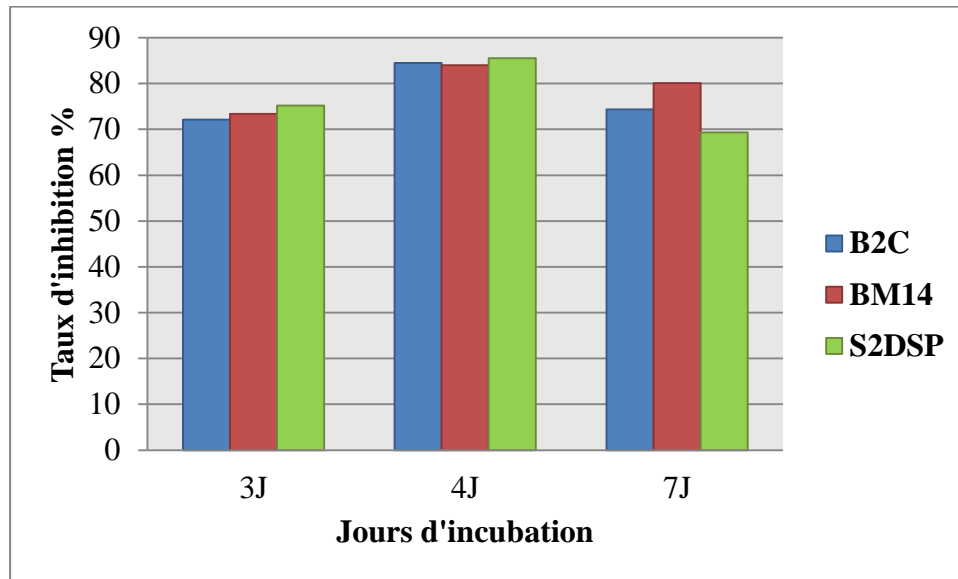


Figure 51 : Taux d'inhibitions de la croissance mycélienne de *Fusarium oxysporum* obtenus par les différentes souches.

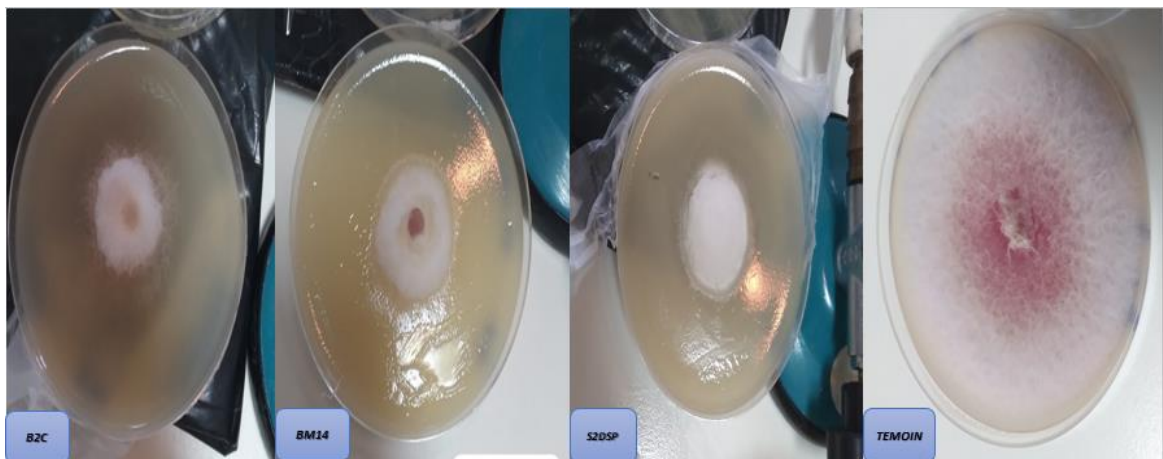


Figure 52 : Activité antagoniste par confrontation indirecte des bactéries vis-à-vis *Fusarium oxysporum*.

Concernant les résultats obtenus pendant la période d'incubation 03 et 04 jours, on remarque une croissance de mycélienne progressive de *Fusarium solani* d'allant de 1.30 à 5.46 cm avec toutes les souches par rapport au témoin dont la croissance rapide environ 3.66 à 7.03 cm. Ce qui traduit les taux d'inhibitions importants obtenus et qui varient entre 60.84% à 66.46% (**Fig.53**) avec toutes les souches antagonistes de *Bacillus subtilis* (*B2C*, *BM14*, *S2DSP*) (**Tableau12**).

Tableau 12 : Moyennes de la croissance mycélienne et leur taux d'inhibitions de *Fusarium solani* en confrontation indirecte avec les bactéries antagonistes (MC : moyenne de croissance, MTI : moyenne de taux d'inhibition).

CID/FS	B2C		BM14		S2DSP		TEMOIN
Jour	MC	MTI%	MC	MTI%	MC	MTI%	MC
3J	1.30±0.29	64.48	1.43±0.29	60.93	1.36±0.29	62.84	3.66±0.29
4J	1.63±0.41	66.46	1.80±0.41	62.96	1.63±0.41	66.46	4.86±0.41
7J	3.93±0.30	44.10	4.66±0.30	33.71	5.46±0.30	22.33	7.03±0.30

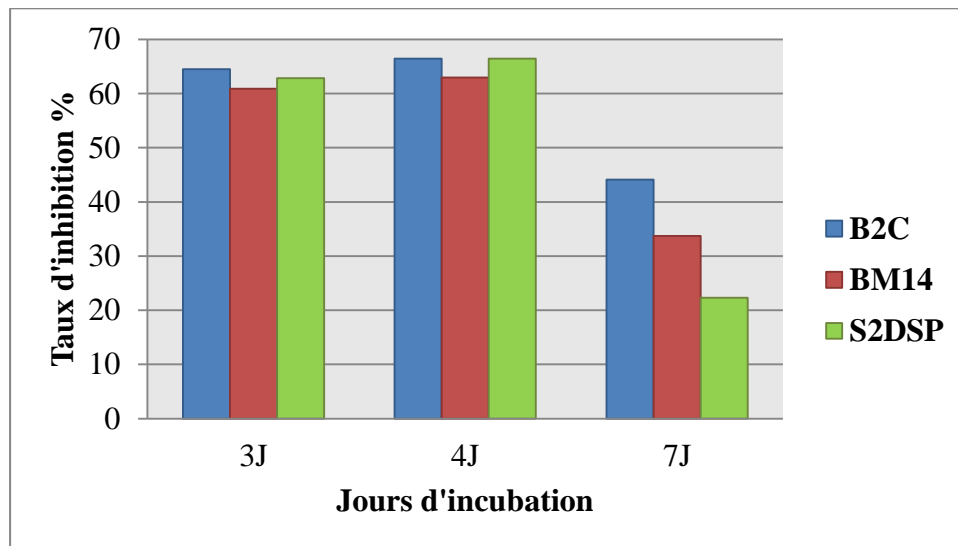


Figure 53: Taux d'inhibitions de la croissance mycélienne de *Fusarium solani* obtenus par les différentes souches.

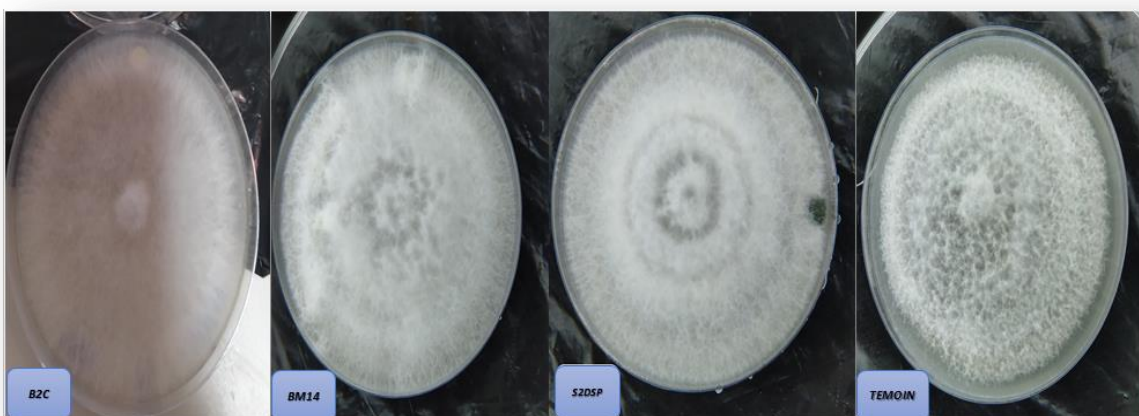


Figure 54 : Activité antagoniste par confrontation indirecte des bactéries antagonistes vis-à-vis *Fusarium solani*.

D'après les résultats obtenus pendant la période d'incubation, on remarque une croissance lente de mycélienne de *Botrytis cinerea* d'allant de 0.96 à 3.3 cm avec les souches bactériennes de *Bacillus subtilis* (B2C, BM14, S2DSP) (Tableau13). Par rapport au témoin dont la croissance rapide environ 1.3 à 4.33 cm, ce qui a conduit à une différence dans le taux d'inhibition appréciable ne dépassant pas 52.42% (Fig.55) vis-à-vis tous les souches testées.

Tableau 13: Moyennes de la croissance mycélienne et leur taux d'inhibitions *Botrytis cinerea* en confrontation indirecte avec les bactéries antagonistes (MC : moyenne de croissance, MTI : moyenne de taux d'inhibition).

CID/BC	B2C		BM14		S2DSP		TEMOIN
	MC	MTI%	MC	MTI%	MC	MTI%	MC
3J	0.96±0.12	26.15	1.00±0.12	23.08	1.16±0.12	10.77	1.3±0.12
4J	1.6±0.16	28.25	1.43±0.16	35.87	1.76±0.16	21.08	2.23±0.16
7J	3.6±0.37	16.86	2.06±0.37	52.42	2.5±0.37	42.26	4.33±0.37

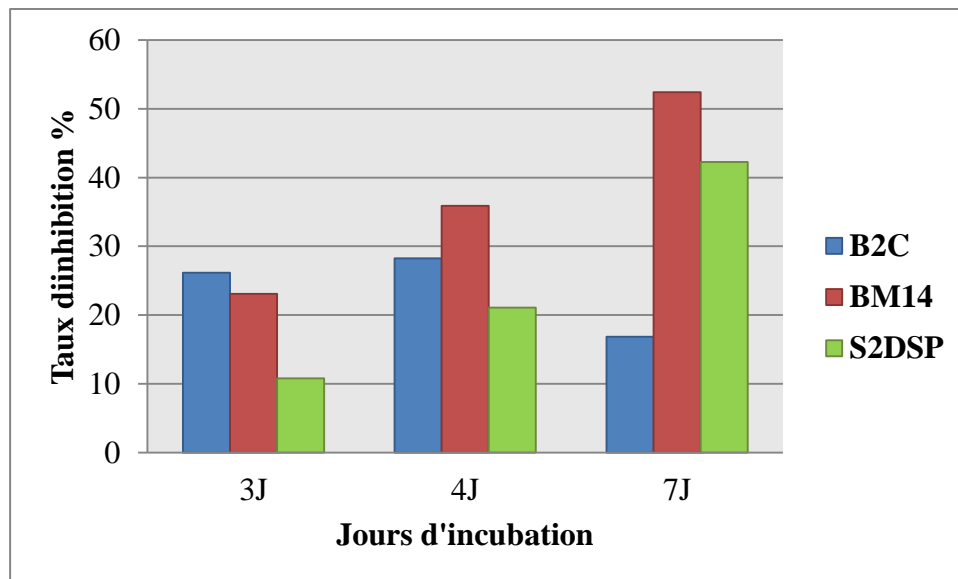


Figure 55 : Taux d'inhibitions de la croissance mycélienne de *Botrytis cinerea* obtenus par les différentes souches.



Figure 56: Activité antagoniste par confrontation indirecte des bactéries antagonistes vis-à-vis *Botrytis cinerea*.

On déduit dans la confrontation indirecte, que les souches de *BM14* présentent un pouvoir d'inhibition important vis-à-vis des champignons phytopathogène (*Botrytis cinerea*, *Fusarium solani*, *Fusarium oxysporum*) avec des taux d'inhibitions (52.42% ,62.46% ,84.01) respectivement (**Tableaux11, 12et13, Fig.51, 53,55**). De même pour la souche de *S2DSP* les pouvoirs d'inhibitions enregistrés étaient aussi importants contre les champignons *Fusarium solani* et *Fusarium oxysporum* dont ils étaient de 66.46% et 85.52% respectivement.

Concernant la souche bactérienne *B2C*, elle possède des taux d'inhibitions de 66.46% et de 84.46% contre *Fusarium solani*, *Fusarium oxysporum* respectivement.

➤ **Méthode de filtra**

D'après les résultats obtenus, nous remarquons que les taux d'inhibitions de la croissance mycélienne des champignons induits par les différents traitements à base de filtrats bactériennes des trois souches de *Bacillus subtilis* utilisées sont beaucoup plus importants par rapport à ceux obtenus dans les deux parties précédentes.

Les taux d'inhibitions enregistrés contre les trois champignons traités étaient relativement considérables, entre 44% à 70% contre *Fusarium oxysporum*, entre 51% à 63% contre *Fusarium solani*, et entre 49% à 65% contre *Botrytis cinerea* (**Tableau 14, 15, 16, Fig.57, 58,59**).

Tableau 14: Moyennes de la croissance mycélienne et les taux d'inhibitions (%) de *Fusarium oxysporum* par les bactéries antagonistes avec la méthode du filtrat (MC : moyenne de croissance, MTI : moyenne de taux d'inhibition).

FIL/FO	B2C		BM14		S2DSP		TEMOIN
Jour	MC	MTI%	MC	MTI%	MC	MTI%	MC
3J	2.10±0.10	51	1.63±0.32	62	1.30±0.26	70	4.33±0.20
4J	2.36±0.32	60	2.66±0.28	54	2.30±0.30	60	5.83±0.15
7J	4.00±0.00	47	4.20±0.43	44	3.66±0.15	51	7.56±0.11

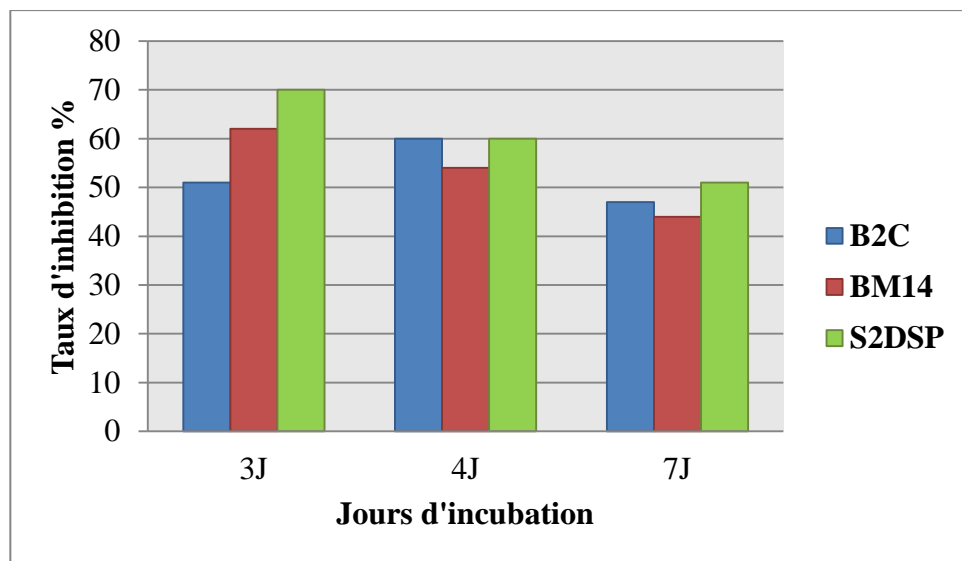


Figure 57 : Taux d'inhibitions de la croissance mycélienne de *Fusarium oxysporum* obtenus par les différentes souches.

Tableau 15: Moyennes de la croissance mycélienne et les taux d'inhibitions (%) de *Fusarium solani* par les bactéries antagonistes avec la méthode du filtrat (MC : moyenne de croissance, MTI : moyenne de taux d'inhibition).

Fil/FS	B2C		BM14		S2DSP		TEMOIN
Jour	MC	MTI%	MD	MTI%	MC	MTT%	MC
3J	1.63±0.11	55	1.40±0.17	62	1.36±0.15	63	3.66±0.29
4J	2.5±0.15	51	2.30±0.10	55	2.36±0.57	54	5.13±0.30
7J	3.23±0.25	54	2.9±0.57	58	2.7±0.00	61	7.00±0.26

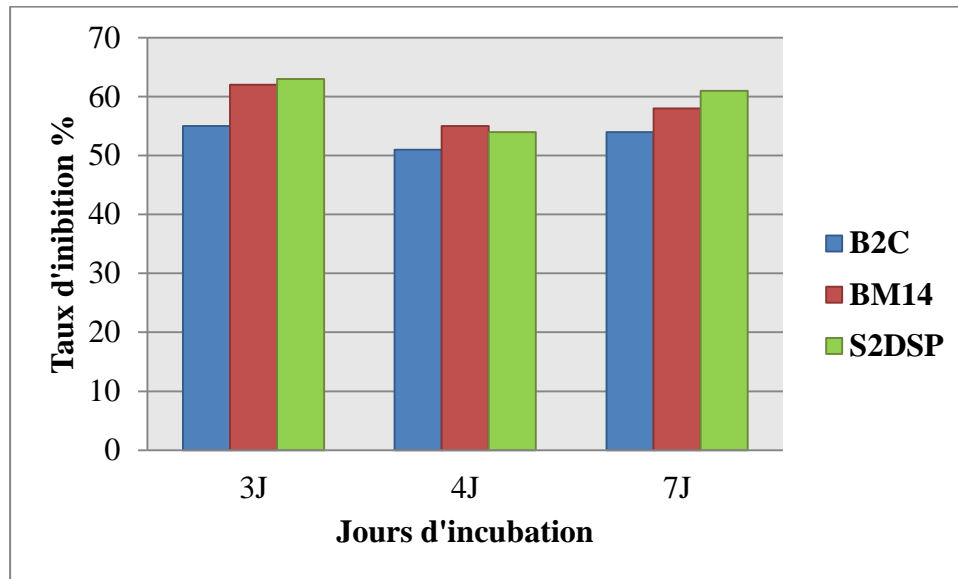


Figure 58 : Taux d'inhibitions de la croissance mycélienne de *Fusarium solani* obtenus par les différentes souches.

Tableau 16 : Moyennes de la croissance mycélienne et les taux d'inhibitions (%) de *Botrytis cinerea* par les bactéries antagonistes avec la méthode du filtrat (MC : moyenne de croissance, MTI : moyenne de taux d'inhibition).

Fil/BC	B2C		BM14		S2DSP		TEMOIN
	MC	MTI%	MC	MTI%	MC	MTI%	
3J	2.36±0.15	49	2.33±0.28	50	1.63±0.11	65	4.70±0.26
4J	2.96±0.05	52	2.90±0.17	53	3.10±0.36	50	6.13±0.66
7J	3.66±0.72	52	3.03±0.25	60	3.40±0.26	56	7.66±0.40

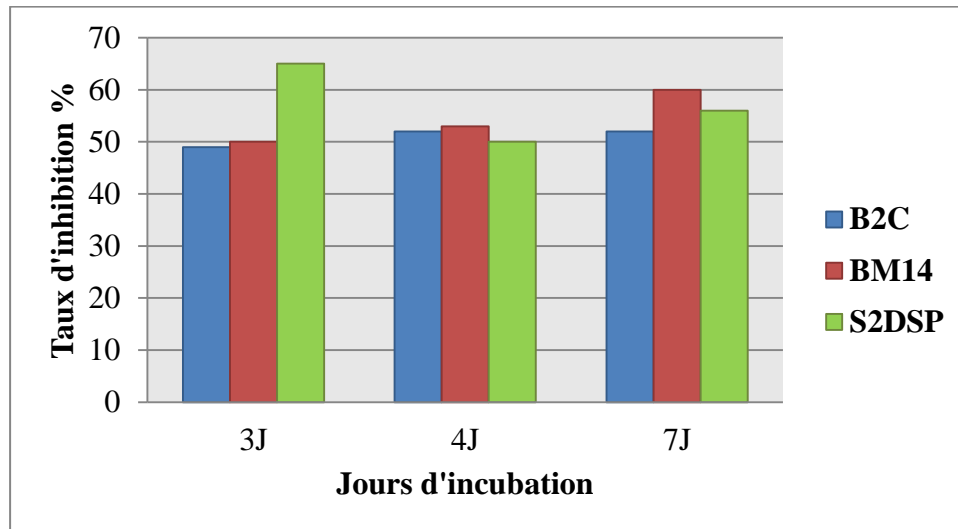


Figure 59 : Taux d'inhibitions de la croissance mycélienne de *Botrytis cinerea* obtenus par les différentes souches.

➤ **Observation microscopique de agent pathogène vis-à-vis l'agent antagoniste**

D'après les observations microscopiques des champignons phtopathogènes traités par les trois bactéries antagonistes, on a observé une modification au niveau du mycélium du pathogène caractérisée par une lyse cellulaire importante et une transformation des filaments mycéliens en cordons (Fig.60, 61, 62, 63,64 ,65).

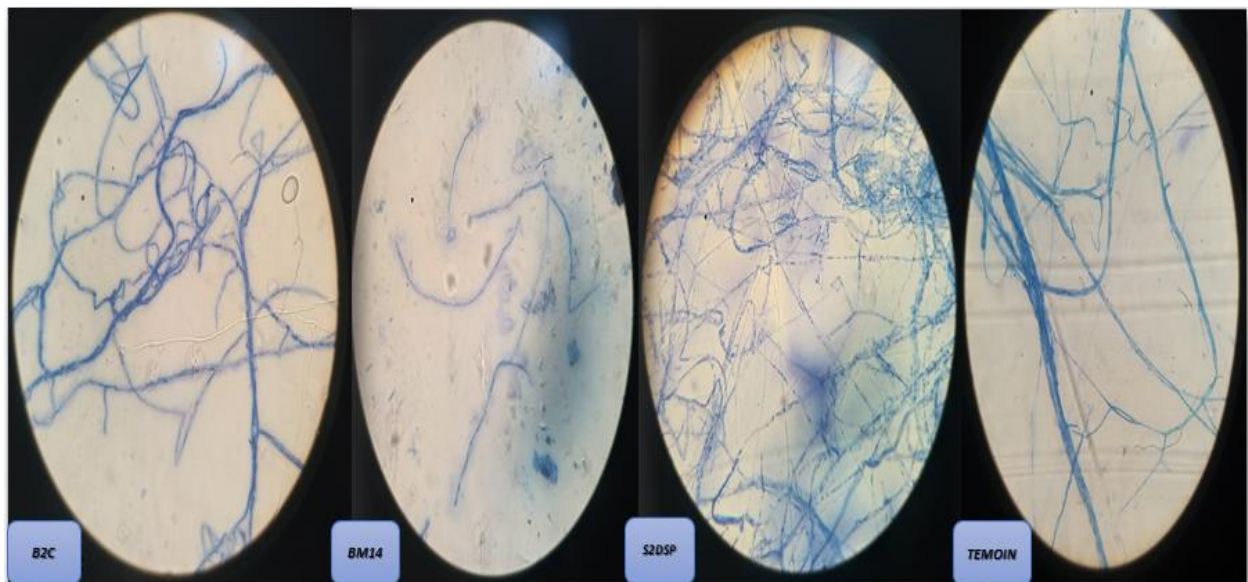


Figure 60 : Effet des 03 souches de *Bacillus subtilis* sur le champignon de *Fusarium oxysporum* en confrontation directe (objectif X40).

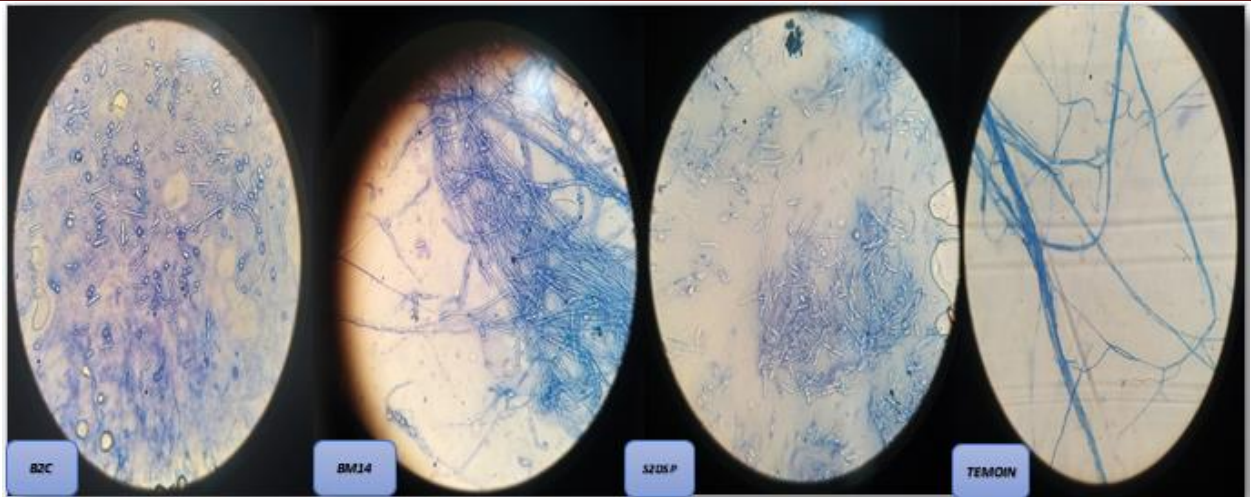


Figure 61: Effet des 03 souches de *Bacillus subtilis* sur le champignon de *Fusarium oxysporum* enconfrontation indirecte (objectif X40).

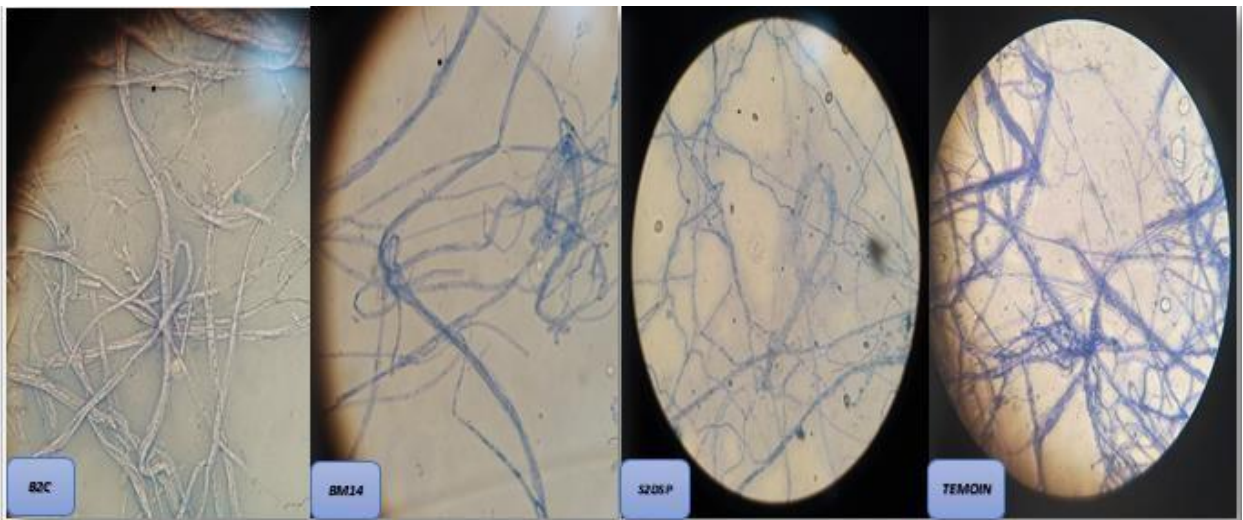


Figure 62 : Effet des 03 souches de *Bacillus subtilis* sur le champignon de *Fusarium solani* en confrontation directe (objectif X40).

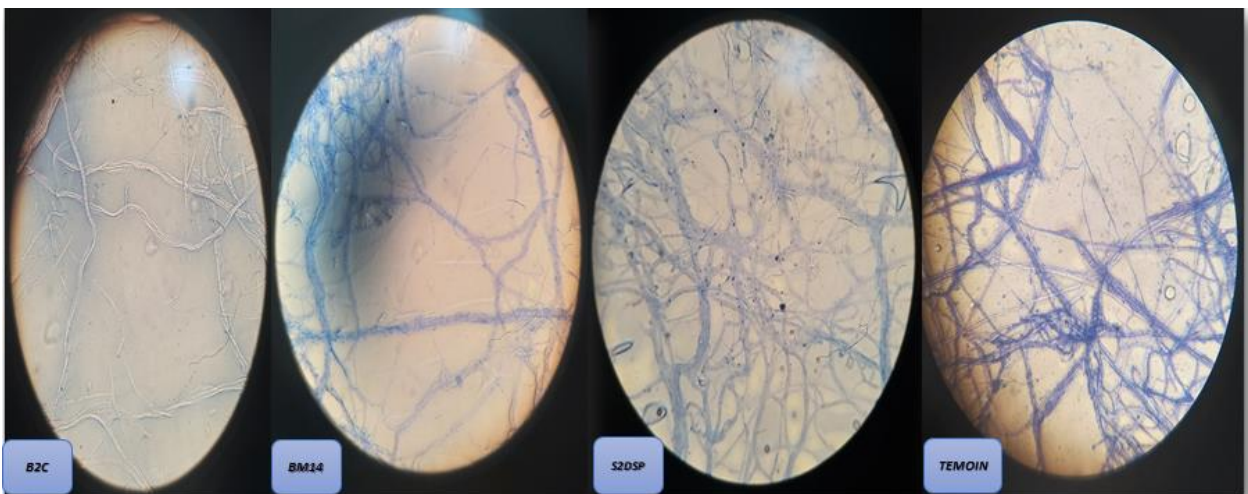


Figure 63 : Effet des 03 souches de *Bacillus subtilis* sur le champignon de *Fusarium solani* en confrontation indirecte (objectif X40).

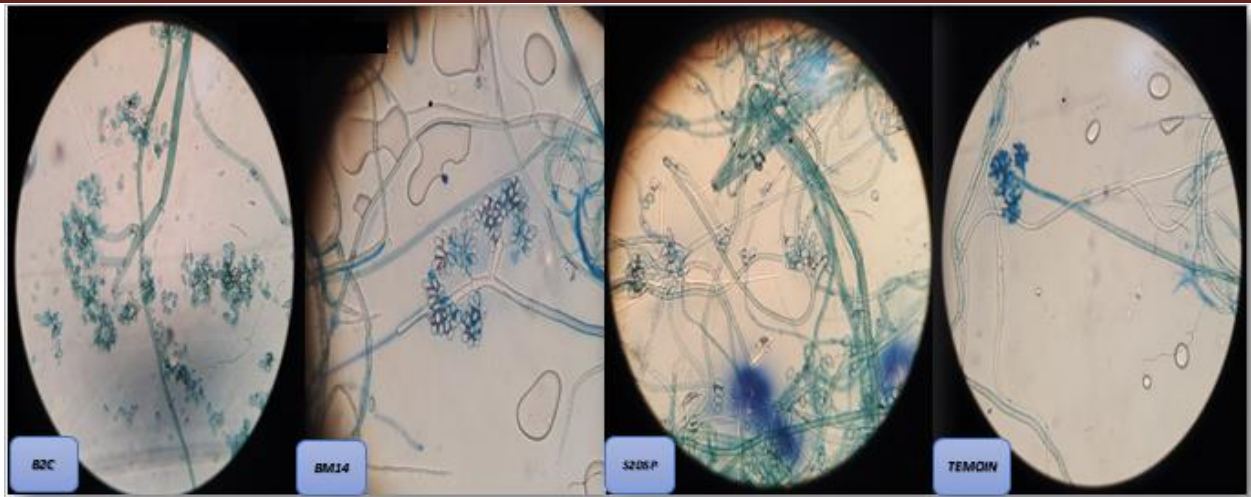


Figure 64: Effet des 03 souches de *Bacillus subtilis* sur le champignon de *Botrytis cinerea* en confrontation directe (objectif X40).

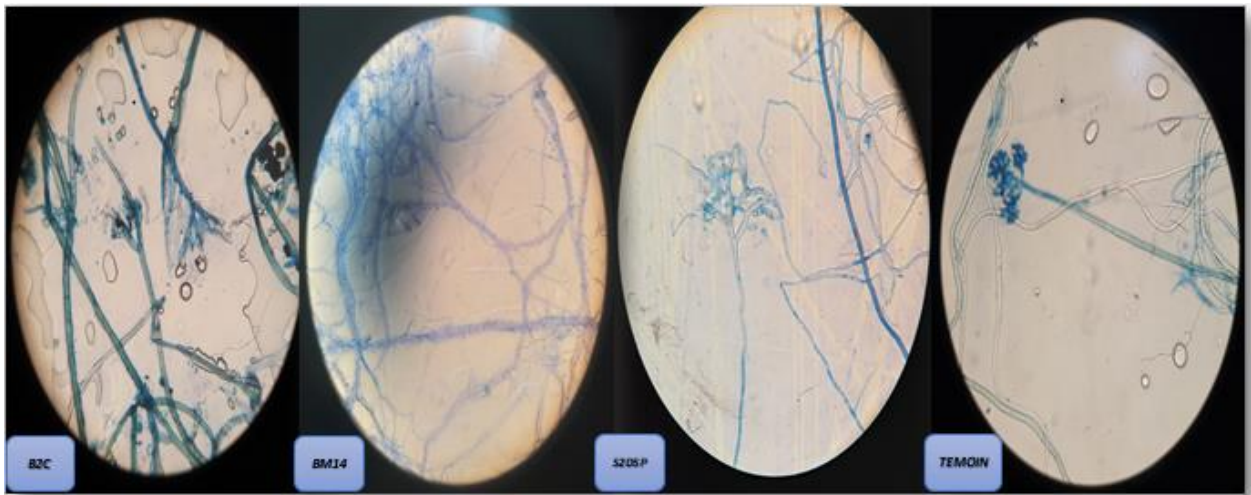


Figure 65: Effet des 03 souches de *Bacillus subtilis* sur le champignon de *Botrytis cinerea* en confrontation indirecte (objectif X40).

Avant la mise en œuvre d'une stratégie de lutte contre ces champignons phytopathogènes à l'aide de produits biologiques, il est nécessaire de connaître le comportement des agents antagonistes et leurs interactions avec le pathogène (**Larkin & Fravel, 1999**).

Les différentes confrontations (Pathogène –Antagoniste) ont montré une activité positive qui s'est manifestée par un ralentissement de la croissance des colonies des germes pathogènes confronté, et ils ont permis d'estimer le potentiel inhibiteur des bactéries vis-à-vis les trois souches fongiques phytopathogènes traitées. Cette évaluation a révélé des intensités inhibitrices variables selon la souche antagoniste.

Williams & Asher, 1996 expliquent que les taux d'inhibitions de la croissance mycélienne varient selon les souches bactériennes car le mode d'action et/ou le type des

métabolites produit par les bactéries différentes d'une souche à une autre.

Les souches *Bacillus subtilis* (B2C, BM14, S2DSP) présentent une action antagoniste contre *Botrytis cinerea* avec un pourcentage d'inhibition allant de 10.77 % à 52.42%, ces résultats sont proches à ceux de **Jemni et al., (2009)** qu'ils ont trouvé que les deux souches de genre *Bacillus* SB1 et SB2 présentent un effet inhibiteur de 50% sur la croissance de *Botrytis cinerea*. Aussi **Mari et al., (1996)** ont signalé que les bactéries à Gram positif appartenant au genre *Bacillus* avaient des efficacités remarquables contre *Botrytis cinerea*.

Kilani-Feki et al., (2016) ont démontré que l'application de la souche V26 de *Bacillus subtilis* sur les fruits des tomates en post-récolte a réduit de 79% de la sévérité de la pourriture causée par le champignon *Botrytis cinerea*, en inhibant son développement et en provoquant des changements morphologiques à son mycélium. Dans le même contexte des maladies de post-récolte, **Punja et al., (2016)** ont démontré que l'utilisation de Rhapsody, un biofongicide à base de *Bacillus subtilis* QST 713, a diminué significativement l'incidence ainsi que la sévérité d'une multitude de maladies fongiques qui affectent les tomates de serre.

Pour le *Fusarium oxysporum*, l'action antagoniste des trois souches bactériennes était puissante avec un pourcentage d'inhibition allant 28.57% à 85.52%, ces résultats sont proche à ceux de **Aouar (2012)** qui ont obtenu avec *Bacillus subtilis* un pourcentage d'inhibition de la croissance de *Fusarium oxysporum* estimé à 49% et 54%. Par contre ces résultats diffèrent à ceux de **Lamari et al., (2014)** où ils ont trouvé que le taux d'inhibition de la croissance de *Fusarium oxysporum* de la fusariose du palmier dattier par la souche de *Bacillus subtilis* est de 22%.

Les taux d'inhibitions inférieurs à 20% peuvent être dus à la présence de résistance au champignon contre les bactéries. De même **Duffy et al., (2003)** ont montré que la résistance des champignons aux molécules fongitoxiques naturelles résulte d'une détoxification accrue de ces substances, d'une moindre pénétration intracellulaire de modifications qualitatives ou quantitatives des cibles. Aussi, **Li et Leifert (1994)** suggèrent que *Botrytis cinerea* est capable de développer une résistance contre la bactérie *Bacillus subtilis*.

Notre résultat montre que l'inhibition de la croissance fongique par la méthode de la confrontation directe semble moins importante à celle obtenue par la confrontation indirecte (à distance). **Fiddaman & Rossall (1993), Kai et al., 2009**, ont montré que les composés volatiles sont produits par un grand nombre de bactéries et jouent un rôle très important dans le biocontrôle. Aussi **Alstrom, 2001 ; Wheatley, 2002 ; Schalchli et al., 2011** ont démontré que ces composés (y compris des alcools, cétones, aldéhydes, éthers, esters, terpène, dérivés

terpéniques) peuvent influencer la croissance des champignons.

L'incorporation de filtrat des souches antagonistes dans le milieu de culture provoque une inhibition importante. Ces résultats d'antagonisme par action de filtrat sont en accord avec ceux de **Howell & Stipanovic (1979)**, **Scher & Barker (1982)** ; et **Park et al., (1988)**.

Ceci confirme aussi l'hypothèse de **Sedra & Maslouly (1994)**. Selon laquelle ces antagonistes sécrètent des substances antibiotiques. Ces dernières agissent sur le parasite par un lys du mycélium ; avec une action d'antibiose.

Selon **Ongena & Jacque (2014)**, l'inhibition de la flore d'altération par *Bacillus subtilis* proviendrait de sa capacité à produire des lipopeptides ayant des propriétés antibactériennes et antifongiques par l'éclatement de la paroi cellulaire des champignons.

Selon **Magnusson (2003)** plusieurs bacilles produisant des antibiotiques ont été utilisés comme agents de lutte biologique contre les champignons pathogènes. Ce résultat nécessite la réalisation dans l'avenir d'une caractérisation parfaite de ou des molécules issues de nos souches afin de les valoriser et les exploiter dans d'autres investigations de phytoprotection.

D'après les observations microscopiques des trois champignons pathogènes après les différents traitements par les trois bactéries on observe qu'il y a des modifications sur la structure de champignon cette dernière peut être agir par les métabolismes secondaire de *Bacillus subtilis*.

Gloud, (2000) a suggéré que les métabolites sécrétés par la bactérie antagoniste peuvent agir sur le champignon phytopathogène comme fongistatique, inhibiteur de la germination, fongicide ou en lysant le mycélium. Selon **Ongena & Jacque (2014)**, l'inhibition de la flore d'altération par *Bacillus subtilis* proviendrait de sa capacité à produire des lipopeptides ayant des propriétés antibactériennes et antifongiques par l'éclatement de la paroi cellulaire des champignons.

Les espèces du genre *Bacillus* produisent des substances antifongiques permettant l'inhibition de plusieurs espèces phytopathogènes (**Yoshida et al., 2001** ; **Nollet & Rathore, 2015**).

Selon la littérature, chez les champignons, la chitine est un constituant essentiel de la paroi qui entoure et protège les cellules fongiques vis-à-vis de l'environnement. La paroi cellulaire est donc essentielle pour la croissance fongique et pour la résistance du champignon aux agressions externes. (**Benhamou et al., 1996**).

D'après **Quecine et al., (2008)**, la quasi-totalité des souches de *Bacillus sp.* Sont connues par une activité chitinasique positive. Les microorganismes producteurs de chitinases

sont qualifiés comme agents de biocontrôle contre plusieurs maladies fongiques des plantes.

Les chitinases bactériennes sont souvent des exochitinases de masse moléculaire élevée qui semblent être sécrétées dans les écosystèmes pour assurer le catabolisme de la chitine, ce dernier est présent dans la cuticule des insectes et dans les parois de la plupart des champignons (Asselin, 1993).

2) Evaluation de l'activité antifongiques de deux huiles essentielles de *Ammoides verticillata* et *Artemisia judaica*

➤ Extraction de l'huile essentielle

1) Propriétés organoleptiques des huiles essentielles extraites

L'examen organoleptique des différentes huiles essentielles a consisté en des tests olfactif et gustatif complétés par une description de l'aspect et de la couleur de ces huiles (Tableau 17).

Tableau 17 : Caractères organoleptiques des huiles essentielles étudiées.

Huiles essentielles	Couleur	Aspect	Odeur	Saveur
<i>Artemisia judaica</i>	Bleu vert	Liquide (huileuse)	Aromatique	Forte et piquante
<i>Ammoides verticillata</i>	Jaune	Liquide (huileuse)	Aromatique	Forte et piquante

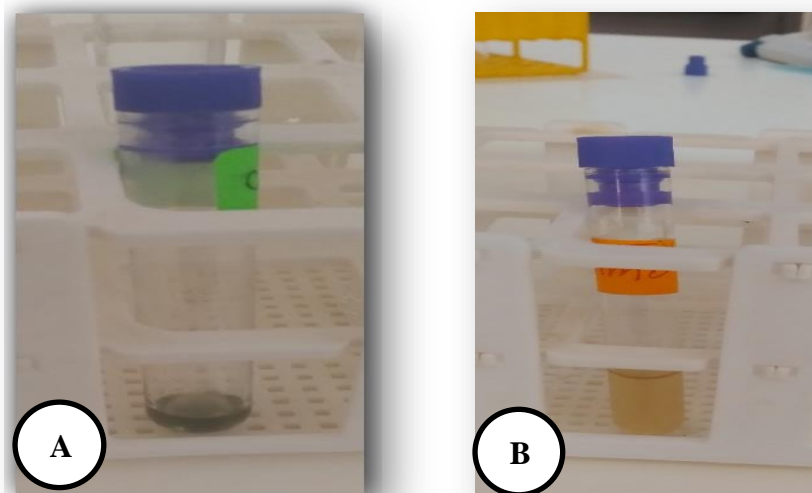


Figure 66 : Huiles essentielle de *Artemisia judaica* **A** et *Ammoides verticillata* **B**.

2) Rendement des huiles essentielles

Le rendement en huile essentielle des deux espèces est calculé en fonction de la masse du matériel végétal sèche (**tableau 18**).

Tableau 18 : Rendement calculé en (%) pour les deux espèces étudiées.

Espèce	Quantité de la biomasse(g)	Rendement(%)
<i>Ammoides verticillata</i>	555	0.9
<i>Artemisia judaica</i>	1070	0.6

Le rendement d'extraction que nous avons obtenu de l'HE d'*Artemisia judaica* est à l'ordre de 0.60%, cette valeur est supérieure à celle obtenu par (**Gherib, 2009**) au mois d'juin **2008** et novembre **2007** (0,2 et 0,4% respectivement). On parallèle, on a obtenu un rendement de l'ordre de 0.9% de l'HE d'*Ammoides verticillata*, et qui est inférieur a ceux obtenu par (**Senouci, 2020**), Dans le mois d'avril-mai **2018** et qui était de 2.6%.

Cette différence des rendements des HE's peut être liée à plusieurs facteurs tels que : la zone géographique de collecte, le climat, le stade de développement et la saison, le lieu et la durée de séchage, la technique et le temps d'extraction...etc.

Selon **Panizzi et al., 1939**, les différences des teneurs en huile essentielle des différentes plantes sont étroitement liées à la période de la récolte et la technique de distillation.

3) Evaluation de l'activité antifongique

➤ Méthode de diffusion

Les résultats ont montrés que les deux huiles essentielles d'*Artemisia judaica* et d'*Ammoides verticillata* utilisées ayant des activités antifongiques remarquables. Dont le pouvoir antifongique d'*Ammoides verticillata* était beaucoup plus important par rapport à celui d'*Artemisia judaica* et ce pour les trois champignons traités (**Fig.67**).



Témoin



Ammoides verticillata



Artemisia judaica

Botrytis cinerea



Témoin



Ammoides verticillata



Artemisia judaica

Fusarium oxysporum



Témoin



Ammoides verticillata



Artemisia judaica

Fusarium solani

Figure 67 : Résultats de méthode de diffusion.

Cette différence d'efficacité qui existe entre les deux HE's sur la croissance mycélienne des champignons est probablement induite par la différence en ce qui concerne les compositions chimiques des deux plantes *Artemisia judaica* et *Ammoides verticillata*.

Car l'activité biologique d'une huile essentielle est principalement liée à sa composition chimique majoritaire (**Senouci, 2020**).

Labiod en 2016 a testé les effets antifongiques de l'huile essentielle de la plante *Satureja calamintha nepeta* de deux zone : zone de Jijel et d'Annaba sur deux champignons *Fusarium.sp*, *Aspergillus.sp* et a trouvé que l'huile essentielle de la plante recueillie de Jijel est la plus puissante de l'huile essentielle de celle recueillie d'Annaba, puis elle a même confirmé que cette différence est due au ratio en produits majoritaires différents.

Aussi **Oumzil et al., en 2002** ont testé les effets antifongiques et antibactériens de trois huiles essentielles de la plante *Mentha suaveolens* provenant de diverses régions du Marocco contre différents microorganismes (*Candida glabrata*, *candida albicans*etc.), et ont indiqué que l'efficacité des huiles essentielles dépende de leurs compositions chimiques.

On peut constater, que l'activité antifongique des deux huiles essentielles contre les souches fongiques ciblées est influencée par leur composition chimique différente.

L'évaluation de l'activité antifongique du fongicide (VAPCOTOP) utilisé par le propriétaire de l'exploitation agricole étudiée, a été réalisée par la même méthode. Les résultats montrent que cette molécule chimique ne présente aucun pouvoir inhibiteur sur la croissance mycélienne de *Fusarium solani* et *Fusarium oxysporum* et un effet négligeable sur *Botrytis cinerea* (**Fig.68**).



Témoin



Boite teste

Botrytis cinerea



Témoin



Boite teste

Fusarium oxysporum



Témoin



Boite teste

Fusarium solani

Figure 68 : Résultats de tests de fongicide.

Contrairement au travail de **Labioud** en **2016** qui porte sur la valorisation des potentialités antimicrobiennes et antioxydants de l'huile essentielle et d'extrait de *Satureja calamintha nepeta*, où les molécules (PROPINEBE et VAPCOTOP) ont été utilisées comme témoins positif. Dans ce travail de recherche VAPCOTOP a montré des activités antifongiques considérables, dont il a donné un pourcentage d'inhibition mycélienne qui dépasse 50% contre *Apsegillus.sp* et *Fusarium.sp*.

VAPCOTOP, c'est un fongicide appartenant à la famille des thiophanate-methyl (TM). La TM est généralement utilisée dans le traitement de plusieurs types d'arbres notamment les vignes, le canola, le blé et les racines de moisson. Il peut être appliqué en tant que traitement par immersion pour les fleurs coupées, bois de rose de bourgeon, ou de pépinière; et pour le traitement des semences pour l'arachide et les morceaux de pommes de terre. Elle a été homologuée comme pesticide aux États-Unis en 1973 pour une utilisation comme fongicide (**Labioud, 2016**).

Cette molécule est classifiée parmi les substances ayant une toxicité minime : catégorie III/IV (soit par voie orale, contact avec la peau, ou par inhalation), toutefois, elle a été classée parmi les molécules pouvant avoir un effet cancérigène chez l'homme (**Anonyme, 2004**).

C'est le fongicide utilisé dans notre travail en tant que molécule active dans le témoin positif dans le but de comparer son effets avec celui des huiles essentielles.

Cela signifié que l'utilisation de ce type de fongicide exige une étude au préalable qui sert essentiellement à une identification parfaite de l'agent causale de la maladie ainsi que ses degrés de sensibilité en vers cette molécule de synthèse *in vitro* et *in vivo*.

➤ **Détermination des concentrations minimales inhibitrices (CMI) des deux huiles essentielles utilisées**

Un suivi quotidien jusqu'à la septième journée des boites qui contiennent le milieu PDA à différentes concentrations des deux huiles essentielles a été effectué afin de déceler les deux plus faibles concentrations qui peuvent inhiber la croissance des trois champignons traités.

L'interprétation des résultats est basée sur la mesure de la pousse fongique, et la cinétique de croissance. Cette lecture est effectuée par comparaison avec des boites témoins réalisées en même temps dans les mêmes conditions que les boites qui correspondent aux tests.

Les valeurs moyennes des mesures journalières de diamètre de croissance des champignons, nous ont permis de déterminer les de la croissance mycélienne en fonction

de la concentration en HE et du nombre de jours d'incubation pour chaque champignons (Tableau 22 ,23 ,24). Elles nous permettent de d'évaluer rapidement l'influence de ces deux paramètres sur la croissance des moisissures en fonction de l'HE utilisée.

❖ Cas d'HE d'*Ammoides verticillata*

Selon les analyses statistiques, l'effet de l'huile d'*Ammoides verticillata* contre les trois champignons diffère d'une façon hautement significativement en fonction des différentes concentrations et cela car le *P* valu obtenu était largement inférieur à 0.05 dans les trois évaluations de l'activité antifongique de l'huile effectuées (Tableau 19, 20, 21).

Tableau 19: Traitement statistique des résultats de *Botrytis cinerea*.

	ANOVA SS	DDL	Carré moyen	F	<i>P</i> valu
CONCENTRATION	49740,8	6	8290,14	191,6	0.000

Tableau 20 : Traitement statistique des résultats de *Fusarium oxysporum*.

	ANOVA SS	DDL	Carré moyen	F	<i>P</i> valu
CONCENTRATION	40956,9	6	6826,16	503,3	0.000

Tableau 21: Traitement statistique des résultats de *Fusarium solani*.

	ANOVA SS	DDL	Carré moyen	F	<i>P</i> valu
CONCENTRATION	45200,7	6	7533,46	316, 7	0.000

Cette différence était à cause du vaste écart qui existe entre les pourcentages d'inhibitions obtenus par les concentrations inférieures à 0.25 µl/ ml et ceux obtenus par des concentrations supérieures à 0.25 µl/ ml.

L'analyse des tableaux 23, 24,25 montre bien qu'il y a une différence dans la manière de la progression de la croissance mycélienne en présence et en absence du traitement par les différentes concentrations et par conséquent les taux d'inhibitions ont suit le même ordre de différence (Fig.69, 71,73).

Les croissances mycéliennes enregistrées suite à l'utilisation des concentrations de (0.25 µl/ml, 0.5 µl/ml, 1µl/ml) étaient tous nulle ce qui traduit la forte activité de l'huile essentielle d'*Ammoides verticillata* contre les trois champignons traités, alors qu'elles étaient différentes d'une concentration à l'autre pour les doses (0.05 µl/ml, 0.1 µl/ml, 0.15 µl/ml) dont elle était comprise entre 0.05 à 0.40 cm pour *Botrytis cinerea* , 0.28 à 0.90 cm pour *Fusarium oxysporum* et entre 0.4 à 1.08 cm pour *Fusarium solani* .

La CMI décelée au bout de 07 jours d'application d'huile essentielle d'*Ammoides verticillata* contre la croissance mycélienne des trois champignons traités : *Botrytis cinerea*, *Fusarium oxysporum*, *Fusarium solani* était de 0.25µl/ml (**Fig.70 ,72 ,74**).

Tableau 22 : Croissance mycélienne et le taux d'inhibition de champignon *Botrytis cinerea* (par rapport aux témoins) en présence de différentes concentrations de huile essentielle d'*Ammoides verticillata* pendant les 07 jours d'incubation (**CM : croissance mycélienne, I : taux d'inhibition**).

Jour		3J		4J		5J		6J		7J	
<i>Botrytis cinerea</i>		CM	I%	CM	I%	CM	I%	CM	I%	CM	I%
Concentration (µl /ml)	Témoin	0.25	0	0.35	0	0.45	0	0.58	0	0.65	0
0.05	Teste	0.2	20	0.28	20	0.38	15.56	0.35	39.66	0.40	34.46
0.1	Teste	0.15	40	0.23	34.29	0.28	37.78	0.33	43.10	0.35	46.15
0.15	Teste	0.05	80	0.2	42.86	0.23	48.89	0.24	58.62	0.24	63.08
0.25	Teste	0	100	0	100	0	100	0	100	0	100
0.5	Teste	0	100	0	100	0	100	0	100	0	100
1	Teste	0	100	0	100	0	100	0	100	0	100

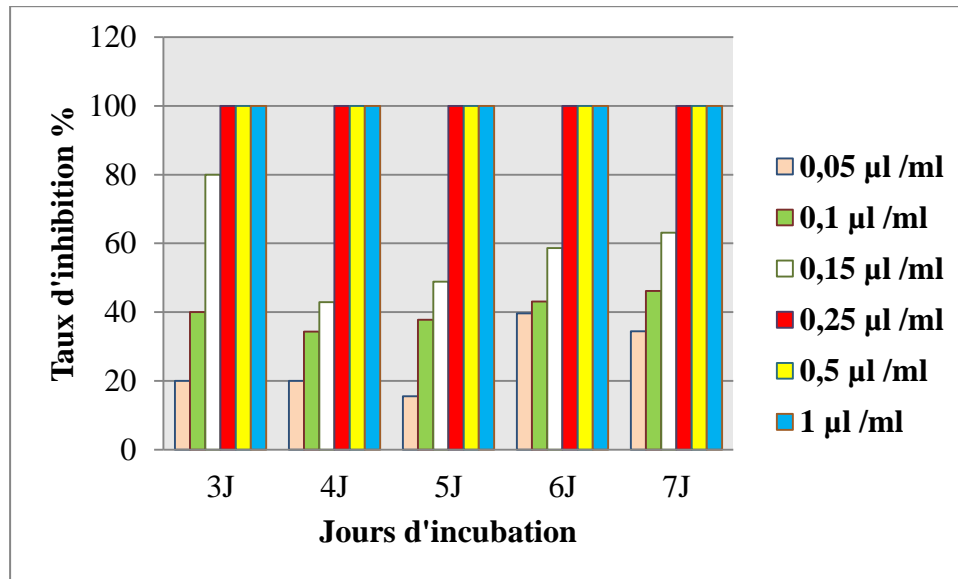


Figure 69 : Taux d'inhibitions de la croissance mycélienne de *Botrytis cinerea* obtenus par les différentes concentrations.

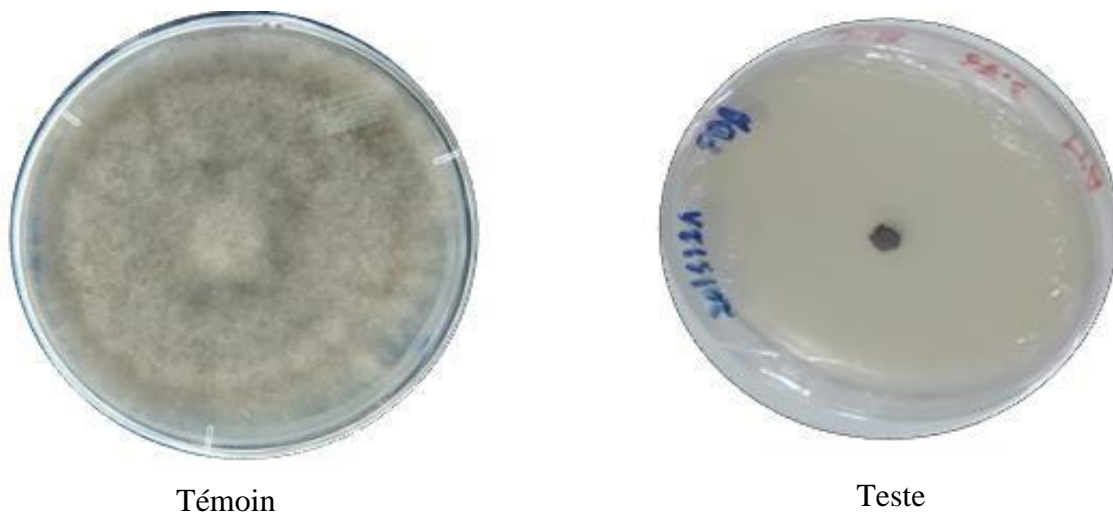


Figure 70 : Aspect macroscopique de colonie testée de *Botrytis cinerea* par la concentration qui correspond à la CMI d'HE d'*Ammoides verticillata* après 7 jours d'incubation.

Tableau 23 : Croissance mycélienne et le taux d'inhibition de champignon *Fusarium oxysporum* (par rapport aux témoins) en présence de différentes concentrations de huile essentielle d'*Ammodendron verticillata* pendant les 07 jours d'incubation (CM : croissance mycélienne, I : taux d'inhibition).

Jour		3J		4J		5J		6J		7J	
<i>Fusarium oxysporum</i>		CM	I%	CM	I%	CM	I%	CM	I%	CM	I%
Concentration (µl /ml)	Témoin	1.03	0	1.25	0	1.3	0	1.55	0	2.08	0
0.05	Teste	0.5	51.46	0.65	48.00	0.7	46.15	0.8	37.5	0.9	56.73
0.1	Teste	0.3	70.87	0.5	60.00	0.63	51.54	0.65	58.04	0.78	62.5
0.15	Teste	0.28	72.82	0.3	76.00	0.35	73.08	0.38	75.48	0.48	76.92
0.25	Teste	0	100	0	100	0	100	0	100	0	100
0.5	Teste	0	100	0	100	0	100	0	100	0	100
1	Teste	0	100	0	100	0	100	0	100	0	100

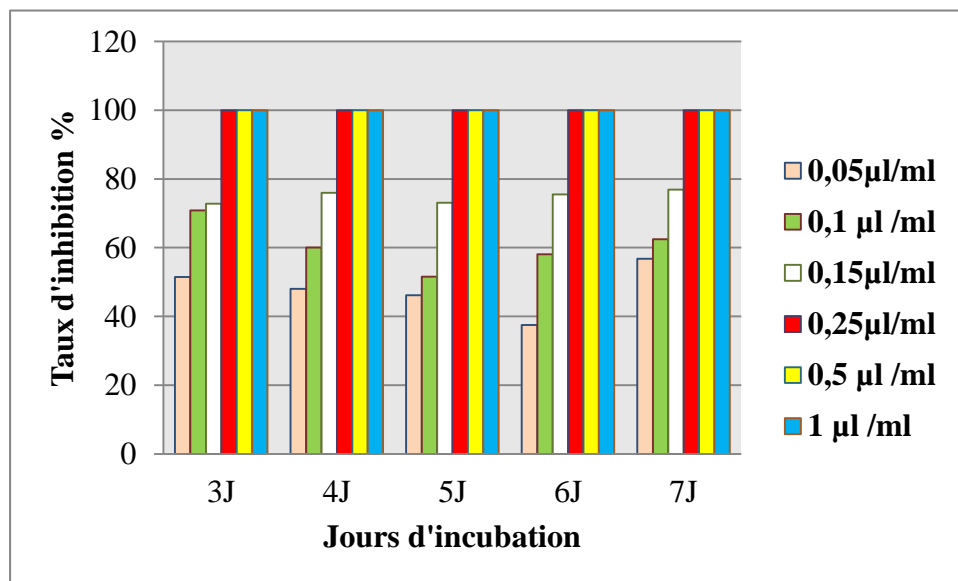


Figure 71: Taux d'inhibitions de la croissance mycélienne de *Fusarium oxysporum* par les différentes concentrations.



Figure 72 : Aspect macroscopique de colonie testée de *Fusarium oxysporum* par la concentration qui correspond à la CMI d’HE d’*Ammoides verticillata* après 7 jours d’incubation.

Tableau 24 : Croissance mycélienne et le taux d’inhibition de champignon *Fusarium solani* (par rapport aux témoins) en présence de différentes concentrations de huile essentielle d’*Ammoides verticillata* pendant les 07 jours d’incubation(CM : croissance mycélienne, I : taux d’inhibition).

Jour		3J		4J		5J		6J		7J	
<i>Fusarium solani</i>		CM	I%	CM	I%	CM	I%	CM	I%	CM	I%
Concentration (µl /ml)	Témoin	0.88	0	1.1	0	1.3	0	1.5	0	2.18	0
0.05	Teste	0.7	20.45	0.75	31.82	0.8	38.46	0.83	44.67	1.08	50.46
0.1	Teste	0.5	43.18	0.65	40.91	0.7	46.15	0.8	46.67	0.9	58.72
0.15	Teste	0.4	54.55	0.5	54.55	0.55	57.69	0.73	51.33	0.8	63.30
0.25	Teste	0	100	0	100	0	100	0	100	0	100
0.5	Teste	0	100	0	100	0	100	0	100	0	100
1	Teste	0	100	0	100	0	100	0	100	0	100

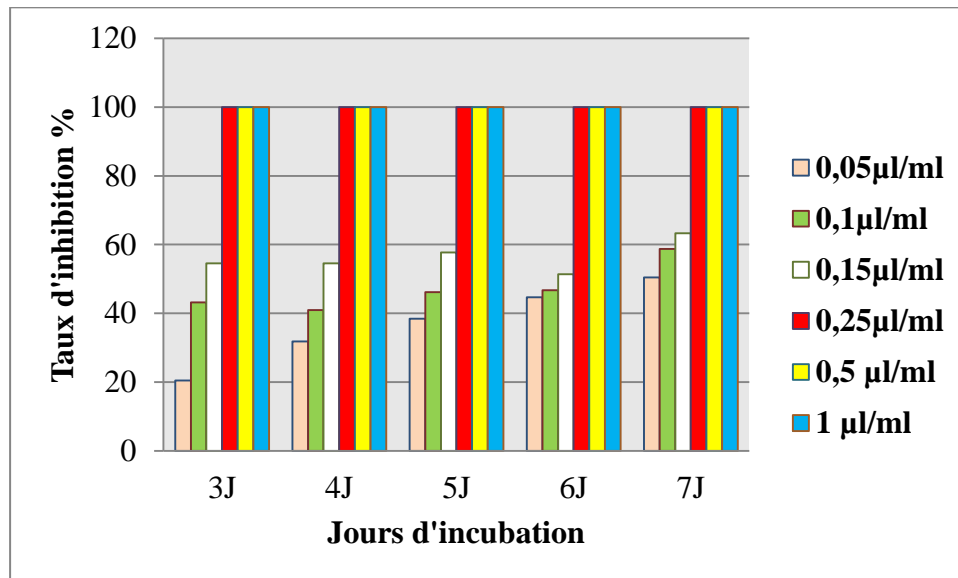


Figure 73 : Taux d'inhibitions de la croissance mycélienne de *Fusarium solani* par les différentes concentrations.



Figure 74 : Aspect macroscopique de colonie testée de *Fusarium solani* par la concentration qui correspond à la CMI d'HE d'*Ammoides verticillata* après 7 jours d'incubation.

Selon l'étude ethnobotanique effectuée sur *Ammoides verticillata*, plusieurs auteurs la considèrent comme une plante médicinale grâce au pouvoir antibactérien et antifongique de ses huiles essentielles (Dubey & Mishra, 1990 ; Srivastava et al., 1999).

Cette plante possède également des propriétés antiallergiques, anthelminthiques, antivirales (Grosjean, 2004), antibactériennes, antifongiques (Abdelouahid & Bekhechi, 2002 ; Laouer et al., 2003 ; Laouer et al., 2008).

Un travail similaire a été réalisé par **Senouci** en **2020** sur les capacités antifongiques de l'huile essentielle d'*Ammoïdes verticillata* contre 4 champignons : *Penicillium expansum*, *Fusarium solani*, *Rhizopus stolonifer*, *Alternaria alternata*. Elle a démontré que *Ammoïdes verticillata* présente de très bonnes activités antifongiques contre ces champignons avec des pourcentages d'inhibition (100%, 97,4%, 71,5%, 57,1%) respectivement en présence de 400 µl / l.

Dans le même travail, des résultats très intéressants ont été obtenus en ce qui concerne l'activité antibactérienne de la même huile contre *Staphylococcus aureus*, *Bacillus cereus*, contre lesquels elle a trouvé des valeurs de CMI de 0,8 µl/ml et de 0.7 µl/ml respectivement.

❖ **Cas d'HE d'*Artemisia judaica* :**

Pour mieux étudier l'effet antifongique d'huile d'*Artemisia judaica*, des analyses statistiques des pourcentages d'inhibitions de la croissance mycélienne en fonction des concentrations ont été réalisées.

Selon les analyse statistique l'effet de l'huile d'*Artemisia judaica* contre les trois champignons diffère significativement en fonction des différentes concentrations et cela car le *P* valu obtenu était nettement inférieur à 0.05 dans les trois évaluations de l'activité antifongique de l'huile effectuées.

Ce qui doit être pris en considération lors de l'application d'un programme de lutte par une optimisation de la concentration la plus efficace.

Tableau 25: Traitement statistique des résultats de *Botrytis cinerea*.

	ANOVA SS	DDL	Carré moyen	F	<i>P</i> valu
CONCENTRATION	42161,6	6	7026,94	2845	0.000

Tableau 26: Traitement statistique des résultats de *Fusarium oxysporum*.

	ANOVA SS	DDL	Carré moyen	F	<i>P</i> valu
CONCENTRATION	39182,5	6,00E+00	6530,41	277,2	0.000

Tableau 27 : Traitement statistique des résultats de *Fusarium solani*.

	ANOVA SS	DDL	Carré moyen	F	P valu
CONCENTRATION	35695,5	6	5949,25	666,8	0.000

Selon les valeurs mentionnées dans les tableaux 28 ,29 ,30 on a observé que la croissance mycélienne pour la plupart des souches testées (*Botrytis cinerea*, *Fusarium oxysporum* et *Fusarium solani*) est lente par rapport celle enregistrée dans le témoin et l'augmentation de la concentration exerceun ralentissement de croissance mycélienne pour les trois champignons ciblés.

Les tableaux ressortent que les pourcentages d'inhibitions d'huile testée augmentent avec l'augmentation de la concentration.

En effet, l'huile *Artemisia judaica* ont induit de taux d'inhibition de la croissance des trois champignons (*Botrytis cinerea*, *Fusarium oxysporum* et *Fusarium solani*) qui sont tous importants et a exercé une bonne activité sur ces champignons notamment pour les concentrations (0.5 µl/ml, 2µl/ml, 4µl/ml) respectivement pour lesquelles le pourcentage d'inhibition arrivé jusqu'à 100% (**Fig.75, 77,79**).

Les résultats montrent que la valeur de CMI de l'HE d'*Artemisia judaica* diffère en fonction du champignon traité, dont elle est de 0,5 µl/ml pour *Botrytis cinerea*, de 2 µl/ml pour *Fusarium oxysporum* et de 4 µl/ml pour *Fusarium solani* (**Fig.76, 78,80**).

Tableau 28 : Croissance mycélienne et le taux d'inhibition de champignon *Botrytis cinerea* (par rapport aux témoins) en présence de différentes concentrations de huile essentielle d'*Artemisia judaica* pendant les différentes durée d'incubation (**CM : croissance mycélienne, I :taux d'inhibition**).

Jour		3J		4J		5J		6J		7J	
<i>Botrytis cinerea</i>		CM	I%	CM	I%	CM	I%	CM	I%	CM	I%
Concentration (µl/ml)	Témoin	1.33	0	1.43	0	1.43	0	1.45	0	1.48	0
0.25	Teste	0	100	0.05	96.5	0.13	93.01	0.13	91.03	0.15	89.86
0.5	Teste	0	100	0	100	0	100	0	100	0	100
1	Teste	0	100	0	100	0	100	0	100	0	100
2	Teste	0	100	0	100	0	100	0	100	0	100
3	Teste	0	100	0	100	0	100	0	100	0	100
4	Teste	0	100	0	100	0	100	0	100	0	100

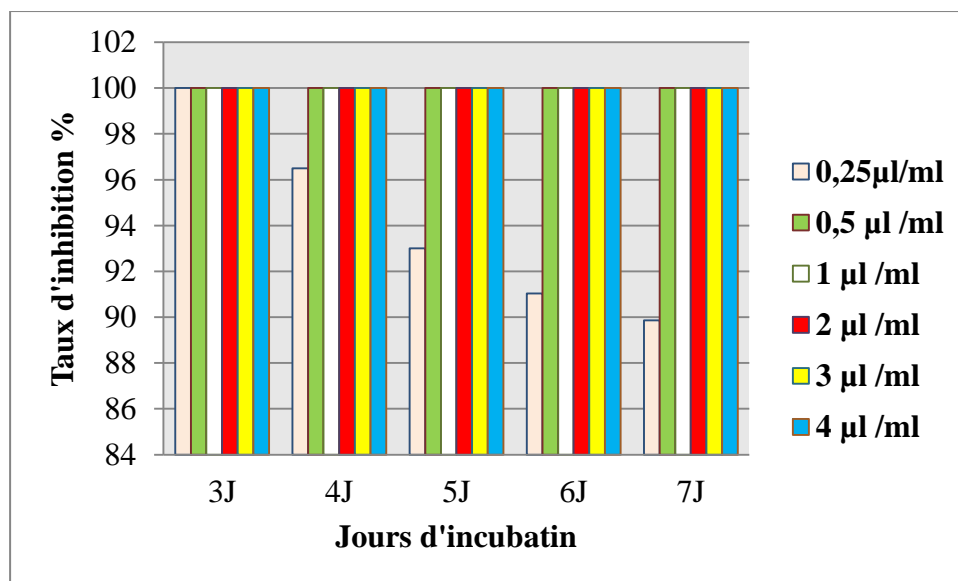


Figure 75: Taux d'inhibitions de la croissance mycélienne de *Botrytis cinerea* obtenus par les différentes concentrations.



Figure 76: Aspect macroscopique de colonie testée de *Botrytis cinerea* par la concentration de CMid'HE d'*Artemisia judaica* après 7 jours d'incubation.

Tableau 29 : Croissance mycélienne et le taux d'inhibition de champignon *Fusarium oxysporum* (par rapport aux témoins) en présence de différente concentrations de huile essentielle d'*Artemisia judaica* pendant les différentes durée d'incubation (CM : croissance mycélienne, I : taux d'inhibition).

Jour		3J		4J		5J		6J		7J	
<i>Fusarium oxysporum</i>		CM	I%	CM	I%	CM	I%	CM	I%	CM	I%
Concentration (µl/ml)	Témoin	1.43	0	1.73	0	2.35	0	2.53	0	2.85	0
0.25	Teste	0.03	97.9	0.2	88.44	0.4	82.99	0.5	80.24	0.93	67.37
0.5	Teste	0.03	97.9	0.2	88.44	0.4	82.99	0.5	80.24	0.73	74.39
1	Teste	0	100	0.03	98.27	0.15	93.62	0.23	90.91	0.33	88.42
2	Teste	0	100	0	100	0	100	0	100	0	100
3	Teste	0	100	0	100	0	100	0	100	0	100
4	Teste	0	100	0	100	0	100	0	100	0	100

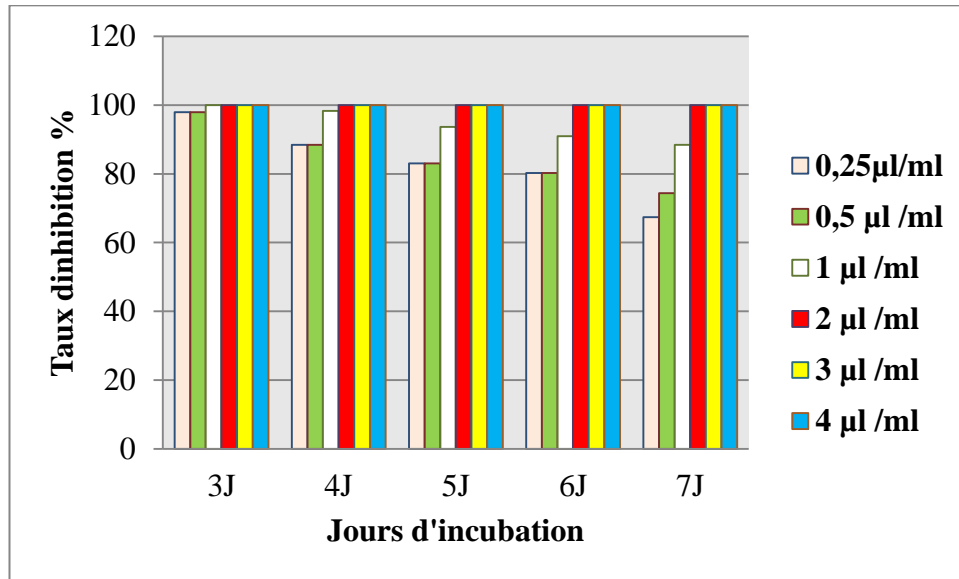


Figure 77 : Taux d'inhibitions de la croissance mycélienne de *Fusarium oxysporum* obtenus par les différentes concentrations.

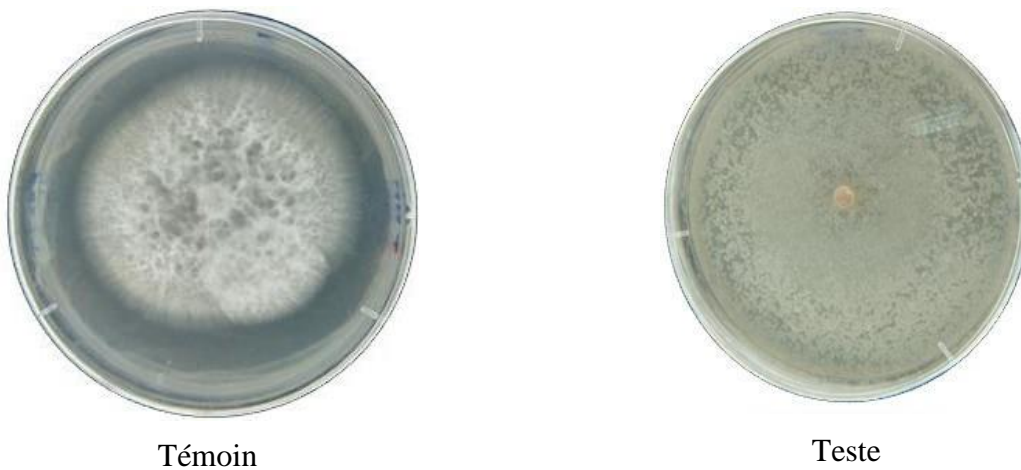


Figure 78: Aspect macroscopique de colonie testée de *Fusarium oxysporum* par la concentration de CMI d'HE d'*Artemisia judaica* après 7 jours d'incubation.

Tableau 30 : Croissance mycélienne et le taux d'inhibition de champignon *Fusarium solani* (par rapport aux témoins) en présence de différentes concentrations de huile essentielle d'*Artemisia judaica* pendant les différentes durée d'incubation (**CM : croissance mycélienne, I : taux d'inhibition**).

Jour		3J		4J		5J		6J		7J	
<i>Fusarium solani</i>		CM	I%	CM	I%	CM	I%	CM	I%	CM	I%
Concentration (µl/ml)	Témoin	1.3	0	1.6	0	1.75	0	2.1	0	2.18	0
0.25	Teste	0.18	86.15	0.28	82.5	0.43	75.43	0.53	74.76	0.68	68.81
0.5	Teste	0.15	88.46	0.25	84.38	0.35	80.00	0.48	77.14	0.63	71.10
1	Teste	0.15	88.46	0.20	87.5	0.30	82.86	0.43	79.52	0.50	77.06
2	Teste	0.03	97.69	0.05	96.88	0.15	91.43	0.18	91.43	0.2	90.83
3	Teste	0.03	97.69	0.04	97.5	0.05	97.14	0.1	95.24	0.15	93.12
4	Teste	0	100	0	100	0	100	0	100	0	100

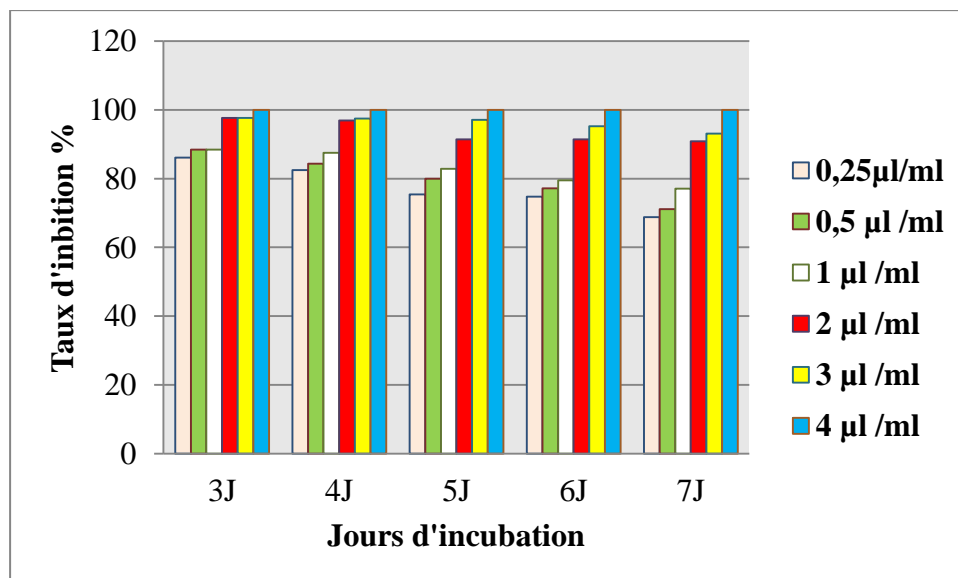


Figure 79: Taux d'inhibitions de la croissance mycélienne de *Fusarium solani* obtenus par les différentes concentrations.



Figure 80 : Aspect macroscopique de colonie testée de *Fusarium solani* par la concentration de CMI d'HE d'*Artemisia judaica* après 7 jours d'incubation.

Le pouvoir antifongique des huiles des plantes aromatiques a été mis en évidence par de nombreux auteurs contre les moisissures allergisantes (**Billerbeck et al., 2002 ; Koba et al., 2004 ; Ouraini et al., 2005**) et contre les dermatophytes et les champignons pathogènes et opportunistes tel que *Candida albicans*, *Cryptococcus neoformans* et *Aspergillus fumigatus* (**Teixeira, 2005**).

La plante *Artemisia judaica* possède différentes activités: antifongique, insecticide, fumigatif, molluscicide (**Abdelgaleil et al., 2008; Bratt et al., 2001; Abd-elhad, 2012 ; Bakry et al., 2011**).

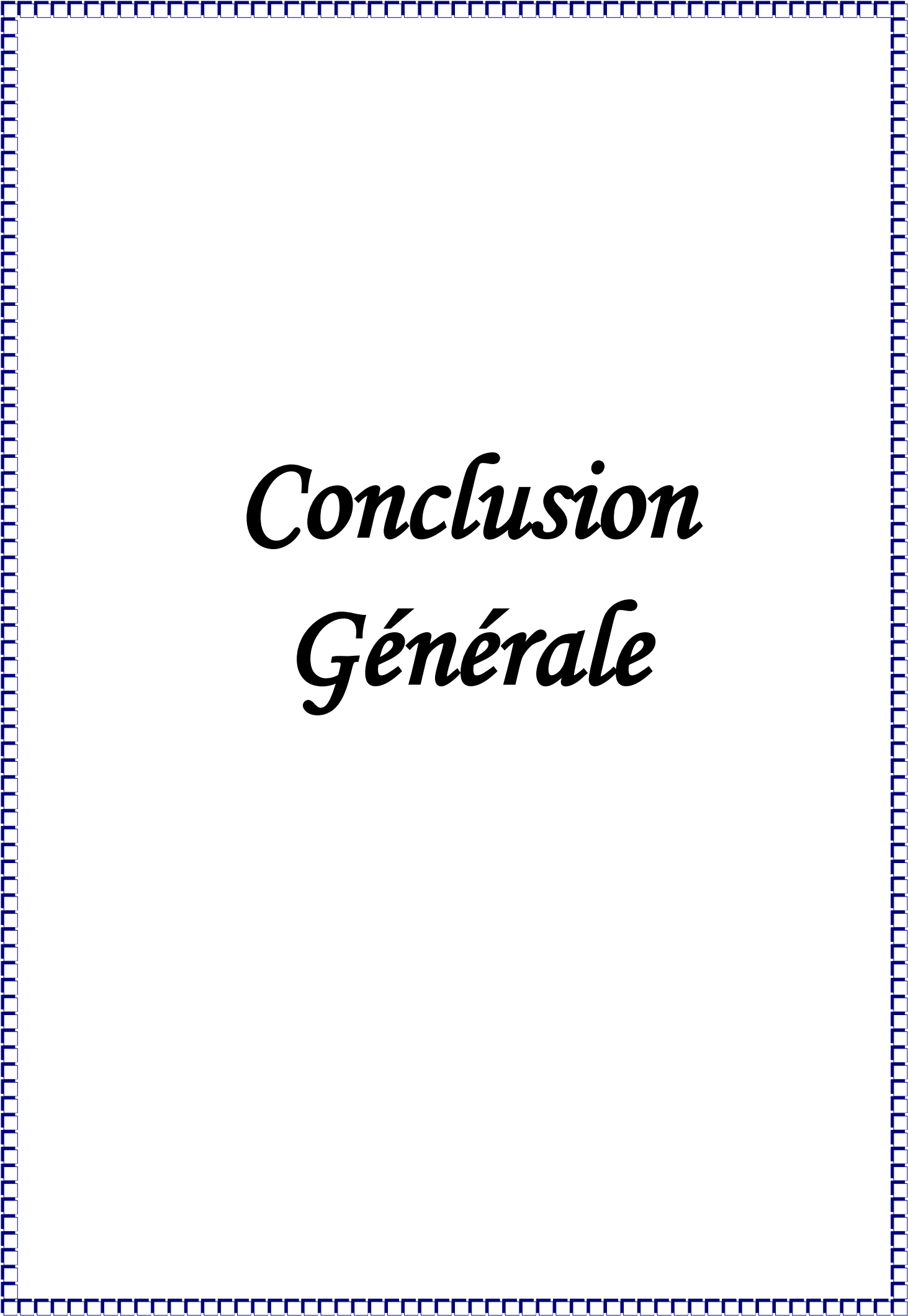
Abdelgaleil et al., (2008) ; Katoh et al., (2006) ; Saleh et al., (2006) et Dubey et al., (2000) ont publié de multiples travaux sur l'*Artemisia judaica*. Ils ont montré que les deux composés chimiques pipéritone et trans-cinnamate d'éthyle (principaux constituants d'huile essentielle d'*Artemisia judaica*) possèdent même une activité insecticide contre *Callosobruchus maculatus* en plus d'une activité antifongique contre d'autres champignons Pathogènes pour l'homme et les végétaux.

Dans une étude de **Gherib en 2009** sur les activités antimicrobiennes et antioxydantes des huiles essentielles et des flavonoides d'*Artemisia judaica*. L'huile essentielle de cette plante a montré des activités antifongiques considérables sur les souches testées (*Aspergillus flavus*, *Aspergillus niger*, *Fusarium oxysporum*, *Rhizopus stolonifer*), à l'exception d'*Aspergillus flavus*, lequel apparaît résistant même à des concentrations élevée de l'huile. Les pourcentages d'inhibitions était à l'ordre de (38.15%, 84.85% ,89.71% ,87.41%) respectivement pour la concentration de 200 µl /20 ml.

Pour la différence au niveau des CMI enregistrées, elle peut être justifiée par une

différence des degrés de sensibilités que présentent chaque champignon vis-à-vis les molécules actives de l'huile utilisée. **Mango & Olsen (2004)** ont confirmé qu'elle existe une différence significative entre les différents degrés de sensibilités des champignons qui font partie du même genre en vers la même huile essentielle.

On conclut, que les deux huiles essentielles d'*Artemisia judaica* et *Ammoides verticillata* possèdent des activités antifongiques très importantes, ces activités différents selon les différentes souches fongiques ciblées.



Conclusion Générale

Les problèmes phytosanitaires de la tomate constituent le facteur principal qui affecte sa culture, elle est attaquée par des agents fongiques responsables de maladies très redoutables telles que : *Fusarium oxysporum*, *Fusarium solani* et *Botrytis cinerea*.

Ces agents fongiques entraînent des pertes de récolte non négligeables allant jusqu'à l'anéantissement total de la récolte. Ce travail a été mené dans le cadre d'une étude concernant les attaques fongiques de la tomate « *Solanum lycopersicum* » et moyens de lutte biologique possibles contre ces agents phytopathogènes.

Une identification des agents causales de la fusariose et de la pourriture grise de la tomate a été faite sur la base des leurs caractéristiques spécifiques macroscopique et microscopique.

Le pouvoir pathogène des trois isolats a été évalué sur la variété de tomate (Varella), il s'est basé essentiellement sur la réponse de l'hôte et le développement des symptômes sur les différentes parties aériennes. Les résultats obtenus permettent de démontrer que nos souches sont virulentes vis-à-vis cette variété de tomate.

Ensuite, des tests de l'activité antifongique *in vitro* dans le cadre de lutte biologique par trois souches de *Bacillus subtilis* (*BM14*, *B2C*, *S2DSP*) et par des huiles essentielles de deux plantes « *Ammoides verticillata* et *Artemisia judaica* » ont été réalisés.

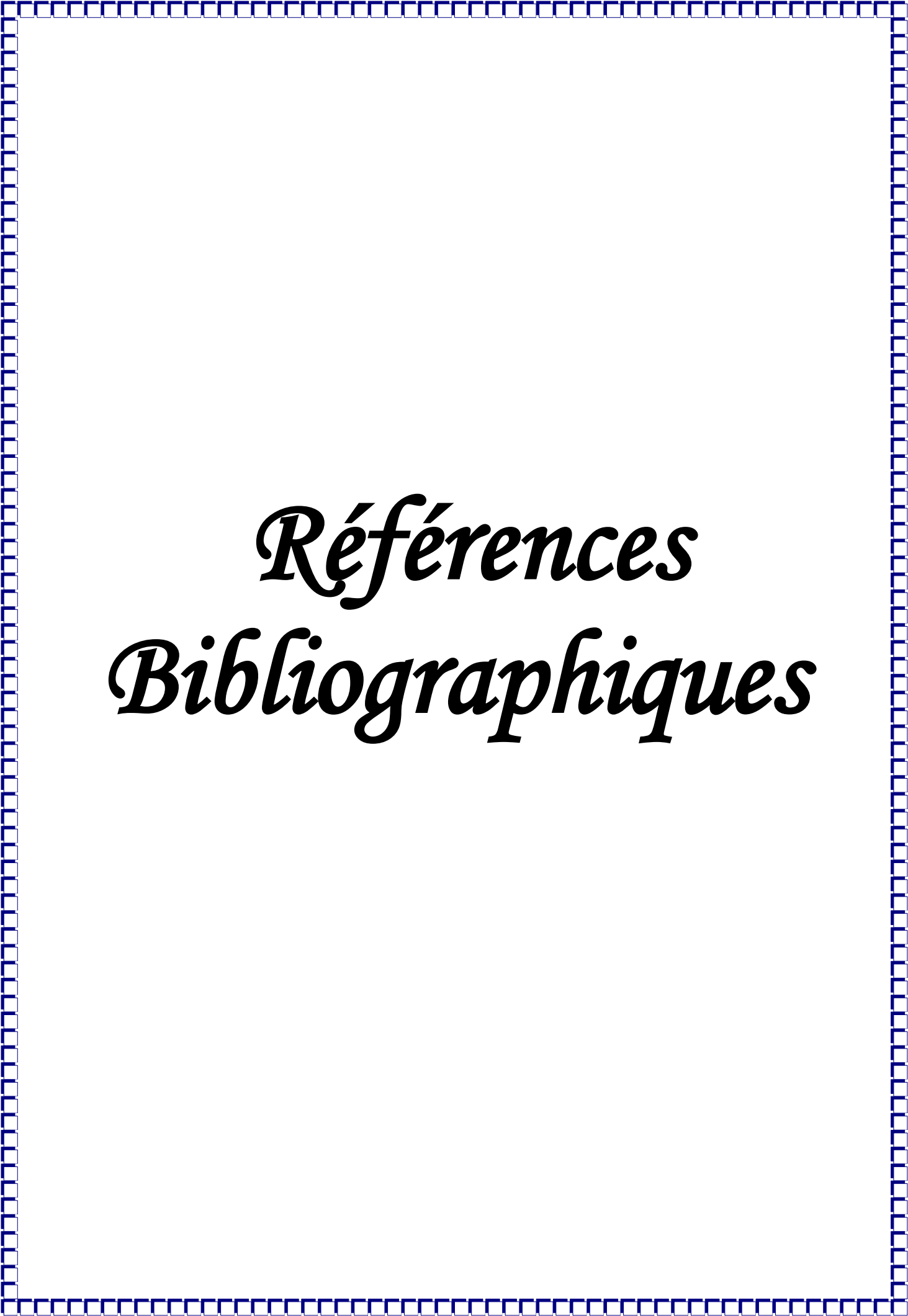
D'après nos résultats, les efficacités antifongique obtenue par les souches de *Bacillus subtilis* (*BM14*, *B2C*, *S2DSP*) diffèrent d'un champignon à un autre selon la méthode de confrontation (directe et indirecte), les champignons confrontés, où les taux d'inhibition de la croissance mycélienne de *Fusarium oxysporum* étaient entre : 64.06%, 85.52% , pour *Botrytis cinerea* ils étaient entre 48.21% , 52.42% et concernent le champignon *Fusarium solani*, le taux d'inhibition était dans les deux méthodes était dans les environs de 66.46%.

L'étude des activités antifongiques des huiles essentielles d'*Ammoides verticillata* et d'*Artemisia judaica* contre: *Fusarium oxysporum* et *Fusarium solani*, *Botrytis cinerea* s'est basé sur leur capacité à inhiber la croissance mycélienne.

L'huile essentielle d'*Ammoides verticillata* a un effet inhibiteur puissant sur les trois souches fongiques testées avec une concentration minimale inhibitrice de 0.25 µl/ml, tandis que l'effet de l'huile essentielle *Artemisia judaica* sur les mêmes champignons était un peu moins puissant avec des CMI de 0.5 µl/ml , 2 µl/ml , 4 µl/ml selon le champignon traité.

Les résultats obtenus montrent que lors de la mise en place d'un éventuel programme de lutte nous aurions la possibilité d'utiliser ces souches bactériennes et ces huiles essentielles comme des bio-fongicides contre les champignons phytopathogènes de la tomate.

En fin, Il serait intéressant de faire des recherches dans le proche avenir, dans le but de trouver d'autres souches du genre *Bacillus spp* qui ont un pouvoir antagoniste sur les champignons de tomate et aussi d'autre biomolécules des plantes aromatiques. Ainsi, il est souhaitable d'étudier le mécanisme d'action de ces agents de lutte biologiques à l'échelle moléculaire. Il faut aussi tester l'efficacité de ces agents de lutte *in vivo* en vue d'une application en conditions de production.



Références Bibliographiques

- **Abdelgaleil Sam, Abbassy Ma, Belal Ash, Abdel Rasoul Maa., 2008.** Bioactivity of two major constituents isolated from the essential oil of *Artémisia judaïca* L. *Bioresource Technology*, Volume 99, 5947–5950
- **Abd-Elhady Hk. 2012.** Insecticidal activity and chemical composition of essential oil from *Artémisia judaïca* L. against *Callosobruchus Maculatus* (F) (Coleoptera bruchidae). *Journal of plant protection research*, Vol. 52, 3.
- **Abdelouahed D.E, Bekhechi C.** Pouvoir antimicrobien de l'huile essentielle d'*Ammoïdes verticillata* (Nûnkha). *Biologie & Santé* vol. 4, n°2, 2004 Département de biologie, Faculté des Sciences Université Abou Bakr Belkaid de Tlemcen-Alger :
- **Abdelsalam, H. & Bogdadi, A., 2010.** Antimicrobial activities of ten medicinal plants used in the folk medicine of Libya. *Acta Horticulturae* 853: 419–422.
- **AFNOR, 2000 :** Huiles essentielles. Ed. PARA Graphic. Tome 1 – Echantillonnage et méthode d'analyse 471 P. Tome 2 – Volume 1 Monographie relative aux huiles essentielles
- **Agrawala J. N. & Pant M. C., 1986.** Effect of feeding *Carum copticum* seeds on serum lipids, high density lipoproteins (HDL) and serum cholesterol binding reserve in the albino rabbits. *Indian Journal of Medical Research*, 83: 93 - 95.
- **Agrios, G.N., 1997.** Control of Plant Diseases. In: *Plant Pathology*, 4th Edition, Academic Press, San Diego, 200-216
- **Agrios, G.N., 2005.** *Plant Pathology* 5th Edition Elsevier Academic Press, California. 922p
- **Aissat Kamel 2008.** Etat sanitaire de la culture de la tomate sous serre et étude épidémiologique de *Botrytis cinerea* (Agent de la pourriture grise).
- **Ajouz, S** estimation du potentiel de résistance de *Botrytis cinerea* aux biofongicides. Thèse de doctorat, université d'Avignon et des Pays de Vaucluse : faculté des sciences, 2009
- **Alabouvette, C. 1990.** Biological control of *Fusarium* wilt pathogens in suppressive soils. Dans: *Biological control of soil-borne plant pathogens*, D. Hornby (ed.), C. A. B. International, Wallingford, pp. 27-43
- **Albrecht C., A. Asselin, Y. Piche & F. Lapeyrie, 1993.** Comparison of Eucalyptus root chitinase patterns following inoculation, by ectomycorrhizal or pathogenic fungi in vitro. In: *Mechanisms of Plant Defence Responses* (1992, Strasbourg France). B. Fritig & M. Legrand (eds). Kluwer Academic Publishers, Dordrecht Boston London, 380.
- **Al-Mustafa A. H. Et Al-Thunibat O. Y., 2008.** Antioxidant activity of Jordanian medicinal plants used traditionally for treatment of diabetes. *Pakistan J. Biol. Sci.*, 11: 351–358 p.
- **Alstrom S., 2001.** Characteristics of bacteria from oil seed rape in relation to their biocontrol of activity against *Verticillium dahlia*. *J. Phytopathol.* 149, 57–64.

- **Ambasta S. P., Ramachandran K., Kashyapa K., Chand R. & Edits.,1986.** The useful plants of India. Publications and Information Directorate, CSIR, New Delhi, India, 643
- **Amstrong G& Amstongj.K, 1974.** Races of *Fusarium oxysporum* f. sp. *pisi*, causal agents of wilt of pea. *Phytopathology*, 64: 849-857.
- **Anonyme, 2004.** Le corridor Ranomafana-Andringita. In Journées de l'ATI aires Protégées. IRD, Document de travail, Orléans, p.27-40.
- **Anonyme., 2004.** US EPA Archives Document, R.E.D. FACTS, Thiophanate-Methyl. Unite States
- **Aouar L., 2012.** Isolement et identification des actinomycètes antagonistes des
- **Aouar Lamia, Sylvain Lerat, Ammar Ouffroukh , Abderrahmane Boulahrouf & Carole Beaulieu .,2012.** Taxonomic identification of rhizospheric actinobacteria isolated from Algerian semi-arid soil exhibiting antagonistic activities against plant fungal pathogens. « Canadian Journal of plant Pathology ». 165-176
- **Ariño J, Et Al., 2007.** Use of yeast genetic tools to define biological roles of novel protein phosphatases. *Methods Mol Biol* 365:299-307
- **Asselin A., 1993.** Quelques enzymes végétales à potentiel antimicrobien. *Phytoprotection*.74, 3-18.
- **Bakkali F., Averbek S., Averbek D. et Idaomar M., 2008).** Biological effects of essential oils – A review. *Food and Chemical Toxicology*, 46: 446-475
- **Bakry Fa, Ragaa Tm, El-Hommosany K., 2011.** Biological and biochemical responses of to some extracts of *Biomphalaria alexandrina* of the plants *Solanum siniacum* and *Artémisia judaïca* L. *Pesticide Biochemistry and Physiology*, 174–180.
- **Bardin, A.J., Le Borgne, R., Schweisguth, F., 2004.** Modes d'action des produits phytosanitaires sur les organismes pathogènes des plantes
- **Bari M.A., Islam W., Khan A.R. And Mandal A., 2010.** Antibacterial and antifungal activity of *Solanum torvum* (Solanaceae). *Int. J. Agric. Biol.*, 12: pp. 386-390
- **Baser Khc., Buchbauer G., 2010.** Handbook of Essential oils: Science, Technology and Applications. CRC Press. UK.
- **Benaouali Hadjira, 2015,** la biodiversité des *Fusarium oxysporum* f.sp.*radicis lycopersici* « caractérisation, compatibilité végétative » la lutte chimique et la lutte biologique.
- **Benaouli Hadjira, 2015.** La biodiversité des *Fusarium oxysporum* f.sp *radices lycopersici* « caractérisation, compatibilité végétative » la lutte chimique et la lutte biologique .Thèse de doctorat.119 p.
- **Benard, C., 2009.** Etude de l'impact de la nutrition azotée et des conditions de culture sur le contenu en polyphénols chez la tomate. (These de Doctorat). Nancy Université, France.
- **Benchelah A.C., Bouziane H., Maka M. Et Ouahes C., 2011.** Fleurs du Sahara. Voyages ethnobotanique avec les Touaregs du Tassili. Ibis Press Paris. 255 p
- **Benhamou N. 1996.** Elicitor-induced plant defense pathways. *Trends Plant Sci.* 1: 233-240.

- **Benmansour Nabahat Ep. Djoudi ., 19 Juillet 2016**, Etude des activités antioxydantes et antibactériennes de l'Artemisia judaica L. par les composés du métabolisme secondaire
- **Benmansour Nabaht., 2016**. Etude des activités antioxydantes et antibactériennes de l'Artemisia judaica L. par les composés des métabolismes secondaires. Thèse de doctorat.
- **Benoit B., 2012** .Nomenclature de la flore de la France. Rev Tela Botanica BDNFF v 4.02
- **Benton, 2007** .Tomato Plant Culture In the Field, Greenhouse, and Home Garden, Second Edition By J. Benton Jones, Jr.Copyright Year 2007
- **Bernard Tivoli ., 1988**, Guide d'identification des différentes espèces ou variétés de Fusarium rencontrées en France sur la pomme de terre et dans son environnement bioactive agents. Comb. Chem. High Throughput Screen. 6, 541–556. biocontrol agents. Antonie Van Leeuwenhoek. 81 (1-4): 537-547.
- **Bettaieb R., Bourgou S., Saidani Tounsi M., Fauconnier M.L. Et Ksouri R., 2017**.Phytochemical composition and antioxidant activity of Lavandula dentate extracts In journal of new sciences, Agriculture and Biotechnology, 39(2) 2096-2105
- **Bilia Ar, Flamini G, Taglioli V, Morelli I Et Vincieri Ff. ,2002**. GC-MS analysis of essential oil of some commercial Fennel teas. Food Chem. 76: 307-310.
- **Blanca I Escudero-Abarca , José E. Barboza Corona, , Journal Of Food Science · June 2004** Antifungal Activity of Bacillus thuringiensis Chitinase and Its Potential for the Biocontrol of Phytopathogenic Fungi in Soybean Seeds
- **Blancard D., Laterrot H., Marchoux G. Et Candresse T., 2009**. Les Maladies De La Tomate. Ed. Inra. p 690
- **Blancard D.,Laterrot M.,Marchoux G., Candresse T.,2009**. Les maladies de la tomate. (Eds). INRA. Paris
- **Blancard.D 2013**.<http://ephytaia.inra.fr/fr/C>
- **Bonmatin, J.M., Laprevote, O., Peypoux, F.,2003**. Diversity among microbial cyclic
- **Booth,C.1971**.the genus fusarim.Kew,UK :Commonwealth Mycological Institute.237p
- **Bórges-Argáez, 2016**. NSECTICIDAL EFFECTS OF PLANT EXTRACTS ON IMMATURE WHITEFLY BEMISIA TABACI GENN. (HEMIPTERA: ALEYROIDEAE) Esau Ruiz-Sanchez Angel Cruz-Estrada Marcela Gamboa-Angulo,Rocio.
- **Bouaoud, Y., Troulet, C., Aissat, K. Et Bardin, M., 2018**. Diversity in the susceptibility of Botrytis cinerea strains to the biological control agent Pseudomonas helmanticensis. 133, 100-104
- **Bounoua Mohammed Djellel., 2006** essais d'utilisation des Pseudomonas spp.et Bacillus spp.dans le biocontrole de Fusarium oxysporum f.sp lycopersici sur tomate et verticillum dahliae sue l'oliver
- **Bouzaata, C. 2016**. *Valorisation des sous-produits de quatre variétés de tomate industrielle (Solanum esculentum L) dans l'Est Algérien*. (These de Doctorat). Université Badji Mokhtar, Annaba, Algérie.

- **Bozin B., Mimica-Dukic N., Anackov G., Zlatkovic B. & Igic R., 2006.** Variability of content and composition of *Mentha aquatica* L. (Lamiaceae) essential oil in different phenophases. *J. Essent. Oil Bear. Pl.* 9(3): 223-9
- **Bratt K, Sunnerheim K, Nordenhem H, Nordlander G, Langstrm B. 2001.** Pine weevil (*Hylobius abietis*) antifeedants from lodgepole pine (*Pinus contorta*). *J Chem Ecol*, 27, 2253–2262.
- **BRIAN WILLIAMSON, BETTINA TUDZYNSKI, PAUL TUDZYNSKI, JAN A. L. VAN KAN, 23 July 2007** *Botrytis cinerea*: the cause of grey mould disease <https://doi.org/10.1111/j.1364-3703.2007.00417.x>
- **Bridier A, Le Coq D, Dubois-Brissonnet F, Thomas V, Aymerich S, Briandet R.,2010.** by antagonistic bacteria. *Biology Control*. 7: 30-37.
- **Bruneton J.** Pharmacognosie, phytochimie, plantes médicinales. Eds Tec&Doc (2009).4 ème éd. 1269p.
- **Burt S., 2004.** Essential oils: Their antibacterial properties and potential applications in foods a review. *Int. J. Food Microbiol.* 94: 223–253.
- **Causse, M., Cranta, C., Saliba-Colombani, V., Moretti, A., Damidaux, R. Et Rousselle, P., 2000.** Valorisation des ressources génétique de la tomate par l'utilisation de marqueurs moléculaire. *Cahiers agriculture*. 9, 197-210.
- **Causse, M., V. Saliba-Colombani, Et Al., 2001.** "Genetic analysis of organoleptic quality in fresh market tomato. 2. Mapping QTLs for sensory attributes." *TAG Theoretical and Applied Genetics* V102 (2): 273-283.
- **Chabasse D., Bouchara J.P., Gentile L., Brun S., Cimon B., et Penn P. 2002.** Cahier de formation Biologie médicale, Les moisissures d'intérêt médical, France : Bioforma. 160p.
- **Cherif H., 2014.** Amélioration de la croissance du blé dur en milieu salin par inoculation avec *Bacillus* sp et *Pantoea agglomerans* isolées de sols arides. Thèse de Doctorat. Microbiologie. Université Ferhat Abbas Sétif1.
- **Chernozemsky I.N, Stoyanov I.S, Petkova-Bocharova T.K, Et Al.,** Geographic correlation between the occurrence of endemic nephropathy and urinary tract tumours in vratza district, Bulgaria. *International Of Cancer*, 19, 1977. 1-11
- **Chougar C, 2012.** Bio écologie de la mineuse de la tomate *Tuta absoluta* (MEYRICK, 1917) (Lepidoptera : Gelechiidae) sur trois variété de tomate sous serre (Zahra, Dawson etTariva) dans la wilaya de Tizi-Ouzou, Université Mouloud MAMMERI de TIZI OUZOU 122p
- **Choukri Tefiani, 2015.** Les propriétés biologiques des huiles essentielles de *Curcuma longa* , *Ammoides verticillata* et *Thymus ciliatus* ssp. *Eu-ciliatus*. Thèse de doctorat .Université de Mostaganem.
- **Comporta P., 1985.** Antagonisme in vitro de *Trichoderma* sp. Vis-à-vis de *Rhizoctonia solani* Kühn. *Agronomie*, 1985, 5 (7), 613-620.
- **Crops Raaijmakers J .M; Vlami M Et Souza J.T.,2002.** Antibiotic production by bacterial The spatial architecture of *Bacillus subtilis* biofilms deciphered using a surface-associated

- **Dastmalchi, K., Damien Dorman, Hj., Oinonen, Pp., Darwis, Y., Laakso, I., Hiltunen, R., 2008.** Chemical composition and in vitro antioxidative activity of a lemon balm (*Melissa officinalis* L.) extract. *Food. Sci. tech LWT.* 41 (3), 391-400
- **Daugaard, H., Sorensen, L., And Loschenkohl, B. 2003.** Effect of plant spacing, nitrogen fertilisation, post-harvestdefoliation and fingerharrowing in the control of *Botrytis cinerea* Pers. in strawberry. *European Journal of Horticultural Science* 68: 77-82
- **Daunay & Al, 2008** a Carmina Gisbert, Jaime Prohens Eggplant relatives as sources of variation for developing new rootstocks: Effects of grafting on eggplant yield and fruit apparent quality and composition déficit hydrique chez le blé dur (*Triticum durum* Desf.): Aspect moléculaires et des méthodes de lutte modernes. Haute Ecole de Paysage d'ingénierie et d'architecture. Genève.
- **DEBBI Ali, 2019.** Etude de la diversité génétique de *Fusarium oxysporum* f. sp. lycopersici agent du flétrissement de la tomate et recherche de l'effet antagoniste de *Trichoderma* spp. A l'égard de l'agent pathogène
- **Deleu,M.,O.Bouffiuox,H.Razafindralambo,M.Paquot,Chbid,P.Thonart,P.Jacques ,And R.Brasseur.,2003.**Interactionof surfactin with membranes :computation approach.*Langmuir*,19 :3377-3385.
- **Dennis, C.; Webster, J., 1980.** Antagonistic Properties of Species-Groups of *Trichoderma*. I. Production of Non-Volatile Antibiotics. *Trans. Br.Mycol. Soc.*, 84:25-39.
- **Dipietro,A .,Madrid,M.P.,Caracuel,Z .,DelgadoJarana,J.,Roncero,M.I.G.2003.**Fu sarium oxysporum :exploring the molecular arsenal of a vascular wilt fungus .*Mol .Plant Pathol.*4 :315-325
- **Dubey N. K. & Mishra A. K., 1990.** Evaluation of some essential oils against dermatophytes. *Indian Drugs*, 27: 529-531.
- **Dubeya Nk, Tiwaria Tn, Mandinb D, Andriamboavonjyc H, Chaumontb J., 2000.** Antifungal properties of *Ocimum gratissimum* essential oil (ethyl cinnamate chemotype). *Fitoterapia*, 71, 567– 569.
- **Duffy, B., Schouten, A., And Raaijmakers, J.M. 2003.** Pathogen self-defense: mechanisms to counteract microbial antagonism. *Annual Review of Phytopathology* 41: 501-538.
- **Dupont F., 2004.** Botanique - Systématique Moléculaire. Ed Masson, 110-125.
- **Duvauchelle, S. & Andrivon, D. 1996.** Le mildiou et son agent *Phytophthora infestans* (Mont.) de Bary. In Rousselle, P.; Robert, Y. Et Croisnier, J.C. Ed. INRA et ITCF. France: 607.
- **E.A.B. Emmert, Jo.Handelsman., 1999.** Biocontrol of plant disease: A (Gram-) positive perspective
- **El Mahjoub M.,Bouzaidi A. ,Jouhria .,Hamrouni A ., El Beji ,1979.**Influence de la salinité des eaux d'irrigation sur la sensibilité du tournesol au *Macrophomina phaseoli*(Maubl)Ashby .*Ann.Phytopathol*11 :61-67

- **Emmanuel Wicker¹, Patrick Quénéhervé², Cica Urbino³ 1 Pram-Cirad 2 Pram-Ird 3 Cirad, 8/02/2007**, Intérêt de la connaissance des bioagresseurs pour l'Agriculture biologique Intérêt de la connaissance des bioagresseurs pour l'Agriculture
- **Emmert E. A. B & Handelsman J., 1999**. Biocontrol of plant disease: a (Gram-) positive perspective. FEMS. Microbiol. Lett. 171, 1-9.
- **Erskine W. & Bayaa B., 1996**. Yield loss, incidence and inoculum density associated with vascular wilt of lentim. Phytopathol. Medith 35. p: 24-32.
- **Fabian Corlierab Foudil Lamarie Michel Bottlaenderf Bruno Duboisabcd Marie Sarazinc**. Two Distinct Amnesic Profiles in Behavioral Variant Frontotemporal
- **Fandohan P., Gnolonif B., Hell K., Marasas, W.F.O, And Wingfield, Mj .,2005**. Natural occurrence of *Fusarium* and subsequent fumonisin contamination in preharvest and stored maize in Benin, West Africa. International Journal of Food Microbiology, 99,173-183.
- **FAO., 2010**. Disponible sur : <http://faostat.fao.org> et <http://ecocrop.fao.org> .P4-5
- **Faostat, 2017** <https://www.techno-science.net/glossaire-definition/Tomate-page-4.html>
- **Fernandes., 2005** .lutte biologique source, PHM revue horticole, n° 465
- **figure site 1.** <http://tomatosphere.parlonssciences.ca/Portals/5/Learning-Strategies/FR/3-Orgde>
- **figure site 2.** www.amfb.eu/Publications/2015/Pourriture-grise.pdf
- **Françoise Rocher, 2007** Lutte chimique contre les champignons pathogènes des plantes : évaluation de la systémie phloémienne de nouvelles molécules à effet fongicide et d'activateurs de réactions de défense génétiques. Thèse de Doctorat. Biotechnologie et génomique végétale. Université de
- **G Selvakumar, P Thamizhiniyan, S Reetha; 2012**. Response of Biofertilizers on Growth, Yield Attributes and Associated Protein Profiling Changes of Blackgram (*Vigna mungo* L. Hepper).
- **Gallagher K. A., Fenical W And Jensen P. R. ,2010**. Hybrid isoprenoid secondary metabolite production in terrestrial and marine actinomycetes. Current Opinion in Biotechnology 21: 794-800
- **Garneau F.X. ,2004**. Le matériel végétal et les huiles essentielles. Manuel pratique. Huiles essentielles : de la plante à la commercialisation. P 1-16
- **Gherib Mohammed ., 2009**, Etude des activités antimicrobienne et antioxydante des huiles essentielle *et des flavonoides d'Artemisia herba alba* Asso; *Artemisia judaica* .L. ssp. *sahariensis*; *Artemisia campestris* L; *Herniaria mauritanica* Murb et *Warionia saharae* Benth. Et Coll. Mémoire Pour l'obtention du diplôme de Magister en Biologie, Université Abou Bekr Belkaid —Tlemcen, 133 p.
- **Ghorri S. 2015**. Isolement des microorganismes possédant une activité anti-*Fusarium*
- **Gloud W. D., 1990**. Biological control of plant root diseases by bacteria. In: Nakas,J.P., Hagedorn, C. Biotechnology of plant-microbe interaction. Ed. Mc Graw-Hill, NewYork, USA, PP. 287-317.

- **González, G.A., Wang, C.Y. And Buta, G.J., 2004.** UV-C irradiation reduces breakdown and chilling injury of peaches during cold storage. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 84(5), 415-422.
- **Guinochet M, De Vilmorin R., 1975.** Flore de France, Fascicule 2. Paris: Éditions du Centre National de la Recherche Scientifique, pp. 672–726.
- **Harris, D., Pacovsky, R.S & Paul, E. A., 1985.** Carbon economy of soybean, *Rizobium, Glomus association*. *New Phytologist* 101, 427-440.
- **Hbid, C., 1996.** contribution à l'étude de la relation entre la structure des lipopeptides de *Bcillus subtilis* et leur activité hémolytique et antifongique. Thèse de doctorat. CWBI.151p
- **Holz G., Coertze S., Williamson B., 2004.** The ecology on plant surfaces on: Botrytis: biology, pathology and control. Y. Elad, B. Williamson, in: Botrytis: biology, pathology and control. Y. Elad, B. Williamson, P. Tudzynski and N. Delen, eds. Kluwer Academic Press, Dordrecht, The Netherlands P:9-27
- **Inoye, S. S., Abe, Repot., 2003.** comparative study of antimicrobial and cytotoxic effects of selected essential oils by gessous and solution contacts *International Journal of Aromatherapy* , Vol 13p 33-34
- **Irina Valer'evna Khilyas, Leyla Farvazovna Minnullina, Adelya Gadelevna Gilyazeva,** internationaux et évaluation des prix. 10ième journée internationale des huiles
- **J. Emmett Duffy & Boris Worm Al, Worm B, Duffy Je., 2003.** Biodiversity, productivity, and stability in real food webs. *Trends Ecol Evo* 18: 628-632
- **Jemmi M., Maaroufi A Et Mejri S., 2009.** Caractérisation et optimisation des conditions de croissance d'un biopesticide bactérien. *Revue des Régions Arides*. Jerba, Tunisie. 1367- 1370.
- **John, I.P., Ailsa, D. H., 2009** .Fungi and food spoilage. Third. Edition .London
- **K.L. Mahefarisoa, N. Simon Delso, V. Zaninotto, M. E. Colin, J.M. Bonmatin.** The threat of veterinary medicinal products and biocides on pollinators: A One Health perspective. *One Health*, Elsevier, 2021, 12, pp.100237.
- **Kasmi M., Aourach M., El Boukari M., Barrijal S. Et Essalmani H., 2018.** Efficacité des extraits aqueux des plantes aromatiques et médicinales contre la pourriture grise de la tomate au Maroc. *Comptes rendus - Biologies*. 340(8):386-393.
- **Ketoh, Gk, Koumaglo, Hk, Glitho, Ia, Huignard J., 2006.** Comparative effects of *Cymbopogon schoenanthus* essential oil and piperitone on *Callosobruchus maculatus* development. *Fitoterapia*, 77, 506–510.
- **Khaled Hibar, Mejda Daami-Remadi, Haifa Khiareddine & Mohamed El Mahjoub Koneman E.W., 2001.** Diagnostico microbiologico : Texto y atlas de color. Quinta edicion. Editorial Médica Panamericana. Buenos Aires
- **Kilani-Feki, O., Khedher, S. B., Dammak, M., Kamoun, A., Jabnoun-Khiareddine, H., Daami-Remadi, M., And Tounsi, S., 2016.** Improvement of antifungal metabolites production by *Bacillus subtilis* V26 for biocontrol of tomato postharvest disease. *Biological Control* 95, 73-82.

- **Koba K, Sanda K, Raynaud C, Nenonene Y.A, Millet J Et Chaumont J.P., 2004.** Activities antimicrobiennes d'huiles essentielles de trois *Cymbopogon* sp. Vis-à-vis des germes pathogènes d'animaux de compagnie. *Annales de Médecine Vétérinaire*, 148, 202-206.
- **Kumar, S.Srivastava, K., 2013.** Screening of tomato genotypes against early blight under field condition. *The bioscan, an international quarterly journal of life sciences* 8(1) : 1899-193.
- **Labiod Ryma., 2016,** Valorisation des huiles essentielles et des extraits de *Satureja calamintha nepeta* : activité antibactérienne, activité antioxydante et activité fongicide.
- **Laguerre, M., Lecomte, J., Villeneuve, P., 2007.** Evaluation of the ability of antioxidants to counteract lipid oxidation: Existing methods, new trends and challenges. *Progress in Lipid Research*, 46 (2007): 244-282
- **Laouer H., Boulaacheb N., Akkal S., Singh G., Marimuthu P., De Heluani C., Catalan C. & Baldovini N., 2008.** Composition and Antibacterial Activity of The Essential Oil of *Ammoides atlantica* (Coss. et Dur.) Wolf. *Journal of Essential Oil Research*, 20: 266-269.
- **Laouer H., Zerroug M. M., Sahli F., Chaker A. N. Valentini G., Ferretti G., Grande M. & Anaya J., 2003.** Composition and Antimicrobial activity of *Ammoides pusilla* (Brot.) Breistr. essential oil. *Journal of Essential oil Research*, 15: 135-138.
- **Lardry Jm., Haberkorn V., 2007.** Les Huiles Essentielles : principes d'utilisation. *Kinesitherapy Reviews*. 61: 18-23.
- **Larkin R.P., Fravel D.R., 1999.** Mechanisms of action and dose-response relationships governing biological control of Fusarium wilt of tomato by nonpathogenic *Fusarium* spp. *Phytopathology*, 89: 1152–1161
- **Leslie & Summerell .,2006 .the fusarium laboratory manual .edition blackwell,Iowa.388p**
- **Li, H., Leifert, C., 1994.** Development of resistance in *Botryotinia fuckeliana* (de Barry) Whetzel against the biological control agent *Bacillus subtilis* CL27. *Zeitschrift fur Pflanzenkrankheiten und Pflanzenschutz*. 101, 414-418.
- **Lidiya Mikhailovna Bogomolnaya, Margarita Rashidovna Sharipova,** *Agricultural Sciences*, 2017, 8, 1-20, *Bacillus subtilis* Strains with Antifungal Activity against the Phytopathogenic Fungi
- **Magan N. & Olsen M., 2004.** *Mycotoxines in food: Detection and control*, Woodhead Publishing in Food Science and Technology.P:190-203.
- **Mahmoudi Mohammed Elhad., 2012,** contribution à l'étude de botrytis cinerea pers agent de la pourriture grise variabilité biologique et essais de lutte chimique et biologique.
- **Mari M., Guizzardi M Et Pratella G.C., 1996.** Biological control of gray mold in pears
- **Mari, M., Guizzardi, M., Brunelli, M., And Folchi, A., 1996.** Postharvest biological control of grey mould (*Botrytis cinerea* Pers.: Fr.) on fresh-market tomatoes with *Bacillus amyloliquefaciens*. *Crop Protection* 15, 699-705.

- **Maria K Magnusson, Anne Arvolaulla-Kaisa Koivisto Hursti, Lars Åberg., 2003.** Choice of Organic Food Is Related to Perceived Consequences for Human Health and to Environmentally Friendly Behaviour.
- **Maxime Bertoux, Leonardo Cruz De Souza, Fabian Corlier, Foudil Lamari, Michel Bottlaeder, Bruno Dubois, Marie Sarazin., 2013.** Two distinct amnesic profiles in Behavioral variant frontotemporal dementia .médecine ancestrale. Editions Lanore, 315.
- **Merghid Manel & Al., 2017.** « Impacts des pesticides utilisés dans la plasticulture sur la santé humaine En Algérie : Étude de cas la wilaya de Constantine », Mémoire de Master, Université des Frères Mentouri Constantine, 114p.
- **Mishra, A. & N. Dubey ., 1994,** Evaluation of some essential oils for their toxicity
- **Mohammedi Z. & Fouzia A., 2007.** Pouvoir fongistatique de l'huile essentielle d'une plante
- **Möller K., 2008.** La distillation à l'alambic, un art à la portée de tous. Ed. UNICO, Paris.
- **Mounia Youcef-Ali, Ali Mounira , Noredine Kacem Chaouche ,In African Journal Of Microbiology Research · February., 2014 .**Antifungal activity and bioactive compounds produced by *Bacillus mojavensis* and *Bacillus subtilis*
- **Müller-Riebau F.J., Berger B.M., Yegen O. & Cakir C., 1997.** Seasonal variations in the chemical compositions of essential oils of selected aromatic plants growing wild in Turkey. *J. Agric. Food Chem.* 45: 4821–4825.
- **Mulligan, C.N., 2005.** Environmental applications for biosurfactants. *Environ. Pollut.* 133(2), 183-198 Catherine Mulligan.
- **N Korolev, T Katan., 1997.** Improved Medium for Selecting Nitrate-Nonutilizing (nit) Mutants of *Verticillium dahlia*.
- **Naika, S., Juede, J., Goffau, M., Hilmi, M., Dam, V., 2005.** La culture des tomates : Production, transformation et commercialization. *Agromisa/ CTA*. Revised edition, 2005 Agrodok-series No 17
- **Naika, S., Van Dam, B., Florijn., A., 2005.** La culture de la tomate : production, transformation et commercialization. Edition Agromisa Fondation, coll, Agrodok, Wageningen.105p.
- **Nasraoui Bouzid ., January., 2006.** Les champignons parasites des plantes cultivées (Biologie, Systématique, Pathologie, Maladies), [Parasitic fungi of cultivated plants : Biology, Systematic, Pathology, Diseases] (with an English version on CD). Centre de Publication Universitaire, 456 p, Tunisie.
- **Nicolas, V., 1991.** Huiles essentielles: Production mondiale, échanges
- **Nicot, P.C.,& Baille, A. 1996.** Integrated control of *Botrytis cinerea* on greenhouse tomatoes, p. 169-189, in *Aerial plant surface microbiology*. C. E. Morris, P. C. Nicot and C. Nguyen-The, eds. Plenum Press, New-York
- **Nollet Lm, Rathore Hs., 2015.** Biopesticides handbook. Ed. CRC PressTaylor & Francis Group. New York. USA. 281P.
- **Noor Khan , Pilar Martínez-Hidalgo , Tyler A Ice , Maskit Maymon , Ethan A Humm , Najmeh Nejat , Erin R Sanders , Drora Kaplan , Ann M Hirsch .,2018.**

Antifungal Activity of Bacillus Species Against Fusarium and Analysis of the Potential Mechanisms Used in Biocontrol.

- **O'donnellk., Kistler H., Tacke B., & Casper H., 2000.** Gene genealogies reveal global phylogeographic structure and reproductive isolation among lineages of *Fusariumgraminearum*, the fungus causing wheat scab. *Proceedings of National Academy of Sciences of the United States of America*, 97(14): 7905–7910, ISSN 1091-6490.
- **Odeh Odah, Mawuli Aziadekey Semihinva Akpavi ., 2014.**La diversité génétique des bananiers plantains cultivés dans la zone Ouest de la Région des Plateaux au Togo March.
- **Ongena M. Jacques P., 2008.** Bacillus lipopeptides: versatile weapons for plant disease biocontrol. *Trends in Microbiology*. 16:115–125.
- **Ongena, M., A. Giger, P. Jacques, J. Dommes Et P. Thonart., 2002.** Study of bacterial determinants involved in the induction of systemic resistance in bean by *Pseudomonas putida* BTP1. *Euro. J. Plant Pathol.*, 108: 187-196.
- **Ongena,M.,F.Daayf,Ph.Jaquesph.Thonart,N.Benhamou.T.C.Paulitz,Andr.R,Béla nnger., 2000 .**systemic induction of phytoalexins in cucumber in reponse to treatments with fluorescent pseudomonds . *Plant pathology* ,49 :523-530.
- **Ongenaet M.,F.Duby, E.Jourdan,T.Beaur,V.Jadin,J.Dommes ,And P.Thonart ., 2004.**Bacillus subtilisM4 decreases plant susceptibility towards fungal pathogenes by increasing host resistance associated with different gene expression .*Appl.Microbiol.biotechnol.*,in press.
- **Ongenaet M.,P.Jacques ,Y.Touré,J.Destain,A.Jabrane, And P.Thonart., 2005.**Involvement of fengycin-tyoe lipopeptildes in the multifaceted biocontrol potentail of *Bacillus subtilis*., *Appl.*
- **Ould El Hadj Mohamed Didi 2 Et Sabaou Nasserline 1, Decembre ., 2014 .** influence de quelques souches bacteriennes d'origine saharienne sur l'expression de la fusariose du lin et du palmier dattier protection. 15: 479-486.
- **Oumzil H., Ghouлами S., Rhajaoui M., Ildrissi A., Fkih-Tetouani S., Faid M., Benjouad A., 2002.** Antibacterial and Antifungal Activity of Essential Oils of *Mentha suaveolens*.*Phytother. Res.* 16:727-731.
- **Ouraini D, Agoumil A, Ismaili-Alaoui M, Alaoui K, Cherrah Y, Amrani M Et Bellabas M.A., 2005.** Etude de l'activité des huiles essentielles de plantes aromatiques à propriétés antifongiques sur les différentes étapes du développement des dermatophytes. *Phytothérapie*, 4,147-157.
- **P.J. Fiddaman S. Rossall ., 1993.** The production of antifungal volatiles by *Bacillus subtilis*.
- **Pannizzi L., Flamini G., Cioni P., Morelli 1., 1993.** Composition and antimicrobial properties of essential oil of four Mediterranean Lamiaceae. *J. of Ethnopharmacology*, 3: 167-170.
- **Pare J., 1997.** Procédé assisté par micro-ondes. Info-essences, *Bulletin sur les huiles essentielles*. 4: 4

- **Park , C.S., Paulitz , T.C & Baker , R ., 1988.** Biocontrol of Fusarium wilt of cucumber resulting from interactions between *Pseudomonas putida* and nonpathogenic isolates of *Fusarium* . *Phytopathology* 78 , 190-197.
- **Patrizia Rubiolo, Barbara Sgorbini, Erica Liberto, Chiara Cordero., 2010.** Analysis of the Plant Volatile Fraction
- **Pellerin P., 2001** . Extraction par le CO₂ à l'état supercritique. *Ann. Fals. Exp. Chim.* V. 94, N°954 – p: 51-62.
- **Quecine M. C., Araujo W. L., Marcon J., Gai1 C. S., Azevedo J. L. And Pizziranikleiner A.A., 2008.** Chitinolytic activity of endophytic *Streptomyces* and potential for biocontrol. Original Article.
- **Quezel P. Et Santa S., 1963** . Nouvelle flore d'Algérie et des régions désertiques méridionales. Ed centre national de la recherche scientifique. 663 p.
- **Raaijmakers J .M; Vlami M Et Souza J.T., 2002.** Antibiotic production by bacterial
- **Raida Moalla1, Manel Gargouri, Foued Khmiri, Lotfi Kamoun, Moncef Zairi1, 2017.** Effets de certains fongicides de synthèse et biologiques sur la croissance mycélienne et l'agressivité de *Fusarium oxysporum* f. sp. *radicis-lycopersici*.
- **Rekibi Fouzi, 2015** .Analyse compétitive de la filière tomate sous serre.cas de la Wilaya de Biskra.
- **Rey Y& Costes C.,**la physiologie de la tomate,étude bibliographique.Ed.INRA. P 111.
- **Roquebert M.F., 1998.** Taxonomie des moisissures ; Méthodes de culture et techniques d'observation ; Identification”, in “Moisissures des aliments peu hydratés”, Ed. Tec & Doc, 39-95
- **Roy K.W., D.E. Hershman, J.C. Rupe, And T.S. Abney.,1997.** Sudden death syndrome of soybean. *Plant Disease* 81:1100-1111.
- **Şahin F., Gulluce M., Daferera D., Sokmen A., Sokmen M., Polissiou M., Agar G. & Ozer H., 2004.** Biological activities of the essential oils and methanol extract of *Origanum vulgare* ssp. *vulgare* in the Eastern Anatolia region of Turkey. *Food Control*. 15: 549–557
- **Saidi, N., Kouki, S., M'hiri, F., Hajlaoui, M. R., Mahrouk, M., Ouzari, H., & Hassen, A., 2009.**Characterization and selection of *Bacillus* sp. strains, effective biocontrol agents against *Fusarium oxysporum* f. sp. *radicis-lycopersici*, the causal agent of *Fusarium* crown and root rot in tomato. *Annals of microbiology*, 59(2), 191-198
- **Sakhr Ajouz .,21-12-2009.** Estimation du potentiel de résistance de *Botrytis cinerea* à des biofongicides
- **Saleh Ma, Belal Mh, El-Baroty G., 2006.** Fungicidal activity of *Artemisia herba alba* asso (*Asteraceae*). *J Environ Sci Health B*, 41, 237–244
- **Salima Punja,1 Catherine J. Nikles,2 Hugh Senior,3,4 Geoffrey Mitchell,4 Christopher H. Schmid,5 Helen Heussler,6 Manisha Witmans,7 And Sunita Vohracorresponding Author1., 2016** . Melatonin in Youth: N-of-1 trials in a stimulant-treated ADHD Population (MYNAP) 2016: study protocol for a randomized controlled trial,

- **Sarvas,M.,Cr.Harwood,S.Bron,Andj.M.Van Dijil., 2004.**Post-translocation folding of secretory proteins in Gram positive bacteria .BBA.1694 :1-3.
- **Sawadogo. , K ., 2013.**conduite d'une culture de multiplication de semences de tomates d'hivernage à la station de farako-bà, INERA Farako, p 65
- **Schalchli H, Hormazabal E, Becerra J, Birkett M, Alvear, M, Vidal J, Quiroz A. ,2011.** Antifungal activity of volatile metabolites emitted by mycelial cultures of saprophytic fungi.J. Chem. Ecol. 27, 503–513.
- **Scher, F.M, & Baker, R., 1982.** Effect of Pseudomonas putida and a synthetic iron chelator in induction of soil suppressiveness to Fusarium wilt pathogens. Phytopathology 72 , 1567-1573.
- **Sedra , My.H., Maslouhy, My.A ., 1995.** Fusariose. vasculaire du palmier dattier (bayoud). II. Action inhibitrice des filtrats de culture de six microorganismes antagonistes isolés des sols de la palmeraie de Marrakech sur le développement in vitro de Fusarium oxysporium f.sp.albedinis .Al awamia , 90 , p.1_8.
- **Sell, C.S. 2003.** A Fragrant Introduction to Terpenoid Chemistry. The Royal Society of Chemistry. Cambridge. 410 p
- **Senouci, H. 2020.** Etude des activités biologiques de l'huile essentielle de *Ammoides verticillata*, en combinaison avec les huiles essentielles de *Curcuma longa* et *Allium sativum* et Micro- encapsulation de l'HE de *Ammoides verticillata* en vue d'une lutte.
- **Shafi, J., Tian, H. Et Ji, M.,. 2017.** Bacillus species as versatile weapons for plant pathogens: a review. Biotechnology & Biotechnological Equipment, 31, 446-459. doi:10.1080/13102818.2017.1286950.
- **Si Mohammed Abdesselem. , 2017,** caractérisation et lutte biologique vis-à-vis de fusarium oxysporum
- **Sijelmassi A.** Les plantes médicinales du Maroc. MAROC, LE FENNAC 1991.,2 :218
- **Smahi Fatiha Lazreg Lakhdar Belabid., 2013.** *First Report of Fusarium acuminatum Causing Damping-Off Disease on Aleppo Pine in Algeria*
- **Smith, S. N., & Snyder, W. C. 1971.** Relationship of inoculum density and soil types to severity of *Fusarium* wilt of sweet potato. Phytopathology 62: 273-277.
- **Snoussi S. A., 2010-** Etude de base sur la tomate en Algérie. Rapport de mission Programme régional de gestion intégrée des ravageurs pour le Proche-Orient. Rome, 52 p
- **Sonenshein, 2001,**Tufts Univ Boston MA:ASM, Bacillus subtilis and its closest relatives subtilis. Nature 390: 249-256
- **Sova, C. Et Al. 2018,** Bringing the Concept of Climate-Smart Agriculture to Lige: Insights from CSA Country Profiles Across Africa, Asia and Latin America, World Bank, and the International Centre for Tropical Agriculture Protein secretion pathways in Bacillus subtilis : Implication for optimization of Pythium ultimum and Aphanomyces cochlioides on sugar-beet seedlings.
- **Srivastava M., Saxena A. & Baby P., 1999.** GC-MS investigation and antimicrobial activity of the essential oil of Carum copticum Benth & look. Acta Alimentaria, 28: 291-295.

- **Tchamdja K.M. 1995.** Etude de performance d'un extracteur artisanal pour la production
- **Teixeira-Duarte M.C, Mara Figueira G Et Sartoratto A., 2005.** Anticandida activity of Brazilian medicinal plants. *Journal of Ethnopharmacology*, 97, 305-311
- **Tholl D. 2006.** Terpene synthases and the regulation, diversity and biological Roles of terpene metabolism. *Current Opinion in Plant Biology* 9: 297-304
- **Todar, K. 2003.** Online textbook. Emertitus, University of Wisconsin-Madison.
- **Toure Y., Ongena M., Jacques P., Guiro A Et Thonart P. 2004.** Role of lipopeptides produced by *Bacillus subtilis* GA1 in the reduction of grey mould disease caused by *Botrytis cinerea* on appel. *Applied Journal of Microbiol.* 96: 1151-1160.
- **Trabut A.L. 1993** .Flore du Nord de l'Afrique : Répertoire des nomes indigènes des plantes spontanées, cultivées et utilisées dans le Nord de l'Afrique. Collection du centenaire de l'Algérie, Alger
- **Trivedi P., Pandey A., 2008.** Recovery of plant growth-promoting rhizobacteria from sodium alginate beads after 3 years following storage at 4°C, *J Ind Microbiol Biothechnol*, N°35, 205-209.
- **Walker, A.S. 2013.** Diversité et adaptation aux fongicides des populations de *Botrytis cinerea*, agent de la pourriture grise. Thèse doctorat de l'université Paris-Sud.
- **Wang S.L., Hsio, W.T. 2002.** Purification and characterization of an antimicrobial chitinase extracellularly produced by *Monascus purpureus* CCR31499 in a shrimp and crab shell powder medium. *J. Agric. Food. Chem.*, 50, pp.2249-2255.
- **Westerlund J., Campbell R. N. Et Kimble K. A., 1974.** Fungal root rots and wilt of chickpea in California. *Phytopathology* 64: 432-436.
- **Wheatley R E. 2002.** The consequences of volatile organic compound mediated bacterial and fungal interactions. *Antonie van Leeuwenhoek.* 81, 357–364.
- **Willem, J.P.** Le guide des huiles essentielles pour vaincre vos problèmes de santé
- **Williams G.E., Asher M.J.C., 1996.** Selection of rhizobacteria for the control of *pythium ultimum* and *aphanomyces cochiloides* on sugar-beet seedling. *Crop Prot* , 15: 479-486.
- **Xiangru Liao, 1 September 1, 2016** .Antifungal Activity of Isolated *Bacillus amyloliquefaciens* SYBC H47 for the Biocontrol of Peach Gummosis
- **Xunhang Li^{1,2}, Yanzhou Zhang¹, Zhiwen Wei¹, Zhengbing Guan¹, Yujie Cai¹, Zahir, I., Babouchi, M., Boulanour, H. Et El Louyti, M., 2009.** Effet des microorganismes isolés à partir des boitopes Marocains sur les phytopathologies. *Rev. Agrobiol.* 8 (2), 971-983
- **Yoshida S, Hiradate S, Tsukamoto T, Hatakeda K, Shirata A. 2001.** Antimicrobial Activity of Culture Filtrate of *Bacillus amyloliquefaciens* RC-2 Isolated from Mulberry Leaves. *Phytopathology* 91: 181–187
- **Zaim S., Belabid L. And Bellahcene M., 2013.** Biocontrol of chickpea *Fusarium* wilt by *Bacillus* spp. rhizobacteria. *J. Plant Prot. Res.*, 53 (2): 177–183.

Annexe

➤ Eau physiologique

Sodium chloride.....9g

Eau distillée.....1000ml

➤ Milieu BN (Bouillon nutritif)

Extrait de levure..... 2 g

Extrait de viande..... 1g

Peptone..... 5g

Chlorure de sodium..... 5 g

➤ Milieu GN (Gélose nutritive)

Hydrolysate tryptique de caséine2,5g

Extrait de viande5g

Glucose1g

Extrait de la levure 2,5g

Agar15g

Eau distillé 1000 ml

➤ Milieu PDA (Pomme de terre dextrose agar)

Pomme de terre :200g

Glucose :20g

Agar :20g

Eau distille :1000ml