

الجمهورية الجزائرية الديمقراطية الشعبية

REPUBLIQUE ALGERIENNE DEMOCRATIQUE ET POPULAIRE

وزارة التعليم العالي و البحث العلمي

Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique

Centre Universitaire Salhi Ahmed -Naama



Mémoire de fin d'études

En vue de l'obtention du diplôme de

Master Académique en sciences biologiques

Spécialité : Microbiologie Appliquée

Thème

Valorisation des potentialités de la bactérie *Bacillus sp* dans la lutte biologique contre les champignons phytopathogènes de l'olivier *Olea europaea*.

Présenté par :

M^{elle} Ait SALEM fahima

M^{me} Zahaf fatna

Soutenu le : 29/09/2020

Jury :

Président : Dr. GHRIB Mohammed MCA

Encadreur : Dr. KEBDANI Mohammed MCB

Examineurs : Dr. SEDDIKI Mohammed MCA

Année Universitaire 2019 /2020



Remerciements



CAR on ne réussit jAmAis seul ...

Avant Tout on remercie le Dieu qui nous a donné la force et le courage d'achever ce travail.



On voudrait exprimer tout notre reconnaissance la plus sincère à notre promoteur Monsieur Kabdani mouhamed d'avoir accepté de nous encadrer et pour sa disponibilité, ses conciles judicieux mais surtout pour sa qualité humaine. Ce travail est pour nous l'occasion de vous témoigner notre profonde gratitude.



On remercie sincèrement Mr GHRIB MOHAMMED Pour l'honneur qu'il nous fait en acceptant de présider ce Jury.



Nous vif remerciment s'adressent aussi à Mr SEDDIKI MOHAMMED pour avoir accepté d'être membre de jury et d'examiner ce modeste travail.



Un merci spécial à tous les enseignants de notre cursus universitaire qui ont contribué à notre formation en particulier Mr Amrouche pour les précieux conseils et les moments agréables.



On adresse également un immense merci à tous les ingénieurs de laboratoire de microbiologie de CUN spécialement Fatima.

Merci 



Dédicaces





*Je dédie ce modeste **travail** ...*

*A mon très cher père : je voudrais remercier pour ton amour, ta générosité, ton soutien moral.
Tu as été pour moi un exemple du père respectueux. Puisse Dieu le Haut vous accorder santé,
bonheur et long vie.*

*A la lumière de mes jours, la source de mes efforts, ma vie et mon bonheur : A ma Mère paix a
son âmes pour ma réussite, de par son amour et son soutien.*

*A mes chères sœurs (Naima, Malika, Fatiha, dgema,) pour leurs encouragements
permanents et leurs enfants (ABD ERAZZAK, AYA, FIRDAOUS, ABD EL FETTAH,
HASSNA).*

A mon cher frère BILAL.

A toutes les personnes de ma grande famille.

*A celui qui j'aime beaucoup et qui m'a soutenue tout au long de ce projet : Mon marie
ABDELKARIM, ton amour et ton affection remplissent mes jours de bonheur.*

A mon binôme FAHIMA.

*A mes très chères amies en particulier : KHAOULA, FATIMA, HOUDA, FATNA, SABAH,
SOURIA, ZAHIA, Sara, Meryem, HANANE, HafSsa, Soumia.*

*A vous, les techniciennes de laboratoire de Microbiologie en particulier: FATIMA, pour votre
collaboration et la bonne ambiance qui a toujours régné entre nous.*

A tous mes enseignants en particulier : Monsieur KeBDaNI.





Je dédie ce mémoire...

A ma reine ma plus belle histoire, mon exemple à la combattante qui m'a supporté dans les moments difficiles quand j'étais malade. Tu as fait plus qu'une mère puisse faire que ses enfants suivent le bon chemin dans leur vie et leurs études. À ma mère sans toi je n'aurais certainement pas terminé mes études je t'aime ma meilleure.

A l'homme de ma vie qui m'a fait toujours confiance, qui m'a toujours poussé et motivé pour réaliser mes rêves. Je te dédie ce travail en témoignage de mon profond amour.

Je t'aime papa.

A mes plus belles sœurs : Sabrina, Asma, Nafissa je vous aime les meilleures.

A mon petit frère que j'aime AbdKrime.

A mes grands-parents maternels et paternels.

A mes cousines Houda , Imane et wardya.

A toute ma famille en particulier, khalo Saide.

A mon binôme fatna.

A mes amies.

A toutes les personnes touchées par cette pandémie de coronavirus et tous les gens qui ont passé des moments difficiles dernièrement.



Sommaire

Remerciement.....	
Dédicace.....	
Liste des abréviations.....	IV
Liste des figures.....	V
Liste des tableaux.....	IV
ملخص.....	
Résumer.....	
Abstract.....	

Introduction	1
---------------------------	----------

PREMIERE PARTIE : Synthèse bibliographique

Chapitre I : Présentation de la plante hôte	4
I. L'olivier	4
I.1. Historique et origine	4
I.2. Répartition géographique	4
I.2.1. Dans le monde	4
I.2.2. Oléiculture en Algérie	5
I.2.3. Oléiculture dans la wilaya de Naama.....	6
I.3. Classification et description botanique d' <i>Olea europaea</i> L.....	7
I.3.1. Classification botanique	8
I.3.2. Description morphologique	9
I.4. Cycle Végétatif de l'olivier	10
I.5. Exigences pédoclimatiques	11
 Chapitre II : Phytopathologie de l'olivier <i>Olea europaea</i> L.....	 12
I. Bactériennes	12
I.1. Tuberculose de l'olivier	12
I.2. Symptômes	12
II. Maladies cryptogamiques	16
II.1. Verticilliose	13

II.1.1. Classification et caractéristiques morphologique.....	13
II.1.2. Cycle de développement de <i>Verticillium dahliae</i>	14
II.1.3. Dégâts causés par <i>Verticillium</i>	15
II.2. Fumagine (<i>Capnodium ssp</i> ; <i>Alternaria ssp</i>)	15
II.2.1. Symptômes	16
II.2.2. Classification de l'agent causal	16
II.2.3. Dégâts causés par la fumagine ;	16
II.3. Pourriture racinaire de l'olivier	17
III.3.1. Symptômes.....	17
II.3.2. Incidence économique	17
II.3.3. Description des agents pathogènes (<i>R. bataticola</i> et <i>S. botrysum</i>)	18
III.3.4. Taxonomie	18
II.3.5. Cycle biologique des parasites	19
II.4. Maladie de flétrissement causé par <i>Fusarium solani</i>	21
II.4.1. Symptômes	21
II.4.2. <i>Fusarium solani</i>	21
III. Phytopathologie de l'olivier dans la région de Naama	22
IV. Isolement et identification des souches fongiques	23
IV.1. Isolement des souches fongiques à partir des feuilles-rameaux	24
IV.2. Isolement des souches fongiques à partir des fruits.....	24
V.2.1. Méthode direct.....	24
IV.2.2. Méthode de dilution	26
V. Obtention des isolats fongiques et purification	26
VI. Identification des souches fongiques	26
VI.1. Ruban adhésif (test de Graham).....	26
VI.2. Micro-culture	27
VII. Méthodes de lutte contre les maladies de l'olivier	31
VII.1. Lutte cultural	32
VII.2. Lutte chimique	32
VII.3. Solarisation.....	33
VII.4. Lutte biologique.....	33
VII.4.1. Méthodes de lutte biologique	33

VII.4.1.1. Lutte biologique par utilisation de la résistance variétale	33
VII.4.1.2. Lutte biologique par utilisation des microorganismes	34
Chapitre III : Agent de contrôle <i>Bacillus sp</i>	35
I. Genre <i>Bacillus sp</i>	35
I.1. Caractéristiques microbiologiques des espèces du genre <i>Bacillus</i>	35
I.2. Habitat.....	36
I.3. Classification	37
II. <i>Bacillus sp</i> comme un agent de biocontrôle.....	38
III. Biofongicides	38
IV. Molécules de lipopeptides de <i>Bacillus sp</i>	40
IV.1. Structure des lipopeptides.....	40
IV.2. Principaux familles des lipopeptides	40
IV.2.1. Surfactines	40
IV.2.2. Fengycines	41
IV.2.3. Iturines.....	41
IV.2.3.1. Structure des iturines	41
IV.2.3.2. Biosynthèse des iturines	42
IV.2.4. Mycosubtiline	43
IV.2.4.1. Relation structure-activité	44
IV.2.4.2. Microdomaines membranaires et antibiotiques ituriniques.....	44
V. Rôles des lipopeptides liés au biocontrôle	46

DEUXIEME PARTIE : Synthèse

Conclusion	60
Références bibliographiques.....	61
Annexes	83

Liste des abréviations

PDA	Potato dextrose agar
GN	Gélose nutritif
EDS	Eau distillée stérile
C°	degré Celsius
%	Pourcentage
cm	Centimètre
mn	Minute
h	Heur
g	Gramme
N°	Numéro
mm	Millimètre
PGRP	Plant Growth Promoting Rhizobacteria).
AA	Acides aminés
LPs	Lipopeptides
ISR	Induction du système immunitaire de la Plante
ES	Erreur standard
<i>B subtilis</i>	<i>Bacillus subtilis</i>
<i>F.oxysporum</i>	<i>Fusarium oxysporum</i>
<i>B.cinerea</i>	<i>Botrytis cinerea</i>
<i>Bti</i>	<i>Bacillus thuringiensis israelensis</i>
<i>Foa</i>	<i>F. oxysporum f. sp. Albedinis</i>

Liste des figures

N° des figures	Titres	Pages
1	Répartition géographique naturelle du complexe <i>Olea europaea</i> (l'olivier Méditerranéen; <i>Subsp. europaea</i>).	5
2	Carte oléicole d'Algérie.	6
3	Aspect générale de l'olivier.	8
4	Tronc de l'olivier.	9
5	Feuilles de l'olivier.	10
6	Cycle végétatif de l'olivier.	11
7	Tumeurs formées sur les rameaux.	13
8	Cycle infectieux de <i>Verticillium dahliae</i> .	15
9	Fumagine sur feuille.	16
10	Pourriture racinaire de l'olivier.	18
11	Cycle infectieux de <i>Rhizoctonia sp.</i>	21
12	Cycle de la maladie de flétrissement causé par <i>Fusarium solani</i>	22
13	Verger de Djellabe Mohammed à Ain séfra, Wilaya de Naama (Algérie).	23
14	Fragments de tissus végétales mises dans des boîtes de pétri contenant le milieu PDA(A : Feuilles d'olivier contaminées ; B Fragments des tiges ; C Fragments des feuilles).	24
15	Fruits d'olivier contaminé(A) ; Fragments des fruits d'olivier mises dans une boîte de pétri contenant le milieu PDA (B).	25
16	Post de travail(A) ; Echantillon broyé(B) ; Peser (C) ; Préparation des dilutions(D).	25
17	Isolats fongiques.	26
18	Technique de micro-culture.	27
19	Observation macroscopique et microscopique de <i>Exophiala sp.</i>	28
20	Observation macroscopique et microscopique d' <i>Aspergillus flavus</i> .	28
21	Observation macroscopique et microscopique d' <i>Aspergillus niger</i> .	29

22	Obseration macroscopique et microscopique d' <i>Altarnaria sp.</i>	29
23	Observation macroscopique et microscopique d' <i>Aspergillus sp.</i>	30
24	Observation macroscopique et microscopique d' <i>Aspergillus sp.</i>	30
25	Observation macroscopique et microscopique <i>Fusarium solani</i> .	31
26	Observation macroscopique et microscopique.	31
27	Photographie de l'observation microscopique de <i>Bacillus subtilis</i> .	36
28	Photographie d'une colonie de <i>Bacillus subtilis</i> sur gélose.	36
29	Structure des antibiotiques ituriniques.	42
30	Schéma des opérons impliqués dans la synthèse des 3 antibiotiques ituriniques : mycosubtiline, iturine A et bacillomycine.	43
31	Rôle des trios familles de lipopeptides dans (A): colonisation des racines et formation de biofilms; (B) Antibiose directe par inhibition de croissances des phytopathogènes; (C) Induction du système immunitaire de la plante (ISR).	48
32	Croissance de <i>Fusarium sp.</i> en absence (à droite) et en présence (à gauche) de <i>Bacillus spp</i> mésophile.	36
33	Croissance de <i>Penicillium sp.</i> en absence (à droite) et en présence (à gauche) de <i>Bacillus spp</i> mésophile.	36
34	Croissance d' <i>Aspergillus sp.</i> en absence (à droite) et en présence (à gauche) de <i>Bacillus spp</i> . Mésophile.	37
35	Résultats de l'activité antifongique vis-à-vis d' <i>Aspergilus niger</i> .	38
36	Résultats de l'activité antifongique vis-à-vis de <i>Fusarium spp</i> .	39
37	Résultats de l'activité antifongique vis-à-vis de <i>Thielaviopsis spp</i> .	39
38	Résultats de l'activité antifongique vis-à-vis de <i>Monilia spp</i> .	39
39	Inhibition in vitro de la croissance des moisissures phytopathogènes: <i>Botrytis cinerea</i> (a), <i>Fusarium oxysporum</i> (b) et <i>Fusarium sp</i> (c). Les isolats antagonistes, ici, sont Rh2.F, 6SEL, SEL et la souche commerciale <i>Bacillus .amyloliquefaciens</i> (FZB42).	41

Liste des tableaux

N° des tableaux	Titres	Pages
1	Potentiel d'olivier par commune.	7
2	Résultats de l'activité antifongique des souches sélectionnées.	38
3	Taux d'inhibition de la croissance de moisissures phytopathogènes <i>F.oxysporum</i> et <i>F.cinerea</i> sous l'effet des isolats testés.	42



Résumer

ملخص

شجرة الزيتون هي شجرة البحر الأبيض المتوسط, يمكن لهذا المحصول أن يتضرر بسبب العديد من الفطريات الممرضة للنبات.

إن استخدام المواد الكيميائية و مبيدات الحشرات قد تشكل خطرا على الإنسان من جهة و على المحيط من جهة أخرى. كما يمكن لبعض الكائنات الحية الدقيقة أن تقدم عوامل ذات خصائص ممتازة في اطار مكافحة البيولوجية ; من بين هاته الأخيرة هناك العصيات التي تمتلك خصائص مهمة لنجاح مكافحة فهي معروفة بإنتاجها للمستقلبات النشطة بيولوجيا. أخذنا عينات من أجزاء مختلفة من أشجار الزيتون في محطتين مختلفتين بولاية النعامة (عين الصفراء والمشرية)، من أجل عزل وتحديد الفطريات الممرضة للنبات من الصنف الكيميائي.

كشفت النتائج عن وجود تنوع فطري كبير في منطقتنا؛

Aspergillus flavus, Aspergillus niger, Fusarium solani, 2 Aspergillus sp, Aspergillus fimigatus, Alternaria sp et Exomphale sp .

قمنا بإجراء دراسة مقارنة بين القوة العدائية أنواع مختلفة من جنس *Bacillus* sp ضد الفطريات الممرضة للنبات وفقا لمجموعة من الدراسات البحثية التي أجريت بالفعل على المستوى الوطني و في المغرب من اجل تقييم تعزيز إمكانيات هذا النوع من العصيات في مكافحة البيولوجية.

الكلمات المفتاحية:

العصيات ، الببتيدات الدهنية ، الفطريات الممرضة للنبات ، مكافحة البيولوجية ، القوة العدائية، شجرة الزيتون.

Résumé

L'olivier et un arbre méditerranéen. Cette culture peut être endommagée par de nombreux champignons phytopathogènes.

L'utilisation des produits chimiques et de pesticides peut présenter un danger pour l'homme d'une part, et pour l'environnement d'autre part.

Certains micro-organismes peuvent également fournir des agents avec des propriétés excellentes dans un cadre de lutte biologique ; parmi ces derniers, il existe des bacilles qui possèdent des propriétés importantes pour un contrôle réussi, car ils sont connus par la production des récepteurs bioactifs.

Nous avons prélevé des échantillons de différentes parties des oliviers dans deux stations différentes de wilaya de Naama (Ain sefra et Mécheria), afin de faire l'isolement et l'identification des champignons phytopathogène de la variété chemlal. Les résultats ont révélé l'existence d'une diversité fongique considérable dans notre région ; *Aspergillus flavus*, *Aspergillus niger*, *Fusarium solani*, 2 *Aspergillus sp*, *Aspergillus fimigatus*, *Alternaria sp* et *Exomphale sp*.

Une étude comparative entre le pouvoir antagoniste de différentes espèces du genre *Bacillus sp* contre les champignons phytopathogènes est effectuée, selon un ensemble de recherches qui ont déjà été menées à l'échelle national et au Maroc à fin de valoriser les potentialités de ce genre de bacilles dans la lutte biologique.

Mots clés :

Bacillus sp, lipopeptides, champignons phytopathogènes, lutte biologique, pouvoir antagoniste, l'olivier.

Abstract

The olive tree is the Mediterranean tree. This crop can be damaged by many phytopathogenic fungi.

The use of chemicals and pesticides can be dangerous for humans on the one hand and for the environment on the other.

Some microorganisms can also provide agents with excellent properties for biological control; among these are bacilli which possess important properties for successful control, as they are known through the production of bioactive receptors.

We took samples from different parts of the olive trees in two different stations of wilaya of Naama (Ain sefra and Méchria), in order to isolate and identify the phytopathogenic fungi of the chemlal variety. The results revealed the existence of considerable fungal diversity in our region; *Aspergillus flavus*, *Aspergillus niger*, *Fusarium solani*, 2 *Aspergillus sp*, *Aspergillus fimigatus*, *Alternaria sp* and *Exomphale sp*.

A comparative study between the antagonistic power of different species of the genus *Bacillus* sp against phytopathogenic fungi is carried out, according to a set of researches that have already been carried out at the national level and in Morocco in order to evaluate the valorization of the potentialities of this genus of bacilli in the biological fight.

On the basis of the results obtained after comparison between these sets of research work on the antagonistic effect of *Bacillus sp* groups, show that *Bacillus* extremities and halotolerant *Bacillus* possess a broad spectrum of antifungal activity.

Key words :

Bacillus sp, lipopeptides, phytopathogenic fungi, biological control, antagonistic power, olive tree.



Introduction

Les plantes constituent la majorité des ressources énergétiques dont dépendent l'homme et les animaux. Malheureusement, lorsqu'une plante est atteinte d'une maladie, sa croissance, sa fertilité et sa productivité sont affectées. Des symptômes se développent et tout ou une partie de l'organisme peut mourir. Les agents responsables des maladies des plantes sont très similaires à ceux rencontrés chez l'homme et les animaux. Ils peuvent être biologiques ou physiques (**Benizri et al., 2001**).

Les oliviers sont parmi les plus anciens arbres fruitiers cultivés dans le bassin méditerranéen y compris l'Algérie (**Benjama, 2003**). Ces dernières occupent toutefois une part très importante dans l'économie agricole de certains pays méditerranéens (**F.A.O, 2009**).

L'olivier est l'arbre fruitier le plus cultivé en Algérie, cette culture occupe une place très importante avec plus d'un tiers du verger arboricole algérien. Une diversité très importante caractérise cette espèce (**Boukhari et al., 2017**). Il existerait plus de 150 variétés d'oliviers plus ou moins cultivées, les plus dominantes sont les variétés : Chemlal et Sigoise (**Benderradji et al., 2016**).

À l'instar des autres pays, les maladies dues aux champignons telluriques sont rencontrées en Algérie. D'après la **F.A.O. (1999)** les maladies phytopathogènes réduisent de 12 à 14% la production agricole mondiale, 70% des dommages étant d'origine fongique (**Aouar, 2012**).

En effet, l'olivier est exposé à un complexe parasitaire très diversifié : ravageurs, oiseaux, maladies cryptogamiques et plantes parasites. L'ensemble des maladies représente une menace pour l'oléiculture (**Semal, 1993**). Parmi les maladies rencontrées sur l'olivier et qui méritent donc d'être approfondies, les affections cryptogamiques qui sévissent dans les zones oléicoles du Bassin méditerranéen (la verticilliose, la fumagine, l'œil de paon.....).

Les microorganismes pathogènes sont difficiles à contrôler car ils peuvent survivre dans le sol pour de longues périodes (**Tschen, 1985**). Pour lutter contre ces maladies, actuellement les moyens chimiques sont les utilisés car il semble qu'ils sont les plus efficaces, mais leur utilisation illimitée dans les sols peut entraîner la pollution de l'environnement et les eaux souterraines et l'apparition de souches pathogènes résistantes. Une recherche sérieuse est nécessaire pour identifier des méthodes alternatives pour la protection des végétaux, qui sont moins dépendantes des produits chimiques et plus respectueuses de l'environnement (**Prapagdee et al., 2008**).

Les mesures de contrôle alternatif telle que l'utilisation d'antagonistes sont nécessaires et ont besoin d'être explorés. Cette stratégie est basée sur l'utilisation de micro-organismes (bactéries, levures ou champignons saprophytes) qui ont soit un potentiel inhibiteur de l'agent causal, soit l'habilité d'accroître le mécanisme de défense de la plante (**Piga et al., 1997; Larkin et Fravel, 2004 ; Benhamou et Nicole, 1999 ; De Boer et al., 1999 ; Chérif et al., 2002 ; Silva et al., 2004**). Le contrôle des phytopathogènes de manière biologique est plus avantageux pour l'environnement en comparaison avec le contrôle chimique (**Nautiyal, 2001**).

Les bactéries appartenant au genre *Bacillus* sont fréquemment utilisées dans le processus de la lutte contre ces phytopathogènes, ce moyen alternatif de protection des plantes par des antagonistes bactériens constitue la solution la plus respectueuse de l'environnement, elle répond aux exigences économiques et écologiques (**Saidi et al., 2009**).

Les biopesticides bactériens représentent la majorité des biopesticides microbiens (**Shores et al., 2010**) et les bactéries du genre *Bacillus* sont les plus étudiées dans la recherche scientifique et les plus exploités en agriculture.

En outre, le genre *Bacillus* possède la possibilité de sporuler dans des conditions défavorables ce qui facilite sa production industrielle et sa formulation en un produit stable (**Lolloo et al., 2010**). Par ailleurs, le genre *Bacillus* a la capacité d'échapper au phénomène de résistance des ravageurs car il développe plusieurs mécanismes de biocontrôle, de biofertilisation et de phytostimulation comme la plupart des PGPRs (plant growth promoting rhizobacteria), afin d'augmenter le rendement des cultures agricoles (**Ait Kaki, 2014**).

De nombreuses souches de *Bacillus* sont exploitées pour la production d'une ou de lipopeptides ; les surfactines (**Kakinuma et al., 1969 ; Kowal et al., 1998**), les fengycines (**Vanittanakom et Loeffler, 1986**) et les iturines (**Besson et al., 1977**) qui sont les trois familles les plus connues. Bien que les lipopeptides soient susceptibles de remplacer les produits synthétiques polluants et toxiques, leur utilisation courante est limitée par le coût et les difficultés des techniques de production (**Kakana, 2005**).

Notre travail a pour objectif de :

- ❖ L'isolement et l'identification des champignons phytopathogènes à partir des organes infectés de l'olivier.
- ❖ Une étude comparative de pouvoir antifongique de quelques souches du genre *Bacillus* sp isolées à partir des différents biotopes contre certains champignons phytopathogènes d'après des études déjà réalisées à l'échelle nationale et au Maroc.

Ce travail s'organise en trois parties :

- La première partie s'articule autour de trois chapitres ; le chapitre I concerne la présentation de la plante hôte (*Olea europaea*). Le chapitre II ; définira d'une part les différentes maladies bactériennes et cryptogamiques de l'olivier et d'une autre part présente les méthodes utilisées pour isoler, identifier les champignons phytopathogènes et les différentes méthodes de la lutte biologique. Pour le troisième chapitre on parle sur l'agent de bio-contrôle (*Bacillus subtilis*).
- Une deuxième partie consacrée à la synthèse.

Et enfin, une conclusion générale résumera les différents résultats obtenus grâce à cette comparaison et les perspectives du présent travail.



PREMIERE PARTIE

Synthèse bibliographique

Chapitre I : Présentation de la plante hôte

I. L'olivier

I.1. Historique et origine

L'olivier est certainement l'un des plus anciens arbres cultivés, pour certains historiens il date depuis le néolithique : 2000 à 3000 ans avant J.-C. en Syrie, en Asie Mineure, au Proche- Orient. Pour d'autres auteurs, c'est en Afrique du côté de l'Égypte ou de l'Éthiopie qu'il a d'abord été cultivé vers 3200 à 3800 ans avant J.-C. Actuellement, il existe des études archéobiologiques et génétiques qui indiquent une domestication en plusieurs points du bassin méditerranéen sur une très longue période. Plus récemment, on sait que les Phéniciens l'ont introduit dans la Péninsule Ibérique. Les Romains ont ensuite développé sa culture car l'huile était fort appréciée à Rome. Avec l'occupation arabe, la culture a été renforcée et diversifiée par l'importation de nouvelles variétés ce qui explique l'importance de l'olivier dans le sud de l'Espagne **(Gaussorgues, 2009)**. L'oléastre était considéré comme un taxon sans intérêt par les chercheurs et les oléiculteurs **(Breton et Bervillé, 2012)**. *Olea europaea subsp.europaea var. sylvestris* est la forme sauvage de l'espèce (*Olea europaea subsp.europaea var.sativa*). **(Breton et Bervillé, 2012)**.

I.2. Répartition géographique

I.2.1. Dans le monde

L'olivier est une espèce thermophile très adaptée au climat méditerranéen. *Olea* aurait persisté dans des zones refuges thermophiles situées dans les régions sud du nord du bassin méditerranéen, au sud du Levant et le nord de l'Afrique **(Carrión et al., 2010)**. Ces derniers travaux rapportent que l'espèce a commencé à se développer dans le niveau bioclimatique thermo-méditerranéen (11,500-8800 avant J-C). A l'ouest de la Méditerranée, l'espèce a commencé à se développer au cours de la période de l'Atlantique (c. 8800-5600 cal. BP). *Olea europaea* L. var. *sylvestris* (l'oléastre, l'olivier sauvage) est une caractéristique importante de l'actuelle végétation méditerranéenne. L'espèce est considérée comme un bio indicateur thermosensible pour la définition du niveau de thermo-méditerranéen bioclimatique et sa répartition naturelle a été confiné aux zones côtières du bassin méditerranéen **(Ozenda, 1975; Rivas-Martinez, 1987)**. Au nord, il est limité par le froid et le gel alors qu'au sud, la culture est limitée par les conditions arides et sahariennes **(Amouretti et Comet, 1998)**. Malgré cela, sa culture a dépassé le bassin méditerranéen et a été exportée dans plusieurs pays du monde tels l'Afrique du Sud et l'Argentine, l'Australie, les Etats unis, **(Rugini et Fedeli, 1990)**.

L'émergence de l'olivier est due principalement à sa plasticité écologique et la valeur nutritionnelle de son fruit dont on obtient principalement de l'huile après extraction dans des moulins ou des olives de tables qui nécessitent des procédés complexes de désamérisation.

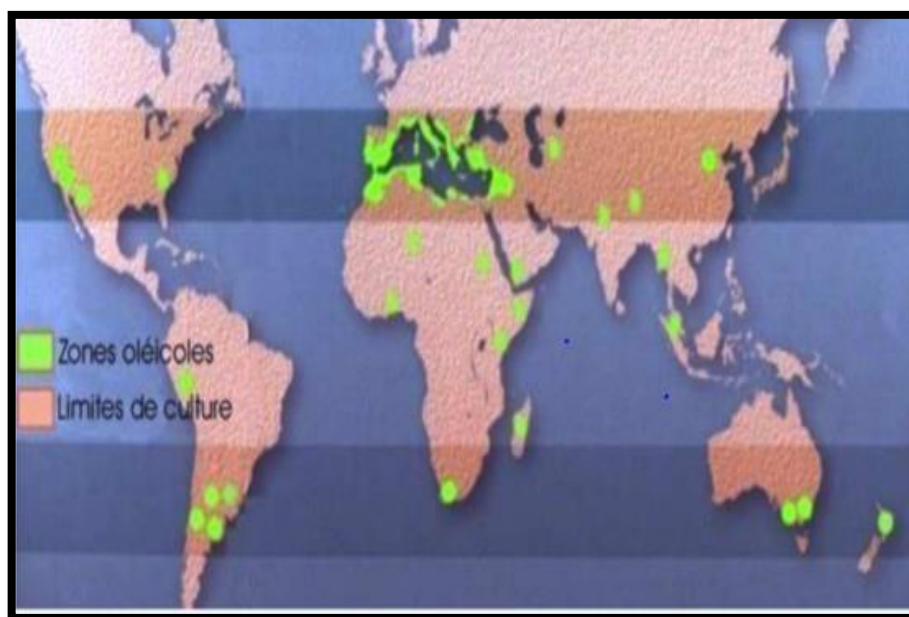


Figure 1 : Répartition géographique naturelle du complexe *Olea europaea* (l'olivier Méditerranéen; Subsp. europaea) (**Rubio de casas, et al., 2006**).

I.2.2. Oléiculture en Algérie

En Algérie, l'olivier occupe une superficie de 350 000 ha de plantation en rapport soit 36 % de la superficie arboricole, avec plus de 35 millions d'oliviers répartis sur 100 000 exploitations oléicoles. Les rendements qui sont de l'ordre de 08 quintaux / ha demeurent les plus faibles des pays oléicoles et cela au vu du vieillissement des sujets, et du non remplacement des anciens vergers par de nouveau la culture étant restée selon les méthodes ancestrales (**MADR, 2013**).

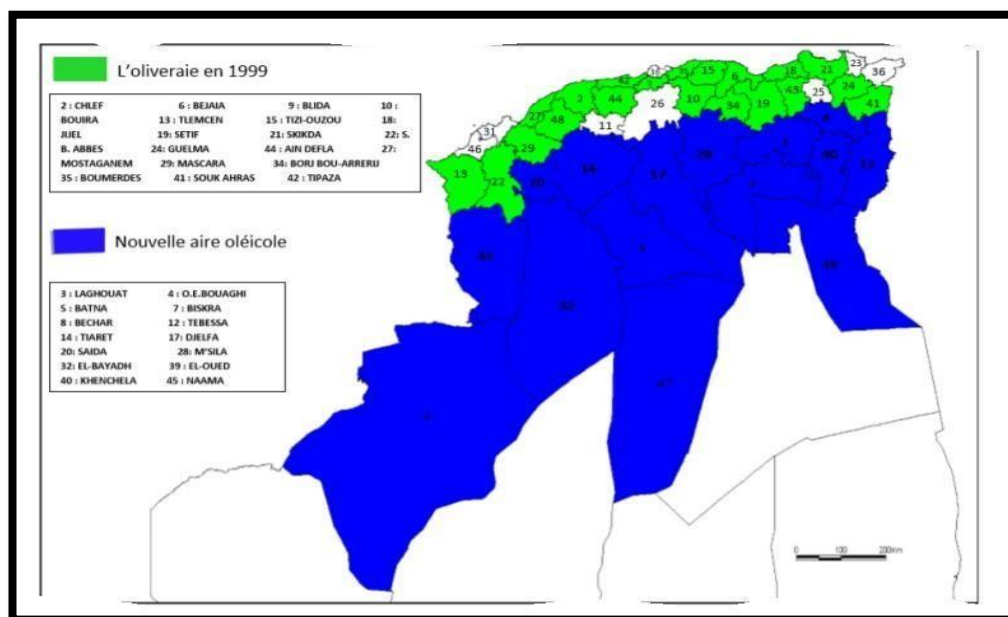


Figure 2 : Carte oléicole d'Algérie (Haddou, 2017).

1.2.3. Oléiculture dans la Wilaya de Naàma

Les surfaces réservées à l'oléiculture ont doublé, ces dernières années, dans la wilaya de **Naama (Tableau. 1)** qui dispose d'atouts naturels considérables augurant d'un avenir prospère pour cette filière, selon des estimations de la direction des services agricoles (DSA).

Tableau 1 : Potentiel d'olivier par commune (DSA, 2019)..

Commune	Superficies total	Superficies en Rapport	Production (ha)
Naâma	230	54	372
Mécherai	172	27	429
Ain Sefra	321	131	1301
Tiout	235	51	824
Sfissifa	330	303	2102
Moghrar	80	35	328
Asla	152	35	661
Djenien-bourzgh	30.75	27	55
Ain Ben Khelil	125	38	477
Mekmen Ben Amar	6	2	33
Kasdir	5.25	1.25	19
El –Boidh	380	104.8	1457
Total	2067	809	8058

I.3. Classification et description botanique d'*Olea europaea* L

I.3.1. Classification botanique

L'arbre d'olivier appartient à la famille des oléacées dans l'ordre botanique des ligustrales qui comprennent près de 30 genres et 500 espèces comme l'olivier sauvage (oleaster) et l'olivier (Stiva) relèvent de la même espèce *Olea europea* (Patrick, 2008).

La classification botanique de l'arbre de l'olivier (Ghedira, 2008 ; Basım et al., 2017) est la suivante :

- **Règne :** Plantae.
- **Embranchement :** Magnoliophyta.
- **Sous - embranchement :** Magnoliophytina.
- **Classe :** Magnoliopsida.
- **Sous Classe :** Dialypétales.
- **Ordre :** Lamiales.

- **Famille :** Oleaceae
- **Genre :** *Olea*.
- **Espèce:** *Olea europaea* L.

I.3.2. Description morphologique

L'olivier est un arbre de 3 à 10 mètres de haut à des branches tortueuses au nombreux rameaux arrondis enchevêtrés les uns dans les autres, les tiges portent des feuilles opposées, entières, ovales allongées, portées par un court pétiole, persistantes, enroulées sur les bords, fleurit entre Mai et Juillet.

Donnant des fruits drupes ovoïdes à noyau dur dont le mésocarpe peut renfermer plus de 30 % de lipides. Ils sont utilisés par l'industrie agroalimentaire (**Pangol, 1975**).

L'olivier est cultivé essentiellement pour son fruit, consommé ou confit ou sous forme d'huile, mais cet arbre est aussi médicinal par ses feuilles. S'adapte bien à des conditions d'environnements extrêmes tels que la sécheresse et la chaleur (**Kasraoui, 2016**).

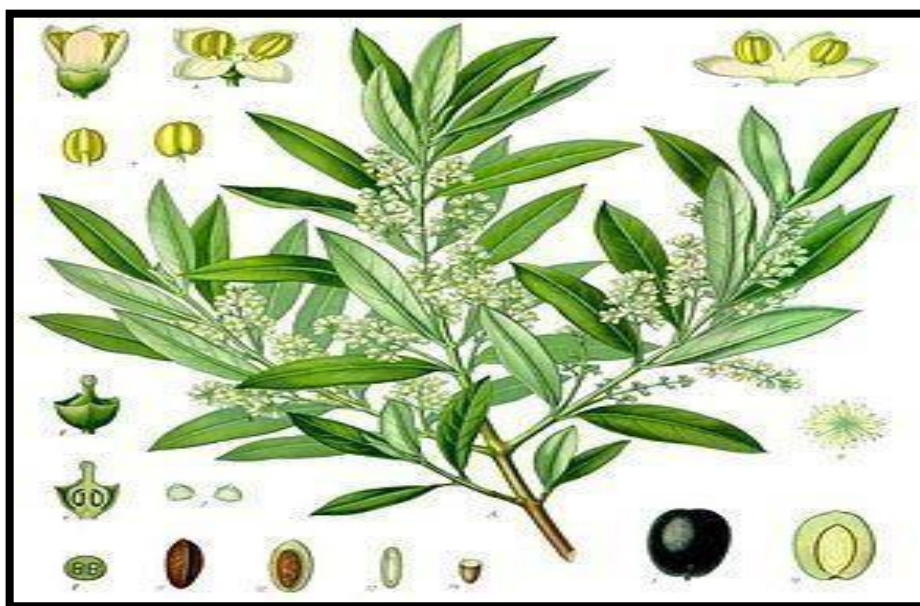


Figure 3 : Aspect générale de l'olivier (Fouraste, 2002).

- **Tronc**

Selon (**Beck et Danks, 1983**) le tronc est jaunâtre puis passe à la brune très claire. Il est très dur, compacte, court, trapu (jusqu'à 2m de diamètre), et porte des branches assez grosses, tortueuses, et lisse



Figure 4 : Tronc de l'olivier (Photo prise par les auteurs, 2020).

- **Système racinaire**

Il est puissant et fasciculé, se prolonge à une profondeur de 5 à 7 m. Le réseau de racines forme une couche ligneuse, appelée la matte, dans laquelle s'accumulent des réserves et qui va permettre de puiser une très grande quantité d'eau dans le sol (**Himour, 2006**). Dans les sols très imperméables et aérés, le système racinaire est pivotant. En revanche, dans les sols lourds, peu ou non aérés, le système racinaire est fasciculé et profond (**Saad, 2009; Medda, 2010**).

- **Rameaux**

Leur taille est de quelques dizaines de centimètres suivant la vigueur et la variété de l'arbre, ils sont délimités à leur base par un entre-nœud marquant l'arrêt de la croissance hivernale.

- **Feuilles**

Les feuilles sont épaisses, lancéolées, simples, opposées et de couleur verte. Leur taille varie de 3 à 5 cm de long sur 1 à 1.5 cm de large (**Bartolozzi et Fontanazza, 1999**). Le feuillage est persistant. Les feuilles vivent au moyenne 3 ans, puis jaunissent et tombent principalement en été (**Cresti et al., 1996**).



Figure 5 : Feuilles de l'olivier (Photo prise par les auteurs, 2020).

- **Fleurs**

Les fleurs sont petites, ovales, blanches et odorantes. Elles sont disposées en grappes (en moyenne de 10 à 40) dressées à l'aisselle des feuilles (**Fabbri et Benelli, 2000**).

I.4. Cycle Végétatif de l'olivier

Au cours de son cycle annuel de développement, l'olivier passe par les phases suivantes

(Walid et *al.*, 2003) :

- Induction, initiation et différenciation florale : durant Janvier et Février ;
- Croissance et développement des inflorescences à l'aisselle des feuilles : au cours du mois de Mars ;
- Floraison durant le mois d'Avril ;
- Fécondation et nouaison des fruits : fin Avril début Mai ;
- Grossissement des fruits : durant Juin-Juillet et Aout ;
- Véraison : au cours du mois de Septembre ;
- Maturation : le fruit atteint son calibre final en Octobre et s'enrichisse en huile ;
- Récolte des fruits : mi-novembre à Janvier.

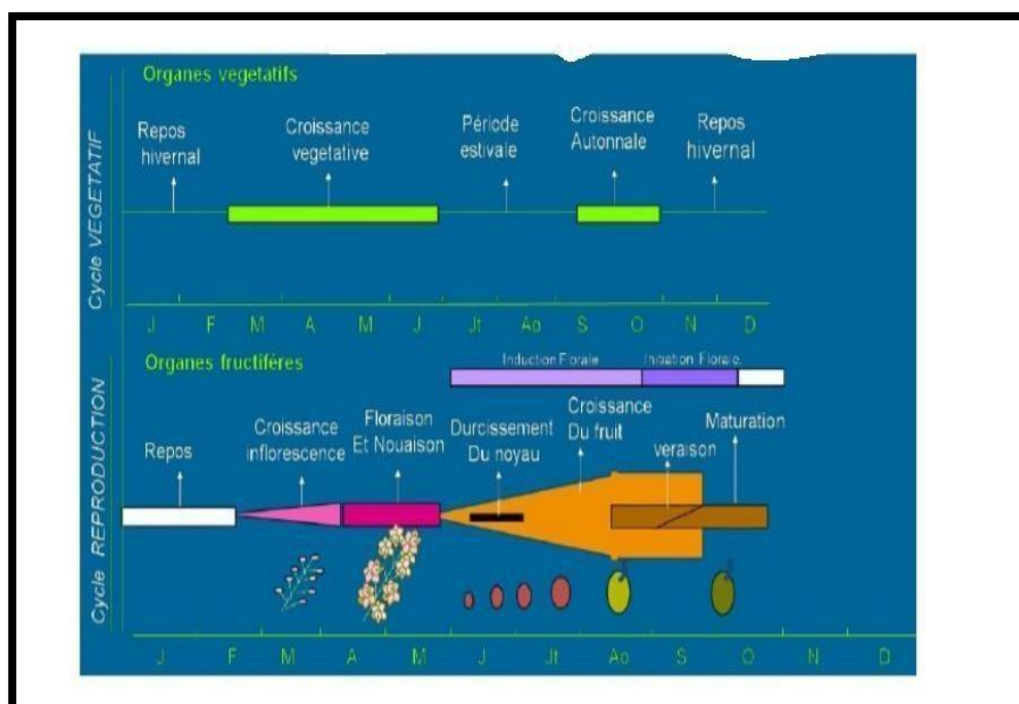


Figure 6 : Cycle végétatif de l'olivier (Rallo , 2000 ;Girona , 2001) .

I.5. Exigences pédoclimatiques :

L'olivier est une espèce rustique, il présente une grande adaptation aux conditions agro-écologiques de la région: résistance aux aléas climatiques, capacité à produire même dans des conditions climatiques difficiles, ne nécessitant pas beaucoup d'entretien. Finalement on peut dire que en dépit des problèmes auxquels se heurte le développement agricole dans l'espace aride de la wilaya de Naama celle-ci dispose d'atouts non négligeables pouvant, dans une perspective de durabilité préserver et améliorer la situation. Les potentialités de la zone et le contexte socioéconomique, présentent de grandes perspectives de développement de l'olivier dans cette zone. Les contraintes qu'on a fait ressortir peuvent être levées par la formation et l'appui technique. Le grand avantage est l'acceptation par les agriculteurs, la demande ne cesse d'augmenter. (Missat, 2011).

Chapitre II : Phytopathologie de l'olivier *Olea europaea*

I. Bactériennes

I.1. Tuberculose de l'olivier

C'est une maladie bactérienne omniprésente dans le bassin méditerranéen, en Italie elle est appelée «Rogne» de l'olivier, en Espagne «Verru» ou «Tuberculos» de l'olivier, en France et en Afrique du Nord on lui donne le nom de «Tuberculose» ou chancre de l'olivier. Il est considéré comme l'un des plus graves maladies affectant les oliviers (*Olea europaea* L) dans la plupart des régions de culture d'olive. Celle-ci est probablement la première maladie clairement décrite dans l'antiquité par Théophrastus (**Iacobellis, 2001**). L'agent causal est le *Pseudomonas savastanoi* pv. *savastanoi* (**Zohary et al., 1975**). Il est considéré comme le seul pathogène responsable de la formation des nœuds (tumeurs) bactériennes des oliviers (*Olea europaea* L) (**Smith, 1908 ; Young et al., 1996 ; Janse, 1982 ; Bradbury, 1986**).

Cette espèce a été divisée en 5 pathovars :

- *Pseudomonas savastanoi*.
- pv. *Fraxini*.
- P. s. pv. *Nerii*.
- P. s. pv. *Glucinea*
- P. s. pv. *Savastanoi* (**Boulssen et Bouraoui, 2016**).

I.2. Symptômes

Le symptôme caractéristique de l'infection est le développement des tumeurs, ou "galles" dans les sites d'infection. Les galles sont le plus souvent formées au niveau des sites de développement des bourgeons, en raison de l'infection des cicatrices foliaires par la bactérie; cependant, ils peuvent également être formés à d'autres points d'entrée des agents pathogènes, tels que les plaies de taille ou de blessures causés par le gel ou la grêle (**Boulssen et Bourraoui, 2016**).



Figure 7 : Tumeurs formées sur les rameaux (Boulssen et Bourraoui, 2016).

II. Maladies cryptogamiques

II.1. Verticilliose

Des Champignon filamenteux sont la cause de cette maladie vasculaire *Verticillium dahliae*. Il pénètre dans l'arbre par les racines et bouche les vaisseaux conducteurs. On observe alors un dépérissement de l'arbre : les feuilles deviennent ternes, puis s'enroulent vers leur face inférieure puis deviennent brunes, sa dissémination se fait grâce à sa conservation sous forme de microsclérotés (**Daayf, 1993**). La verticilliose menace de plus en plus l'olive dans plusieurs pays du bassin méditerranéen. En Algérie, la maladie a été notée dans la région du Kabylie (**Benchabane, 1990**). Plusieurs oliveraies sont également infestées dans la région de Tlemcen (**Boukenadel, 2001**).

II.1.1. Classification et caractéristiques morphologiques

Genre *Verticillium* a été mis en évidence pour la première fois par (**Nées Von Esenbeck, 1816**). Basé sur la morphologie de ses conidiophores (**Heffer, 1995**). L'agent infectieux *V. dahliae* est un champignon imparfait, haploïde et dimorphe (**Pegg et Brady, 2002 ; Klosterman et al. 2009**), le classent comme suit :

- **Régne :** Fungi
- **Phylum:** Ascomycota
- **Sub-phylum :** Pezizomycotina
- **Classe :** Sordariomycètes

- **Sous classe :** Incertaesedis
- **Ordre :** Phyllachorales
- **Famille :** Plectosphaerellacea
- **Genre :** *Verticillium*
- **Espèce :** *Verticillium dahlia*

II.1.2. Cycle de développement de *Verticillium dahliae*

Verticillium dahliae peut survivre dans le sol durant plusieurs années, jusqu'à 20 ans, sous forme de microsclérotés (amas de cellules de 0.1 à 0.5 mm) libres ou dans des tissus infectés (Civantos, 1999; Julien, 2005). C'est un Parasite facultatif, son cycle de développement se déroule en 2 phases, une phase saprophytique qui comprend une période d'activité et une phase parasitaire qui se déroule dans la plante-hôte (Hiemstra, 1998).

Pendant la phase saprophytique, le champignon pérennise, sous forme de microsclérotés, plus de 14 ans dans le sol, aux dépens des débris végétaux et des matériaux organiques (Triki et al., 2006). C'est ainsi qu'il se dissémine par le mouvement des sols infectés, les débris végétaux infectés, l'eau d'irrigation, l'équipement agricole, le vent, les insectes telluriques, prédateurs, pollinisateurs...etc. (Civantos, 1999; Klosterman et al., 2009; Chawla et al. 2012). Il résiste aussi bien au froid qu'à la chaleur et supporte des écarts thermiques allant de 30°C à 55°C (Schnathorst et Mathre, 1966). Le saprophyte s'active et redevient agressif au rétablissement des bonnes conditions de température et d'humidité du sol.

La phase parasitaire du champignon débute par la germination des micro-sclérotés en réponse aux exsudats racinaires de l'olivier. Il en résulte une émission des hyphes qui colonisent le cortex des racines. Le mycélium s'introduit par l'extrémité ou par les cellules épidermiques (Garber, 1966) et gagne ensuite via la sève les vaisseaux du xylème, c'est l'infection primaire (Fradin et Thomma, 2006 ; Vallad et Subbarao, 2008).

Le parasite se reproduit asexuellement dans les vaisseaux, à l'intérieur desquels il progresse, grâce aux transports des conidies par le flux de la sève ascendante aux pièces aériennes de l'arbre (Vallad et Subbarao, 2008), où elles constituent des foyers secondaires d'infection ; c'est l'infection secondaire (Garber, 1966).

La poursuite ainsi de l'infection du système vasculaire conjugué aux toxines émises par le parasite, font que la plante produise des dépôts gommeux qui obstruent les vaisseaux conducteurs y entravant ainsi le transport d'eau (Klosterman et al., 2009) et donne des symptômes de flétrissement qui se déclenchent sur les parties aériennes atteintes (Tombesi et

al., 2007 ; Laoune et *al.*, 2011).

A la fin du cycle d'infection, le champignon forme des microsclérotés dans les parties mortes de l'arbre. Cela permet le retour du champignon au sol et la reprise éventuelle d'un nouveau cycle infectieux (Fradin et Thomma, 2006 ; Klosterman et *al.*, 2009).

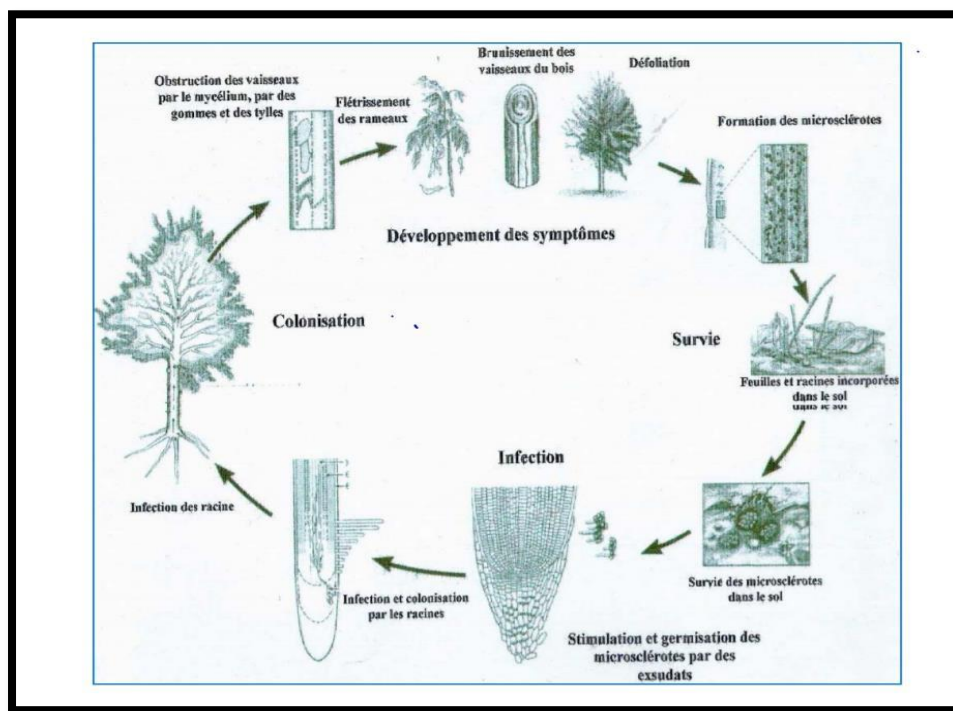


Figure 8 : Cycle infectieux de *Verticillium dahliae* (Hiemstra et Harris, 1998).

II.1.3. Dégâts causés par *Verticillium*

Les dégâts de la verticilliose se manifestent par un brunissement des tissus vasculaires, un dessèchement des branches (secondaires et principales, des rameaux voire l'herbe entier, accompagnés d'une défoliation importante (Bellahcene, 2004). Un herbé dépéri et dépourvu de feuilles pousse difficilement et, va donc synthétiser de nouvelles feuilles au détriment d'autres organes (fleurs, fruits). Il en résulte, une baisse de production proportionnelle à l'intensité de l'attaque .En Grèce, la perte annuelle due à la verticilliose est estimée à 17000 tonnes d'olives a une intensité seulement de 2 à 3 % d'arbres atteints (Thanassouloupoulos et *al.*, 1971). En Algérie la verticilliose est considérée comme un sérieux problème pour l'oléiculture, d'ailleurs, elle en représente la principale maladie vasculaire et les pertes qu'elle inflige ne sont pas minime (Matallah-Boutiba et *al* ; 1997 ; Bellahcene et *al* ; 2004).

II.2. Fumagine (*Capnodium ssp.* ; *Alternaria ssp.*)

La fumagine ou « noir de l'olivier » est une maladie colportée par différents champignons qui se développent sur les substances sucrées du miellat sécrété par les insectes suceurs de sèves (cochenille noire de l'olivier, psylle). Les feuilles sont recouvertes d'une sorte de poussière noire ressemblant à de la suie, empêchant l'arbre de respirer et le condamnant à mourir par asphyxie. (Ghezlaoui, 2011).

II.2.1. Symptômes

Elle se manifeste par un dépôt noirâtre, semblable à de la suie, qui recouvre la surface des feuilles et du bois. La fumagine est associée à la présence de cochenilles noires de l'olivier (*Saisettia oleae*) et de gouttelettes collantes de miellat (Le Verge et al., 2016).

II.2.2. Classification de l'agent causal

La fumagine est en fait le produit d'un complexe de plusieurs champignons appartenant à deux groupes:- Ascomycètes, ordre de Périssporiales, famille des Capnodiacees, genre *Capnodium*, espèce: *Olea arnaud*, *Méridionale arnaud*, *Herbarum link*; *Salicinum mont*. *Oleaphilum prill*. - Deutéromycètes, ordre des Hyphales, famille des Dématiacées : *Cladosporium herbarum* Link, *Cladosporium fumago* Link, formes conidiennes de *Capnodium salicinum mont*, et *Alternaria tenuis* Neos (Argenson et al, 1999). Dans les oliveraies atteintes où l'on lutte de façon quasi permanente, il est plus prudent de réaliser au moins un traitement préventif avec des produits cupriques (à base de cuivre) : sulfates: (bouillie bordelaise à 1% : 1Kg pour 100L d'eau), Oxychlorure de cuivre à 500 g/h.



Figure 9 : Fumagine sur feuille (FABRE, 2012).

II.2.3. Dégâts causés par la fumagine

Elle recouvre la surface des feuilles, la fumagine limite la photosynthèse et les échanges gazeux de l'olivier. La croissance de l'arbre et la production d'olives s'en trouvent réduites. Le développement de la fumagine vient affaiblir des arbres déjà affectés par la cochenille noire. Dans des cas plus sévères, la persistance de la fumagine peut causer une défoliation. Les répercussions exactes de la fumagine sur la production d'olives restent difficiles à évaluer mais elle n'est pas anodine (**Le verge et al., 2016**).

II.3. Pourriture racinaire de l'olivier

La pourriture racinaire de l'olivier est une maladie vasculaire de l'olivier, elle est causée par un complexe de champignons telluriques (**Tombesi et al., 2007**) : *Rhizoctonia bataticola* (**Taubenhaus, 1913**), *Armillaria mellea* kemm, *Fusarium solani* sacco, *Corticium rolfsii* cerzi, *Fusarium oxysporum*, *Phytophthora megasperma*, *Corticium solani*, *Rosellinia necatrix*. Ces mycètes agissent en synergie, tenant chacun à part l'infection (**Boulila, 1994**), en dehors de ces micro pathogènes, *Stemphylium betryosem* wallr. (**Wallroth, 1833**) dans le cas d'attaque importante, peut infester l'olivier (**De Andrés cantero, 1975 ; Al-shebel et al., 2005**).

II.3.1. Symptômes

Les symptômes de la pourriture racinaires se manifestent généralement par des oliviers grêles les branches portent des feuilles réduites en taille et en nombre, ces dernières prennent un aspect jaunâtre en printemps et qui s'accroît pour devenir jaune doré en été. Cette couleur persiste durant toute la saison estivale mais avec l'arrivée de l'automne le végétal commence à retrouver plus ou moins normal au fait son feuillage devient couleur vert-pale surtout après une pluie ; toute fois il garde son aspect faible et dégarni (**Boulila, 1994**).

Par forte attaque, les feuilles commencent à se nécroser par leur bout et finissent par se dessécher. Il s'en suit une chute non négligeable qui se répercute sur l'inflorescence qui se déshydrate, brunissement et meurt. Si la nouaison a lieu, les fruits restent limités en nombre perdant de volume, deviennent ridés et tombent. Dans certaines situations, l'olivier est foudroyé à un tel point que les fruits restent adhérents au pied (**Boulila, 2011**).



Figure 10 : Pourriture racinaire de l'olivier (Google, 2020).

II.3.2. Incidence économique

Cette maladie sévit surtout dans les régions chaudes (températures du sol supérieur à 28 °C °) (D'Hondt-Defrancq, 1984), les jeunes arbres sont généralement les plus vulnérables (Tombesi et al., 2007). En Tunisie, tout comme l'Algérie, le nombre d'olivier atteints par ce dépérissement est extrêmement limité et ne constitue pas, un véritable danger (Trapero et al., 2011).

II.3.3. Description des agents pathogènes (*R. bataticola* et *S. botrysum*)

Les champignons présentent une variabilité physiologiques, mais généralement il se développent rapidement entre 25 et 35 °C (Mathieu et Mathieu, 1976 ; Csondes et al., 2012) . Microscopiquement ce mycète s'identifier par un mycélium stérile, ramifier à angle droit ou de 45° (Alabouvette et Bremeersch , 1975) ; El Mahjoub et Bouzaidi , 1891) et également par la production des pycnide (Shaw, 1925 ; Crous et al , 2006). Au point de vue morphologique , ce champignons présente sur milieu PDA un mycélium velouté a cotonneux de couleur olive a brun olive (Simmons , 1967 ; Mwakuturya, 2006) , de revers pigmentés en noire (Larone , 1995) Leur conidiophores sont court , non septé à extrémité renflés (Wehmyer 1961 et 1975) , échinulées (Hocen et al., 2011).

II.3.4. Taxonomie

Il était décrit pour la première fois comme une espèce distincte par (Taubenhaus, 1913), la littérature le classe comme appartenant au :

- **Règne :** Fungi
- **Phylum :** Basidiomycota
- **Sous phylum :** Agarimycota
- **Classe :** Basidiomycète
- **Sous classe :** Agarimycota mitosporic
- **Ordere :** poluporales
- **Famille :** Corticiaceae
- **Genre :** *Rhizoctonia*
- **Espèce :** *bataticola*

S. botryosum est le stade anamorphe (forme imparfaite) de *Pleospora herbarum* (**Kiffer et Morelet, 2000**), il a été décrit pour la première fois comme une espèce distincte par (**Wallroth, 1833**) par, selon (**Inderbitzin et al., 2009**) sa taxonomie est la suivante :

- **Règne :** Fungy
- **Phylum :** Ascomycota
- **Sub-phylum :** Pezizomycotina
- **Classe :** Dothideomycetes
- **Sous-classe :** Pleosporomycetidae
- **Ordre :** Leosporales
- **Famille :** Pleosporaceae
- **Genre :** *Stemphylium*
- **Espèce :** *S. botryosum*

II.3.5. Cycle biologique des parasites

R. bataticola est un phytopathogène facultatif, saprophyte de sol et parasite de faiblesse de l'olivier (**Boulila, 1994**). Il dispose de potentialités saprophytiques importantes dans le sol, où il survit sous forme des micro sclérotés jusqu'à 4 années aux dépens de la matière organique morte disponible (**Boosalis et Scharen, 1959 ; Kaisar et al., 1988**). Ces structures de résistance offre au mycète la particularité de tolérer les températures au-dessus de 30 °C et les sols dont la teneur est faible en matières nutritives (**Cloud et Rupe, 1991**).

Suite à certaines conditions (température entre 28 et 35 °C, stress hydrique, sol peu profond), les exsudats racinaires de la plante hôte induisent la germination des micro sclérotés, sur la surface racinaire, il en résulte des hyphes qui pénètrent les cellules épidermiques par une pression mécanique et une digestion enzymatique (**Dhingra et Sinclair, 1977**). Les hyphes se

développent tout d'abord de façon intercellulaire dans le cortex, puis intracellulaire par l'intermédiaire du xylème, une fois dans les vaisseaux conducteurs, le parasite se propage à travers la racine pivotante, et colonise la base de la tige de la plante hôte. La formation des micro sclérotas a lieu en fin de cycle végétatif dans les vaisseaux conducteurs de la plante hôte **(Wyllie, 1988)** causant leur obstruction **(Agrios, 1988)**. Les plantes fortement infestées meurent prématurément en raison de la production de toxine phaséolinone fongique **(Bhattacharya et al., 1994)**.

On suppose qu'une éventuelle attaque de *R. bataticola* serait facilitée par la présence de scolytes (*Hylesinus* spp.) sur les oliviers malades, car l'infection se manifeste davantage sur des végétaux affaiblis ou vivant dans des conditions de stress **(Boulila, 1994)**. Quant au *S. botryosum*, il n'existe presque aucun travail sur l'épidémiologie de ce champignon chez l'olivier. Cependant, il est à signaler qu'il est un parasite facultatif, saprophyte de sol et parasite secondaire de l'olivier **(Al-Shebel et al., 2005)**.

Pendant sa phase saprophytique, le mycète habite le sol et survit sur les débris végétaux, sous sa forme mycélienne, par l'intermédiaire de ses périthèces **(Mwakutuya, 2006)**. Ces dernières germent à une température de 5 à 10 °C et une humidité de 96% **(Basallote-Ureba et al., 1998)**.

Si les conditions sont favorables, le thalle produit des conidies et envahit le tissu végétal de la plante hôte, produisant ainsi des phytotoxines (Stemphytoxine, Altertoxine) **(Davis et Stack, 1991)**. La reprise de l'infection pourrait se reproduire en cas de dispersion des spores par le vent et les projections d'eau consécutives à une pluie ou une irrigation. Les rosées matinales favorisent également son développement, ainsi que des périodes climatiques humides et relativement froides **(Prados-Ligero et al., 2003)**.

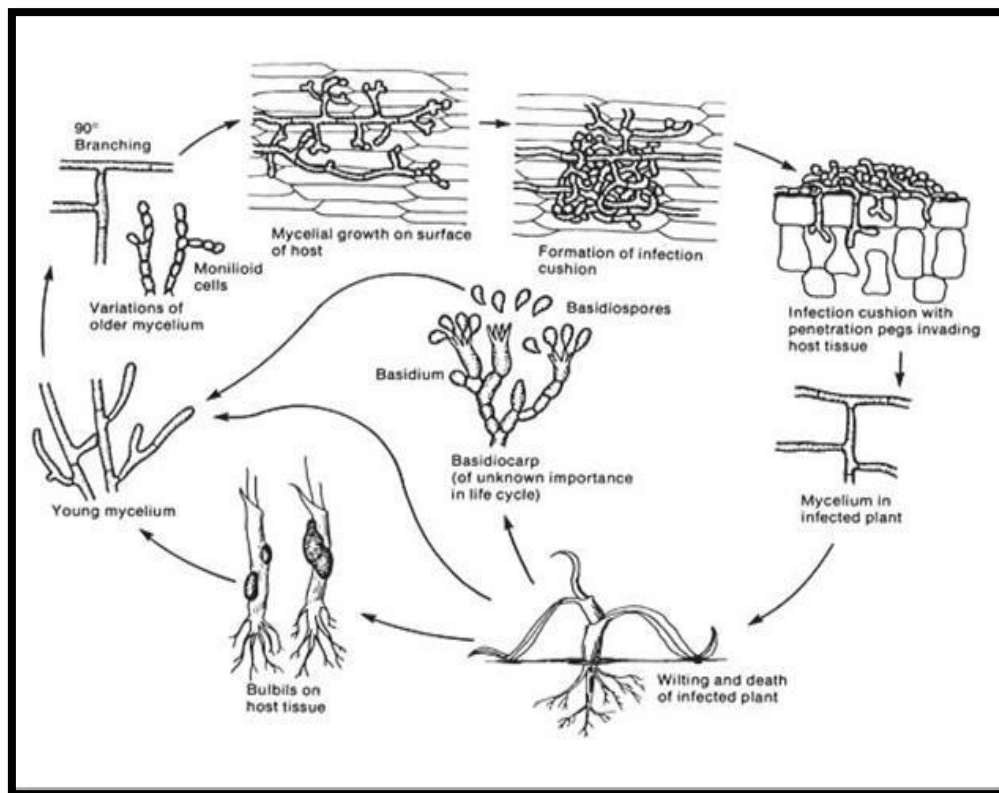


Figure 11 : Cycle infectieux de *Rhizoctonia* sp. (Dhingra et Sinclair, 1977).

II.4. Maladie de flétrissement causé par *Fusarium solani*

Le genre *Fusarium* regroupe plusieurs espèces (44 espèces) selon (Booth, 1971) phytopathogènes susceptibles d'attaquer un grand nombre de plantes, et provoqué de grandes pertes économiques. Le *Fusarium solani*, est l'un des espèces du genre *Fusarium* les plus importantes d'un point de vue phytosanitaire.

II.4.1. Symptôme

C'est une maladie d'enroulement des feuilles, brunissement de la zone apicale des feuilles qui se termine par un dépérissement et la présence de nécroses au niveau du collet. Feuilles séchées restent attachées aux jeunes branches pendant un long moment. Les symptômes ont commencé à apparaître deux mois après l'inoculation (Nasraoui, 2018).

II.4.2. *Fusarium solani*

Fusarium solani est membre d'un clade monophylétique qui comprend environ 60 espèces phylogénétiques connues sous le nom de "complexe d'espèces *Fusarium solani*" (ou *Fusarium solani* Species Complex, FSSC) (O'Donnell, 2015 ; Geiser et al., 2013). Plusieurs espèces sont douées de virulence et sont alors responsables de maladies souvent associées à

des pourritures racinaires sur une gamme vaste et diversifiée d'une centaine de plantes hôtes. Les espèces hôtes prédominantes sont les cultures maraichères. La classification taxinomique complète, actuelle et corrigée de cette espèce (ou complexe d'espèces) est la suivante : (Zhang et al., 2006) :

- **Règne :** Fung
- **Division :** Ascomycota
- **Classe :** Sordariomycetes
- **Sous classe :** Hypocreomycetidae
- **Ordre :** Hypocreales
- **Famille :** Nectriaceae
- **Genre :** *Nectria*

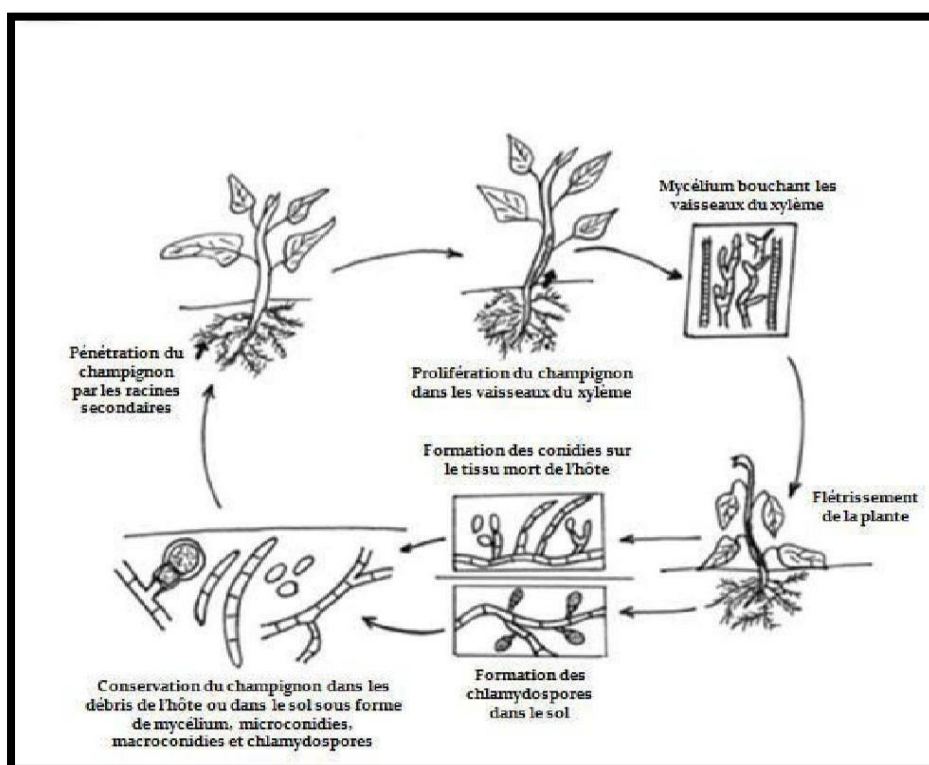


Figure 12 : Cycle de la maladie de flétrissement causé par *Fusarium solani* (Nasraoui, 2006).

III. Phytopathologie de l'olivier dans la région de Naama

Vu l'indisponibilité d'un recensement des champignons phytopathogènes qui affectent le rendement de l'oléiculture dans la région de Naama. Nous avons procédé à effectuer une petite partie expérimentale qui consiste à faire l'isolement et l'identification des champignons phytopathogènes à partir des organes infectés de l'olivier (feuilles, rameaux et fruits). Afin

d'aider nos agriculteurs à cibler leurs ennemis naturels avant de choisir les méthodes et les moyens les plus adéquats pour les éradiquer.

- Ce présent travail a été réalisé au niveau de laboratoire de Microbiologie. Centre universitaire SALHI Ahmed Naama. Il porte sur :

- ✓ L'isolement et l'identification des champignons phytopathogènes à partir des organes infectés de l'olivier (feuilles, rameaux et fruits).

- ✚ Deux sorties ont été effectuées dans le but de réaliser l'échantillonnage des feuilles, tiges et fruits d'olivier.

- La première sortie a été réalisée au **12.11.2019** au verger de **(Ala mohammed)**, située à Mécheria, Wilaya de Naama.

- Pour la deuxième destination **(le 31.12.2019)** était vers le verger de **(Djellabe mohammed)**, située à Ain séfra, Wilaya de Naama **(Fig. 13)**. Nous avons choisi les arbres au hasard. Nous avons confiné utile d'effectuer un prélèvement de différentes parties de l'arbre, non seulement les organes d'olivier altérés. Les prélèvements ont été effectués à partir d'une seule variété d'olivier (Chemlal).

Les arbres prélevés présentent des symptômes évolutifs au niveau de site d'étude. Une fois que toutes les échantillons sont prélevés, on les met dans des sachets stériles puis ils sont acheminent directement au laboratoire.



Figure 13 : Verger de Djellabe Mohammed à Ain séfra, Wilaya de Naama (Algérie)
(Photos prise par les auteurs, 2020).

IV. Isolement et identification des souches fongiques

➤ Milieu d'isolement

L'isolement des champignons s'effectue sur milieu **PDA** (*Potato dextrose agar*) (voir annexe A).

IV.1. Isolement des souches fongiques à partir des feuilles-rameaux

On divise en deux parties une boîte de pétri. Les rameaux et les feuilles sont découpés en fragments de 1 à 4 mm de diamètre à l'aide d'un secteur stérile. Ensuite, ces fragments sont déposés à l'ordre de 8 fragments par boîte de Pétri contenant un milieu de culture PDA (**Fig. 14**) additionné l'acide lactique stérile 15% pour éliminer les contaminations bactériennes. Les boîtes sont ensuite incubées à 25C° pendant 3 à 7 jours.

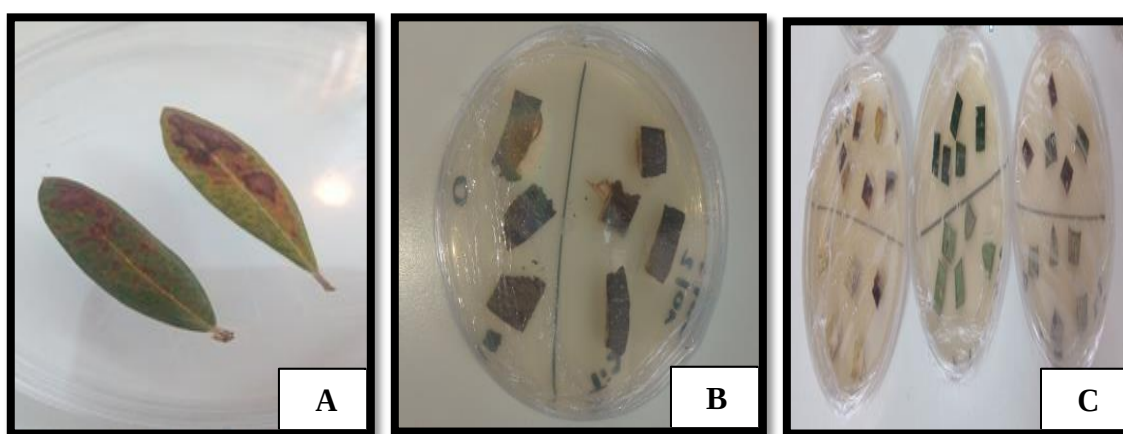


Figure 14: Fragments de tissus végétales mises dans des boîtes de pétri contenant le milieu PDA (**A** : Feuilles d'olivier contaminées ; **B** Fragments des rameaux ; **C** Fragments des feuilles) (**Photos prise par les auteurs, 2020**).

IV.2. Isolement des souches fongiques à partir des fruits

Pour isoler la microflore des fruits d'olivier, nous avons utilisé deux méthodes :

IV.2.1. Méthode direct

Les fruits d'olivier sont découpés de la même manière des feuilles et des rameaux en petits morceaux de 3 à 4 mm de diamètre à l'aide d'un secteur stérile et les déposer par la suite dans une boîte de pétri contenant le milieu PDA (**Fig. 15**). Ensuite, on incube les boîtes à une température de 25C° dans un incubateur pendant 3 à 7 jours.



Figure 15: Fruits d'olivier contaminé(A) ; Fragments des fruits d'olivier mises dans une boîte de pétri contenant le milieu PDA (B) (Photos pris par les auteurs, 2020).

IV.2.2. Méthode de dilution

Broyer dans un mortier les fruits d'olivier. Ensuite à l'aide d'une balance peser 1g de cet échantillon. Puis suspendre l'échantillon broyé dans 9ml d'eau distillée stérile, agiter et laisser décanter. Cet échantillon correspond à la dilution 10^{-1} . Après agitation des tubes par un vortex, les dilutions 10^{-2} jusqu'à 10^{-4} sont réalisées. Ensuite à l'aide d'un râteau, 0,1ml de chaque dilution estensemencé en surface sur milieu PDA additionné de l'acide lactique stérile de 15%. Les boîtes sont mises à incuber sous une température de 25°C pendant 3 à 7 jours (Fig. 16).

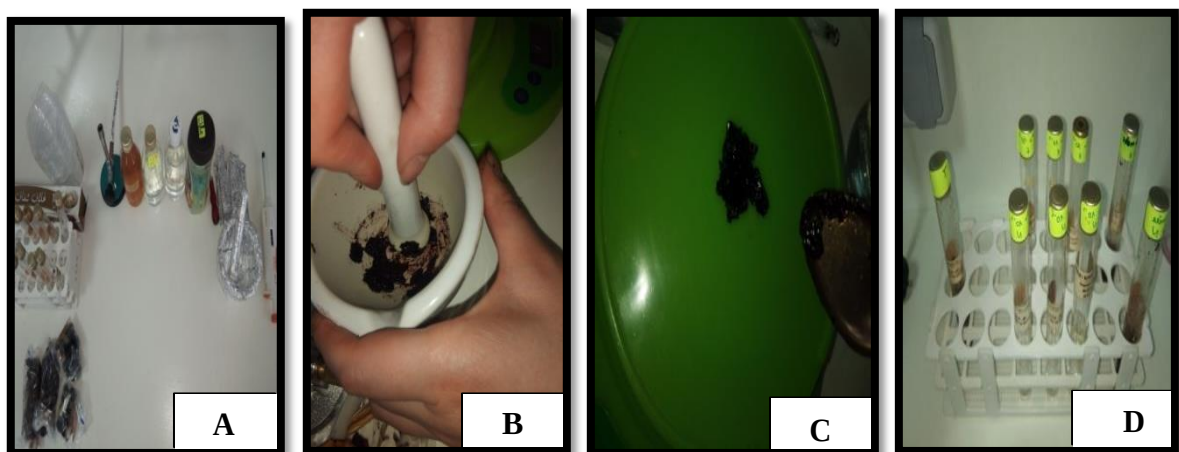


Figure 16: Post de travail(A) ; Echantillon broyé(B) ; Peser (C) ; Préparation des dilutions (D) (Photos prise par les auteurs, 2020).

V. Obtention des isolats fongiques et purification

Après un bon développement des colonies (**Fig. 17**), on effectue des repiquages de chaque colonie pour purifier les champignons et minimiser les risques de contamination, jusqu'à arriver à isoler sur chaque boîte de Pétri une seule colonie d'un champignon donné (**Guiraud, 1998**).

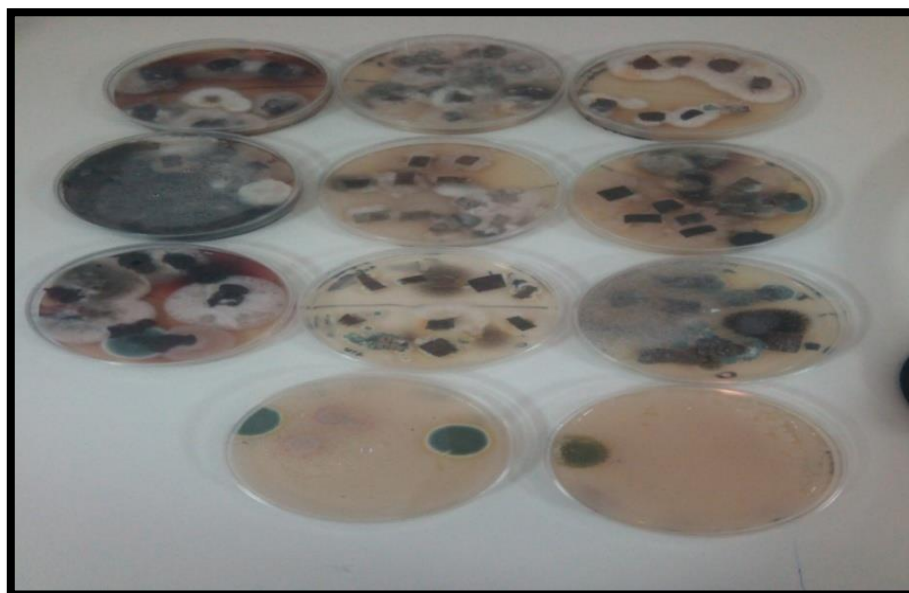


Figure 17 : Isolats fongiques (Photo prise par les auteurs, 2020).

VI. Identification des souches fongiques

L'identification des champignons phytopathogènes d'olivier a été réalisée par l'observation macroscopique (aspect des colonies : forme, taille, couleur, odeur) et par l'observation microscopique (aspect des spores et du mycélium).

- L'identification macroscopique se fait à l'œil nu, elle se base sur les caractères suivants : couleur de colonies, vitesse de croissance, l'odeur et l'aspect de mycélium aérien.
- L'identification microscopique permet d'observer le mycélium et les spores des champignons pathogènes. Cette identification se fait par plusieurs méthodes, deux méthodes sont plus utilisées :

VI.1. Ruben adhésive (test de Graham)

Consiste à coller un morceau de scotch à une des extrémités d'une pipette pasteur stérile, poser le morceau de scotch sur l'échantillon de champignon à étudier, puis sur une lame stérile déposer d'abord une goutte de colorant (bleu de méthylène), ensuite déposer l'objet

entre lame et lamelle et observer la lame au microscope optique aux différents grossissement.

VI.2. Micro-culture

Elle est effectuée selon la méthode des micro-cultures (**Harris et al, 1989**). Elle consiste à Ensemencer les bords d'un petit carreau d'une mince couche de milieu PDA par les spores de l'agent pathogène. Le carreau ensemencé est déposé sur une lame stérile et recouvert par une lamelle. La lame est placée dans une boîte de Pétri stérile, contenant du papier filtre stérile, imbibé d'eau distillée stérile (EDS). Après 3 à 4 jours d'incubation, la lamelle à laquelle adhère le mycélium est transférée sur une autre lame contenant quelques gouttes de bleu de méthylène pour l'observation microscopique (**Fig. 18**).

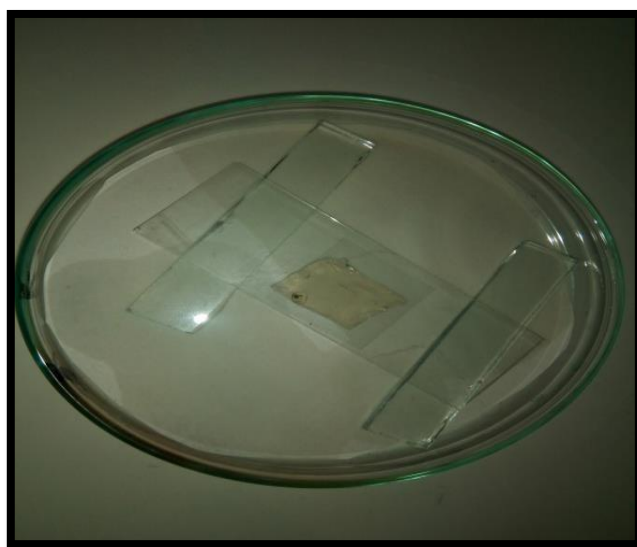


Figure 18: Technique de micro-culture (Photo prise par les auteurs, 2020).

❖ Résultats obtenues

Selon (**Barnett et Hunter, 1972**), l'identification de l'espèce est basée sur les caractéristiques morphologiques des hyphes et des organes de reproduction asexuée. Après 7 jours de culture sur milieu PDA ; la caractérisation macroscopique et microscopique des isolats a permis d'identifier 4 genres et 4 espèces fongiques :

- **L'isolat B1** correspond au genre *Exophiala sp* : les espèces de ce genre se caractérisent par des colonies à croissance lente, une texture des colonies en général mécoïde devenant veloutée et une couleur brun foncé à noire et le verso est foncé. Les conidies sont unicellulaires, hyalines et cylindriques.

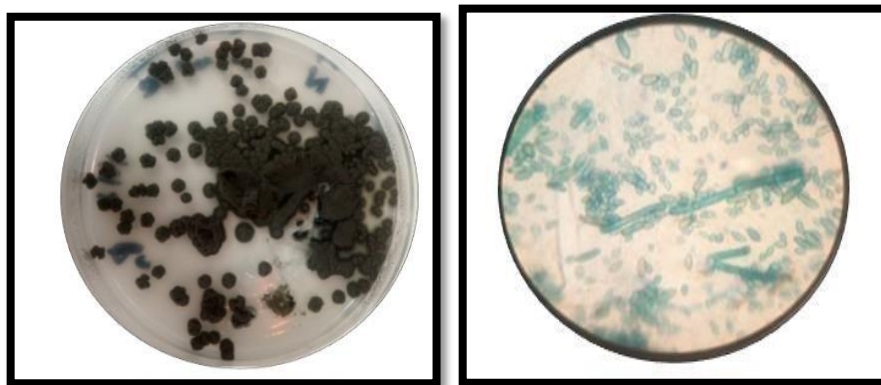


Figure 19 : Observation macroscopique et microscopique d'*Exophiala* sp (Photos prise par les auteurs, 2020).

- L'isolat B2 correspond à l'espèce *Aspergillus Flavus* : caractérisée par des colonies duveteuses a poudreuses, blanche puis jaune, puis vert jaune , le verso est incolore, rosé a brin. Les conidies sont grosse vert pâle et le conidiophore est long.

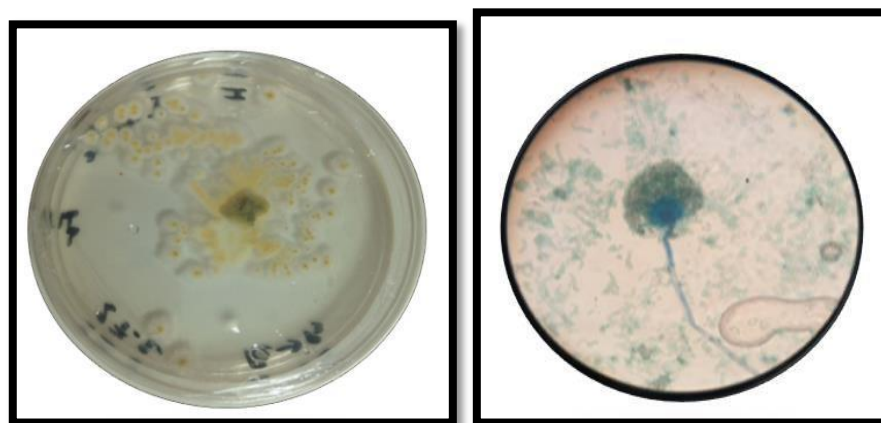


Figure 20 : Observation macroscopique et microscopique d'*Aspergillus flavus* (Photos prise par les auteurs, 2020).

Conidiophore est rugueux, et Vésicule est globuleuse, et Phialides formées le plus souvent sur des mérules, groupées sur les trois quarts supérieurs de la surface de la vésicule.

- L'isolat B3 correspond à l'espèce *Aspergillus niger* : est caractérisée par des colonies d'abord blanches, puis jaune et enfin granuleuses noires, le verso incolore à jaune pâle avec une croissance rapide (2 à 3 jours). Tête conidienne est radiée disposées en plusieurs colonnes noires, les conidiophores sont très long atteignant 1,5 à 3 mm, lisse, hyalin.

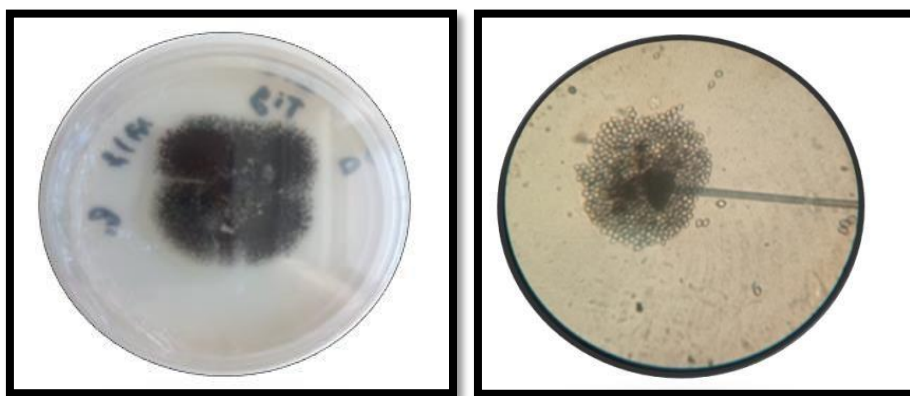


Figure 21 : Observation macroscopique et microscopique d'*Aspergillus niger* (Photos prise par les auteurs, 2020).

- L'isolat B4 correspond au genre *Alternaria sp* : ce genre est caractérisé par des colonies blanc-gris au départ, devient rapidement foncée (vert foncé à noire) au recto comme au verso, la texture est duveteuse à laineuse. Hyphes septés, sont ramifiés et tardivement certains filaments sont pigmentés en brun, les conidiophores sont cloisonnés, bruns, septés, ramifiés, plus ou moins droits ou flexueux, les conidies sont brunes, pluricellulaires d'aspect ovoïde, avec une partie basale arrondie et une extrémité apicale allongée en bec plus ou moins important.

- En absence de bec marqué c'est, la disposition en chaines des dictyospores qui caractérise le genre *Alternaria*.



Figure 22 : Observation macroscopique et microscopique d'*Alternaria sp* (Photos prise par les auteurs, 2020).

- L'isolat B5 correspond au genre *Aspergillus sp* : se présente sous forme de colonies duveteuse à poudreuse.

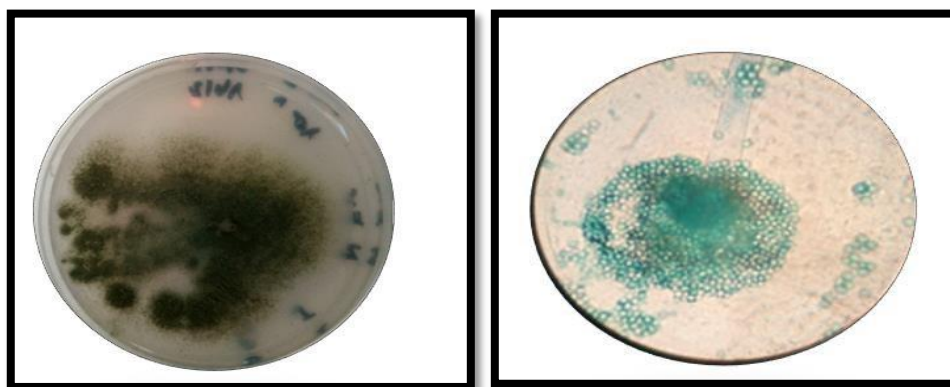


Figure 23 : Observation macroscopique et microscopique d'*Aspergillus sp* (Photos prise par les auteurs, 2020).

- L'isolat B6 correspond genre d'*Aspergillus sp* : les colonies de ce genre est de couleur blanc, l'aspect de tapie est poudreuse, le revers pas de pigment. Hyphe septés, les conodiophore sont long, et non cloisonné, des phialides directement insérées sur la vésicule, les conidies globulaires, vert pale, échinulées et la tête aspergillaire est unisériée, radiée.

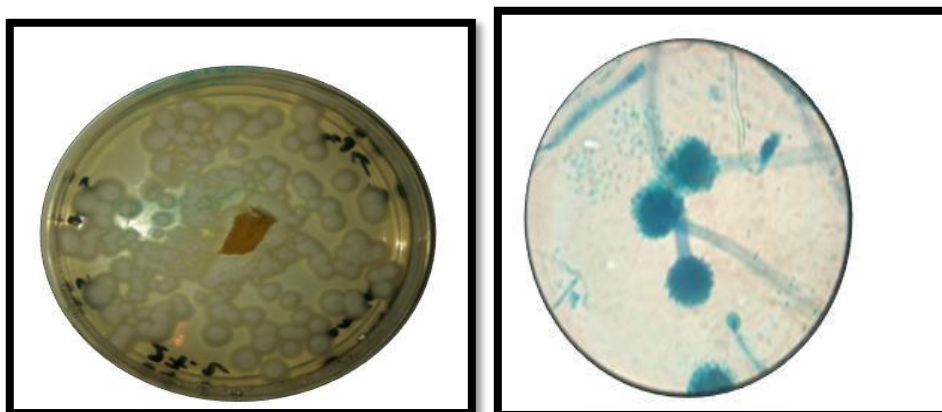


Figure 24: Observation macroscopique et microscopique d'*Aspergillus sp* (Photos prise par les auteurs, 2020).

- L'isolat B7 correspond à l'espèce *Fusarium solani* : est caractérisée par des colonies duveteuses ou cotonneuses, blanche a crème avec un verso pale. Les conidiophores sont des mycéliums septés, les phialides sont courtes et solitaires (8 à 20 μm de long sur 3 à 5 μm de large), les macroconidies sont abondantes, discrètement incurvées, avec une cellule basale bien marquée (elles contiennent 3 à 5 logettes (23 à 54 μm de long sur 3 à 4,5 μm de large) et les micronides sont nombreuses, unicellulaires, d'aspect ellipsoïdal ou cylindrique, droites ou légèrement courbées (5 à 12 μm de long sur 2,3 à 3,5 μm de large), disposées en

« fausses ».

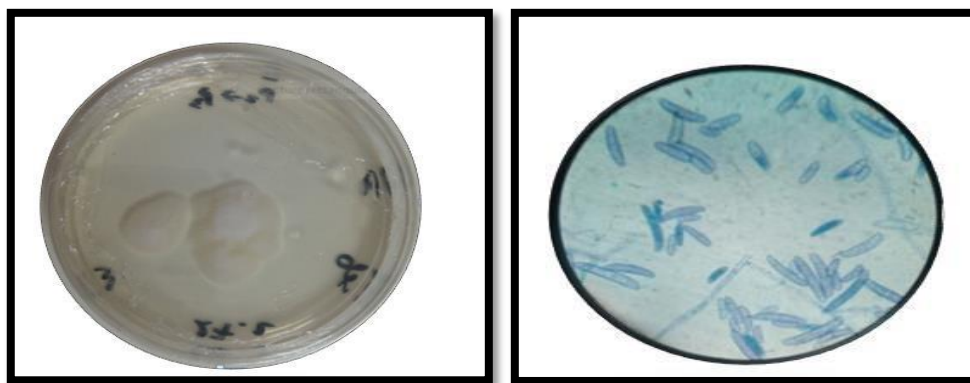


Figure 25 : Observation macroscopique et microscopique de *Fusarium solani*
(Photos prise par les auteurs, 2020).

- L'isolat B8 correspond au *Aspergillus fimigatus* : est caractérisées par des colonies blanc puis vert, vert-gris puis vert foncé à gris-noirâtre, le verso est incolore, jaune, vert ou brun-rouge.

Du point de vue microscopique, les têtes conidiennes, strictement unisériées, en colonne compacte sont d'abord bleu-vert puis virant au vert bronze. Les conidiophores sont courts (300-500 μm), lisses, s'élargissent insensiblement. Ces dernières (20-30 μm en diamètre), vertes, sont fertiles dans leur moitié supérieure. Les phialides dressées, sont densément groupées, de couleur verte. Les conidies sont globuleuses diamètre, et échinulées.

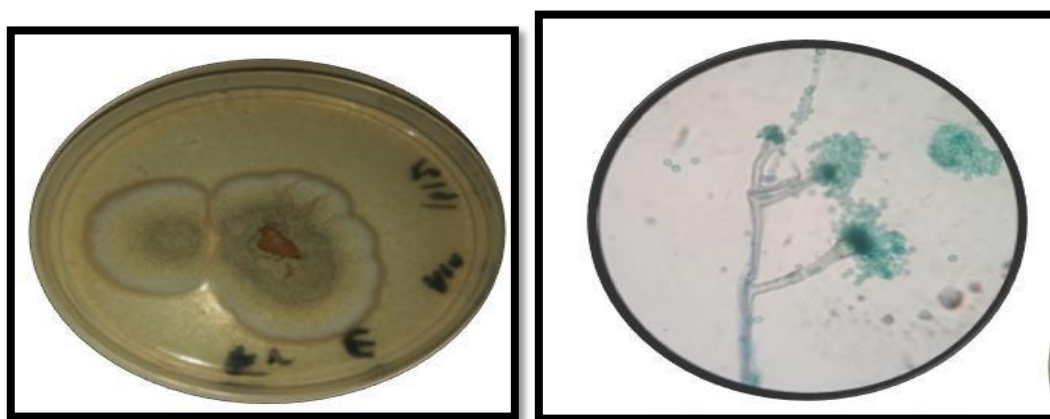


Figure 26 : Observation macroscopique et microscopique d'*Aspergillus fimigatus*
(Photos prise par les auteurs, 2020).

VII. Méthodes de lutte contre les maladies de l'olivier

La gestion des maladies fait partie intégrante de la culture de l'olivier et constitue un élément clé de la production d'une huile de qualité. Elle doit donc être prise en compte dans toutes les décisions prises tout au long de la culture, à commencer par la plantation elle-même. Ensuite, les principales mesures de lutte contre les maladies de l'oléiculture sont développées, en tenant compte du fait que les ennemis de l'olivier font partie de la biodiversité de l'agrosystème oléicole et que les actions de la culture ne doivent pas viser à éliminer totalement ses ennemis, mais à vivre avec eux, c'est-à-dire à maintenir une population compatible avec une production durable et qualitative. (Trapero et al., 2011).

VII.1. Lutte culturale

Ces dernières années, la multiplication de plants d'olivier est principalement assurée par la technique de bouturage. Pour aboutir à des plants sains et vigoureux, il est fortement recommandé d'utiliser des substrats indemnes d'organismes pathogènes, de s'assurer que le sol n'ait pas été préalablement infesté par les agents pathogènes, et que les terres des oliveraies n'aient pas supporté précédemment des cultures sensibles aux *Fusarium* même, il est fortement recommandé de respecter les densités de bouturage, d'enlever et d'incinérer les boutures pourries ainsi que les branches infectées ou mortes taillées, ou encore de désinfecter les outils de taille, et d'installer des systèmes de drainage efficaces (Vossen et al., 2008). Des chercheurs roumains (Costache et al., 1979) ont observé que les plants sont plus susceptibles à l'attaque du *Verticillium* dans les conditions suivantes :

- ✓ une température du sol inférieure ou égale à 25°C;
- ✓ une humidité relative de 40% plutôt que 80%;
- ✓ une courte photopériode; et une fertilisation azotée excessive.

Toutes mesures qui permettent d'éviter ces conditions vont aider à prévenir le développement de la maladie: maintenir un sol chaud, assurer une période de lumière assez longue, éviter la fertilisation excessive.

VII.2. Lutte chimique

Les champignons présentent un pic de développement durant les périodes chaudes et humides, entre mars et juin. Afin de limiter leur propagation, des traitements préventifs sont fortement conseillés, dans des périodes précises dans l'année, si possible avant l'apparition des symptômes de maladies. La bouillie bordelaise reste encore un traitement couramment

appliqué. Cependant, des produits chimiques de synthèse dont la dangerosité sur l'environnement, les oléiculteurs et les consommateurs sont abondamment appliqués. (Tombesi et al., 2007). La lutte chimique contre les agents phytopathogènes présente une certaine limite à cause des dangers liés à la santé humaine et l'apparition de la résistance progressive des pathogènes (Hamlaoui et al., 2006).

VII.3. Solarisation

La solarisation du sol est l'une des méthodes physiques de contrôle les plus efficaces pour réduire à moyen et long termes la densité populationnelle de différents pathogènes comme *Fusarium*, mais également *Verticillium* et *Rhizoctonia*. Cette méthode consiste en une "pasteurisation" du sol. Elle consiste en une élévation de la température des couches superficielles (jusqu'à 30-40 cm). Cette élévation thermique est assurée par l'énergie irradiante du soleil (Maroua, 2018).

VII.4. Lutte biologique

La lutte biologique, par l'utilisation d'agents bénéfiques ou auxiliaires de cultures), ou de leurs produits, pour empêcher ou réduire les pertes ou dommages causés par des organismes nuisibles (parasites, ravageurs et mauvaises herbes) (Sforza et Sheppard, 2004). Un engouement de plus en plus prononcé pour la lutte biologique s'est forgé avec la connaissance des effets néfastes des pesticides chimiques sur les écosystèmes et la santé humaine. De plus, les lois environnementales sont de plus en plus contraignantes et visent à réduire l'utilisation des pesticides dans l'agriculture conventionnelle, d'où l'intérêt croissant pour cette approche alternative qu'est la lutte biologique. La lutte biologique est l'une des composantes de la lutte intégrée contre les organismes nuisibles. Cependant, la lutte biologique est aujourd'hui considérée plurielle car elle associe tous les moyens de lutte disponibles, chimique, biologique, mécanique, thermique, etc. Elle vise non pas à éradiquer les ravageurs, mais à maintenir leur population en dessous d'un seuil de nuisibilité plaçant les structures agricoles dans une situation économique supportable (Avis et al., 2008).

VII.4.1. Méthodes de lutte biologique

Il existe plusieurs méthodes de lutte biologique :

VII.4.1.1. Lutte biologique par utilisation de la résistance variétale

La résistance variétale est la capacité pour une variété de plante d'obtenir une bonne productivité malgré la présence de bio agresseur. Deux mécanismes sous-tendent à ce

Concept: l'antixénose, quand la plante par sa physiologie, sa morphologie ou sa phylogénie repousse ou amoindrit les dommages causés par le ravageur, et l'antibiose quand la plante est capable de produire une substance pouvant empêcher le développement du bio agresseur (Kouassi, 2001).

VII.4.1.2. Lutte biologique par utilisation des microorganismes

Comme les bactéries, le champignon et les virus. Il s'agit d'utiliser surtout les microorganismes tels que *Pseudomonas sp.* Et *Bacillus sp.* (Mercado,2004), *Streptomyces plicatus*, *Frankia sp.* (Bonjar , 2005), *Serratia plymuthica* , *Glomus mosseae*, *G. intraradices*, *G. claroideum* (Karajeh,1999) et *Trichoderma virens* (Hanson, 2000).

Chapitre III : Agent de contrôle *Bacillus* sp

I. Genre *Bacillus* sp

I.1. Caractéristiques bactériologiques des espèces du genre *Bacillus* spp

Le groupe *Bacillus* englobe des bâtonnets qui forment des endospores en conditions d'aérobiose. Les espèces appartenant à ce groupe présentent une forme droite ou légèrement incurvée, survenant en paire ou en chaînettes, mais aussi en longs filaments, généralement à bouts ronds. Toutefois les membres du groupe *Bacillus cereus* ont souvent été décrits comme des bâtonnets à bouts carrés. Le diamètre cellulaire varie de 0,4 à 1,8 μm et la longueur de 0,9 à 10,0 μm . Gram positif ou Gram variable, mobiles au moyen de flagelles péritriches ou immobiles. Certaines espèces comme *Bacillus anthracis*, *Bacillus subtilis*, *Bacillus licheniformis* et *Bacillus megaterium* produisent une capsule constituée d'acide poly-D glutamique (Amziane, 2014). Cette capsule contribue à la virulence de *Bacillus anthracis*. La flagellation n'est pas considérée comme un caractère taxonomique particulièrement utile pour la définition du genre, mais la présence ou l'absence de mobilité continue à être indiquée dans la plupart des descriptions d'espèces. Ce caractère est d'une certaine valeur à l'identification. A titre d'exemple, *Bacillus anthracis* et *Bacillus mycoides* sont immobiles, tandis que la plupart des souches de *Bacillus cereus* sont mobiles. Les flagelles de *Bacillus thuringiensis* peuvent se lier à des cellules d'insectes et jouer un rôle important dans la virulence de ce dernier (Zhang et al., 2012). Aérobie ou anaérobie facultative, l'accepteur final d'électron est l'oxygène, remplaçable par d'autres produits pour certaines espèces. La catalase est produite par la plupart des espèces alors que l'oxydase est variable. Chimio-organotrophes, phototrophes ou auxotrophes, elles nécessitent plusieurs facteurs de croissance. La plupart des espèces ont un potentiel peu ou pas pathogène et sont rarement associées à des pathologies humaines ou animales à l'exception de *Bacillus anthracis*, l'agent du charbon bactérien. D'autres espèces peuvent causer des intoxications alimentaires et des infections opportunistes telles que *Bacillus cereus*. Les souches de *Bacillus thuringiensis* sont pathogènes uniquement à l'encontre des invertébrés.

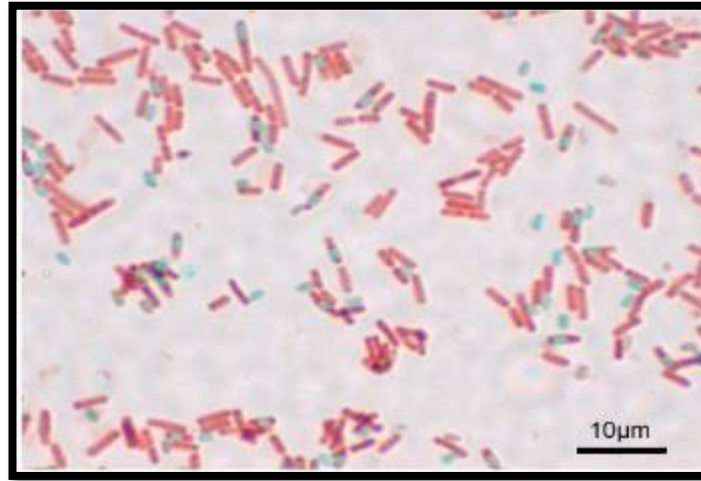


Figure 27 : Photographie de l'observation microscopique de *Bacillus subtilis* (Bridier et al., 2010).

I.2. Habitat

Les *bacillus spp* mésophiles sont des germes ubiquitaires de l'environnement car leurs spores leur confèrent une grande résistance. On en trouve dans le sol qui constituent le principale réservoir (Yilmaz et al, 2006), Dans l'eau de mer et sur les plantes, insectes, animaux, et de l'air (Pignatelli et al., 2009), On en trouve également dans les aliments (cacao, sucre, épices, lait) et même dans les produits stérilisés alimentaires ou médicamenteux à cause de la thermorésistance des spores.



Figure 28 : Photographie d'une colonie de *Bacillus subtilis* sur gélose (Google, 2016).

Les bactéries du genre *Bacillus* font partie de la famille des Bacillaceae (Delerras, 2007).

- **Règne :** Bacteria
- **Phylum :** Firmicutes

- **Classe :** Bacilli
- **Famille :** Bacillaceae
- **Ordre :** Bacillales
- **Genre :** *Bacillus*
- Espèces *Bacillus spp.*

I.3. Classification

La classification la plus utilisée se fonde sur la forme de la spore et distingue trois groupes (Maughan et Van der Auwera, 2011).

- *Bacillus* à spore ovale non déformante
- *Bacillus* à spore ovale déformante
- *Bacillus* à spore ronde déformante

Il existe un grand nombre d'espèces avec des propriétés physiologiques et des habitats très variés. Certaines espèces sont trouvées dans l'eau douce, d'autres dans l'eau de mer. Il existe des espèces thermophiles, acidophiles, psychrophiles, alcalinophiles.

- *Bacillus cereus* bactérie ubiquitaire présente dans le sol et nombreux autres environnements, certaines souches sont pathogènes.
- *Bacillus licheniformis*
- *Bacillus megaterium* très fréquente dans le sol.
- *Bacillus subtilis*, ubiquitaire, bactérie du sol, utilisée en biotechnologie, est un exemple d'adaptation. Elle forme des spores capables de survivre dans des conditions extrêmes, révélant une adaptation très ancienne.
- *Bacillus thuringiensis* pathogène des insectes, ses vertus entomotoxiques ont été à l'origine d'un intérêt agricole, sylvicole et commercial dès les années 1930, mais beaucoup plus marqué à la fin du 20ème siècle, notamment avec le développement du génie génétique et le brevetage du vivant.

Les premières applications de *Bacillus thuringiensis* dans l'environnement datent de 1933. Il a été utilisé dès les années 1950 dans les forêts, les champs et les vignobles. Jusqu'au milieu des années 1970, sa principale application était la lutte contre les lépidoptères défoliateurs dans les forêts et certains papillons parasites des grandes cultures, de maïs notamment. En 1976, la

découverte des sérotypes israelensis (Bti) et tenebrionis a permis l'ouverture de nouveaux marchés, grâce à une action larvicide sur les moustiques, les similies et les coléoptères.

Plusieurs espèces du genre *Bacillus* sont efficaces dans le bio contrôle de divers champignons phytopathogènes (**Williams et Asher, 1996 ; Landa et al., 1997 ; Commare et al., 2002 ; Swain et Ray, 2006**).

Les espèces de *Bacillus* productrices d'antibiotiques sont *B. subtilis*, *B. polymyxa*, *B. brevis*, *B. licheniformis*, *B. circulans*, *B. cereus*. Les antibiotiques polypeptidiques produits par *Bacillus* les plus utilisés dans les traitements médicaux sont la bacitracine, la gramycidine S, les polymyxines, la tyrotricine (**Morikawa et al., 1992 ; Perez et al., 1993 ; Drablos et al., 1999**). Ils ont un large spectre d'action et sont utilisés comme agents antifongiques (**Milner et al., 1995**).

La plupart de ces *Bacillus* ont été capables d'inhiber la croissance de *Fusarium oxysporum* efficacement in vitro. D'autres pathogènes parmi le *F. oxysporum* dont *F.o. ciciris*, *F.o. phasioli* et *F.o. melonis* sont inhibés par des isolats de *Bacillus spp.* de la rhizosphère du pois chiche (**Landa et al., 1997**).

II. *Bacillus sp* comme un agent de biocontrôle

Avec le désir accru de respect de l'environnement et de durabilité, la lutte biologique contre les agents pathogènes fait également l'objet d'une attention. Le bio-contrôle est défini comme l'utilisation de produits naturels et d'organismes vivants pour supprimer les populations d'agents pathogènes. L'utilisation d'agents de lutte biologique, soit comme alternative à d'autres formes de lutte contre les maladies des plantes, soit comme supplément, a attiré l'attention du monde entier pour être incluse dans une stratégie de gestion intégrée des agents pathogènes dans divers systèmes alimentaires. Cependant, pour éviter une sélection irrationnelle des antagonistes des agents phytopathogènes à adopter comme produits commerciaux, les modes des activités des antagonistes et Les effets doivent être bien compris. Les antagonistes bactériens sont couramment utilisés, et beaucoup d'entre eux appartiennent au genre *Bacillus* (**Boscher, 2012**).

Les bactéries appartenant au genre *Bacillus* produisent de nombreuses molécules antibiotiques et antifongiques dont certaines sont synthétisées par voie ribosomale (subtiline, subtilosine A, TasA, subblancine) alors que d'autres telles que la bacylisine, la chlorotetaine, la mycobaciline, les rhizotocines, la bacillaene, la difficidine, ainsi que les lipopeptides appartenant aux familles des surfactines, iturines et fengycines sont produites par synthèse peptidique non

ribosomale (**Mnif, 2015**). La rhizobactérie *B. subtilis* appartient à l'embranchement des firmicutes, à la famille des Bacillaceae et au genre *Bacillus* (**Chtioui, 2011**), est l'une des bactéries Gram+ les plus étudiées (**Sonenshein et al., 2002**). *Bacillus subtilis* dédie environs 5% de son génome à la synthèse d'antibiotiques et produit plus d'une vingtaine de composés antimicrobiens aux structures différentes (**Ongena et Jacques, 2008**). La biosynthèse de molécules lipopeptidiques est l'un des mécanismes d'action majeurs de *B. subtilis* lui permettant la colonisation du milieu. Cette bactérie est actuellement utilisée comme agent de biocontrôle et les lipopeptides qu'elle produit font partie des plus connus (**Jacques et al., 2014**).

III. Biofongicides

Les biofongicides constituent, en plus des éliciteurs, une source alternative de contrôle des maladies des plantes. Il s'agit de formulations organiques qui peuvent dériver de plantes, animaux, microorganismes ou minéraux. Les biofongicides issus d'organismes vivants (champignons et bactéries) peuvent contrôler l'activité des champignons et bactéries pathogènes et agissent selon quatre différents modes d'action: (i) en produisant des antibiotiques ou des toxines, (ii) en parasitant les champignons pathogènes ou (iii) en rivalisant avec eux (compétition sur les nutriments) et (iv) pour certains d'entre eux en induisant les résistances localisées ou systémiques chez les plantes (**Heydari et Pessarakli, 2010**). Les extraits de certaines plantes (huiles essentielles, sirops, etc.), ou certains minéraux (cuivre, silice, etc.) peuvent également constituer des biofongicides intéressants. Les biofongicides microbiens montrent plusieurs avantages en comparaison avec les produits phytosanitaires de synthèse. Ils ont une action spécifique vis-à-vis des ravageurs, ils ne sont pas toxiques et se dégradent plus rapidement dans l'environnement (**Thakore, 2006**). Cette catégorie de biopesticides, en particulier les PGPRs (dont le genre *Bacillus* fait partie), ont des modes d'action variés et peuvent par conséquent supprimer la résistance chez le pathogène. Ils protègent la plante par plusieurs mécanismes directs et indirects, à savoir: la compétition, l'antagonisme direct et la stimulation du système immunitaire de la plante. Ils peuvent également promouvoir la croissance des plantes (biofertilisation et phytostimulation) et/ou stimuler les interactions entre les plantes et d'autres microorganismes bénéfiques (**Antoun et Prevost, 2006**). La biofertilisation se manifeste dans la solubilisation des nutriments insolubles dans le sol, par exemple, beaucoup de microbes bénéfiques du sol produisent des enzymes (phytase et phosphatases non spécifiques) et des acides organiques, pour solubiliser

les formes insolubles du phosphate organique et inorganique, respectivement. En revanche, la phytostimulation est la promotion directe de croissance des plantes à travers la modulation de la balance hormonale. Les phytohormones incluent les cytokines, les gibberellines et les auxins (Francis et al., 2010; Lugtenberg et Kamilova, 2009).

IV. Molécules de lipopeptides de *Bacillus* sp

Les lipopeptides du genre *Bacillus* sont synthétisés par des complexes multienzymatiques via une voie non ribosomiaux. En fonction de leur structure et propriétés biologiques ils sont subdivisés en trois familles, les surfactines, les iturines, les fengycines (Bonmatin et al., 2003).

IV.1. Structure des lipopeptides

Les lipopeptides issus de *Bacillus* sp, ont été isolés durant les années 1949 et 1986; ils rassemblent plus de 30 peptides différents liés à des chaînes variées d'acides gras. La synthèse non ribosomale conduit à une hétérogénéité importante, non seulement au niveau du type et de la séquence en acides aminés (AA), mais aussi au niveau de la nature du cycle peptidique et la nature, longueur et ramification de la chaîne d'acides gras (Mnif, 2015 ; Ongena et Jacques, 2008). Les lipopeptides du genre *Bacillus* sont classés selon leur séquence en acides aminés en 3 familles distinctes : les surfactines, les iturines et les fengycines (ouplipastatines). Cependant, suite à la découverte des kurstakines en 2000, il a été suggéré qu'elles soient également ajoutées en tant que famille de lipopeptides (Jacques, 2011).

IV.2. Principaux familles des lipopeptides

IV.2.1. Surfactines

La surfactine tire son nom de son efficacité prouvée en tant que biosurfactant. Les AA L-Glu et L-Asp renforcent son caractère amphiphile (Coutte, 2009). Elle est capable de réduire la tension de surface de l'eau de 72 à 27 mN.m⁻¹ à une concentration aussi faible que 0,01% et s'organise en micelles à une concentration supérieure à la CMC (concentration micellaire critique) de 10 mg/L. De potentielles activités antibactériennes, antivirales, anti tumorales, anticoagulantes, hémolytiques, inhibitrices d'enzymes ainsi qu'inductrices du mécanisme de résistance des plantes ont été démontrées pour la surfactine. Cependant, aucune activité antifongique directe ne lui a été attribuée, bien que des effets synergiques existeraient (Chtioui, 2011). Le mode d'action principal de la surfactine serait la perturbation des

membranes ; elle semble également être un élément clé à la création de biofilms stables et pourrait inhiber les biofilms formés par d'autres bactéries (**Romero et al., 2007**).

IV.2.2. Fengycines

Les fengycines sont des décapeptides partiellement cycliques reliés à une chaîne d'acides gras β -hydroxylée de 14 à 18 carbones (**Chtioui, 2011**). Les fengycines ont une activité hémolytique moins importante que les iturines et surfactines mais gardent une forte toxicité fongique, particulièrement envers les champignons filamenteux. Leur mode d'action est moins bien connu que ceux des autres familles de lipopeptides. On sait cependant qu'ils interagissent avec les couches lipidiques et peuvent altérer la structure des membranes cellulaires (**Ongena et Jacques, 2008**). La revue de (**Ongena et Jacques, 2008**) a récapitulé les propriétés des lipopeptides mises en relation avec l'activité de biocontrôle des bactéries du genre *Bacillus*. Ces propriétés sont de trois natures :

- Favoriser la croissance invasive de la bactérie, donc potentiellement sa capacité à coloniser les feuilles et les racines, améliorant ainsi sa compétitivité (essentiellement la surfactine).
- Inhiber la croissance et/ou la germination des spores d'un grand nombre de champignons pathogènes (essentiellement fengycine et iturine).
- Stimuler les défenses naturelles des plantes (notamment surfactine et fengycine).

IV.2.3. Iturines

Leur nom est associé à Ituri ; une région du Congo dont le sol a été l'échantillon où a été découverte cette famille pour la première fois (**Abdellaziz, 2018**).

IV.2.3.1. Structure des iturines

Les iturines sont composées d'un hepta-peptide cyclique lié à un β -aminoacide gras (**Walia et Cameotra, 2015**).

La chaîne de l'acide gras varie de 13 à 17 atomes de carbone en taille et peut être sous forme *n*, *iso* ou *anteiso*, menant à plusieurs isomères pour chaque membre de cette famille (**Delcambe et al., 1977 ; Peypoux et al., 1984**). La masse moléculaire de ces composés varie de 1021 à 1099 Da (**Guez, 2007**).

Le cycle est formé par une liaison amide entre le groupement α -COO du septième acide aminé et le groupement β -NH₂ de l'acide gras β -aminé qui est lié à son tour par son

groupement α -COO au N-terminal du premier acide aminé. (Pathak et Keharia, 2012).

Les membres de la famille se caractérisent par une séquence chirale invariable d' α -aminoacides (LDDLDDL) avec un résidu tyrosine en position 2 et un résidu asparagine en position 3 (Guez, 2007).

Ils présentent par contre une hétérogénéité au niveau des acides aminés présents dans les positions 1, 4, 5, 6 et 7 de la partie peptidique. Sur la base de la variation de ces acides aminés, les iturines ont été classées comme l'iturine A, l'iturine C, l'iturine D, l'iturine E, la bacillomycine D, la bacillomycine F, la bacillomycine L, la bacillomycine Lc, la mycosubtiline, la mojavencine, la mixirine et le subtilène A (He et al., 2017; Pathak et Keharia, 2012 ; Ma et al., 2012 ; Thasana et al., 2010). La figure 29 comporte la composition de la plupart des représentants de cette famille.

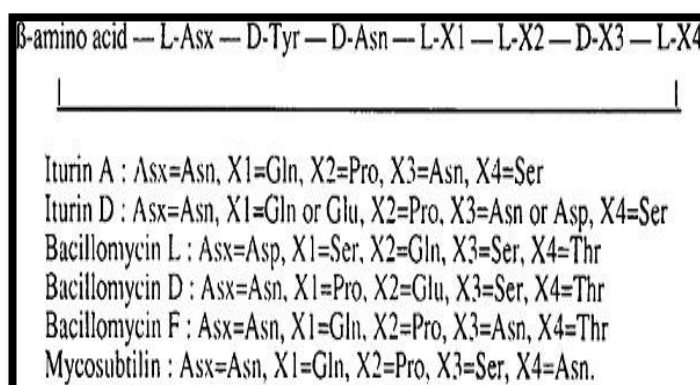


Figure 29 : Structure des antibiotiques ituriniques (Besson et Michel, 1989).

IV.2.3.2. Biosynthèse des iturines

Contrairement aux autres lipopeptides, les iturines sont synthétisées par un complexe hybride PKS-NRPS. L'opéron iturine, mycosubtiline et bacillomycine sont d'une taille de 37,8-40 kb et consiste en quatre ORFs qui sont respectivement, *ItuA*, *ItuB*, *ItuC*, et *ItuD*, gènes *fenF*, *mycA*, *mycB*, et *mycC* et *bamD*, *bamA*, *bamB* et *bamC*. Chacun de ces ORFs code pour la synthétase correspondante (Meena et Kanwar, 2015 ; Ongena et Jacques, 2008 ; Moyne et al., 2004 ; Jacques, 2011).

Les trois derniers gènes codent pour les NRPS responsables de l'incorporation du premier résidu pour *ituA* (*mycA* ou *bamA*), les quatre résidus suivants pour *ituB* (*mycB* ou *bamB*) et les deux derniers résidus pour *ituC* (*mycC* ou *bamC*). *FenF* (*ItuD*) code pour une malonyl-CoA transacylase (domaine MCT) et la *mycA* contient également des gènes apparentés aux

polycétides synthases. Ces gènes sont responsables des dernières étapes de la biosynthèse de la chaîne d'acides gras (dernière élongation et β -amination) avant son transfert au premier acide aminé de la fraction peptidique. La *mycA* est composée d'un acyl-CoA ligase (AL-domaine), acyle protéine carrier (domaine ACP), β -kétosynthase (domaine KS), et d'une amino-transférase (domaine AMT) (Ongena et Jacques, 2008). La figure 26 montre l'organisation de ces trois opérons. La différence entre les structures de l'iturine A et de la mycosubtiline (dans laquelle les derniers acides aminés sont inversés) peut s'expliquer par un changement de domaine intragénique au niveau des synthétases *mycC* et *ituC* (Ongena et Jacques, 2008).

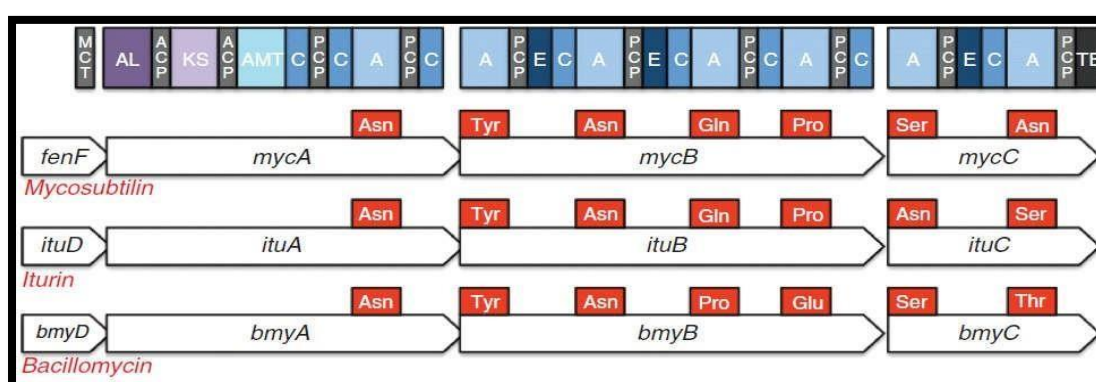


Figure 30 : Schéma des opérons impliqués dans la synthèse des 3 antibiotiques ituriniques : mycosubtiline, iturine A et bacillomycine (Jacques, 2011).

Dans les milieux artificiels les iturines ne sont synthétisées qu'au tout début de la phase stationnaire (Ongena et Jacques, 2008). Une production beaucoup plus élevée d'iturines a été observée lors de l'incubation en présence de *Pythium* et de *Fusarium* contrairement à *Botrytis*, pour laquelle aucune augmentation de synthèse iturinique n'a pu être constatée. Ces observations suggèrent fortement que certains signaux chimiques émis (sans contact) par ces agents phytopathogènes pourraient être détectés par *B. amyloliquefaciens* qui à son tour module une production accrue d'iturines et de fengycines (Cawoy et al., 2014).

IV.2.4. Mycosubtiline

Il existe une grande ressemblance de composition entre la mycosubtiline et l'iturine. En effet, les 2 antibiotiques renferment les mêmes α -amino acides et des β -amino acides homologues et ont été isolés à partir de deux souches de *B. subtilis*. La mycosubtiline se distingue par contre de l'iturine A uniquement par l'inversion des deux derniers acides aminés de la partie

peptidique c'est-à-dire qu'elle contient la sérine et l'asparagine au niveau de la 6^{ème} et 7^{ème} positions respectivement (**Bonmatin et al., 2003**).

IV.2.4.1. Relation structure-activité

Après avoir déterminé les particularités structurales des antibiotiques ituriniques (conservation d'une alternance LDDLLDL pour les acides aminés, présence de la séquence acide gras β -aminé – L-Asn – D-Tyr – D-Asn dans tous les lipopeptides ituriniques) ainsi que leurs spécificités biologiques (spectre antifongique étendu et très forte activité), il s'est avéré intéressant de déterminer la relation structure-activité de ces antibiotiques afin d'identifier les groupements nécessaires et de comprendre leur mode d'action. La chaîne hydrocarbonée semble jouer un rôle important au moment de l'insertion du lipopeptide iturinique au sein de la membrane plasmique des cellules cibles. Les lipopeptides ituriniques dépourvus de cette chaîne restent inactifs (**Bland et al., 1991**). La nature et la longueur des chaînes hydrocarbonées des acides gras β -aminés jouent également un rôle dans les activités biologiques des antibiotiques ituriniques. Plus la chaîne acyle est longue, plus le lipopeptide est actif. La ramification de type *iso* augmente aussi l'activité par rapport à la forme *n* pour le même nombre d'atomes de carbone (**Bland et al., 1991 ; Maget-Dana et al., 1994**). Le blocage de la fonction alcool des résidus séryles par acétylation ou méthylation diminue l'activité biologique par rapport à l'état natif. Cependant, l'effet n'est pas aussi drastique que dans le cas de la méthylation ou l'acétylation de la fonction –OH phénolique du résidu tyrosyle (**Besson et al., 1979**). L'hydroxyle phénolique du résidu tyrosyle est indispensable pour l'activité biologique. En effet, le blocage de cette fonction par une méthylation ou une acétylation diminue très fortement l'activité biologique des lipopeptides ituriniques testés (mycosubtiline, iturine A, bacillomycine Lc) (**Besson et al., 1979**).

D'autre part, afin de comprendre la nature des interactions impliquant la fonction OH phénolique, les structures résolues par RMN et modélisées de la bacillomycine Lc native ou méthylée sur la tyrosine ont été comparées. Ces modèles montrent que la formation d'une liaison hydrogène impliquant la fonction –OH phénolique de la forme native est possible, alors qu'elle ne l'est pas dans le cas de la bacillomycine Lc méthylée (**Volpon et al., 1999**).

IV.2.4.2. Microdomaines membranaires et antibiotiques ituriniques

Une autre étude réalisée par (**Mehmt Nail Nasir, 2011**) a prouvé l'interaction spécifique entre le cholestérol et la mycosubtiline interagit avec les membranes plasmiques des cellules

sensibles. Cependant, les mécanismes moléculaires de ses activités biologiques n'ont pas été complètement élucidés. Notre objectif était donc d'analyser les interactions de la mycosubtiline avec les membranes biologiques en utilisant des membranes biomimétiques telles que les monocouches et multicouches de Langmuir. Des changements structuraux de la mycosubtiline, impliquant son squelette peptidique et la chaîne latérale de son résidu tyrosyle, ont été observés lorsque le lipopeptide interagissait avec des multicouches contenant du cholestérol. Les interactions de la mycosubtiline avec les monocouches constituées de lipides purs et de phospholipide / cholestérol ou phospholipide / sphingomyéline / cholestérol ont également été examinées. Un comportement original de la mycosubtiline envers les monocouches contenant du cholestérol a été trouvé. Cependant, ce comportement original a été perdu lorsque la mycosubtiline interagissait avec des monocouches de cholestérylacétate pur. Cela suggère l'implication du groupe alcool de cholestérol dans les interactions mycosubtiline – cholestérol au sein des membranes.

De plus, la mycosubtiline a induit des changements dans l'organisation et la morphologie des monocouches contenant du cholestérol, ce qui correspond à une monocouche dans un état plus ordonné (**Nasir et al., 2011**). La monocouche lipidique en absence de la mycosubtiline présente une organisation homogène tandis qu'en présence de la mycosubtiline, une organisation hétérogène est observée avec l'apparition des domaines au sein de la monocouche mixte. Cette apparition peut être liée à la coexistence de domaines formés soit par les différents lipides entre eux après action de la mycosubtiline, soit par un mélange de la mycosubtiline et des lipides, soit par des molécules de mycosubtiline seules entre elles (**Nasir et al., 2011**).

De plus, le modèle membranaire constitué de DPPC/ sphingomyéline/cholestérol utilisé lors de ces études peut être considéré comme un modèle membranaire mimant la composition de certains microdomaines membranaires. Comme la mycosubtiline semble montrer une préférence pour les stérols qui se trouvent incorporés dans des systèmes composés de phosphatidylcholine à chaîne acyle saturée, de sphingomyéline et de cholestérol, une hypothèse serait qu'elle agit au niveau des radeaux lipidiques se trouvant au sein des membranes plasmiques des cellules sensibles. Il existe deux arguments majeurs en faveur de cette hypothèse : l'existence de tels radeaux au sein des membranes plasmiques des érythrocytes (**Koumanov et al., 2005**) et le fait que les lipopeptides ituriniques sont actifs sur les érythrocytes. De plus, dans le cas de l'iturine A, qui ne diffère de la mycosubtiline que par l'inversion de deux acides aminés, il a été démontré que ce lipopeptide lyse les globules

rouges en libérant dans le milieu des vésicules riches en stérol, sphingomyéline et phosphatidylcholine (**Thimon et al., 1994**). Ces deux arguments suggèrent donc que l'action antibiotique ituriniques peut avoir lieu au niveau des radeaux lipidique.

V. Rôles des lipopeptides liés au biocontrôle

Les lipopeptides interviennent dans plusieurs mécanismes de biocontrôle développés par les bactéries du genre *Bacillus* (**Asma, 2014**). Ces mécanismes sont évoqués ci-dessous :

Colonisation des racines des plantes

Les plantes créent un environnement nutritionnel et physicochimique spécifique pour le développement des microorganismes dans la rhizosphere (**Bais et al., 2006**). La colonisation des racines par les *Bacillus* est un processus complexe dans lequel les lipopeptides peuvent intervenir à différents niveaux. L'attachement et l'agrégation des micro-colonies sous forme de biofilm est à la base du phénomène de colonisation (**Ramey et al., 2004**). Dans ce contexte, les études ont montré le rôle des surfactines et non pas des fengycines ou des iturines dans la formation des pellicules dans l'interface eau-air (**Peypoux et al., 1999; Kinsinger et al., 2003**).

Bais et ses collaborateurs ont mis en évidence le rôle des surfactines dans la formation d'un biofilm stable, de la souche *B. subtilis* 6051 sur les racines d'*Arabidopsis* (**Bais et al., 2006**). La suppression de l'expression des surfactines dans cette souche diminue le taux de colonisation et le biocontrôle de la maladie causée par *Pseudomonas syringae* (**Ahimou et al., 2000**) .

L'activité spécifique des surfactines dans l'adhésion cellulaire et / ou la formation de biofilm pourrait s'expliquer par sa topologie 3D, qui renforce son caractère amphiphile par rapport aux autres familles de LPS (**Bonmatin et al., 2003; Peypoux, 1999**). Les colonies bactériennes se déplacent sur la racine pour atteindre la niche la plus riche en nutriments. Ceci s'effectue par le phénomène de «swarming». Il s'agit d'un mouvement guidé par les flagelles, il permet aux bactéries de se déplacer sous forme de biofilm tout au long de la surface des racines. Ce mouvement dépend principalement de la production des biosurfactants (**Raaijmakers et al., 2006; Daniels et al., 2004**). Il a été récemment démontré que les surfactines et les mycosubtilines fonctionnent comme des agents mouillants, en réduisant la tension de surface (**Leclerc et al., 2006**).

Antagonisme

Les activités antimicrobiennes des trois familles de lipopeptides ont été largement mises en évidence *in vitro*. En revanche, peu d'études associent le biocontrôle à la production *in planta* des lipopeptides. L'iturine A produite par le *B. subtilis* RB14 augmente le taux de germination des plantes de tomates et les protègeait contre le pathogène racinaire *Rhizoctonia solani* (Asaka et Shoda, 1996). La surproduction de la mycosubtiline par le *B. subtilis* ATCC 6633a aussi conduit à une réduction de l'infection des tomates par *Pythium aphanidermatum* (Leclerc et al., 2005). La contribution des iturines et des fengycines dans le contrôle de la phyllosphère du melon infecté par *Podosphaera fusca* a été mise en évidence par la récupération de ces LPs des feuilles traitées et en utilisant la technique «LP déficient transformant» (Romero et al., 2007).

(Preecha et al., 2010) ont démontré que la réduction de la sévérité de la maladie des plantes de soja causée par les *Xanthomonas axonopodis* pv. *Glycines* (KU-K-46012) est due aux surfactines produites par le *B. amyloliquefaciens* (KPS46). Le *Bacillus subtilis* GA1 qui produit de quantités importantes de lipopeptides et plusieurs homologues de fengycines protège les fruits de pomme contre *Botrytis cinerea*. Le rôle des fengycines a été démontré par traitement des fruits par des extraits enrichis et par récupération de ce lipopeptide, des zones d'inhibitions sur les fruits traités (Toure et al., 2004).

Induction du système de défense des plantes

L'implication des LPs dans le phénomène d'ISR a été démontrée sur divers pathosystèmes grâce à l'utilisation de LPs purifiés ou via l'utilisation de mutants possédant des motifs antigéniques modifiés. Les surfactines pures et les fengycines à moindre mesure fournissent le même effet d'induction de l'immunité des plantes de soja que celui établi par les cellules de la souche *B. amyloliquefaciens* (S499). Dans une approche complémentaire, la surexpression des gènes de fengycines et de surfactines par le *B. subtilis* 168 est associée à l'induction d'ISR dans des plantes de tomates et de soja (Ongena et al., 2007). Le traitement des suspensions de cellules de tabac avec la surfactine seule, induit aussi des réactions immunitaires comme la phosphorylation, l'alcalinisation extracellulaire Ca^{2+} dépendante et le burst oxydatif, sans provoquer la mort des cellules (Jourdan et al., 2009).

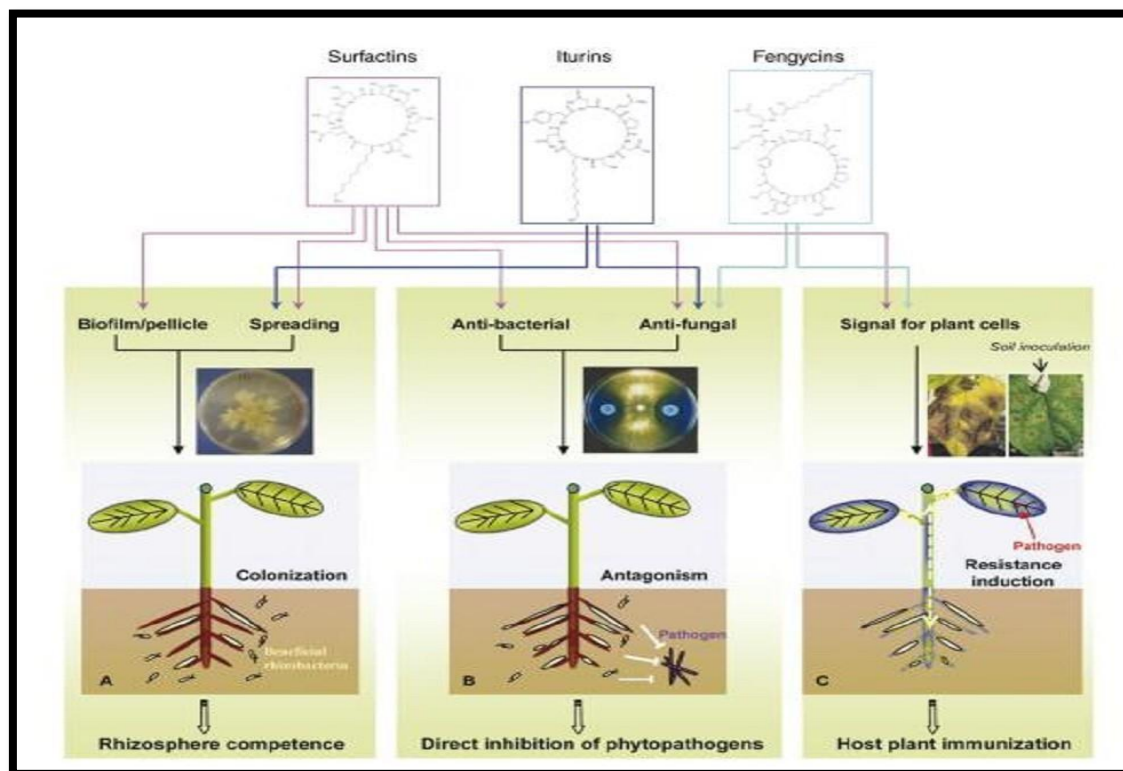


Figure 31 : Rôle des trois familles de lipopeptides dans (A): colonisation des racines et formation de biofilms; (B) Antibiose directe par inhibition de croissance des phytopathogènes; (C) Induction du système immunitaire de la plante (ISR) (Ongena *et al.*, 2007).



TROIXIEME PARTIE

Synthèse

Les champignons sont eux seuls responsables de 70% des pathologies végétales. En effet, sur les 100.000 espèces fongiques décrites dans la littérature, 8000, sont des pathogènes des plantes. Les maladies qu'elles provoquent sont qualifiées de cryptogamiques (**David et Diane, 1993**). A l'instar des autres pays, les maladies dues aux champignons rencontrés en Algérie. D'après la (**F .A O 1999**), les maladies phytopathogènes réduisent de 12 à 14 % La production agricole mondiale et pour faire face à ces dégâts, plusieurs moyens de lutte sont employés.

L'étude corrélatrice entre les aspects microscopique et macroscopique réalisée sur les champignons isolés à partir des différents organes de l'olivier de Naama, a montré qu'il existe une diversité fongique considérable, représentée par des espèces qui font partie des genres ; *Aspergillus sp* (*Aspergillus flavus*, *Aspergillus niger* et *Aspergillus fumigatus*, *Fusarium sp* (*Fusarium solani*), *Alternaria sp* et *Exophiala sp*.

Parmi ces moyens, figurent la lutte biologique par l'emploi d'antagonistes bactériens et fongiques efficaces effectivement, ces microorganismes contrôlent généralement leurs agents pathogènes cibles par différents mécanismes, y compris l'antibiose, mycoparasitisme, compétition pour les nutriments, production des enzymes lytiques ainsi que des métabolites secondaires, l'induction de la résistance des plantes. Ainsi, les effets inhibiteurs des microorganismes vis-à-vis des phytopathogènes sont de plus en plus explorés. Parmi ces antagonistes bactériens, les souches de *Bacillus sp* sont les plus étudiées.

C'est dans ce cadre qu'on a réalisé cette synthèse en analysant la littérature d'un ensemble de publications de recherches effectuées à l'échelle nationale et au Maroc ciblant l'étude de l'effet des antagonistes bactériens sur les champignons pathogènes tout en visant à mettre le point sur la valorisation de genre *Bacillus* isolé à partir des biotopes Algériens et marocains.

Vu sa localisation géographique l'Algérie et le Maroc sont très riches en niches écologiques à savoir les écosystèmes marins et côtiers, montagneux, septiques, ainsi les écosystèmes humides et sahariens. L'ensemble de ces biotopes caractérisés par une vaste biodiversité et, par conséquent, constituent un réservoir de la faune, la flore et des microorganismes.

Prenant le premier exemple réalisé par **Bouzerouata Asma en 2017** qui a appliqué une lutte

biologique *in vitro* par *Bacillus sp* mésophile isolé de Adrar contre des champignons isolés de plantes infectées (Olivier, tomate, pomme de terre, oignons, ail, Betterave, l'aubergine, carotte) qui ont été identifiés par la suite en tant que *Alternaria sp*, *Aspergillus sp*, *Fusarium sp* et *penicillium*).

La souche *Bacillus spp* mésophile a été confrontée avec trois souches fongiques pathogènes (*Aspergillus*, *Penicillium* et *Fusarium*) sur milieu PDA.

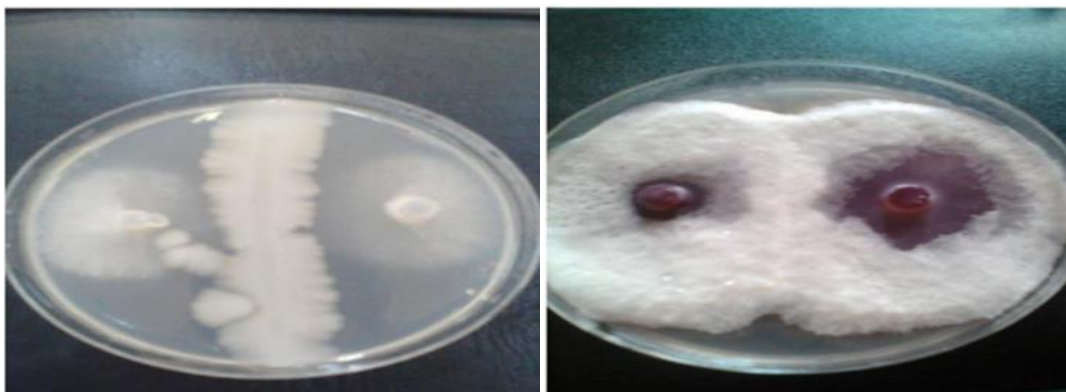


Figure 32: Croissance de *Fusarium sp.* en absence (à droite) et en présence (à gauche) de *Bacillus spp* mésophile (Bouzerouata, 2017).

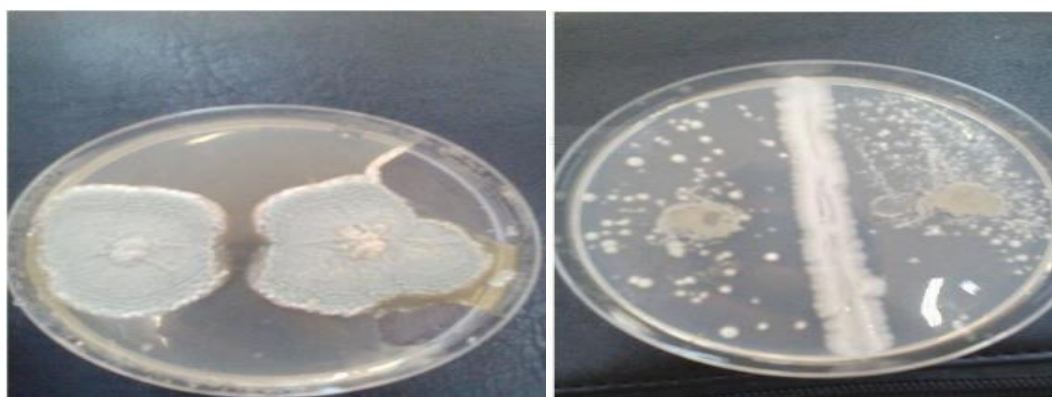


Figure 33 : Croissance de *Penicillium sp.* en absence (à droite) et en présence (à gauche) de *Bacillus spp* mésophile (Bouzerouata, 2017).

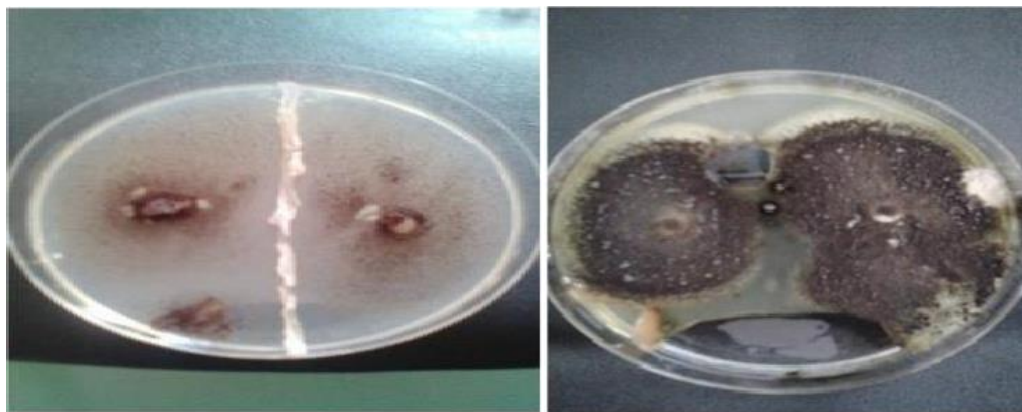


Figure 34: Croissance d'*Aspergillus sp.* en absence (à droite) et en présence (à gauche) de *Bacillus spp.* mésophile (Bouzerouata, 2017).

Les figures (32), (33) et (34) illustrent la capacité de la souche *Bacillus spp.* mésophile à inhiber la croissance mycélienne des trois souches de moisissures pathogènes. Cette inhibition se traduit par la réduction du diamètre des colonies d'*Aspergillus*, *Penicillium* et *Fusarium*, par rapport au témoin.

Nous remarquons que le meilleur taux d'inhibition était celui de *Bacillus spp.* mésophile sur *Penicillium sp.* (70%) suivi d'*Aspergillus sp.* (60%). Alors que le pourcentage d'inhibition de *Fusarium sp.* par la souche antagoniste était de 33%.

Une autre étude effectuée par **Ameziane Touazi Meriem en 2014** durant laquelle 222 souches de *Bacillus* halotolérantes et halophiles ont été isolées à partir du sol rhizosphériques et des sédiments de sebkha des zones semi arides et arides (Naama , Bécher , Biskra , Timimoune , Ain salah , Goléa , kerzaze , Tagourte , Timoudi , Tamentit , Taghit , Ougroute) qui ont été identifier en tant que *B. licheniformis*, *B. subtilis*, *B.mojavensis* et *B. Pumilis* , puis elles ont été criblées pour leur activité antagoniste vis à vis quatre champignons phythopathogènes, qui sont *Monilia spp*, *Thielaviopsis spp*, *Colletotrichum spp*, et *Fusarium spp*, et *Aspergillus niger* avec des pourcentages déférents. L'activité antagoniste *in vitro* a été étudié selon la méthode de confrontation par contacte directe.

13 souches de *Bacillus sp* ont été sélectionnées pour la recherche de synthétases de lipopeptides. La sélection a été faite sur la base de leurs aptitudes antagonistes.

L'importance de l'activité antifongique est estimée par mesure du rapport d'inhibition; plus- l e

rapport calculé « **R** » est inférieur à « 1 » et proche de « 0 » plus l'activité antifongique est considérée comme étant importante.

Tableau 2 : Résultats de l'activité antifongique des souches sélectionnées (Ameziane, 2014).

souches	Activité antifongique				
	Mon	Thi	Col	Fus	Asp
<i>Bacillus licheniformis</i>	0,25	0,48	0,5	0,52	0,53
<i>Bacillus subtilis</i>	0,25	0,44	0,4	0,47	0,37
<i>Bacillus licheniformis</i>	0,22	0,5	0,54	0,4	0,28
<i>Bacillus thurgiensis</i>	0,3	0,6	0,5	-	0,35
<i>Bacillus mojaensis</i>	0,25	0,5	-	-	0,34
<i>Bacillus licheniformis</i>	0,68	-	0,31	-	0,66
<i>Bacillus amyloliquefaciens</i>	0,77	0,52	-	0,63	-
<i>Bacillus cereus</i>	0,45	0,29	0,35	0,48	0,29
<i>Bacillus safensis</i>	0,28	0,45	0,37	-	0,25
<i>Bacillus licheniformis</i>	0,75	0,56	-	0,43	0,39
<i>Bacillus pumilis</i>	0,37	0,32	0,24	0,40	0,18
OGH3 <i>Bacillus mojavensis</i>	0,45	0,50	0,50	0,54	0,38
<i>Bacillus subtilis</i>	0,48	0,29	0,52	0,54	0,20



Figure 35: Résultats de l'activité antifongique vis-à-vis d'*Aspergillus niger* (Ameziane, 2014).



Figure 36 : Résultats de l'activité antifongique vis-à-vis de *Fusarium* spp (Ameziane, 2014). .

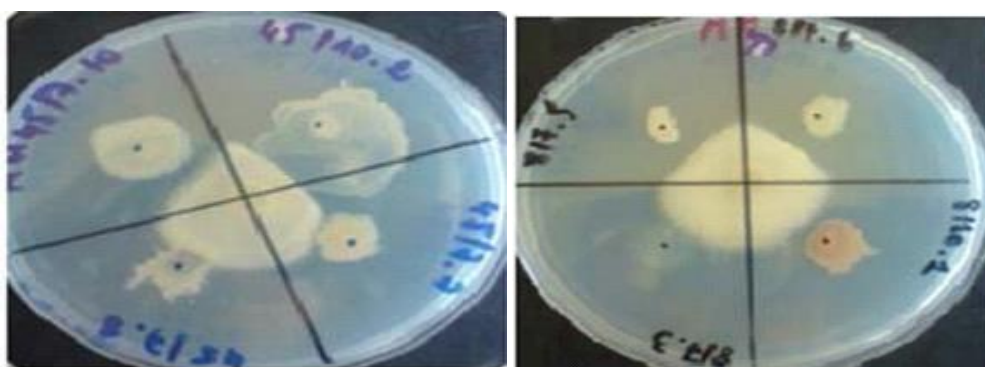


Figure 37 : Résultats de l'activité antifongique vis-à-vis de *Thielaviopsis* spp (Ameziane, 2014). .

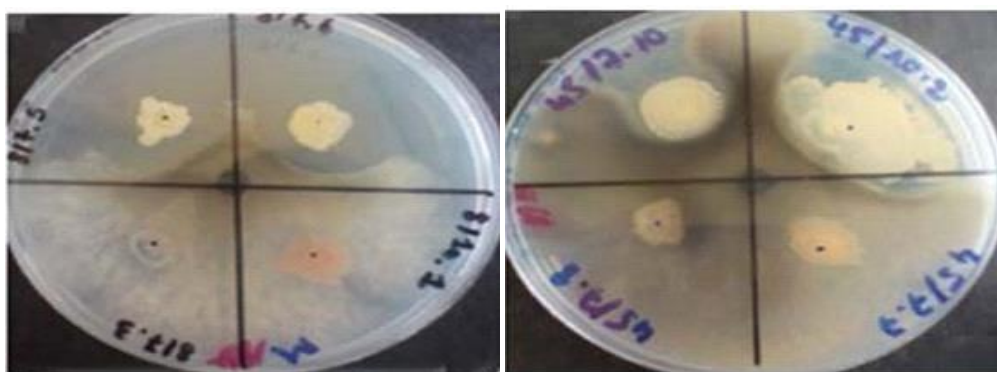


Figure 38 : Résultats de l'activité antifongique vis-à-vis de *Monilia* spp (Ameziane, 2014).

Toutefois, dans ce travail, des souches (*Bacillus licheniformis*, *cereus*, *pumilis*, *mojavensis*) qui ont montré un important antagonisme à l'encontre des mycètes testés n'ont présenté

aucune bande caractéristique de la synthétase de la mycosubtiline après l'analyse par PCR.

Une relation étroite a été démontrée entre le potentiel de l'activité antifongique et la production des deux lipopeptides en même temps, qui sont la surfactine et la fengicine.

En plus, ils ont constaté que parmi les 13 souches à haut pouvoir enzymatique sélectionnées ; 5 souches (*Bacillus licheniformis*, *Bacillus amyloliquefaciens*, *Bacillus pumilis* et *Bacillus subtilis*) révèlent une activité antifongiques considérables.

Ces souches feront l'objet d'une étude plus approfondie en plus de la phylogénie par ARNr 16S. Ils ont orienté le regard vers les deux souches *Bacillus subtilis* et *Bacillus pumilis* qui présentent une activité lipasique en parallèle avec la synthèse de la surfactine. Ces deux caractéristiques pourraient être dans le même sens d'une production de biosurfactants. Cet axe est envisagé ultérieurement comme perspectives avec ces deux souches.

A cet égard l'étude réalisée par **Ait kaki en 2013** a prouvé les capacités phytosanitaires de *Bacillus sp* *in vitro* et *in situ* des bactéries du genre *Bacillus*, isolées de divers environnements de l'Est Algérien à savoir ; l'eau du lac salé d'Ain M'lila et de la rhizosphère d'une plante située à sa proximité; de l'eau de la source thermal d'Oued El Athmanya et du sol situé à sa proximité; et enfin de la rhizosphère de la plante *Calendula officinalis*, cultivée en serre dans la région de Sétif, qui ont été identifiés comme *B. amyloliquefaciens*, *B. atrophaeus*, *B. atrophaeus*, *B. mojavensis*, *B. subtilis* subsp. *spizizenii*, *B. velezensis*, pour lesquelles il a indiqué l'existence des substances responsables d'activité contre des champignons phytopathogènes (*Alternaria alternata*, *Aspergillus niger*, *Botrytis cinerea*, *Cladosporium cucumerinum* et *Fusarium oxysporum*).

L'activité antagoniste dans ce travail a été testée *in vitro* selon la méthode de confrontation par contact directe, ainsi que *in situ* dans des conditions de pot.

Les trois souches *B. amyloliquefaciens* (9SRTS), *B. subtilis* subsp. *spizizenii* (23SRTS) et *B. atrophaeus* (6SEL) sont utilisées dans le traitement des graines et/ou du sol. En effet, plusieurs lots sont préparés, à savoir: ST-GT (sol traité- graines traitées); ST-GNT (sol traité graines non traitées); SNT-GT (sol non traité- graines traitées); SNT-GNT (sol non traité graines non traitées= Contrôle). Deux variétés de pois chiches sont utilisées, en l'occurrence, CV. Flipe 13 90 et Mega grain tradind CO. (P): Kabuli. Il est à noter que dans le cas de la

deuxième variété, seulement le lot (ST-GNT) est testé, en utilisant le *B. amyloliquefaciens* (9SRTS) et le *B. subtilis* sp. *spizezenii* (23SRTS). Les graines sont lavées trois fois avec de l'eau distillée stérile et séchées sur du papier filtre stérile. Les graines sont, ensuite, traitées avec 10 ml de suspensions bactériennes à 10^7 spores/mL et semées dans le sol naturellement infecté avec le pathogène *Sclerotonia sclerotiorum*. Le traitement du sol est réalisé en pulvérisant les mêmes suspensions bactériennes dans les puits formés à la surface. Dans chaque pot de 30 cm de diamètre, six graines sont semées et les traitements effectués sont répétés trois fois. Les données concernant l'importance de la maladie et la taille des plantes sont mesurées après 30 jours de semis. Cette expérience est effectuée selon la méthode de **Karimi et al. (2012)**. Il faut noter que les résultats de cette étude est intéressants.

Le test de l'activité antifongique appliqué sur les bactéries obtenues a révélé que 28 % des isolats ont été sélectionnés pour leur capacité à inhiber la croissance de certaines moisissures phytopathogènes les souches *Botrytis cinerea*, *Fusarium oxysporium* et *Fusarium sp*, ont fait l'objet de l'ensemble des tests répétés au long de ce travail et les résultats de taux d'inhibition de la croissance des moisissures phytopathogènes de *F. oxysporium* et *B. cinerea* sous l'effet des isolats testés.

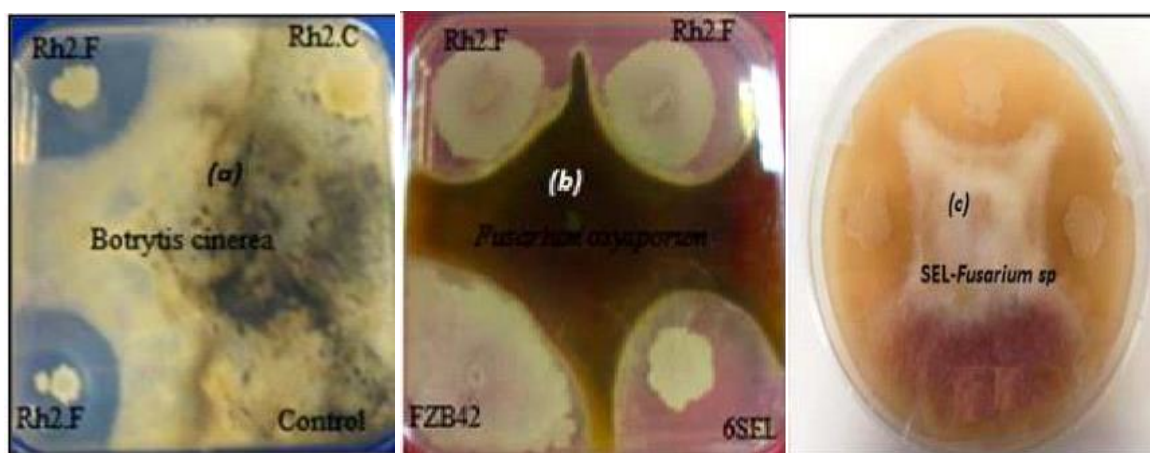


Figure 39 : Inhibition *in vitro* de la croissance des moisissures phytopathogènes: *Botrytis cinerea* (a), *Fusarium oxysporium* (b) et *Fusarium sp* (c). Les isolats antagonistes, ici, sont Rh2.F, 6SEL, SEL et la souche commerciale *Bacillus amyloliquefaciens* (FZB42) (**Ait, 2013**).

Tableau 3: Taux d'inhibition de la croissance de moisissures phytopathogènes *F. oxysporum* et *F. cinerea* sous l'effet des isolats testés (Ait, 2013).

Isolats	Taux d'inhibition de la croissance fongique(%)	
	<i>B.cinerea</i>	<i>F.oxysporum</i>
<i>B. amyloliquefaciens</i>	74,2±1,4	72,5±2,5
<i>B. amyloliquefaciens</i>	83,3±1,4	84,2±1,4
<i>B. amyloliquefaciens</i>	74,2±1,4	70,8±2,9
<i>B. amyloliquefaciens</i>	75±2,5	65,8±1,4
<i>B. amyloliquefaciens</i>	75±2,57	1,7±1,4
<i>B. atrophaeus</i>	69,2±1,4	66,7±1,4
<i>B. mojavensis</i>	2,8±3,8	65,8±2,9
<i>B. amyloliquefaciens</i>	65±2	83±2
<i>B. subtilissubsp. Spizeni</i>	48±2	39±2
<i>B. velezensis</i>	61±2	60±2

Dans les conditions de pots 4.10.1.1-Variété: CV. Flipe 13 90:

En général, le traitement du sol, naturellement infecté par *Sclerotonia sclerotiorum* (données fournies par la station INRA Algérie) et/ou des graines de pois chiches, avec les suspensions de souches ; *B. amyloliquefaciens* (9SRTS), *B. subtilis subsp. spizezenii* (23SRTS) et *B. atrophaeus* (6SEL), à concentration de 10^7 spores/ml, a permis la promotion et la protection des plantes utilisées dans l'expérience (La meilleure protection des plantes de pois chiches (variété : CV. Flipe 13 90) est observé dans le lot «sol traité-graines non traitées: ST-GNT». En effet, le pourcentage de feuilles décolorées par plante dans ce lots traités par les souches (9SRTS) et (23SRTS), est significativement plus bas ($P < 0.01$) par rapport au lot témoin (9% et 8%, respectivement, versus 63%). En revanche, la bonne croissance des plantes, est observée dans le lot «sol non graines traitées: SNT-GT» où la taille des plantes atteint 16 et 15cm versus 10cm dans le lot témoin (tableau 13). Enfin, aucune différence significative n'est observé dans le taux de germination des graines de pois chiches, entre les lots traits et le lot témoin.

Variété: Mega grain tradind CO. (P): Kabuli :

Du fait que, la meilleure protection de plantes de pois chiche variété: CV. Flipe 13 90 est

observe dans le lot «sol traité-graines non traitées : ST-GNT », le test *in situ* sur le pois chiche (variété : Mega grain tradind CO. (P) : Kabuli) est effectué par le traitement du sol, naturellement infecté par *S. sclerotiorum*, avec des suspensions (10^7 spores/ml) de souches *B. amyloliquefaciens* (9SRTS), *B. subtilis* subsp. *spizezenii* (23SRTS) et *B. atrophaeus* (6SEL). Les résultats obtenus montrent qu'après un mois de semis, seulement, le traitement avec les souches bactériennes testées, ici, ont une influence positive sur la promotion et la protection des plantes de pois chiche, dans des conditions de pots et en plein champs. En effet, la souche *B. amyloliquefaciens* (9SRTS) appliquée dans le lot ST-GNT (sol traité-graines non traitées) assure un meilleur effet sur l'augmentation la taille des plantes et la diminution de la gravité de la maladie causée par *Sclerotonia sclerotiorum*, dans le cas de la variété CV. Flipe 1390. Ces paramètres versus le témoin, estimés après un moi de semis, étaient (13 cm vs 10 cm) et (9% vs 63%). Par ailleurs, la souche (9SRTS) diminue significativement la gravité de la maladie de la variété : Mega grain tradind CO. (P) : Kabuli (41% vs. 74% : témoin), et augmente le poids des racines (0,31g vs 0,06g). Ces resultants corroborant ceux trouvés par **Karimi et al (2012)**, où plusieurs souches de *B. subtilis* (B1, B6, B28, B40, B99 et B108), avait un effet positif sur la taille des plantes de pois chiche, le poids des racines et leur protection contre *Fusarium oxysporum* f. sp. *ciceri*, estimé après un mois de semis et l'isolaB28 présentait les meilleurs effets. Par ailleurs, l'inoculation du sol infecté avec du *Fusarium oxysporum* f. sp. *ciceri*, avec cet isolat, avait un effet supérieur, par rapport au lot de grains traitées et semis dans le même type de sol. En effet, le pourcentage de réduction de la maladie était 44% et 39%, respectivement dans ces deux lots (**Karimi et al., 2012**). En revanche, (**Moradi et al., 2012**) ont montré l'absence de différence significative entre l'effet d'inoculation du sol et celui du traitement des graines sur le développement des plantes de pois chiche (variété Pirooz et variété Hashem).

Les analyses de spectrométrie de masse couplée à l'HPLC (LC-MS.MS), avec une méthode de fragmentation, type CID (collision-induced dissociation), appliqué sur l'extrait des fengycines produites par *B. amyloliquefaciens* (ET) ont permis de déceler que la majorité des homologues de fengycines produits par cette souche sont à chaîne d'acide gras insaturé, en plus des nouveaux homologues de fengycines A et B, ayant des chaînes d'acides gras à 20 et à 18 atomes de carbone, respectivement, chose qui est rare chez les membres du groupe *B. subtilis*. Par ailleurs, deux nouvelles variantes de fengycines ont été décrites pour la première fois dans ce travail.

La deuxième partie de la synthèse analyse brièvement l'ensemble des recherches réalisées au Maroc.

La première étude réalisée par **El Hasani et al en 2007** qui ont isolé *Bacillus amyloliquefacience* à partir des rhizosphères de la pomme de terre (à Marrakeche) et ils ont testé l'effet antagoniste par la méthode co-culture côte à côte sur des plaques PDA de pathogène et d'autres antagonistes. Les suspensions de chaque *Bacillus sp* étaient striées au centre de chaque plaque de culture. Après 0–48 h d'incubation, deux disques de 5 mm de culture de *F. osysporum f. sp. Albedinis* de 7 jours placés à 2,5 cm l'un de l'autre de chaque côté de *Bacillus sp* striés. Les plaques ont ensuite été incubées à $25 \pm 2^\circ \text{C}$. Le pourcentage de l'inhibition a été évalué en mesurant le rayon de la colonie de *F. osysporum f. sp. Albedinis* du côté *Bacillus sp*. Le rayon de la colonie d'un témoin cultivé en absence de *Bacillus sp* a également été noté. Les mesures ont été prises après 2 à 6 jours. Des échantillons d'incubation et de mycélium de *F. osysporum f. sp. Albedinis* ont été collectés à partir de la région d'interface avec d'autres *Bacillus sp* testés, est observé sous microscope optique. Dix jours après l'incubation, des disques de 5 mm ont été récoltés à la périphérie des colonies de *F. osysporum f. sp. Albedinis* sur le côté de *Bacillus sp* testés et mis en suspension dans un volume approprié d'eau distillée stérile. La sporulation de *F. osysporum f. sp. Albedinis* était déterminé au microscope à l'aide d'un hémacytomètre et les résultats ont été exprimés en nombre de conidies par cm^2 de colonie.

Ils ont observé une inhibition de 23 % de croissance mycélienne du *F. osysporum f. sp. Albedinis*, *Bacillus amyloliquefacience* réduit significativement la sporulation à $(4,57 \times 10^5)$ conidies/ cm^2 du *F. osysporum* par rapport au contrôle négatif $(55,11 \times 10^5)$ après 10 jours d'incubation au milieu PDA.

Dans la même étude ont isolé *Bacillus pumilus* à partir de Rhizosphère de pomme de terre également et ils ont testé l'effet par la même méthode motionné au-dessus contre les mêmes champignons, *in vitro* *B. pumilus* réduit la sporulation à $(7,48 \times 10^5)$ conidies/ cm^2 de *F. oxysporum* et *Fusarium sp* par rapport au contrôle négatif $I = (55,11 \times 10^5)$ après 10 jours d'incubation au milieu PDA.

Une autre étude réalisée par **Ait Barka et al en 2007** qui ont isolé *Bacillus subtilis* pour tester l'effet antagoniste contre *F. osysporum f. sp. albedinis* la méthode de co-culture coté à coté.

In vitro, *B. subtilis* réduit significativement la sporulation à $(2,38 \times 10^5)$ conidies/ cm^2 de *F.*

osysporum f.sp.albedinis par rapport au control négatif (55,11×105) après 10 jours d'incubation au milieu PDA.

Les maladies causées par les phytopathogènes ont des répercussions graves sur l'économie mondiale. A l'instar des autres pays, les pesticides chimiques polluant l'environnement restent la principale mesure pour traiter les cultures infectées au Algérie. Afin de pallier ce problème, des microorganismes peuvent être utilisés comme des agents de lutte biologique potentiels pour combattre les phytopathogies. Ainsi, plusieurs études Algériennes et marocaines ont mis l'accent sur leur activité antimicrobienne. Effectivement, à travers notre synthèse bibliographique, nous avons pu recenser plusieurs *Bacillus sp* isolés à partir des biotopes Algérien et marocains et capables d'inhiber la croissance des phytopathogènes.

Il faut signaler que presque tous les *Bacillus sp* isolé à partir des zones extrémophiles ont présenté l'effet le plus important contre les champignons phytopathogène.

À cet égard, d'autres enquêtes sont nécessaires pour purifier les métabolites bioactifs responsables d'effets antimicrobiens de ces microorganismes et d'évaluer leur impact sur un large éventail de phytopathogènes sur le terrain, couplées à d'autres investigations ciblant l'évaluation des coûts et la sécurité d'application des microorganismes trouvés pour la protection des cultures en tant que bio-pesticides.



Conclusion

Les biotopes algérienne offrent un vaste champ d'investigation pour l'isolement de nouvelles souches de *Bacillus sp* , en l'occurrence, de nouvelles molécules ayant une application en lutte biologique.

Le but principal de notre travail de recherche était de réaliser une étude comparative entre le pouvoir antagoniste de différentes espèces du genre *Bacillus sp* contre les champignons phytopathogènes, selon un ensemble de recherches qui ont déjà été menées à l'échelle nationale et au Maroc à fin d'évaluer la valorisation des potentialités de ce genre de bacilles dans la lutte biologique.

Les recherches actuelles constituent donc un véritable pont de passage entre l'utilisation de molécules chimiques ayant un impact sur la santé humaine et/ou animale à court ou à long terme, vers l'utilisation de biomolécules naturelles ou molécules « vertes ». De ce fait, il serait intelligent que cet arsenal biologique de molécules naturelles trouve son application réelle dans les différents domaines de la vie.

L'analyse de résultats de la littérature de l'ensemble de ses travaux dans le cadre de la lutte biologique a montré que les souches de *Bacillus sp* sont des bio-pesticides potentiellement intéressantes pour lutte contre les champignons phytopathogènes notamment les *Bacillus* extrémophiles et halotolérantes qui ont révélés la meilleure activité antifongique.

Les résultats de l'activité antifongique de ces travaux nous ouvrent des voies de recherche intéressantes telles que:

- ✓ En savoir plus sur les nouvelles espèces du genre *Bacillus sp* pas encore décrites.
- ✓ Recherche d'autres potentialités de *Bacillus* vis-à-vis d'autres microorganismes non seulement les champignons.
- ✓ L'étude de la potentialité des nouvelles molécules antifongique produites par l'espèce du genre *Bacillus* contre les champignons phytopathogènes dans le cadre de la lutte biologique.

La lutte biologique est née d'un certain échec de la lutte chimique, et a prouvé qu'elle forme une alternative fiable de la lutte chimique à raison de ses avantages concernant les enjeux économiques ainsi que l'équilibre biologique et environnemental.



Références bibliographiques

A

- **Argenson C., Regis S., Jourdain J., M., Yaysse P.** L'olivier. Ctifl, France, (1999) : pp 204.
- **Alabouvette C., Bremeersch L.** Les dégâts causent par *Macrophomina phaseoli* dans les cultures de tournesol Defence des vegetaux. 173, (1975) : pp 125-131.
- **Agrios GN.** Plant Pathology. 3ème Edition Academic Press INC, London, (1988): pp 845.
- **Avis, T, J., Gravel ,V., Antoum, H., Tweddell , R.J.** Multifaceted beneficial effects of rhizosphere microorganisms on plant health and productivity. Soil Boil Biochem, 40, (2008): pp 1733-1740.
- **Al-shebel S.M.** Studies on fungal olive diseases in AL-jouf and Riyadh Regions Kingdom of Saudi Arabia. No.SP, (2005): pp 8-46.
- **Asma A K.** Recherche de nouvelles potentialités de bactérie d genre *Bacillus* pour l'agriculture et l'agro-alimentaire. Thèse de doctorat en Biotechnologie, Biologie et Environnement, Université Constantine, (2014): 113 pp.
- **Ahimou, F. Jacques, P., Deleu, M.** Surfactin and iturin A effects on *Bacillus subtilis* surface hydrophobicity. Enzyme Microb. Technol, 27, (2000): pp 749-754.
- **Asaka, O., Shoda, M.** Biocontrol of *Rhizoctonia solani* damping-off of tomato with *B. subtilis* Rb14. Appl Environ Microbiol, 62, (1996): pp 4081–4085.
- **Aouar L; Sylvain L; Ammar O; Abderrahmane B et Carole B.** Taxonomie identification of rhizospherie actinobacteria isolated from Algerian semi-arid soil exhibiting antagonistes activities against plant fungal pathogens. Canadian journal of plant Phatology, (2012): pp 165-176.
- **Ait-Kaki, A., Kacem-Chaouche, N., Ongena, M., Kara-Ali, M., Dehimat, L., Kahlat, K., & Thonart, P.** In vitro and in vivo characterization of plant growth promoting *Bacillus strains* isolated from extreme environments of Eastern Algeria. Applied Biochemistry and Biotechnology, 172(4), (2014): pp 1- 1735.
- **Amouretti MC and Comet G.** Artisanat et matériaux : (la place des matériaux dans l'histoire des techniques). Cahiers d'histoire des techniques, (1998) : pp 251.

- **Amziane T M.** Screening de souches du groupe *Bacillus* à partir de micro-habitat de zones arides. Phylogénie, mise en évidence et caractérisations de métabolites. Thèse de Doctorat, Université des sciences et de la Technologie Houari Boumediene, (2014): 222pp.
- **Ait B E.** Interaction entre la vigne, *Vitis vinifera* L. , et une bactérie endophytique, *Burkholderia phytofirmans* souche PsJN : colonisation, induction de défenses et résistance systémique contre *Botrytis cinerea*. Thèse de Doctora en Biologie et physiologie végétales, (2007).
- **Antoun, H., Prevost, D.** Ecology of plant growth promoting rhizobacteria. PGPR: Biocontrol and Biofertilization. Siddiqui, Z.A, (2012) : pp 38.

B

- **Bradbury, J.F.** Guide to plant pathogénique bacteria. CAB International Mycological Institute, Kew, UK, (1986): p 332.
- **Boulsen B Z et Bouraui N.** Etude sur la tuberculose de l'olivier ; isolement et identification présomptifs de quelques isolats bactériens à partir des tumeurs. Mémoire de master, Université des Frères Mentouri Constantine, (2016) : 79p.
- **Bellahcene M.** La verticilliose de l'olivier : étude épidémiologique et diversité génétique de *Verticillium dahlia kleb*, Agent de la verticilliose. Thèse de doctorat, Université Orane (Algérie), (2004) : 144pp.
- **Boulila M., Mahjoub M.** Inventaire des maladies de l'olivier en Tunisie. Bulletin OEPP/EPPO Bulletin, 24 (4), (1994 Décembre) : pp 817-823.
- **Boulila M.** Current knowledge on major disorders of olive in Tunisia. Revue Ezzaitouna, 12 (1), (2011) : pp 1-7.
- **Boosalis M.G., Scharen A.L.** Methods for microscopic detection of aphanomyces eutiches and *rhizoctonia solani* and for isolation of *rhizoctonia solani* associated with plant debris. Phytopathology, 49 (4), (1959): pp 192-198.
- **Bridier A, Le Coq D, Dubois-Brissonnet F, Thomas V, Aymerich S, Briandet R.** The spatial architecture of *Bacillus subtilis* biofilms deciphered using a surface-associated model and in situ imaging. PLoS One, 6(1), (2010).

- **Bhattacharya D., Dhar T.K., Siddiqui K.A.I., Ali E.** Inhibition of seed germination by *Macrophomina phaseolina* is related to phaseolinone production. J. Appl. Bacteriol, 77, (1994): 129-133.
- **Basallote-Ureba M.J., Prados-Ligero A.M., Melero-Vara J.M.** Effectiveness of tebuconazole and procymidone in the control of *Stemphylium* leaf spots in garlic. Crop Protection, 17, (1998): pp 491-495.
- **Bonjar G.H.S., Aghighi S.** Chitinolytic and microsclerostatic activity of Iranian strains of *Streptomyces plicatus* and *Frankia* sp. On olive isolate of *Verticillium dahliae*. Biotechnology, 4, (2005): pp 108-113.
- **Bounoua M.D.** Essais d'utilisation des *Pseudomonas* spp. et *Bacillus* spp. dans le biocontrôle de *Fusarium oxysporum f.sp. lycopersici* sur tomate et *Verticillium dahliae* sur l'olivier. Mémoire de magister, Université d'Oran (Algérie), (2008) : 90 pp.
- **Boukenadel F.** Contribution à l'étude de *Verticillium dahliae* Kleb., agent de la verticilliose de l'olivier. Mémoire de magister, Université de Tlemcen (Algérie), (2001): 103 pp.
- **Benchabane M.** Observation des cas de verticilliose de l'olivier à cap Djinet et Sidi-Aïch. Rapport de mission. ITAF, Algérie, (1990) : 5 pp.
- **Breton C, Bervillé A.** L'histoire de l'olivier. 1 ère Edition , Quæ, (2012) : pp 224.
- **Basim H., Basum E., Abdulai M., Baki D., Oztürk N.** Identification and characterization of *Alternaria alternata* causing leaf spot of olive tree (*Olea europaea*) in Turkey. Crop Protection, 92, (2017): pp 83-89.
- **Beck J.S., Danks F.** Determinación del umbral de tratamientos para la mosca del olivo (*Bactrocera oleae* Gmel, Diptera, Tephritidae) en olivar destinado a la producción de aceite. Bol.Sanid. Vegetal Plagas , 21 (4), (1983) : pp 577-588.
- **Bartolozzi F., Fontanazza G.** Assessment of frost tolerance in olive (*Olea europaea* L.). Sci. Hort, 81, (1999): pp 309-319.
- **Bais, H. P., Weir, T. L., Perry, L. G., Gilroy, S., Vivanco, J. M.** the Role of Root Exudates in Rhizosphere Interactions with Plants and Other Organisms. Rev. Plant Biol, 75, (2006): pp 233-266.
- **Bonmatin, J.M., Laprévote, O., Peypoux, F.** Diversity among microbial cyclic lipopeptides: iturins and surfactins. Activity-structure relationships to design new bioactive agents. Comb. Chem. High Throughput Screen, 6, (2003): pp 541-556.

- **Besson F., Peypoux F., Michel G. & Delcambe L.** Antifungal activity upon *Saccharomyces cerevisiae* of iturin A, mycosubtilin, bacillomycin L and of their derivatives; inhibition of this antifungal activity by lipid antagonists. *J. Antibiot*, 32, (1979): pp 828-833.
- **Besson F. & Michel G.,.** Action of mycosubtilin, an antifungal antibiotic of *Bacillus subtilis*, on the cell membrane of *Saccharomyces cerevisiae*. *Microbios*, 59, (1989): pp 113-121.
- **Bland J.M., Lax A.R. & Klich M.A. (1991).** Structure activity studies of the iturins. not GLP. In *Peptides* (edited by Giralt D. & Andreu D), pp: 426-427. Leiden, The Netherlands.
- **Benizri E; BaudoinE; Di Battista L et Guchert A.** Des bactéries pour la santé des plantes. *Bio Future*, 210, (2001): pp 52-56.
- **Benjama A.** méthodes d'évolution rapide du degré d'attaquede l'olivier par la tuberculose causée par *Pseudomonas savastanoi* pv. *Savastanoi*, en verger au Maroc. *Fruits*, 58, (2003): pp 213-219.
- **Boujhari R ; Kiciri S ; Gaouar S.B.S. (2017).** Les variétés d'olivier à diffusion très restreinte dans l'Est Algérien : Un potentiel génétique non exploité, une richesse en voie de disparition. In *Le Secteur Oléicole : Contraintes, Enjeux et Défis*, pp : 1-16.
- **Benderradji L ; Djebri Z ; Rebbas K ; Ghadbane M ; Bounar R; Benniou R.** Oléiculture dans la région d'El-Hodna (M'sila, Algérie): état des lieux et régénération in vitro de l'olivier. *Revue Agriculture*, 1, (2016): pp 259-264.
- **Behamou N; Nicole M.** Cell biology of plant immunization against microbial infection: the potential of induced resistance in controlling plant diseases. *Plant Physiology and Biochemistry*, 37, (1999): pp 703-719.
- **Besson F., F Peypoux., G Michel and L Dulcambe.**Structure of Bacillomycin L, antibiotique de *Bacillus subtilis*. *Eur. J. Biochem*, 77, (1977): pp 61-67.
- **Barnett H.L., Barry Hunter B.** Illustrated genera of imperfecti fungi. Third Edition, Burgess Publishing Company, (1972): pp 239.
- **Bouzerouata A.** Applicationde *Bacillus spp.*mésophile dans la lutte biologique. Diplôme de Master en Biologie, Université Abou-Bakr Belkaid –Tlemcen, (2017): 65pp.

C

- **Ceikh M.** Caractérisation des Acides Gras de l'Huile d'Olive de Sabra en corrélation avec l'évaluation Sensorielle et l'Analyse Physico-chimique. Mémoire de Master en Sciences des Aliments, Université de Tlemcen, Tlemcen, (2016) :67P.
- **Civantos L.** Contrôle des parasites et des maladies de l'olivier. Conseil Oléicole International, Madrid, Espagne, (1999) : pp 207.
- **Chawla S., Woodward JE., Wheeler T.A.** Influence of *Verticillium dahliae* Infested Peanut Residue on Wilt Development in Subsequent Cotton. International Journal of Agronomy, 2012, (2012 June 20) : pp 1-5.
- **CsÖndes I., Cseh A., Taller J., Poczai P.** Genetic diversity and effect of temperature and pH on the growth of *Macrophomina phaseolina* isolates from sunflower fields in Hungary. Mol Biol Rep, 39 (3), (2012 June 22) : pp 3259-3269.
- **Crous P.W., Slippers B., Wingfield M.J., Rheeder J., Marasas W.F.O., Philips A.J.L., Alves A., Burgess T., Barber P., Groenewald J.Z.** Phylogenetic lineages in the Botryosphaeriaceae. J. Mycol, 55, (2006): pp 235-253.
- **Cloud G.L., Rupe J.C.** Comparison of three media for enumeration of sclerotia of *Macrophomina phaseolina*. Plant. Dis, 75, (1991) : pp771-772.
- **Campbell C.L., Van der Gaag D.J.** Temporal and spatial dynamics of microsclerotia of *Macrophomina phaseolina* in three fields in North Carolina over four to five years. Phytopathology, 83, (1993): pp 1434-1440.
- **Corbaz R.** Principe de phytopathologie et de lutte contre les maladies des plantes. Pressepolytechniques et universitaires romandes, Canada, (1990) : pp 56.
- **Carrión Y, Ntinou M, Badal E.** *Olea europaea* L in the North Mediterranean Basin during the Pleniglacial and the Early-Middle Holocene. Quat Sci Rev, 29, (2010): pp 952-968.
- **Cresti M., Linskens H. F., Mulcahy D. L., Bush S., Di Stilio V., Xu M.Y., Vignani R., Cimato A.** Preliminary communication about the identification of DNA in leaves and olive oil of *Olea europaea*. Adv. Hort. Sci, 10, (1996): pp 105-107.
- **Commare, R.R., Nandakumar, R., Kandan, A., Suresh, S., Bharthi, M., Raguchanger, T., Samiyappan, R.** *Pseudomonas fluorescens* based formulation for

the management of sheath blight disease and leaf folder insect to rice. Crop Prot, 21, (2002): pp 671-677.

- **Coutte F.** Production Sélective de lipopeptides par *Bacillus subtilis* en bioreacteur à membrane. Thèse, Université Lille 1, France, (2009).
- **Cawoy H, Mariutto M, Henry G, Fisher C, Vasilyeva N, Thonart P, Dommes J, Ongena M .** Plant defense stimulation by natural isolates of *Bacillus* depends on efficient surfactin production. Mol Plant Microbe Interact, 27, (2014): pp 87-100.
- **Costache M, Lacatusu V, Tomescu A, Mandricel M.** Studies on the factors predisposing cucumber plants to infection by *Fusarium oxysporum f.sp. cucumerinum* and *Verticillium dahlia*. Probleme de protectia plantelor, 7(1), (1979): pp 51-60.
- **Chérif M; Sadfi N; Benhamou N; Boudabous A ; Hajlaoui M R; Tirilly I.** Ultrastructurale and cytochemical aspects of the interaction of the antagonistic bacteria *Bacillus cereus* X16 and *Bacillus thuringiensus* 55T with *Fusarium var. sambucinum* in vitro. Journal. Plant Pathol, (2002).
- **Chtioui O.** Production sélective de lipopeptides par *Bacillus subtilis* en bioréacteur à disques tournants. Tthèse de doctorat, Lille, Université Lille I sciences et technologies, (2011) : 196 pp.

D

- **Daayf F.** La verticilliose du cotonnier, pouvoir pathogene et diversité génétique de *Verticillium dahliae*. Réaction de la plante à l'infection. Thèse de doctorat, Université des sciences et techniques de Montpellier, France, (1993) : 202p.
- **Dhingra O.D., Sinclair J.B.** annotated bibliography of *Macrophomina phaseolina*. Universidade Federal de Vicosa, Minas Gerais, Brazil, (1977) : 244 pp.
- **Davis V.M., Stack M.E.** Mutagenicity of stemphytoxin III, a metabolite of *Alternaria alternata*. Appl. Environ. Microbiol, 57(1), (1991) : pp 180-182.
- **Dhingra O.D., Sinclair J.B.** An annotated bibliography of *Macrophomina phaseolina*. Thèse de doctora, universidade Federal de Vicosa, Minas Gerais, Brazil, (1977) : 244 pp.

- **D'Hondt-Defrancq, M.** Les principales maladies bactériennes et cryptogamiques de la pomme de terre. Cours International sur la culture de la Pomme de Terre. Cambérène, (2015) : 20 pp.
- **Diaz A., Rallo P., De la Rosa R.** Self- and cross-incompatibility mechanism: a strategy to ensure high variability in olive populations. Olea, 25, (2006): pp 29-35.
- **De Andrés Cantero A.** Catálogo de parásitos del olivo. Bol. Serv. Plagas, 2, (1975): pp 1-189.
- **Delarras, C.** Microbiologie pratique pour le laboratoire d'analyses ou de contrôle sanitaire. Lavoisier, (2007): pp 476.
- **Drablos, F., Nicholson, D., Ronning, M.** Exafs study of zinc coordination in Bacitracin A. Biochim. Biophys. Acta, 1431, (1999): pp 433-442.
- **Daniels, R. Vanderleyden, J., Michiels, J.** Quorum sensing and swarming migration in bacteria. FEMS Microbiol. Rev, 28, (2004): pp 261-289.
- **Delcambe L , Peypoux F, Besson F , Guinand M, Michel G .**Structure of iturin and iturin-like substances (proceedings) . Biochem Soc trans, 4, (1977): pp 1122-1124.
- **De Boer M; Van Dre Slui I; Van Loon I C; Bakker P.A.H.M.** Combining fluorescent *Pseudomonas spp* strain to enhance suppression of *Fusarium wilt* of radish. European Journale of Plant Pathology, 105, (1999): pp 201-210.

E

- **EL Mahjoub M., Bouzaidi A., Jauhri A., Hamrouni A., EL Beji M.** Influence de la salinité des eaux d'irrigation sur la sensibilité du tournesol au *Macrophomina phaseoli*. Annales de Phytopathologie, 11, (1891) : pp 61-67.
- **El HassniM., El Hadrami A., Daayf F., Chérif M., Ait Barka E and El Hadrami I.** Biooical control of bayoud disease in date palm : Selection of micro-organisms inhibiting the causal agent and inclucing defense relations. Environ Exp Bot, 59, (2007): pp 224-234.

F

- **Fradin E.F., Thomma B.P.H.J.** Physiology and molecular aspects of *Verticillium wilt* diseases caused by *V. dahliae* and *V. albo-atrum*. Mol. Plant. Pathol, 7 (2), (**2006 Mars 1**) : pp 71-86.
- **Fabbri A., Benelli C.** Flower bud induction and differentiation in olive. J. Hort. Sci. Biotech, 75, (**2000**): pp 131-141.
- **F A O, 2009.**
- **F A O, 1999.**
- **Fouraste. I.** Etude botanique « l'olivier ». Faculté des Sciences Pharmaceutiques de Toulouse, (**2002**) : pp 10.
- **FABRE, 2020.**
- **Francis, I., Holsters, M., Vereecke, D.** The Gram-positive side of plant-microbe interactions. Environmental Microbiology, 12, (**2010**) : pp 1-12.

G

- **Gaussourgues R.** L'olivier et son pollen dans le bassin méditerranéen. Un risque allergique. Revue Française D'allergologie, (49), (**2009**) :(52-56).
- **Ghedira K.** L'olivier, Phytothérapie. (6), (**2008**): pp 83-89.
- **Garber R.H., Houston B.** Penetration and development of *Verticillium albo-atrum* in cotton plants. J. Phytopathol, (56), (**1966**): pp 1121-1126.
- **Ghezlaoui, M.** Influence de la variété, Nature du sol et les conditions climatiques sur la qualite des huiles d'olives des varietes Chemlal, Sigoise et d'Oléastre dans la Wilaya de Tlemcen. Thèse de magister, Université de Tlemcen, (**2011**) : 205pp.
- **Geiser , D.M., Aoki, T., Bacon, C.W., et al.** One fungus, one name: Defining he genus *Fusarium* in a scientifically robust way that preserves longstanding use. Phytopathology, 103, (**2013**) : pp 400-408.
- **Girona J, Luna M, Arbone´s A, Mata M, Rufat J, Marsal J.** Respuesta de olivos jo´venes (*Olea europaea*, cv. „Arbequina“) adiferentes cantidades de agua de riego. Determinacio´n de lasfunciones de produccio´n. Fruticultura Prof, 120, (**2001**): pp 29-34.

- **Guez Js , chenikher S, Cassar JP , Jacques P.** Setting up and modelling of overflowing fed-batch cultures of *Bacillus subtilis* for the production and continuous removal of lipopeptides .J Biotechnol, 1, **(2007)**: pp 67 -75.
- **Giraud J.** Microbiologie alimentaire. Edition Donod, Paris, **(1998)** : pp 330.

H

- **Hiemstra J. A. (1998).** Some generale features of *Verticillium wilts* in trees. In A Ompendium of *Verticillium wilts* in trees species. (Edited by Ponsen and Looigen, Wageningen), pp 8-11, UK, The Netherlands.
- **Hanson L.E.** Reductionof *Verticillium* wilt symptoms in cotton following seed treatment with *Trichoderma virens*. J. Cotton. Sci, 4, **(2000)**: pp 224-231.
- **Heffer V. and R. Regan.** *Verticillium* wilt of ash. The Digger, **(1995 June)**: pp 48-49.
- **Hemza B.** Contribution à l'étude de l'effet de l'irrigation et la fertilisation azotée et potassique sur les performances productives et qualitatives de l'olivier suoer-intensif. Thèse de doctorat, Université de Lleida, **(2016)** : 201 pp.
- **Himour S.** Etude comparée de régénération de plants par voie végétative en culture in vitro. Mémoire de Magister en en biologie et physiologie végétale, Université Mentouri, Constantine, **(2006)** : pp 92 pp.
- **Hosen M.I.** Cultural, physiological comparison and fungicidal sensitivity between two **Iacobellis, N.S. (2001).** In Encyclopedia of Plant Pathology (edited by Maloy& T.D Murray), pp 713-715. Olive knot.
- **Haddou D.** L'infestation de la Teigne de l'olivier dans quelques vergers. Mémoire de master en agronomie, Université de Tlemcen, **(2017)**: 76 pp.
- **Heydari, A., et Pessarakli, M.** A review on biological control offungal plant pathogens using microbial antagonists. J. Biol. Sci, 10(4), **(2010)**: pp 273-290.
- **He CP. , Fan LY., Wu WH , Liang YQ, Li R., Tang W , Zheng XL, Xiao YN, Liu ZX ., Zheng FC.** Identification of lipoprtides produced by *Bacillus subtilis* CZK1 isolated from the aerial roots of rubber trees .Genetics and Molecular Research, **(2017)**: pp 1-16.
- **Harris, A. W., Young, J. W., Bowell, E., Martin, L. J., Millis, R. L., Poutanen,**

- M., ... & Zeigler, K. W. Photoelectric observations of asteroids 3, 24, 60, 261, and 863. *Icarus*, 77(1), (1989): pp 171-186.
- HAMLAOUI, L.; DEHOUM, H. et CHEBABHI, K. Contribution à l'étude de la lutte biologique des champignons phytopathogènes par l'utilisation de *Bacillus sp.* Mémoire de master, Université Mohamed Boudiaf-M'sila, (2005) : 28 pp.

I

- **Inderbitzin P., Mehta J.Y.R., Berbee M.L.** Pleospora species with Stemphylium anamorphs: a four locus phylogeny resolves new lineages yet does not distinguish among species in the Pleospora herbarum clade. *Mycologia*, 101 (3), (2009): pp 329-339.

J

- **Julien J.** Verticilliose des arbres; la mort par apoplexie. *PHM-Revu.* (474), (2005) : pp 44-47.
- **Janse, J.D.** *Pseudomonas syringae subsp. savastanoi ex Smith subsp. nov., nom. rev.*, the bacterium causing excrescences on *Oleaceae* and *Nerium oleander L.* *International Journal of Systematic Bacteriology*, 32 (2), (1982 April): pp 166-169.
- **Jourdan, E., Henry, G., Duby, F., Dommes, J., Barthelemy, J.P., Thonart P., Ongena, M.** Insights into the defense-related events occurring in plant cells following perception of surfactin-type lipopeptide from *Bacillus subtilis*. *Mol. Plant Microbe Interac*, 22, (2009): pp 456–468.
- **Jacques P., Krier F., Derave J., Béchert M., Leclere V., Chollet M., Coucheney F., Boistel C., Lemièrre S., Hofle M., Van Hese N., D'aes J., Pauwelyn E., Orgena M., Cawoy H., Henry G., Ait Barka E., Dorey S., Jacquard C., France G., Fernandez O., Reignault P., Randoux B., K hong G., Tisserant B., Delanode L., Temmerman F., Bogaert A., Van Nieuwenhuysse P., Cap N., Beyers T.** Les lipopeptides d'origine microbienne des substances testées au laboratoire sous serre au champ se montrent

prometteurs comme agents de biocontrôle aux multiples facettes. *Phytoma*, 672, (2014): pp 38-42.

K

- **Klosterman SJ, Atallah ZK, Vallad GE, Subbarao K.V.** Diversity, pathogenicity and management of *Verticillium species*. *Annu. Rev. Phytopathol* (47), (2009): 39-62.
- **Kaisar S.A.K.M., Das S.N.** Physical factors that influence the growth and spread of charcoal rot pathogen (*Macrophomina phaseolina*) infecting maize. *J. Phytopathol*, 123, (1988): pp 47-51
- **Karajeh M., Al-Raddad A.** Effect of VA mycorrhizal fungus (*Glomus mosseae* Gerd & Trappe) on *Verticillium dahliae* Kleb of olive. *Dirasat. Agric. Sci*, 26, (1999): pp 338-341.
- **Kapulnik Y., Tsrer L., Zipori I., Hazanovsky M., Wininger S., Dag A.** Effect of MF application on growth, productivity and susceptibility to *Verticillium wilt* of olives grown under desert conditions. *Symbiosis*, 52, (2010): pp 103-111.
- **Kasraoui, M.F.** L'olivier. Consulté in <http://www.kasraoui.com>. Le : 2016.
- **Kinsinger R.F., Shirk M.C., Fall R.** Rapid surface motility in *Bacillus subtilis* is dependent on extracellular surfactin and potassium ion. *J. Bacteriol*, 185, (2003): pp 5627-5631.
- **Koumanov K.S. et al.** Comparative lipid analysis and structure of detergent-resistant membrane raft fractions isolated from human and ruminant erythrocytes. *Arch. Biochem. Biophys*, 434, (2005): pp 150-158.
- **Kiffer E., Morelet M.** The Deuteromycetes: mitosporic fungi, classification and generic keys. Enfield, NH, (2000): pp 120.
- **Kakinuma Y., M Sugiyama and M Kaneda.** Bacilpeptins nex cyclic lipopeptide antibiotic from *Bacillus subtilis* FR-2. *J. Antibiot*, 48(10), (1995): pp 1095-1103.
- **Kowal M., J Vater., B Kluge., T Stein., P Franck and D Ziessow.** Separation and characterization of surfactin isoforms produced by *Bacillus subtilis* OKB 105. *J. Colloid. Interface Sci*, 204, (1998): pp 1-8.

- **Kakana P.** Etude de la biosynthèse des lipopeptides par *Bacillus subtilis* et de leurs potentialités d'utilisation dans la lutte biologique au Burundi. Thèse de doctora, Faculté universitaire des sciences agronomiques de Gembloux, (2005): 219 pp.
- **Karimi, K., Amini, J., Harighi B., Bahramnejad, B.** Evaluation of biocontrol potential of *Pseudomonas* and *Bacillus spp.* against *Fusarium wilt* of chickpea. AJCS. 6, (2012): pp 695-703.

L

- **Lacobellis, N.S. (2001).** Olive knot. . In Encyclopedia of Plant Pathology. (Edited by Maloy& T.D Murray), pp 713-715. John Wiley and sons, NewYork, USA.
- **Laouane H., Lazrek H.B., Sedra M.H.** Synthesis and toxicity evaluation of cinnamyl acetate: a new phytotoxin produced by a strain of *Verticillium dahlia* 252 pathogenic on olive tree. Intl. J. Agr. Biol, (13), (2011) : PP 344-346.
- **Lavini A., Jardak T.** Conseil Oléicole Internationale. Technique de production enoléiculture. 1ère édition, ISBN, Madrid (Espagne), (2007) : pp 348.
- **Larone D.H.** Medically Important Fungi: A Guide to Identification. 2nd Ed, American Society for Microbiology, Washington DC, (1995): pp 135.
- **Labdaoui D.** Impact socio-économique et environnemental de modèle d'extraction des huiles d'olives à deux phases et possibilité de sa diffusion dans la région de Bouira (Algéri). Thèse de doctora, Université Abdelhamid Ibn Badis de Mostaganem, (2017): 178 pp.
- **Leva A., Petruccelli R., Montagni G., Muleo R.** Field performance of micropropagated olive plants (cv. Maurino): morphological and molecular features. Acta. Hort, 586, (2002): pp 891-893.
- **Loussert R. Et Brousse C.** L'olivier, Techniques culturales et productions méditerranéennes, C.P, Maisonneuve et larouse, Paris, (1978): pp 473.
- **Laumonier R.** Cultures fruitières Méditerranéens. Bailliére J .B. et fils, Paris, France, (1960).

- **Landa,B.B., Hervas , A.,Bethiol,W.,Jimenez-Diaz,R.M.** Antagonistic Activity of bacteria from the chickpea rhizosphere against *Fusarium oxysporum f.sp.ciceris*. *Phytoparasitica*, 25, (1997): pp 315-318.
- **Leclère, V., Bechet, M., Adam, A., Guez, J. S., Wathelet, B., Ongena, M., Thonart, P., Gancel, F., Chollet-Imbert M., Jacques, P.** Mycosubtilin overproduction by *Bacillus subtilis* BBG100 enhances the organism's antagonistic and biocontrol activities. *Appl. Environ. Microbiol*, 71, (2005): pp4577-4584.
- **Leclere, V., Marti, R., Béchet, M., Fickers, P., Jacques, P.** The lipopeptides mycosubtilin and surfactin enhance spreading of *Bacillus subtilis* strains by their surfaceactive properties. *Arch. Microbiol*, 186, (2006): pp 475–483.
- **Larkin R.P; Fravel D.R.** Efficacy of various fungal and bacterial biocontrol organisms for control of *Fusarium wilt* of tomato. *Plant Dis*, 82, (1998): pp 1022-1028.
- **Lugtenberg, B., Kamilova, F.** Plant-growth-promoting-rhizobacteria. *Annual Review of Microbiology*, 63, (2009) : pp 541-556.

M

- **Matallah-Boutiba A.** La verticilliose de l'olivier: Approches cyto-histologique et ultrastructurale des interactions Olivier-*Verticillium dahliae* Kleb. Thèse de magister, université Oran, Algérie, (1998): 105pp.
- **Mwakutuya E.** Epidemiology of Stemphylium blight of lentil (*Lens culinaris*) in Saskatchewan, M.S. Thesis, Univ. Saskatchewan, Saskatchewan (Turk), (2006): 230pp.
- **Mihail D.J.** *Macrophomina phaseolina*: Spatio-temporal dynamics of inoculum and of disease in a highly susceptible crop. *Phytopathology*, 79, (1989): pp 848-855.
- **Mercado-Blanco J., Rodriguez-Jurado D., Hervas A., Jimenez-Diaz R.M.** Suppression of *Verticillium wilt* in olive planting stocks by root-associated fluorescent *Pseudomonas spp.* *Biological control*, 30, (2004): pp 474-486.
- **Medda A.** Les mycorhizes de l'olivier (*Olea europaea L.*) Aspect écologiques, effet sur la croissance et exploitation en pépinière. Thèse de doctorat en biologie végétale, Université Badji Mokhtar, Annaba, (2010): 116 pp.

- **Mathieu J., Mathieu C.** Comportement de différentes lignées de tournesol vis-à-vis de *Macrophomina phaseoli*. Mise au point de test de la résistance variétale. Thèse de doctorat, ENSA de Montpellier (FR), (1976), 185 pp.
- **Müller H., Tejedor-Gonzalez E., Mercado-Blanco J., Rodríguez-Jurado D., Jiménez-Díaz R.M., 21 Berg G.** Effect of the biological control strain *Serratia plymuthica* HRO C48 on *Verticillium wilt* of olive trees cv. Arbequina. Bulletin OILB/SROP, 30, (2007): pp 173-177.
- **Maroua B A.** Etude de la relation mycoparasitaire *Trichoderma harzianum* avec *Fusarium solani* chez l'Olivier ; Caractérisations moléculaires et fonctionnelles des aquaporines chez *Trichoderma harzianum*. Thèse de doctora, Université de Carthage, (2018): 241 pp.
- **Maughan H. and Van der Auwera G.** *Bacillus* taxonomy in the genomic era finds phenotypes to be essential though often misleading. Infection, Genetics and Evolution, 11, (2011): pp 789-797.
- **Morikawa, M., Ito, M., Imanaka, T.** Isolation of a new surfactin producer *Bacillus pumilus* A-1, and cloning and nucleotide sequence of the regulator gene, *psf-1*. Journal of fermentation and bioengineering, 74(5), (1992): pp 255-261.
- **Milner, J. L., Raffel, S.J., LEthbridge, B.J., Handelsman, J.** Culture conditions that influence accumulation of zwittermicin a by *Bacillus cereus* UW85. APPL. Microbiol. Biotechnol, 43, (1995): pp 685-691.
- **Ma Z, Wang N, Hu J , Wang S .** Isolation and characterization of a new iturinilipopeptide *mojavensis* A produced by a marine derived bacterium *Bacillus mojavensis* .the Journal of Antibiotics, 65, (2012): pp 317-322.
- **Meena KR , Kanwar SS.** Lipopeptides as the Antifungal and Antibacterial Agents Application in Food Safety and therapeutics. Review Article Hindawi Publishing Corporation Bio Med Research International, (2015): pp 1-9.
- **Moyne AL , Cleveland TE, Tuzun S.** Molecular characterization and analysis of the operon encoding the antifungal lipopeptide *bacillomycin D*. FEMS Microbiol Lett, 234, (2004): pp 43-49.
- **Maget-Dana R. & Peypoux F.** Iturins, a special class of pore-forming lipopeptides: biological and physicochemical properties. Toxicology, 87, (1994): pp 151- 174.

- **Moradi, H., Bahramnejad, B., Amini, J., Siosemardeh, A., Allahverdipoor, K.H.** Suppression of chickpea (*Cicer arietinum* L.) *Fusarium* wilt by *Bacillus subtilis* and *Trichoderma harzianum*. *POJ*. 5, (2012): pp 68-74.

N

- **Nasraoui , B.** Les champignons parasites des plantes cultivées. Centre de Publication Universitaire .Tunisie, (2006) : pp 456.
- **Navarro, C. et Parra, M.A. (2008).** Plantación. In *El cultivo del olivo* (edited by Barranco, D., Fernandez-Escobar, R. et Rallo, L.), pp 191-237. Junta de Andalucía et Mundi Prensa, España.
- **Nasir M.N.** Caractérisation biophysique des interactions de la mycosubtiline, agent antimicrobien, avec des systèmes membranaires biomimétiques. Thèse de doctorat, Université Claude Bernard Lyon 1 (France), (2011).
- **Nasir M.N. & Besson F.** Specific interactions of mycosubtilin with cholesterol-containing artificial membranes. *Langmuir*, 27, (2011): pp 10785-10792.
- **Nautiya C.S. (2001).** Biocontrol of plant diseases for agricultural sustainability. In *biocontrol potential and its exploitation in sustainable agriculture* (edited by Upadhyay R.K; Mukerji K.G; Chamola B.P), pp: 9-23. Kluwer academic, New York.

O

- **O'Donnell, K. , Ward , T.J., Robert , V.A.R.G. Crous , P.W., Geiser, D.M., Kang .S.** DNA sequence based identification of *Fusarium* Current status and future directions .*Phytoparasitica*, 43, (2015): pp 583-595.
- **Ongena, M., Jourdan, E., Adam, A., Paquot, M., Brans, A., Joris, B., Arpigny, J. L., Thonart, P.** Surfactin and fengycin lipopeptides of *Bacillus subtilis* as elicitors of induced systemic resistance in plants. *Environ. Microbiol*, 9, (2007): pp 1084–1090.
- **Ozenda.** Sur les étages de végétation dans les montagnes du bassin méditerranéen. *Doc, Cartogr, Ecol*, 16, (1975) : pp 1-32.

- **Ongena M, Jacques P .2008.** Bacillus lipopeptides: versatile weapons for plant disease biocontrol. Trends Microbiol 16:115–125.

P

- **Pegg G.F., Brady B.L.** *Verticillium wilts*. CAB International, CABI Publishing, Wallingford, UK, (2002): 552p.
- **Prados-Ligero A.M., J.L., Melero-Vara J.M., Corpas-Hervias C., Basallote-Ureba M.J.** Relationships between weather variables, airborne spore concentrations and severity of leaf blight of garlic caused by *Stemphylium vesicarium* in Spain. Eur. J. Plant. Pathol, 109, (2003): pp 301-310.
- **Porrás-Soriano A., Marcilla-Goldaracena I., Soriano-Martin M.L., Porrás-Piedra A.** Development and resistance to *Verticillium dahliae* of olive plantlets inoculated with mycorrhizal fungi during the nursery period. J. Agric. Sci, 144, (2006): pp 151-157.
- **Pangol, J.** Précis de botanique pharmaceutique Tom 2. 2^{ème} Edition, Maloine, Paris, (1975).
- **Perez, C., Suarez, C., Castro, G.R.** Antimicrobial activity determined in strains of *Bacillus circulans* cluster. Folia Microbiol, 38, (1993): pp 25-28.
- **Peypoux F, Pommier MT , Das BC , Besson F, Delcambe L , Michel G.** Structure of bacillomycin D and bacillomycin L peptidolipid antibiotics from *Bacillus subtilis* J antibiot, 12, (1984): pp 1600-1604.
- **Peypoux, F. Bonmatin, J. M., Wallach, J.** Recent trends in the biochemistry of surfactin. Appl. Microbiol. Biotechnol, 51, (1999): pp 553-563.
- **Preecha, C., Michael, Sadowsky J., Prathuangwong, S.** Lipopeptide Surfactin Produced by *Bacillus amyloliquefaciens* KPS46 is Required for Biocontrol Efficacy Against *Xanthomonas axonopodis* pv. *Glycines*. Kasetsart J. (Nat. Sci.), 44, (2010): pp 84 – 99.
- **Pathak, K.V., Keharia, H., Gupta, K., Thakur, S.S., Balaram, P.** Lipopeptides from the Banyan Endophyte, *Bacillus subtilis* K1: Mass Spectrometric Characterization of a Library of Fengycins. J. Am. Soc. Mass Spectrom, 10, (2012): pp 1716-1728.

- **Patrick.** L'olivier. 1^{ère} édition, Edisud, France, (2008).
- **Prapagdee B., Kuekulvong C. and Mongkolsuk S.** Antifungal potential of extracellular metabolite produces by *Streptomyces hygroscopicus* against phytopathogenic fungi. Int. J. Biol. Sci. 4, (2008): pp 330-337.
- **Piga P.M., Belanger R.R., Paulitz T.C., Benhamou N.** Increased resistance to *Fusarium oxysporum f.sp.radicis-lycopesci* in tomato plants treated with the endophytic bacterium *Pseudomonas fkuorescens* strain. Physiol. Mol. Plant. Pathol, 50, (1997): pp 302-320.

R

- **Rubio de Casas R, Besnard G, Schönswetter P, Balaguer L, Vargas P.** Extensive gene flow blurs phylogeographic but not phylogenetic signal in *Olea europaea L.* Theoretical and Applied Genetics, 113, (2006): pp 575-583.
- **Ramey, B.E., Koutsoudis, M., von Bodman, S.B., Fuqua, C..** Biofilm formation in plant-microbe associations. Curr. Opin. Microbiol. 7, (2004): pp 602-609.
- **Raaijmakers, J.M., De Bruijn, I., De Kock, M.J.** Cyclic lipopeptide production by plant-associated *Pseudomonas* spp.: diversity, activity, biosynthesis, and regulation. Mol. Plant Microbe Interact, 19, (2006): 699–710.
- **Romero, D., de Vicente, A., Rakotoaly, R.H., Dufour, S.E., Veening, J.W., Arrebola, E., Cazorla, F.M., Kuipers, O.P., Paquot, M., Pérez-García, A.** The iturin and fengycin families of lipopeptides are key factors in antagonism of *Bacillus subtilis* toward *Podosphaera fusca*. Mol. Plant Microbe Interact, 20, (2007): pp 430-440.
- **Rallo ,P.,G.Dorado,and,A,Martin.** Development of simple sequence repeats (SSR) in olive tree (*Olea,europaea.L.*). Theoretical and Applied Genetics, 101, (2000): pp 984-989.
- **Rugini E & Fedeli E. (1990).** Olive (*Olea europaea L.*) as an oilseed crop. In Biotechnology in Agriculture and Forestry, Legumes and Oil Seed Crops (edited by Bajaj YPS), pp 593-641. Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg.
- **Rivas-Martínez S.** Memoria y mapas de series de vegetación de España.1, (1987).

S

- **Serdoun Bekri, N.** Détection de *Pseudomonas savastanoi*, agent de la tuberculose de l'olivier évaluation et comparaison d'une technique d'isolement sur milieux de cultures et d'une technique sérologique (immunofluorescence). Mémoire de magister, Université d'Oran, (2013) : 58p.
- **Schnathorst W.C., Mathre D.E.** Host range and differentiation of a severe form of *Verticillium albo-atrum* in cotton. Phytopathology, (61), (1996) : pp 1155-1161.
- **Shaw F.J.F.** Studies in diseases of jute plant,"11". . Dept. Agric. India., Bot. Ser, 13, (1925): 193-199.
- **Simmons E.G.** Typification of Alternaria, Stemphylium and Ulocladium. Mycologia, 59, (1967): pp 67-92.
- **Sforza R., Sheppard A., Kreiter S., Coutinot D. (2004).** Coup de projecteur sur la lutte biologique en région méditerranéenne : bilan de la première journée d'information organisée par le CILBA. In Bonnes pratiques autour du traitement (edited by M Thierry), pp 8-12.
- **Saad D.** Etude des endomycorhizes de la variété Sigoise d'olivier (*Olea europa L.*) et essai de leur application à des boutures semi-ligneuses multipliées sous nébulisation. Mémoire de magister, Université d'Oran, Es -Sénia, (2009): 124 pp.
- **Sikaoui.** Réflexion sur les densités de plantation de l'olivier. IV salon international de l'olivier « OLEA 2006 » : L'oléiculture : Levier du développement agricole Marrakech, (2006): pp 25-28.
- **Swain,M.R,Ray,R.C. 2006.** Biocontrol and other beneficial activities of *Bacillus Subtilis* isolated from cowdung microflora. Microbiological research, 164(2), (2006): pp 121-130.
- **Smith, E.F.** Recent studies on the olive-tubercle organism. Bur. Plant Indust. Bull, (131), (1908).
- **Semal J.** Traité de pathologie végétale.- Les Pres Agronomiques de Gembloux. ASBL, Belgique, (1993): pp 621.
- **Silva H. S. A ; Romeiro R.S ; Carrer-Filho R ; Pereira J.L.A ; Mizubuti E.S.G ; Mounteer A.** Induction of systemic resistance by *Bacillus cereus* against tomato

- foliar diseases under field conditions. Journal of Phytopathology, 152, (2004): pp 371-375.
- **Saidi, N., Kouki, S., M'Hiri, F., Hajlaoui, M. R., Mahrouk, M., Ouzari, H., & Hassen, A.** 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), (2009): pp 191-198.
 - **Shoresh, M., Harman, G., Mastouri, F.** Induced systemic resistance and plant responses to fungal biocontrol agents. Annual Review of Phytopathology, 48, (2010): pp 21-43.
 - **Serdoune Bakri N.** Détection *Pseudomonas Savastanoi* , agent causal de la tuberculose de l'olivier Evaluation et comparaison d'une technique d'isolement sur milieux de cultures et Référence bibliographique 42 d'une technique sérologique (immunofluorescence) . Diplôme de Magister : Phytopharmacie. Université d'Oran, (2013).

T

- **Triki M.A., Hassaïri A., Mahjoub M.** Premières observations de *Verticillium dahliae* sur olivier en Tunisie. Bulletin OEPP Bulletin OPPO, 36 (1), (2006 June 30) : pp 69-71.
- **Tombesi A., Tombesi S., Saavedra M.S., Fernandez-Escobar R., d'Andria R.** Conseil Oléicole Internationale. Technique de production enoléiculture. 1ère édition, ISBN, Madrid (Espagne), (2007) : pp 348.
- **Taubenhaus, J. J.** The black rot of sweet potato. Phytopathology, 3 (3), (1913): pp 161-164.
- **Toure, Y., Ongena, M., Jacques, P., Guiro, A., Thonart, P.** Role of lipopeptides produced by *Bacillus subtilis* GA1 in the reduction of grey mould disease caused by *Botrytis cinerea* on apple. J Appl Microbiol, 96, (2004): pp 1151–1160.
- **Thimon L., Peypoux F., Exbrayat J.M. & Michel G.** Effect of iturin A, a lipopeptide from *Bacillus subtilis* on morphology and ultrastructure of human erythrocytes. Cytobios, 79, (1994): pp 69-83.

- **Thasana L, Prapagdee B, Rangkadilok N, Sallabhan R, Aye SL , Ruchirawat S, Loprasert S.** *Bacillus subtilis* SSE4 produces subtilene a new lipopeptid antibiotic possessing an unusual C15 unsaturated B-amino acid .EFBS letters, 584, **(2010)**: pp 3209-3214
- **Thanassouloupoulos C.C., Kistos, G.T. (1971).** *Verticillium wilt* in Greece. In Proceeding of 1st of Int, pp 1-22. Wye College. London, UK.
- **Trapero, A., Roca. Luis, F., Moral. J., Trapero. C., López-Escudero. F.J. (2011).** Capítulo 7: las enfermedades y su manejo en el olivar ecológico. In El olivar ecologico (edited by junta de andalucía), pp 206-256. University of Cordoba, Spain.
- **Tschen, J. S. M., & Kuo, W. L.** Antibiotic inhibition and control of *Rhizoctonia solani* by *Bacillus subtilis*. Plant Protection Bulletin, **(1985)**.
- **Thakore, Y.** The biopesticide market for global agricultural use. Industrial Biotechnology, 2, **(2006)** : pp 194-208.

V

- **Vallad G.E., Subbarao K.V.** Colonization of resistant and susceptible lettuce cultivars by a green fluorescent protein-tagged isolate of *Verticillium dahlia*. Phytopathology, 98 (8), august **(2008)**: pp 871-885.
- **Vossen , P.D., Blanco. M.A.** *Verticillium Wilt* of olive. First press, newsletter of olive oil production and evaluation, 3, **(2008)**: pp 1-9.
- **Volpon L., Besson F. & Lancelin J.M.** NMR structure of active and inactive forms of the sterol-dependent antifungal antibiotic bacillomycin L. FEBS, 264, **(1999)**: pp 200- 210.
- **Vanittanamom N., W Loeffler., M Ulrike and L Jung.** Fengycin a novel antifungal lipopeptide antibiotic produced by *Bacillus subtilis* F-29-3. J. Antibiot, 39, **(1986)**: pp 888-901.

W

- **Wehmeyer L.E.** world monograph of the genus *Pleospora* and its segregates. University of Michigan Press, Michigan, **(1961)**: pp 451.

- **Wehmeyer L.E.** The pyrenomycetous fungi. Mycologia Mem, 6, **(1975)**: 1-250.
- **Wyllie T.D. (1988).** Charcoal rot of soybean-current status. In Soybean diseases of the north central region (Edited by T. D. Wyllie and D. H. Scott). APS Press, St. Paul, MN.
- **Walid L.D., Skirdej A., Elattir H.** Transfert de technologie en agriculture. Bulletin mensuel d'information et de liaison du PNTTA, **(2003)**.
- **Williams, G.E. , Asher, M. J.C.** Selection of rhizobacteria for the control of *Pythium ultimum* and *Aphanomyces cochlioides* on sugar -beet seedlings. Crop Prot, 15, **(1996)**: pp 479-486.
- **Walia NK, Cameotra SS.** Lipopeptides Biosynthesis and Applications. JMicrob Biochem technol, 7, **(2015)**: pp 103-107.
- **Wilson, E.E. & Ogawa, J.M.** Fungal, bacterial, and certain nonparasitic diseases of fruit and nut crops in California. Richmond, Calif, USA, **(1979)**: pp 190.
- **Wallroth F.G.** Flora Cryptogamica germaniae pars post. J.L. Schrag, Nurnberg, **(1833)**.

Y

- **Young, J.M., Saddler, G.S., Takikawa, Y., De Boer, S.H.,Vaqueterin, L.,Gardan, L.,Gvozdyak, R.I. & Stead De.** Names of plant pathogenic bacteria. Review of plant pathology, (75), **(1996)**: 721-763.

Z

- **Zohary, D. & Spiegel-Roy, P.** Beginning of fruits growing in the old world. Science, 187 (4174), **(1975 January 31)**: pp 319-327.
- **Zhang R, Hwang S-F, Chang K-F, Gossen BD, Strelkov SE, Turnbull GD, and Blade SF.** Genetic Resistance to *Mycosphaerella pinodes* in 558 Field Pea Accessions. Crop Sci, 46, **(2006)**: pp 2409-2414.
- **Zhang YJ, Zhou Y, Ja M, Shi R, Chun-Yu WX, Yang LL, Tang SK, Li WJ.** *Virgibacillus albus* sp. nov., a novel moderately halophilic bacterium isolated from

Lop Nur salt lake in Xinjiang province, China. Antonie Van Leeuwenhoek, 102,
(2012): pp 553–560



Annexes

Annexe A : Composition du milieu de culture utilisé**❖ Milieu PDA (Potatoes Dextrose Agar) :**

Pomme de terre	200g
Glucose.....	20g
Agar-agar.....	15g
Eau distillée	1000ml

▪ Mode d'emploi

Après bien laver la pomme de terre, découper et peser 250g de cette dernière puis mélanger avec 500ml d'eau distillée. Faire bouillir à 100C° pendant 45min à 1h. Au mêmes temps dissoudre 15g d'agar-agar dans 500ml d'eau distillée. Ensuite filtrer la pomme de terre à l'aide d'un papier filtrante. Le filtrat venant de pomme de terre est mélangé avec 20g de glucose. Ajuster le volume du mélange au moyen de l'eau distillée jusqu'à 1000ml si nécessaire. Auto-claver le mélange à la température de 121C° pendant 15min.