

الجمهورية الجزائرية الديمقراطية الشعبية
REPUBLIQUE ALGERIENNE DEMOCRATIQUE ET POPULAIRE
التعليم العالي والبحث العلمي وزارة
MINISTERE DE L'ENSEIGNEMENT SUPERIEUR ET DE LA RECHERCHE
SCIENTIFIQUE
جامعة 20 اوت 1955- سكيكدة
UNIVERSITE 20 AOUT 1955- SIKKDA



Faculté des Sciences
Département des Sciences de la Nature et de la Vie
Mémoire Présenté en Vue de l'Obtention du Diplôme de Master
Filière : Biologie
Spécialité : Microbiologie appliquée
Intitulé :

Biocontrôle de *Bacillus sp.* contre *Alternaria sp.* responsable de la
maladie cryptogamique de la vigne (*Vitis vinifera L.*)

Présenté Par : - Nekhoul Wafa - Bouzeraâ Rayane
- Hamrouche Nardjis - Haddadi Ikram

Membre de Jury:

Mme. Sakhraoui. N (MCA)	Présidente	Univ. du 20 Août 1955 – Skikda
Mme. Maachia. L (MAA)	Promotrice	Univ. du 20 Août 1955 – Skikda
Mme. Aggoun. A (MCA)	Examinatrice	Univ. du 20 Août 1955 – Skikda

Année universitaire 2022/2023

Remerciement

Au terme de cette étude, nous tenons tout d'abord à remercier Dieu tout-puissant de nous avoir guidés et d'avoir accordé courage, patience et santé tout au long de ces années d'études et de vie en général, afin de faire face à toutes les difficultés et obstacles qui ont jalonné notre parcours.

Nous souhaitons exprimer nos remerciements particuliers à notre Encadreur, *Mme Machiaa*, qui a été constamment présente à nos côtés tout au long de cette année pour nous orienter et nous apporter une aide précieuse, nous permettant ainsi d'approfondir au maximum notre travail et d'être fiers du résultat obtenu aujourd'hui.

Nous adressons également nos sincères remerciements à *Monsieur Aouzal Badis*, doctorant, qui a accepté de diriger ce travail avec bienveillance, et à qui nous témoignons notre profond respect.

Nous exprimons notre gratitude envers les membres du jury, en particulier le Dr *Sakhraoui* qui a présidé ce mémoire, et le Dr *Aggoun* qui a accepté d'examiner ce travail.

Enfin, nous tenons à remercier tous les enseignants qui ont contribué à notre formation universitaire, et qui ont joué un rôle important dans notre parcours.

Dédicace

Du profond de mon cœur, je dédie ce travail à tous ceux qui me sont chers.

A mes très chers parents les prunelles de mes yeux.

A ma mère Nora qui n'a jamais cessé de ménager ses efforts pour que J'atteigne ce niveau. Ni sacrifices, ni privatisations ne l'ont empêché d'accomplir son devoir de mère soucieuse de l'avenir de ces enfants.

A mon cher papa Abdelhamid qui a su se montrer patient, compréhensif, sa Chaleur paternelle a été et sera toujours pour moi d'un grand réconfort.

Que dieu vous procure santé, prospérité et bonheur.

A ma chère sœur Hana, et **mes chères frère Aymen et Abdou** merci pour l'encouragement et l'aide qu'il m'a toujours accordé, que dieu les protège et leur offre ma chance et le bonheur.

Une dédicace spéciale A ma chère Nourhane, merci d'être mes côtés dans tous les moments, tu as partagé mes joies et mes peines, mes Victoires et mes défaites, je suis profondément reconnaissant de t'avoir ma vie, j'espère de tout mon cœur que notre amitié durera éternellement.

A toute la famille **Nekhoul**.

Sans oublier mon amie d'étude depuis les jours du lycée ma chère **Rayane**, je te souhaite une vie heureuse et magnifique.

A tous ce qui m'a apporté d'aide de près ou de loin, merci.

WAFA

Dédicace

La première chose que j'écris, remerciez *ALLAH* de m'avoir aidé à terminer ce travail, et pour me donne la patience et le courage durant ces longues années d'étude *ALHAMDULILLAH*.

Je dédie ce succès à :

Chère maman (Soumai), qui sacrifie toute sa vie afin de me voir devenir ce que je suis, elle me donne de la force et la volonté d'avancer, Je souhaite que Dieu me le garde.

Cher papa (Samir), qui s'est battu pour nous, il me donne la force et l'amour.

Mes adorables sœurs (Soundes & Ritadje), pour leur amour et leur foi en mes capacités, je vous souhaite du succès dans vos études et dans la vie.

Mon petit frère (mohamed mahdi), ce que je lui souhaite réussit et persévérance.

Yama Jamila & mon père Houcin, qui m'a appris le sens de l'Amour Sans Limites, merci pour votre fatigue, vos prières et votre fierté.

Mes tantes, surtout **ma tante Nadia**, merci pour tout ce que vous avez fait pour moi.

Mes oncles, surtout **mon oncle Kamel**, qui m'aimait comme sa fille, et **mon oncle Habib**, qui m'a inculqué l'amour de la lecture, Merci.

À toute la famille **Badach et Bouzeraâ**.

Spéciale dédicace à ma copine Nour, merci pour tous les moments que nous avons passés ensemble et c'était plein de joie et de rires. Merci d'être à mes côtés, et pour votre amour et votre honnêteté, je t'aime ma sœur.

Pour mon partenaire dans les circonstances et l'étude **ma chère amie wafa**, je te souhaite une vie pleine de bonheur et de réussite.

A mes amis, **Amani Chaouit & Ikram Chebel**, merci pour vos encouragements et votre amour.

Au **hamilat tadj elwakar club**, je t'aime mes princesses.

A mes enfants dans **Elathir club**, je vous souhaite du succès et de la brillance.

A toutes les personnes qui j'aime et toute la promotion de **master 2 microbiologie appliquée** et surtout mes collègues de groupe (**mémoire 2023**) et à tous ce qui m'a apporté d'aide de près ou de loin, merci.

RAYANE

Dédicace

Je dédie ce modeste travail:

À **mes chers parents**, en guise de gratitude pour tout leur sacrifice, soutien, confiance, compréhension et amour. Vous êtes les êtres les plus chères à mon cœur, aucun mot ne pourra exprimer ma gratitude et mon estime pour vous.

À **mon bras droit Salem.**

À **mes très chères sœurs : Rania, Ines, Omaima, Bassma**

À **mon cœur le petit frère : Adem**

À mon cadeau que Dieu m'a donné ma **deuxième sœur Nerdjis**

À mes tantes maternelles mes soutiens dans la vie: **Hanane, Saida, Meriem et Sameh.**

À tous mes enseignants qui ont contribué à ma formation du primaire jusqu'au magister.

IKRAM

Dédicace

Je dédie ce modeste travail :

À mes très chers parents que j'aime profondément, pour leur soutien et leur aide qu'ils m'ont apporté durant mes années d'études. Qui m'ont toujours soutenue et encouragée à suivre les chemins que je désirais. Rien au monde ne vaut les efforts fournis par eux jour et nuit pour mon éducation et mon bien-être. Jamais je ne les remercierai assez de m'avoir donné le meilleur d'eux-mêmes.

A mon chers et unique frère : **Monsif**

A mes très chères sœurs : **Nesrine, Saousen Wiam et Soundes Lina**

Une dédicace spéciale à la personne qui m'a accompagné pendant mes moments de crise et de joie, A la princesse de mon coeur, ma soeur, que la vie m'a donnée, mon amour, ma meilleure **Haddadi Ikram.**

A toutes mes chères amies Ikram et Marwa qui sont toujours à mes côtés dans les bons et les mauvais moments.

À tous ceux qui m'ont appris une lettre, mes enseignants.

NARDJIS

SOMMAIRE

	Page
LISTE DES ABREVIATIONS	
LISTE DES FIGURES	
LISTE DES TABLEAUX	
RESUMES	
Introduction	01
Chapitre I : Synthèse bibliographique	
1. <i>Alternaria</i>	03
1.1. Taxonomie de genre <i>Alternaria</i>	03
1.2. Les symptômes de genre <i>Alternaria</i>	03
1.2.1. Feuille	03
1.2.2. Tige	03
1.2.3. Fruits	03
1.3. Morphologie de genre <i>Alternaria</i>	04
1.3.1. Description macroscopique	04
1.3.2. Description microscopique	04
1.4. Le mode d'infection de genre <i>Alternaria</i>	04
1.4.1. La conservation	05
1.4.2. Pénétration et invasion	05
1.4.3. Sporulation et dissémination	05
2. <i>Bacillus</i>	06
2.1. Taxonomie de genre <i>Bacillus</i>	06
2.2. Fiche pratique	06
2.3. Bio-contrôle des agents phytopathogènes par les bactéries du genre <i>Bacillus</i>	07
2.3.1. Les lipopeptides cycliques et les sidérophores	07
2.3.2. Production d'enzymes lytiques	07
2.3.3. Production des composés organiques volatiles (VOCs)	08
2.4. L'antagonisme de <i>Bacillus</i> vis-à-vis de quelques agents phytopathogènes	08
Chapitre II : Matériel et méthodes	
1. Cadre d'étude	10
2. Description du jardin botanique	10
3. Matériel	11
3.1. Matériel expérimental	11

3.2. Matériel végétal	11
3.3. Matériel biologique	12
4. Méthodes	12
4.1. Échantillonnage	12
4.2. Isolement de l'agent phytopathogène	13
4.2.1. Désinfection	13
4.2.2. Isolement de l'agent antagoniste	14
4.2.2.1. Sol infecté	14
4.2.2.2. Sol non infecté	14
4.3. Mise en culture	14
4.3.1. Préparation des milieux de culture	14
4.4. Ensemencement	15
4.4.1. La vigne	15
4.4.2. Sol infecté	16
4.4.3. Sol non infecté	16
5. Sélection des isolats	16
5.1. Identification des champignons	16
5.1.1. Observation macroscopique	16
5.1.2. Observation Microscopique	17
5.1.2.1. L'état frais	17
5.2. Identification des bactéries	17
5.2.1. Observation macroscopique	17
5.2.2. Observation microscopique	17
5.2.2.1. L'état frais	17
5.2.2.2. Coloration de Gram	18
6. Test d'antagonisme	18
6.1. Confrontation directe	19
6.2. Confrontation indirecte	19
6.3. Activité antifongique des biosurfactants.	20
6.3.1. Préparation des précultures (l'inoculum)	20
6.3.2. Fermentation en batch	20
6.3.3. Récupérations des surnageant	21
6.3.3.1. par centrifugation	21
6.3.3.2. Séparation liquide-liquide	22
6.3.4. test des disques	23
7. Microencapsulation	23
7.1. Préparations des solutions	23
7.1.1. Préparation du bouillon (TYG)	23
7.1.2. Préparation la solution d'alginate	24
7.1.3. Préparation chlorure de calcium (CaCl ₂)	25
7.2. Préparations des billes	25
7.2.1. Ensemencement	27
8. Test in situ	28
Chapitre III : Résultats et discussion	
1. Résultats	29
1.1. Résultats de la mise en culture des fragments de l'écores de la vigne	29
1.2. Résultats des observations microscopiques (boites témoin)	29

1.3. Résultats de La mise en culture du sol	30
1.4. Résultat de la coloration de Gram	31
1.5. Résultats des tests d'antagonisme (confrontation)	32
1.5.1. Résultats des observations macroscopiques des tests de confrontation	32
1.5.1.1. Résultat de la Confrontation directe	32
1.5.1.2. Résultats de la Confrontation indirecte	33
1.5.2. Résultats de l'observation microscopique du test de confrontation	34
1.5.2.1. Résultats de la Confrontation directe	34
1.5.2.2. Résultats de la Confrontation indirecte	35
1.6. Résultats de Test des disques	36
1.6.1. Résultats de l'activité antifongique du biosurfactant	36
1.7. Résultats de l'observation macro/microscopique des billes	36
1.7.1. Observation macroscopique	36
1.7.2 Observation microscopique	38
2. Discussion	39
Conclusion	42
Références bibliographiques	

LISTE DES ABREVIATIONS

Abréviation	Signification
BN	Bouillon nutritif
SB	Sabouraud
GN	Gélose nutritive
B	Bacillus
O. N. S. S.A	Office National de la Sécurité Sanitaire des produits Alimentaires
PGPR	Plant Growth Promoting Rhizobacteria
pH	Potentiel hydrogène
TSH	Toxine spécifiques humaine.
TSNH	Toxines spécifiques non humaine.

LISTE DES FIGURES

N°	Titre	Page
1	Les symptômes de <i>Alternaria</i> sur les feuilles de pomme de terre.	4
2	La situation géographique du jardin botanique.	10
3	La vigne malade.	12
4	L'écorce de la vigne.	13
5	Sol non-infectée.	13
6	Sol infectée.	13
7	Les étapes de la désinfection.	13
8	Suspension du sol infecté.	14
9	Suspension du sol non infecté.	14
10	Préparation des milieux de culture.	15
11	Ensemencements des fragments d'écorce de la vigne.	15
12	L'ensemencement des sol.	16
13	Confrontation directe entre <i>Alternaria sp</i> et bactérie <i>Bacillus sp</i> .	19
14	Confrontation indirecte entre <i>Alternaria sp</i> et bactérie <i>Bacillus sp</i> .	20
15	Préparation des milieux de fermentation.	21
16	Récupération des surnageant par centrifugeuse	22
17	Recuperation des surnageants.	22
18	Test des disques.	23
19	Préparation du bouillon (TYG).	24
20	Préparation de la phase organique.	24
21	Préparation chlorure de calcium (cacl ₂).	25
22	Les préparations dans l'autoclave.	25
23	Préparation des billes (traitement).	26
24	L'ensemencement des billes.	27
25	Test in situ par les biosurfactant.	28
26	Boite témoin de sol non infecté.	31

27	Boite témoin de sol infecté.	31
28	Coloration de Gram de bactérie <i>Bacillus sp</i> (Objectif X100).	31
29	Résultats du test des disques (5,7 : <i>Bacillus sp</i> ; 6 : <i>Lactobacillus bulgaricus</i> ; 8 : <i>Saccharomyces cerevisiae</i>)	36

LISTE DES TABLEAUX

N°	Titre	Page
1	La taxonomie du genre <i>Alternaria</i> .	3
2	La taxonomie du genre <i>Bacillus</i> .	6
3	Fiche pratique <i>Bacillus</i> .	6
4	Récapitulatif du matériel utilisé.	11
5	Observation macroscopique des isolats de la vigne.	29
6	Résultats de l'état frais des isolats de la vigne.	30
7	Résultats de l'observation macroscopique du test de confrontation directe.	32
8	Résultats de l'observation macroscopique du test de confrontation indirecte.	33
9	Observation microscopique du test de confrontation directe.	34
10	Résultats de l'observation microscopique de test de confrontation indirecte.	35
11	L'aspect macroscopique.	36
12	L'aspect microscopique de l'état frais des microorganismes encapsulés.	38

Résumé

Cette étude a été menée dans le but d'isoler et d'identifier le phytopathogène responsable de la maladie de la vigne (*Vitis vinifera* L.) située dans le jardin botanique de l'université de Skikda. Pour évaluer in vitro une action antagoniste, nous avons commencé par l'échantillonnage à partir de la vigne, du sol infecté, et du sol non infecté, suivi par les étapes microbiologiques d'isolement et d'identification ainsi que les méthodes de confrontation directe et indirecte. L'extraction liquide-liquide des biosurfactants d'isolats purs de *Saccharomyces cerevisiae*, de *Lactobacillus bulgaricus* et de *Bacillus sp* par fermentation en batch et leurs activités antifongiques (méthode des disques) a été également réalisé au laboratoire. Une approche de microencapsulation de ces isolats purs a été utilisée pour une application in situ comme agents de bio contrôle. Les résultats obtenus ont montré que l'agent phytopathogène est un champignon qui appartient au genre *Alternaria* et l'antagoniste candidat est la bactérie du genre *Bacillus*. L'étude a également révélé le pouvoir antifongique des biosurfactants testés. Ces résultats contribuent à l'optimisation des stratégies de biocontrôle et ouvrent la voie à de nouvelles applications pour lutter contre *Alternaria sp*.

Mots clés : Bio contrôle, *Bacillus sp.*, *Alternaria sp.*, biosurfactants, microencapsulation.

Abstract

This study was conducted with the aim of isolating and identifying the phytopathogen responsible for vine (*Vitis vinifera* L.) disease in the botanical garden of Skikda University. To evaluate the antagonistic action in vitro, we started by sampling from the vine, infected soil, and non-infected soil, followed by microbiological isolation and identification steps as well as direct and indirect confrontation methods. Liquid-liquid extraction of biosurfactants from pure isolates of *Saccharomyces cerevisiae*, *Lactobacillus bulgaricus*, and *Bacillus sp* through batch fermentation and their antifungal activities (disk method) were also performed in the laboratory. A microencapsulation approach for these pure isolates was used for in situ application as biocontrol agents. The results showed that the phytopathogenic agent is a fungus belonging to the *Alternaria* genus, and the candidate antagonist is a bacterium of the *Bacillus* genus. The study also revealed the antifungal power of the tested biosurfactants. These results contribute to the optimization of biocontrol strategies and open up new avenues for combating *Alternaria sp*.

Keywords: Biocontrol, *Bacillus sp.*, *Alternaria sp.*, biosurfactants, microencapsulation.

ملخص

تمت هذه الدراسة بهدف عزل وتحديد مسبب الأمراض النباتية المسؤولة عن مرض الكروم (*Vitis vinifera* L.) في حديقة النباتات في جامعة سكيكدة. لتقييم العمل المضادة في المختبر، بدأنا بأخذ عينات من الكروم والتربة المصابة والتربة غير المصابة، تليها خطوات العزل والتحديد المجهرية وأساليب المواجهة المباشرة وغير المباشرة. تم أيضاً إجراء استخلاص سائل-سائل لمستحضرات السطح الحيوي من *Saccharomyces cerevisiae*، *Bacillus sp* و *Lactobacillus bulgaricus* بواسطة التخمر الدفعي وتم تنفيذ أنشطة مضادة للفطريات (طريقة الأقراص) في المختبر. تم استخدام كبسولات دقيقة لهذه العزلات النقية لتطبيقها في الموقع كعوامل مكافحة حيوية. أظهرت النتائج أن عامل مسبب الأمراض النباتية هو فطر ينتمي إلى جنس *Alternaria* والمنافس المرشح هو بكتيريا من جنس *Bacillus*. كما كشفت الدراسة عن قوة مضادة للفطريات لمستحضرات السطح الحيوي المختبرة. تساهم هذه النتائج في تحسين استراتيجيات مكافحة الأمراض النباتية وتفتح آفاقاً جديدة لمكافحة *Alternaria sp*.

كلمات مفتاحية: مكافحة حيوية، *Bacillus sp*، *Alternaria sp*، biosurfactants، كبسولات دقيقة.

Introduction

Ces dernières années, les cultures agricoles ont subi des dommages en raison de la dépendance des agriculteurs à l'utilisation d'antifongiques chimiques pour les protéger. Une observation importante a été faite ; les champignons cryptogamiques ont développé une résistance à ces antifongiques chimiques, entraînant une diminution des récoltes et des revenus des agriculteurs, impactant ainsi l'économie. Face à cette situation, les chercheurs se sont tournés vers le biocontrôle comme solution alternative (Agrios, 2005).

Pour résoudre ce problème, il est nécessaire de remplacer les fongicides synthétiques par des biofongicides (Minh *et al.*, 2023). Les bactéries du genre *Bacillus* sont considérées comme des agents de lutte biologique prometteurs (Mutlu *et al.*, 2020). Ces isolats bactériens ont démontré leur efficacité en tant qu'antagonistes contre *Colletotrichum gloeosporioides* et *Penicillium digitatum* (Minh *et al.*, 2023), ainsi que contre *Pseudomonas syringae*, responsable de l'infection des racines d'*Arabidopsis*, tant *in vitro* que *in vivo* (Harsh *et al.*, 2004).

Plusieurs études ont prouvé leur efficacité dans le contrôle des pathogènes fongiques courants post-récolte des pommes et des agrumes (Khadiri *et al.*, 2023), ainsi que dans la prévention de la pourriture apicale et des maladies de la moisissure verte sur d'autres arbres (Minh *et al.*, 2023). Ce processus a commencé à se répandre avec l'homologation de plusieurs spécialités commerciales à base de souches de *Bacillus sp.* pour lutter contre certaines maladies cryptogamiques (O.N.S.S.A., 2022).

Selon les résultats de l'étude de (Tozlu *et al.*, 2018) les *Bacillus subtilis* ont démontré des propriétés antagonistes contre *Alternaria alternata* *in vitro*. Dans une autre étude menée par (Tekiner *et al.*, 2019) différents isolats de bactéries tels que *Bacillus megaterium*, *Bacillus subtilis* et *Bacillus cereus* ont montré leur efficacité contre *Alternaria alternata* dans des conditions *in vitro*.

L'objectif principal de notre étude est d'identifier l'agent phytopathogène responsable de la maladie de la vigne (*Vitis vinifera* L.) présente dans le jardin botanique de l'université 20 août 1955 - Skikda. Et tenter de trouver une solution naturelle. Selon les symptômes observés à l'œil nu, nous pouvons prédire que le phytopathogène responsable est *Alternaria sp.* Reste à confirmer !!!!!!!

Chapitre I

Synthèse Bibliographique

1. *Alternaria*

Nées (1816) a observé pour la première fois un champignon qu'il nomma *Alternaria* ces derniers sont des moisissures atmosphériques, qui présente des modes de vie saprophytes ainsi que phytopathogènes et ubiquitaires extrême (Simmons, 1993). Avec un mode de multiplication asexuée (Benoit, 2011).

1.1. Taxonomie de genre *Alternaria* :

Les espèces du genre *Alternaria* sont principalement définies par les caractéristiques des conidies, plus de 275 espèces présente dans le monde ont été décrite (Simmons, 2007).

Tableau 1 : La taxonomie du genre *Alternaria* (Catalogue of lif, 2023).

Règne	Fungi
Embranchement	Ascomycota
Classe	Dothideomycetes
Ordre	Pleosporales
Famille	pleosporaceae
Genre	<i>Alternaria</i>

1.2. Les symptômes du genre *Alternaria* :

Toutes les parties vertes de la vigne peuvent être attaquées par ce phytopathogène.

1.2.1. Feuille :

- Petite tache de couleur jaunes à brunes, et entourées d'un halo jaune à vert pâle.
- Se nécrosent et s'agglomèrent pour former de grandes plages d'aspect brûlé (>2cm de diamètre) (Brigitte & Matthias, 2021).

1.2.2. Tige :

- Développement des lésions sur les tiges et les pétioles.
- Désintégration de la partie inférieure de la tige (Grogan *et al.*, 2000).

1.2.3. Fruits :

- Des tâches fantômes
- Une croissance réduite (rabougrissement)

- Mort rapide et effondrement des semis jeunes (**Messiaen *et al.*, 1991**).



Figure 1 : Les symptômes du *Alternaria* sur les feuilles de pomme de terre (**Kaba, 2018**).

1.3. Morphologie de genre *Alternaria* :

1.3.1. Description macroscopique :

Les colonies d'*Alternaria sp.* ont une croissance rapide sur le milieu Sabouraud (SB) à 25°C-30°C, la couleur des colonies au départ blanc - gris, devient rapidement foncée (vert foncé à noire) le recto comme au verso (**Ayad, 2019**). La surface des colonies est souvent hétérogène, pour la texture est laineuse et duveteux (**Chabasse *et al.*, 2002**).

1.3.2. Description microscopique :

Se présente sous la forme de long filaments mycélium (hyphes), les conidiophores sont bruns. Les conidies d'*Alternaria sp.* sont simples ou ramifiées (**Champion, 1997**). Elles présentent des cloisonnements transversaux et longitudinaux et se terminent par une longue cellule terminale. Elles sont de taille microscopique de 15 à 20 µm de large et de 150 à 300 µm de long. Le montage et l'examen microscopique des conidies dans une goutte d'eau permettent d'identifier les spores (**Fires, 1832**).

1.4. Le mode d'infection du genre *Alternaria* :

Se manifeste en 3 étapes :

1.4.1. La conservation :

L'*Alternaria sp.* peut se conserver dans les résidus de culture, les sols contaminés et les tubercules infectés durant plusieurs années (**Christine, 2000**).

1.4.2. Pénétration et invasion :

Une fois les spores d'*Alternaria sp.* sont en contact avec les cellules végétales, elles sont capables de germer et produisent un ou plusieurs tubes germinatifs (**Sherf et al., 1986**).

La pénétration dans les tissus végétaux se fait soit directement à travers les stomates ou les blessures, ou soit par pénétration enzymatique.

La colonisation de l'hôte est facilitée par des enzymes (Cellulase, pectine galacturonase de méthyle) (**Blancard et al., 2012**).

1.4.3. Sporulation et dissémination :

Formation des courts conidiophores surmontés de longues conidies pluricellulaires sur les tissus colonisés .Les spores sont disséminées par le vent, la pluie, les insectes et les irrigations par aspersion.

Le genre de champignons *Alternaria* est un groupe de nécrotrophes font appel à diverses processus infectieux pour exercer leur pouvoir pathogène durant l'interaction hôte-pathogène (**Sherf et al., 1986**).

2. *Bacillus*

C'est un genre très diversifié, plus de 90 espèces particulièrement hétérogènes, saprophytes et ubiquitaires. *Bacillus* pourrait être intéressant à utiliser comme Plant Growth Promoting Rhizobacteria (PGPR) (Caulier *et al.*, 2019).

2.1. Taxonomie de genre *Bacillus* :

On classe les *Bacillus* selon la capacité à former des spores ainsi que sur la morphologie de la spore et en fonction d'autres critères (thermophile, caractère respiratoire et fermentaire, etc) (Guiraud, 2003).

Tableau 2 : Taxonomie de *Bacillus* (Bergey, 2004).

Règne	Bacteria
Embranchement	Firumicutes
Classe	Bacilli
Ordre	Bacillales
Famille	Bacillaceae
Genre	<i>Bacillus</i>

2.2. Fiche pratique :

Tableau 3 : Fiche pratique de *Bacillus* (Delarras, 2014).

Fiche pratique	
Morphologie	Bacilles à extrémités plus ou moins rectangulaire de 3 à 9 μm × 0,6 à 1 μm . Présence de capsules polypeptidique chez <i>B.anthraxis</i> et <i>B.megaterium</i> spores ou endospores libre ou dans leur sporanges.
Coloration de Gram	Gram+ (parfois faible).
Mobilité	Positive Cellules à ciliation péritriche seul <i>B.anthraxis</i> immobile.

Type respiratoire	Aérobies stricts ou anaérobie facultatif suivant l'espèce.
Catalase	Positive
Oxydase	Positive et négative (en général négative).
Conditions de culture	Espèce mésophile développent à 30°C en 24 à 48 heures Espèce psychotrope (certaines souches de <i>B. cereus</i>) se développent à 20 °C en 18 à 48 heures Espèce thermophile se développent à 55 ° C en 12 à 16 heures.
Caractères spécifiques	Exigent 3 à 12 % de NaCl suivant les espèces Produisent des acides à partir du glucose.
Milieux de culture	Milieux d'usage courant, donnant sur milieu gélosé des colonies de type R.
Milieux d'isolement sélectif	Gélose Mossel (MYP) Bio-Rad. Gélose Bacara. AES chemunex.
Identification biochimique	API® 50 CH avec API 50 CHB / E medium, et API 20 ETM bio Mérieux SA.

2.3. Bio-contrôle de *Bacillus* :

Désigne une inhibition ou une action défavorable d'un organisme sur la virulence d'agents phytopathogènes, qui se manifeste généralement par :

2.3.1. Les lipopeptides cycliques et les sidérophores :

C'est le métabolite antifongique le plus puissant sécrété par les *Bacillus*. Il facilitant le déplacement de cette bactérie à l'intérieur du tissu végétal et permettant aussi la détection des surfactines (Kinsinger *et al.*, 2003).

2.3.2. Production d'enzymes lytiques :

Parmi ces enzymes la chitinase et la β -1,3-glucanase responsables de la dégradation de la paroi cellulaire des champignons par conséquent engendre la lyse cellulaire des agents pathogènes

fongiques (**Leelasuphakul *et al.*, 2006**). En générale, ces enzymes lytiques possèdent un potentiel important pour la gestion des champignons phytopathogènes (**Das *et al.*, 2012**).

2.3.3. Production des composés organiques volatiles (VOCs) :

Sont un mélange complexe de molécules de faible poids moléculaire, lipophiles et odorants, capable de diminuer ou inhiber la croissance du pathogène (**Schulz *et al.*, 2017**), sont aussi dotés d'activité antimicrobienne et améliorent la croissance des plantes et leur résistance systémique (**Tahir *et al.*, 2017**).

2.4. Les agents phytopathogènes sensible à *Bacillus* :

- *Trichoderma* ;
- *Fusarium Oxysporum* ;
- *Aspergillus Niger* ;
- *Botrytis cinerea* ;
- *Penicillium sp.* ;
- *Alternaria alternata* ;
- *Colletotrichum* (**Mebarki & Benakli, 2017**).

Chapitre II

Matériel et Méthodes

1. Cadre d'étude

L'objectif principal de notre étude est d'identifier l'agent phytopathogène responsable de la maladie de la vigne présente dans le jardin botanique de l'Université du 20 août 1955 de Skikda. Et de tenter de trouver une solution naturelle ; rechercher l'antagoniste approprié pour la lutte biologique.

Notre travail a été réalisé au sein du laboratoire de microbiologie n°213 situé dans le Hall technologique de la Faculté de technologie de l'université du 20 août 1955 de Skikda, durant la période 9 mars 2023 au 2 mai 2023.

2. Description du jardin botanique

Le Jardin botanique et mexicain de l'Université du 20 août 1955 est situé sur la route d'El Hadaiek, dans la partie ouest du campus universitaire, à environ 4 km au sud-ouest de la ville de Skikda. Il est considéré comme l'un des plus anciens de la région, car il a été fondé en 1900 par l'ancienne école de Philippeville (Sakhraoui *et al.*, 2019).



Figure 2 : La situation géographique du jardin botanique.

3. Matériel

3.1. Matériel expérimental :

Tableau 4 : Récapitulatif du matériel utilisé.

Appareillage	Verrerie	Réactifs	Divers
Bec bunsen	Béchers	Eau distillée	Anse de platine
Agitateur+plaque chauffante	Lame	Eau minérale	Pipette pasteur
Bain marie	Lamelle	Eau physiologique (0.9%)	Cuillère
Balance	Boite de pétri	Glycérine végétale	Couteau
Microscope	Flacon	Bleu de méthylène	Disque papier
Réfrigérateur	Tube à essai	L'Hypochlorite de Sodium	wattman
	Tube hémolyse-verre de montre	Éthanol	Spatule
	Tube conique	Gélose nutritive (lyophilisée)	Pince
	Erlenmeyer	Sabouraud (lyophilisée)	Papiers aluminium
	Ampoule à décanter	Huile d'olive	Papier filtre
	Entonnoir en verre	Alginate (tropical gin)	Papier para film
		CaCl ₂	Papier buvard
		Tryptone agar	
		Glucose (Sigma_aldirich)	
		Extrait de levure	
		MgSO ₄	
		Alcool	
		Fuchsine	
		Violet de gentiane	
		Lugol	
		Acétate d'éthyle	
		L'eau de robinet	

3.2. Matériel végétal :

Nous avons travaillé sur la vigne (*Vitis vinifera* L., 1753)

D'après **Chalabi Ramdane** dans son livre dans lequel il parle des jardins de l'université 20 août 1955 skikda _ Algérie : "J'ai introduit cette espèce à partir de décembre 2009 au niveau de différents jardins : botanio (181 plants), jardin d'hôtes (68 plants), pelouse (25 plants).

Les cépages cultivés (nombre : 13) sont conduits en palisser, en treille et en gobelet Red globe, Dattier de Beyrouth, Italia, Alphonse Lavallée, Sultanine, Cardinal, Dabouki (Sabel), Amambouhmar, Chasselas, Ora, (Incomparable, Muscat de Hambourg, Muscat d'Alexandrie" (**Chalabi, 2019**).



Figure 3 : la vigne malade.

3.3. Matériel biologique :

Nous avons été fournis par le laboratoire de microbiologie :

- La levure (*Saccharomyces cerevisiae*) ;
- La bactérie lactique (*Lactobacillus bulgaricus*).

4. Méthodes

Durant notre travail, nous avons effectué notre expérience dans une zone aseptique assurée par le bec bunsen.

4.1. Échantillonnage :

Les échantillons (sol et vigne) sont pris à partir du jardin botanique de l'Université. Le prélèvement du sol a été réalisé à l'aide d'une cuillère stérile. Nous avons prélevé deux échantillons ; l'un provenant du sol où la vigne a été plantée, et le second dans un endroit plus éloigné (témoin). Nous avons également prélevé l'écorce de la vigne à l'aide d'un couteau stérile.

Ainsi, nous avons mis chaque échantillon (sol témoin infecté, sol témoin non infecté, écorce de la vigne) dans un sachet en papier stérile.



Figure 4 : L'écorce de la vigne.

Figure 5 : Sol non infecté.

Figure 6 : Sol infecté.

4.2. Isolement de l'agent phytopathogène :

4.2.1. Désinfection :

L'isolement est réalisé à partir de fragments de l'écorce présentant les symptômes caractéristiques de la maladie ; nous avons remarqué la formation de tâches sur les feuilles allant du brun au noir, et d'autres prennent une teinte brune rougeâtre.

La méthode est faite dans des conditions aseptiques, nous désinfectons deux fragments récoltés par trempage dans l'eau javellisée (Hypochlorite de Sodium) stérile pendant deux minutes, puis rincés dans l'éthanol pendant dix minutes, et en fin dans l'eau distillée stérile, puis séché sur papier buvard stérile. La désinfection est effectuée pour éliminer les microflores.

Afin de procéder au test d'antagonisme, il est nécessaire, d'une part, d'isoler l'agent phytopathogène responsable de la maladie de la vigne à partir de l'écorce de l'arbre à partir de son écorce et du sol infecté (**Liangliang et al., 2022**).



Figure 7 : Les étapes de la désinfection.

4.2.2. Isolement de l'agent antagoniste :

4.2.2.1. Sol infecté :

La préparation de suspension consiste, tout d'abord, à préparer la solution du sol, nous mettons un peu de sol dans un tube à essai et en ajoute 5 ml de l'eau physiologique stérile (0.9%), puis homogénéisé manuellement pendant 20 minutes.

4.2.2.2. Sol non infecté :

Pour la préparation de la suspension, nous recommençons le même processus effectué pour le sol infecté, dans les mêmes conditions.

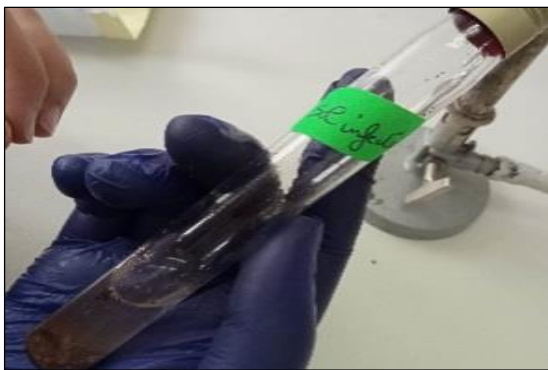


Figure 8 : Suspension du sol infecté.



Figure 9 : Suspension du sol non infecté.

4.3. Mise en culture :

4.3.1. Préparation des milieux de culture :

- Mettre 14 g de la poudre de Gélose nutritive (GN) dans un bécher ;
- Remplir jusqu'à 0,5 litre avec de l'eau distillée ;
- Poser le bécher sur la plaque chauffante + agitateur ;
- Laisser le bécher jusqu'à ébullition ;
- Répartir la GN liquide dans les flacons pour stérilisation à l'autoclave à 120 C° pendant 20 minute ;
- De la même manière, nous préparons le milieu de Sabouraud (SB) la seule différence 32,5g de Sabouraud dextrose agar dans 0.5 litre de l'eau (Delarras, 2004).

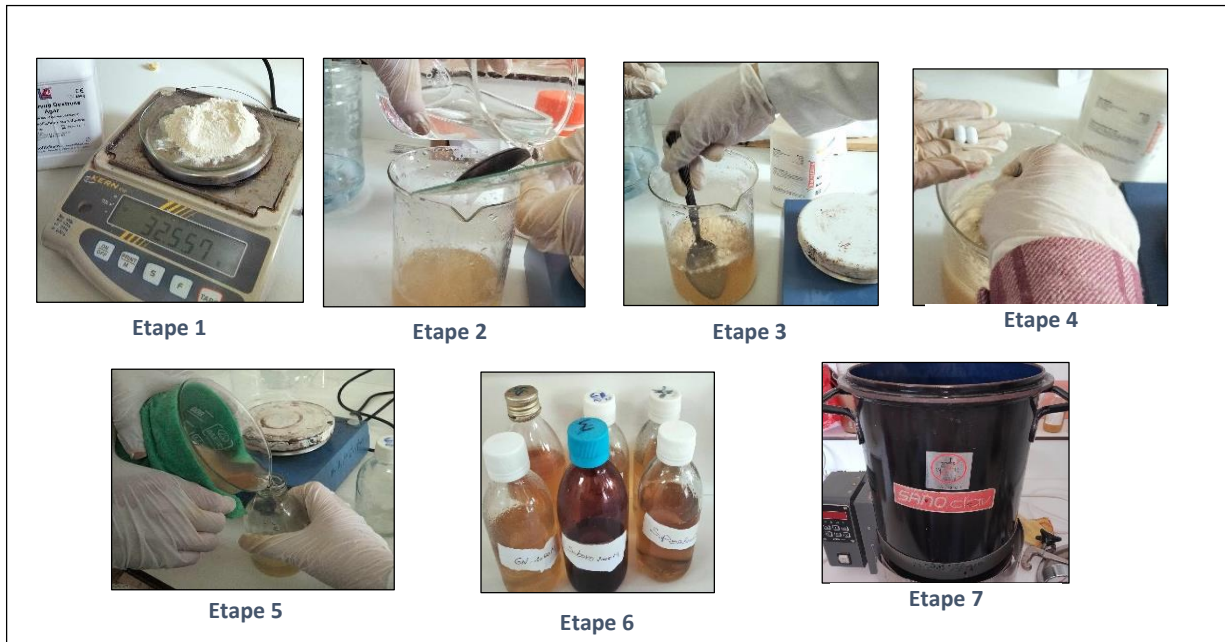


Figure 10 : Préparation des milieux de culture.

4.4. Ensemencement :

4.4.1. La vigne :

Les fragments d'écorce désinfectés de la vigne sont placer à l'aide d'une pince stérile dans le centre des boites de pétri, une contenant GN et l'autre SB.

Les boites sont mises à incuber pendant six (06) jours à une température ambiante et l'obscurité.

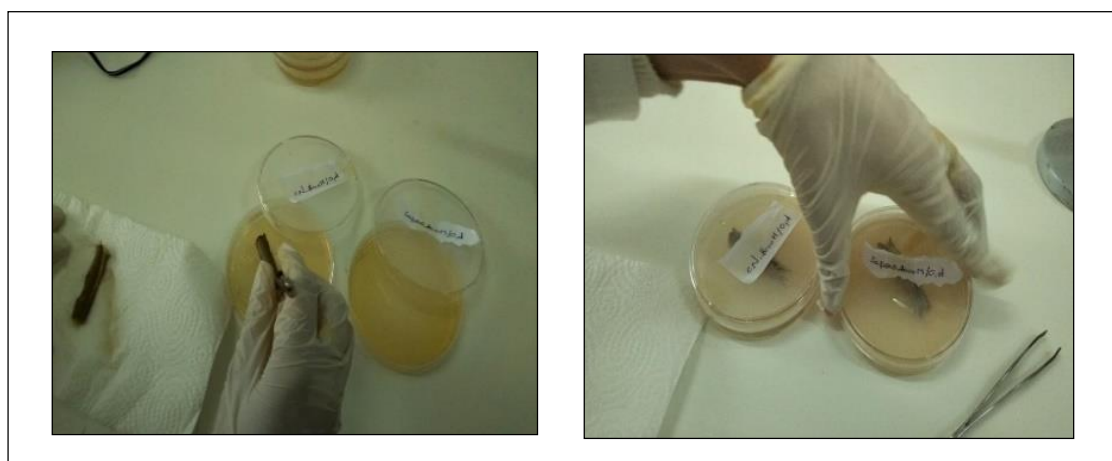


Figure 11 : Ensemencements des fragments d'écorce de la vigne.

4.4.2. Sol infecté :

La suspension homogénéisée du sol infecté a été ensemencé à l'aide de la méthode par épuisement en strie avec la pipette pasteur stérile dans quatre boîtes de pétri (**Guezlane-Tebibel *et al.*, 2008**). Deux contenant GN et deux contenant SB, les boîtes sont incubés à l'envers température ambiante et à l'obscurité.

4.4.3. Sol non infecté :

En recommence le même processus effectué pour le sol infecté, dans les mêmes conditions.



Figure 12 : L'ensemencement des sol.

NB : Les boîtes témoin sont des boîtes sans confrontation ; nous avons trois (3) boîtes témoin :

- Des écorces de la vigne ;
- Du sol non infecté ;
- Du sol infecté.

5. Sélection des isolats

Les colonies isolées ont été sélectionné pour subir les tests d'antagonisme en présence des boites témoins.

5.1. Identification des champignons :

5.1.1. Observation macroscopique :

Est essentiellement basée sur les caractères culturels et morphologiques microscopiques (**Botten *et al.*, 1990**).

L'identification se fait à l'œil nu en observant la boîte recto-verso selon les caractéristiques suivantes :

- La vitesse de croissance (rapide, moyenne, lente) ;
- La texture des colonies ;
- La couleur des colonies ;
- La couleur du revers de la culture ;
- La topographie.

5.1.2. Observation Microscopique :

5.1.2.1. L'état frais :

Consiste en l'examen microscopique, Ce type d'observation permet d'apprécier, à l'aide du microscope optique, la morphologie des champignons, des levures et des moisissures.

L'observation est réalisée en utilisant la méthode de drapeau (technique de Rothe) :

- Découper un morceau de ruban adhésif transparent "scotch" en évitant de laisser des empreintes sur la face adhésive. Utiliser une pince pour le manipuler ;
- Appliquer la face adhésive sur la colonie de moisissure ;

Placer le morceau de ruban sur une lame (l'observation peut se faire à sec ou avec une goutte d'eau ou de Bleu de méthylène sur la lame) ;

- Observer la moisissure en faible luminosité avec un objectif x10 et /ou 40 (**Delarras, 2014**).

5.2. Identification des bactéries :

5.2.1. Observation macroscopique :

Il s'agit de l'étude de l'aspect de la colonie, sa taille, sa forme, sa couleur et sa consistance sont caractéristiques de chaque espèce. Elle nécessite l'observation à l'œil nu, en lumière naturelle et artificielle, en éclairage direct et par transparence des colonies.

5.2.2. Observation microscopique :

5.2.2.1. L'état frais :

Est utilisé pour observer la mobilité, la morphologie et leurs modes de regroupement.

À partir d'une culture sur milieu solide :

- Déposer une gouttelette d'eau physiologique stérile sur une lame ;
- Prélever une fraction de colonie à partir de milieu de culture (SB ou GN) avec une anse de platine ;
- Émulsionner très délicatement pour obtenir une suspension homogène ;
- Recouvrir d'une lamelle en évitant de piéger des bulles d'air ;
- Ne pas prolonger l'observation au-delà de 3 à 10 minutes ;
- Veiller à ce que le liquide ne déborde pas (sinon, jeter la lame et recommencer) ;
- Placer la lame avec la lamelle sur le porte-objet et en utilisant un objectif x40 ;
- Observer rapidement en faible luminosité (car les cellules sont transparentes) :
 - Fermer le diaphragme
 - Abaisser le condensateur
 - Diminuer l'éclairage de la lampe si le microscope le permet.

5.2.2.2. Coloration de Gram :

Une coloration de Gram peut également être réalisée pour différencier les bactéries selon leur structure de paroi :

- À partir d'une colonie, un frottis est réalisé, séché à l'air et fixé par la chaleur ;
- Une première application de violet de gentiane est effectuée pendant une minute, puis rincée à l'eau ;
- Une deuxième application de Lugol est réalisée pendant une minute, puis rincée à l'eau ;
- Une troisième application d'alcool est réalisée pendant 15 secondes, puis rincée ;
- Une quatrième application de fuchsine est effectuée pendant une minute ;
- Ensuite, la lame est rincée et séchée à l'air ou délicatement entre deux feuilles de papier filtre fin (ou buvard), sans froter ;
- Enfin, l'observation se fait au microscope avec un objectif x100 à immersion. Avec cette coloration double, les bactéries "Gram +" apparaissent en violet foncé, tandis que les bactéries "Gram -" sont colorées en rose ou en rouge (Delarras, 2014).

6. Test d'antagonisme

Pour connaître les facteurs affectant l'antagonisme, nous étudions son développement et sa relation avec l'agent pathogène par deux méthodes (Hibar *et al.*, 2005) :

6.1. Confrontation directe :

- Ce test se fait dans une boîte de Pétri ;
- Remplir la boîte de Pétri avec un milieu de culture adapté (SB) ;
- Ensemencer deux échantillons différents, un champignon et une bactérie ;
- Prélever À l'aide d'un couteau stérile, un cylindre de gélose contenant le champignon de la boîte témoin et le placer à une distance de 3 centimètres du centre de la boîte ;
- Prélever une colonie bactérienne à l'aide de l'anse de platine à partir de la boîte de témoin (GN) ;
- Placer la colonie dans la boîte (SB) en laissant une distance de 3 à 5 centimètres du cylindre de champignon ;
- Incuber La boîte de pétri ensemencer pendant six (06) jours à une température ambiante.

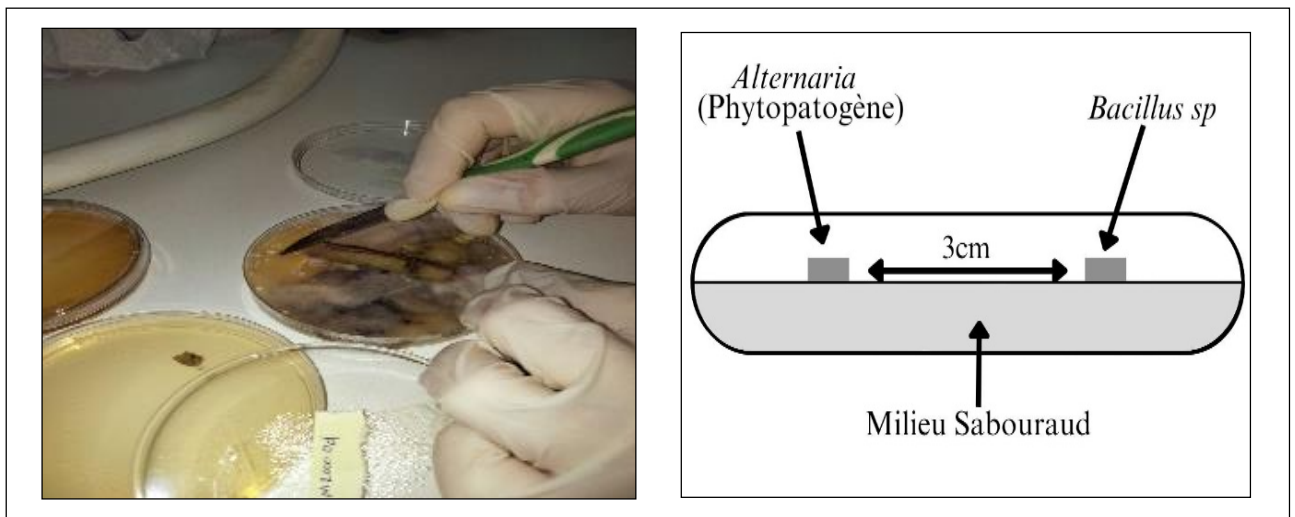


Figure 13 : Confrontation directe entre *Alternaria sp.* et *Bacillus sp.*

6.2. Confrontation indirecte :

Cette méthode consiste à repiquer l'antagoniste et le phytopathogène dans deux boîtes séparées :

- Remplir la boîte de SB et le couvercle par GN, et laisser solidifier ;
- Prélever à l'aide d'un couteau stérile, un cylindre de gélose contenant l'agent phytopathogène ;
- Déposer le cylindre au centre de la gélose SB ;
- Prélever une colonie isolée de l'agent antagoniste à l'aide de l'anse stérile ;
- Ensemencer la colonie prélevée par la méthode en stries sur GN du couvercle ;
- Poser le couvercle sur la boîte et fermer avec du Parafilm ;

- Incuber La boîte à l'envers est incubée à température ambiante pendant six (06) jours.

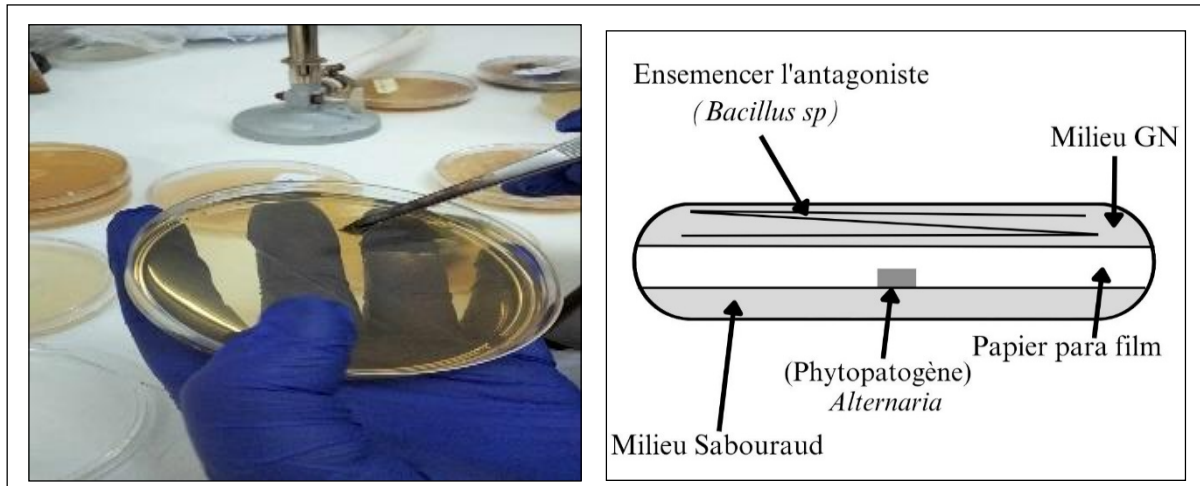


Figure 14 : Confrontation indirecte entre *Alternaria sp.* et *Bacillus sp.*

6.3. Activité antifongique des biosurfactants :

Afin de réaliser ce test, nous avons eu recours à l'utilisation des souches pures de :

- *Saccharomyces cerevisiae* ;
- *Lactobacillus bulgaricus* ;
- *Bacillus sp.* (agent antagoniste).

6.3.1. Préparation des préculture (l'inoculum) :

Pour revivifier les souches pures ; nous avons procédé comme suit :

- Verser quatre millilitre de bouillon nutritif (BN) stérile dans chaque tube à essai ;
- Ensemencer chaque souche pure dans le BN puis incubé à température 37 C° pour les bactéries et 30 C° pour la levure pendant 24 h.

6.3.2. Fermentation en batch :

Mettre dans un erlenmeyer stérile de (500 ml) :

- 100 ml d'eau minérale ;
- 1 ml d'huile végétale (olive) ;
- 1 ml de l'inoculum ;
- Agitation manuelle ;
- Incubation 3 jours à température ambiante et à l'obscurité.

NB : Nous faisons ce processus pour tous les inoculums que nous avons préparés précédemment, chacune séparément dans un erlenmeyer différent. la même procédure répété en changeant la source de carbone glycérol au lieu de l'huile d'olive.

Au total nous avons préparé six (06) erlenmeyers comme suit :

- Huile+ *Saccharomyces cerevisiae* ;
- Huile+ *Lactobacillus bulgaricus* ;
- Huile+*Bacillus sp.* ;
- Glycérine+ *Saccharomyces cerevisiae* ;
- Glycérine + *Lactobacillus bulgaricus* ;
- Glycérine+ *Bacillus sp.*



Figure 15 : Préparation des milieux de fermentation.

6.3.3. Récupération des surnageants :

Elle à été effectuée selon deux méthodes :

6.3.3.1. par centrifugation :

Après l'incubation des six (06) erlenmeyers :

- Verser un volume du milieu de fermentation dans chaque tube à hémolyse ;
- Mettre chaque tube à hémolyse dans un autre tube conique puis les identifier ;
- Placer les dans la centrifugeuse 7000 rpm pendant 20 minutes, pour séparer la biomasse et les surnageants (**Hentati, 2018**).



Figure 16 : Récupération des surnageants par centrifugeuse

6.3.3.2. Séparation liquide-liquide :

Selon les résultats obtenus du test des disques nous avons sélectionné les biosurfactants dont la source de carbone est l'huile d'olive ; nous avons alors trois milieux de fermentation :

- Huile + *Saccharomyces cerevisiae* ;
- Huile+ *Lactobacillus bulgaricus* ;
- Huile+*Bacillus sp.*

par défaut, vu le problème rencontré lors de la récupération des biosurfactants par centrifugation, nous avons choisi une autre méthode basée sur la séparation liquide-liquide qui consiste à :

- verser un volume d'acétate d'éthyle dans le milieu de fermentation 1:1 V ;
- mélanger le contenu de chaque erlenmeyer ;
- transvaser chaque erlenmeyers dans une empoule à décantation ;
- placer les dans leurs support approprié ;
- laisser les à l'obscurité pendant 24 H ;
- Récupérer chaque phase organique dans un bécher identifié ;
- Placer les becher dans l'étuve à 30 C° jusqu'à évaporation du solvant ;
- Récupérer les trois biosurfactants brut pour utilisation ultérieure (Grady *et al.*, 2019).



Figure 17 : Recupération des surnageants.

6.3.4. Test des disques

- Couler deux boîtes Pétri par GN ;
- Ensemencer les par le champignon phytopathogène en utilisons l'anse de platine ;
- Diviser chaque boîte en quatre cadrans ;
- Imprégner un disque stérile de papier whatman dans chaque tube à hémolyse à l'aide d'une pince (juste dans la partie surnageante) ;
- Placer chaque disque imprégné dans un cadrans une partie des deux boîtes de Pétri ;
- Laisser les boîtes sur paillasse pendant une heure ;

Incuber les boîtes à l'envers à température ambiante

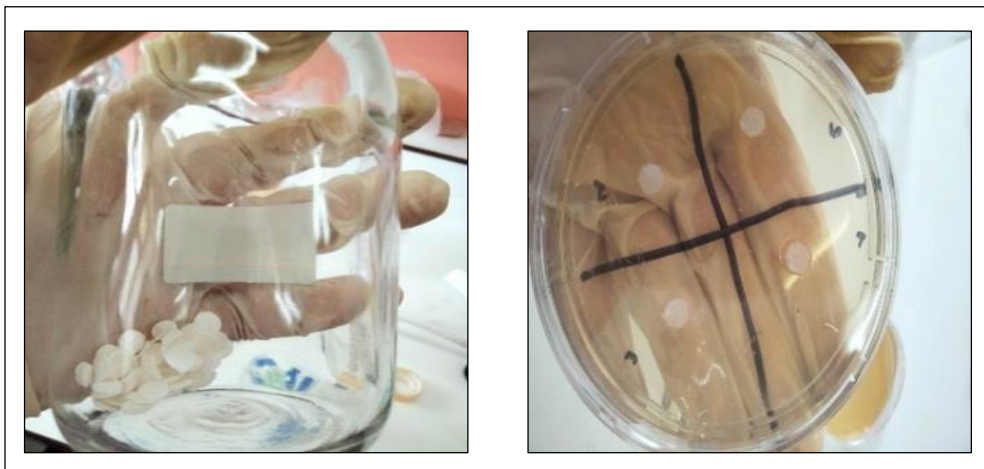


Figure 18 : Test des disques.

7. Microencapsulation

7.1. Préparations des solutions :

7.1.1. Préparation du bouillon (TYG) :

Dans un bécher en ajoute :

- 5 g de tryptone ;
- 3 g d'extrait de levure ;
- 5 g Glucose ;
- 0.247 g $Mg\ So_4 \cdot 7H_2O$;
- 1L d'eau distillée.

En mélange tous et en le met dans l'agitateur pendant 20 minutes, après en verse le mélange dans un flacon (Downes & Ito, 2001).

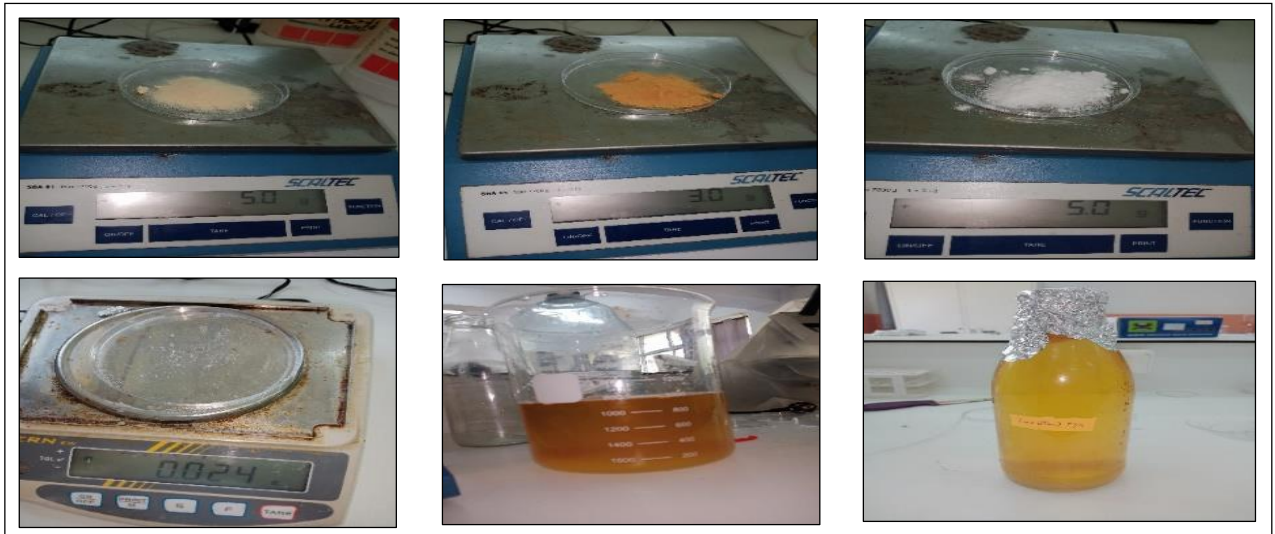


Figure 19 : Préparation du bouillon (TYG).

7.1.2. Préparation la solution d'alginate

Dans un bécher en ajoute :

- 2 g d'alginate de sodium ;
- 100 ml d'eau distillée.

En mélange jusqu'à virage de la couleur jaune, après en verse le mélange dans un flacon, (Benhouria *et al.*, 2015).



Figure 20 : Préparation de la phase organique.

7.1.3. Préparation chlorure de calcium (CaCl_2) :

Dans un bécher en ajoute :

- 4 g de chlorure de calcium ;
- 100 ml d'eau distillée.

En mélange tous et en la verse dans un flacon (**Benhouria et al., 2015**).



Figure 21 : Préparation chlorure de calcium (CaCl_2).

On met les flacons du bouillon (TYG), d'alginate, et de Chlorure de calcium (CaCl_2) dans l'autoclave pendant 20 min a une température de 120 °C.



Figure 22 : Les préparations dans l'autoclave.

7.2. Préparations des billes :

Dans un bécher de 100 ml qui contient de *Saccharomyces cerevisiae* en ajoute :

- 10 ml d'eau distillé stérile ;
- Agitation pendant une minute ;
- 10 ml d'alginate ;
- Agitation pendant 15 minute ;

- En prend la solution à l'aide d'une seringue (2,5 ml), dans une boîte de pétrie contient chlorure de calcium, en met la solution de la seringue goutte à goutte tout en mélangeant pour voire des billes, en même temps déplacer la boîte de pétrie circulairement.

Incubation pendant 24h à une température ambiante.

- Après, Mettre un entonnoir qui contient un papier filtre au-dessus d'un bécher ;
- Déverser le contenu de la boîte Pétri qui contient la levure sur le papier filtre après en rince la boîte Pétri deux fois par l'eau distillée stérile ;
- Lorsque la solution est presque finie d'affaissement, rincer le papier filtre du côté par l'eau distillée stérile ;
- Lorsqu'il ne reste qu'une petite quantité de la solution sur le papier filtre, retournez-le sur la boîte de Pétri ;
- Ajouter 5 ml d'eau physiologique stérile dans la même boîte de Pétri, mélanger un peu;
- Conserver la solution au réfrigérateur à 4 C° jusqu'à l'utilisation ;

Répétez le même processus pour *Lactobacillus bulgaricus* et *Bacillus sp.*



Figure 23 : Préparation des billes (traitement).

Afin de confirmer la présence des microorganismes, nous avons ensemencé les billes dans un milieu de culture GN.

7.2.1. Ensemencement :

Coulée une boîte de pétrie par GN, puis l'ensemencer avec les billes de *Saccharomyces cerevisiae* qui s'est coincé dans le papier filtre.

Répétez le même processus pour *Lactobacillus bulgaricus* et *Bacillus sp.*



Figure 24 : L'ensemencement des billes.

8. Test in situ

Consiste à tester sur terrain (jardin botanique) les microbilles préparées ; il s'agit de trois pieds de vigne malade arrosés par les deux flacons biosurfactant de (*Saccharomyces cerevisiae* et *Lactobacillus bulgaricus*) et le tube a essai (*Bacillus sp.*) selon la figure suivants :

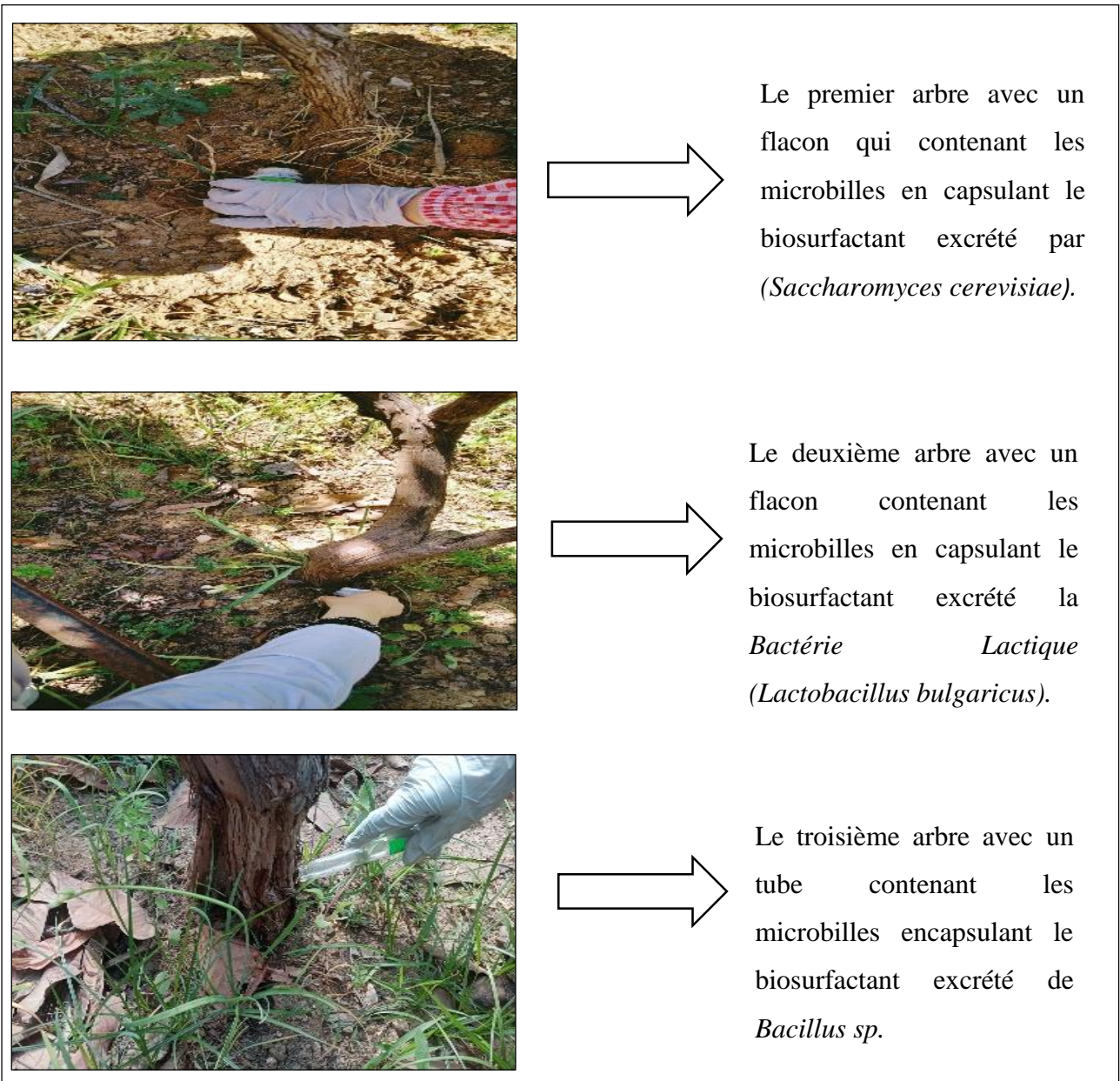


Figure 25 : Test in situ par les biosurfactant.

Chapitre III




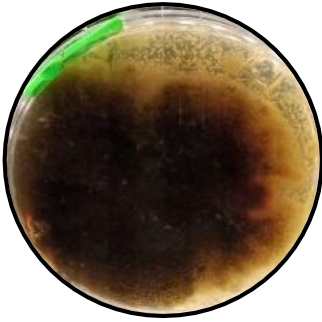
Résultats et Discussion

1. Résultats

1.1. Résultats de la mise en culture des fragments de l'écorce de la vigne :

Les résultats de l'ensemencement des fragments de vigne sur les milieux GN et SB sont récapitulés dans le tableau suivant :


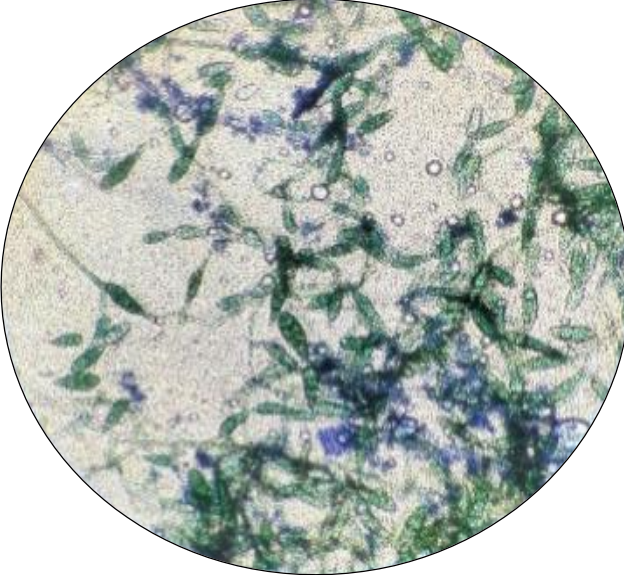
Tableau 5 : Observation macroscopique des isolats de la vigne.

Photos des boîtes		Aspect macroscopique
Recto	Verso	
		<p>Sur GN :</p> <ul style="list-style-type: none"> • Des grosses colonies aplaties ; • Des filaments couleur blanche et grise ; • Des colonies de taille moyenne couleur beige.
		<p>Sur SB :</p> <ul style="list-style-type: none"> • Des grosses colonies surélevées de couleur beige ; • Texture laineuse de couleur verte, blanche et marron et revers marron et noir ; • La vitesse de croissance moyenne.

1.2. Résultats des observations microscopiques (boîtes témoin) :

Les observations microscopiques d'isolats de la vigne sont récapitulées dans le tableau suivant :

Tableau 6 : Résultats de l'état frais des isolats de la vigne.

Observation microscopique	Aspect microscopique
	<p>Sur GN :</p> <ul style="list-style-type: none"> • Des bacilles isolés • Présence des spores et endospores • Mobile par ciliature pérित्रiche
	<p>Sur SB :</p> <ul style="list-style-type: none"> • Des filaments septés ; • Des macro-conidies septés ; • Forme ellipsoïde à cylindrique vert et court ; • Présence des chaînes des conidies.

1.3. Résultats de La mise en culture du sol :

Le résultat des boîtes témoin des sols sur GN après incubation sont illustrées dans les figures suivant :

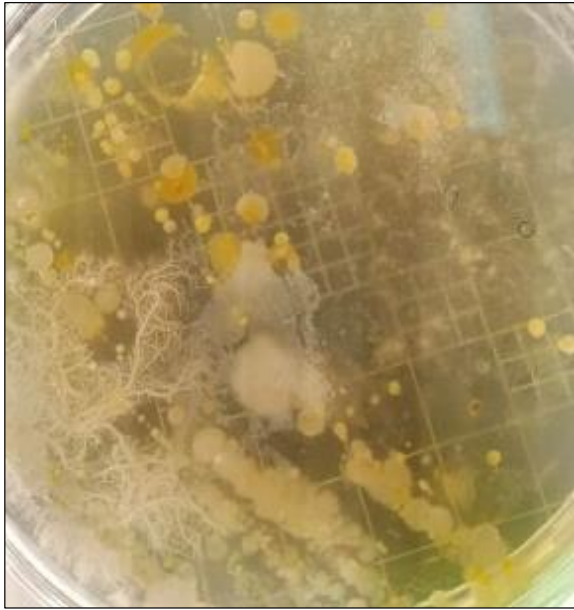


Figure 25 : Boite témoin de sol non infecté.



Figure 26 : Boite témoin de sol infecté.

1.4. Résultat de la coloration de Gram :

Bactérie antagoniste du genre *Bacillus sp* apparaît à la coloration de Gram sous forme bâtonnet sporulée coloré en mauve (**Figure 25**).

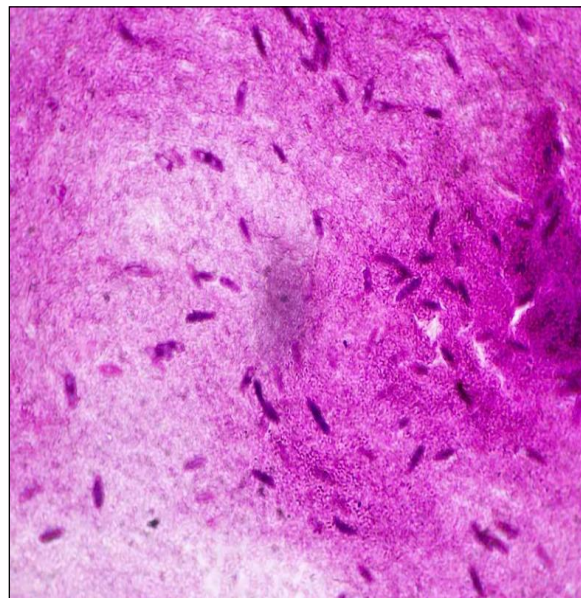


Figure 27 : Coloration de Gram de bactérie *Bacillus sp*. (Objectif X100).

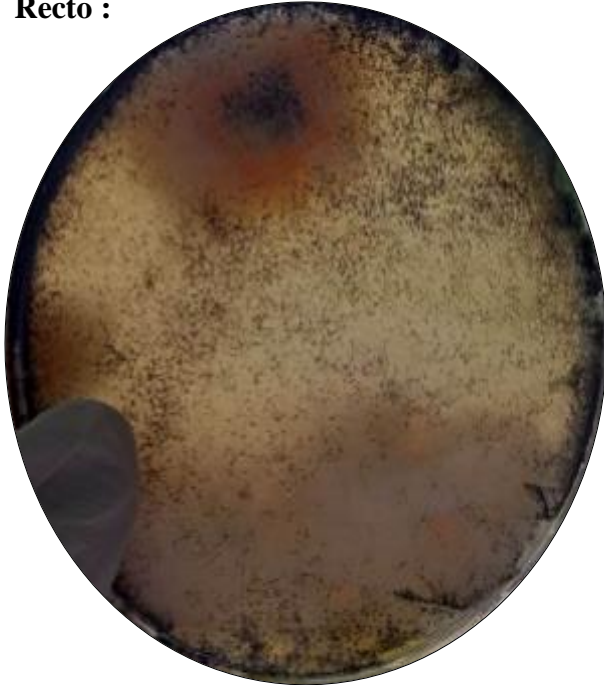
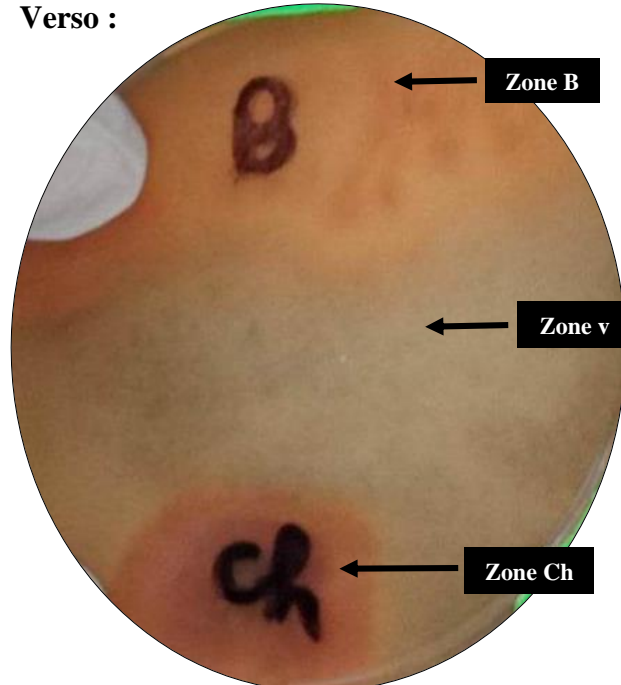
1.5. Résultats des tests d'antagonisme (confrontation) :

1.5.1. Résultats des observations macroscopiques des tests de confrontation :

1.5.1.1. Résultat de la Confrontation directe :

Les observations macroscopiques du test de confrontation directe sont récapitulées dans le tableau suivant :


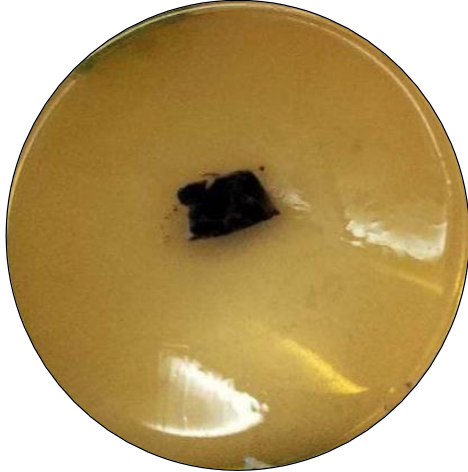
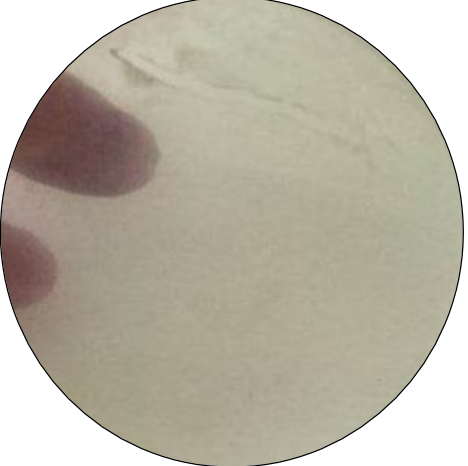
Tableau 7 : Résultats d'observation macroscopique du test de confrontation directe.

Aspect macroscopique	
<p>Recto :</p> 	<p>Verso :</p> 
<ul style="list-style-type: none"> • Présence des spores ; • Couleur principale de bactérie est blanche ; • Couleur principale de champignons est orange et marron dans le centre de la colonie fongique. 	<p>Nous observons trois 3 zones distinctes :</p> <ul style="list-style-type: none"> • La croissance très faible dans la zone v (vide) intermédiaire montre l'antagonisme entre la zone B (<i>Bacillus sp</i>) et Ch (<i>Alternaria sp</i>).

1.5.1.2. Résultats de la Confrontation indirecte :

Les observations macroscopiques du test de confrontation indirecte sont récapitulées dans le tableau suivant :

Tableau 8 : Résultats d'observation macroscopique du test de confrontation indirecte.

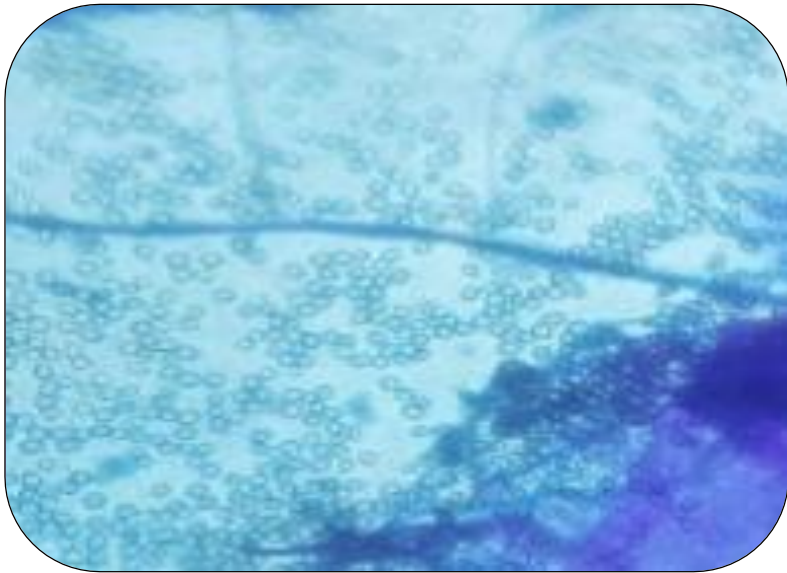

Confrontation indirecte	Aspect macroscopique	
	<p>Champignon :</p> 	<ul style="list-style-type: none"> • Aucune prolifération du cylindre du champignon.
	<p>Bactérie :</p> 	<ul style="list-style-type: none"> • Des colonies muqueuses ; • Couleur blanche ; • Croissance rapide formation d'un tapis.

1.5.2. Résultats de l'observation microscopique du test de confrontation :

1.5.2.1. Résultats de la Confrontation directe

Les observations microscopiques du test de confrontation directe sont récapitulées dans le tableau suivant

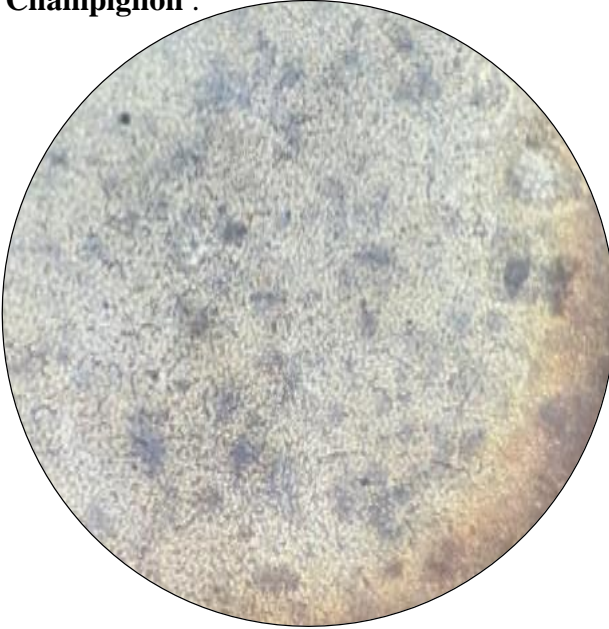
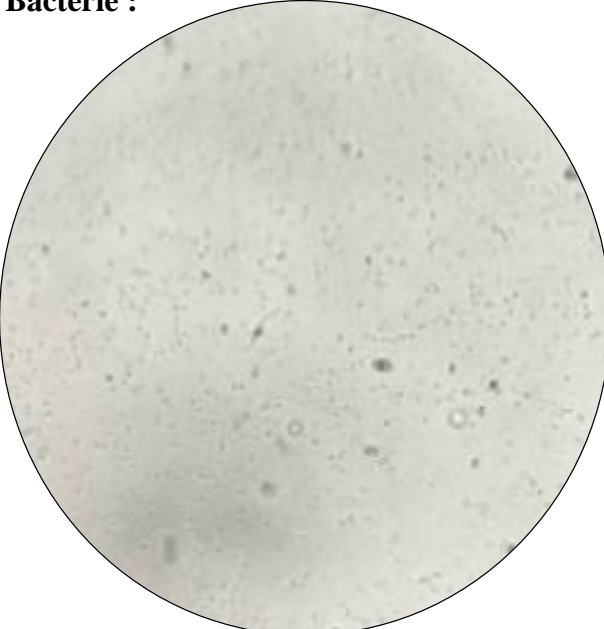
Tableau 9 : Observation microscopique du test de confrontation directe.

Aspect microscopique	
Côté du champignon	 <ul style="list-style-type: none"> • La morphologie des macro conidies d'Alternaria à changer de la forme ellipsoïde en micro conidies rondes et ovoïde.
Côté de a bactérie	 <ul style="list-style-type: none"> • Forme Bâtonnet ; • Mobile ; • Spores libres.

1.5.2.2. Résultats de la Confrontation indirecte :

Les observations microscopiques du test de confrontation indirecte sont récapitulées dans le tableau suivant :

Tableau 10 : Résultats de l'observation microscopique du test de confrontation indirecte.

Aspect microscopique	
Champignon : 	Bactérie : 
<ul style="list-style-type: none">• La germination des spores a été bloquée ;• La morphologie de champignon est réduite.	<ul style="list-style-type: none">• Des bâtonnets avec quelque spore.

1.6. Résultats de Test des disques

1.6.1. Résultats de l'activité antifongique du biosurfactant

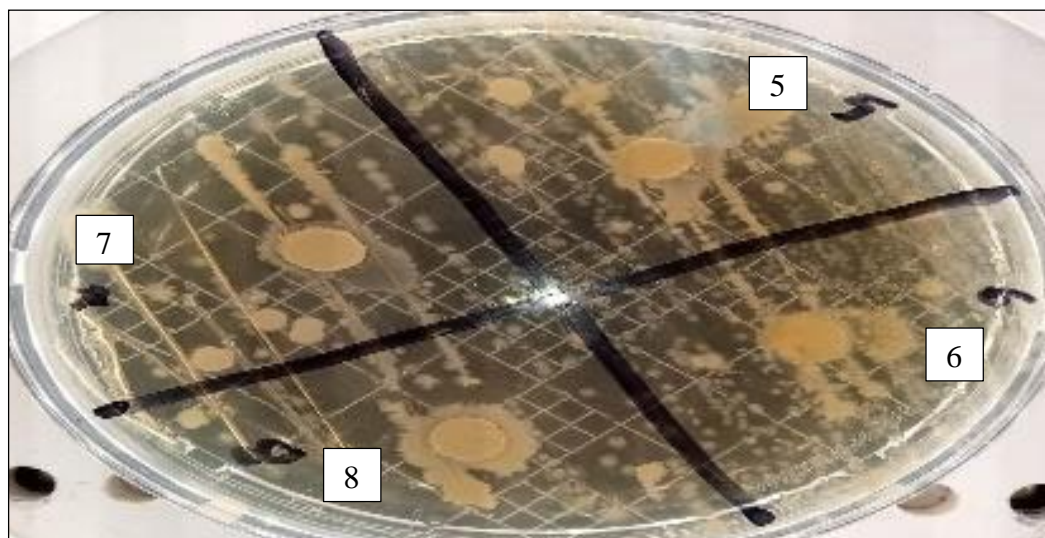


Figure 28 : Résultat du test des disques

(5,7 : *Bacillus sp* ; 6 : *Lactobacillus bulgaricus* ; 8 : *Saccharomyces cerevisiae*).

Selon la (**Figure 28**) la boîte de pétri montre :


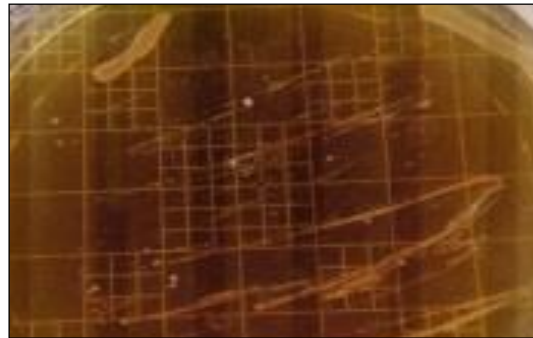
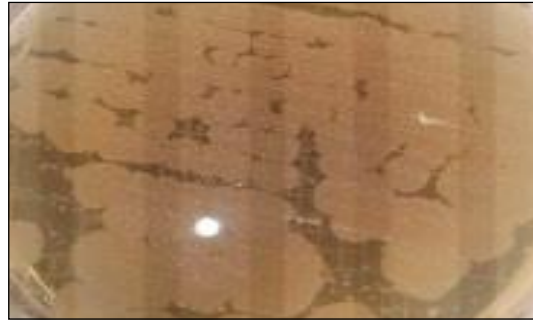
- La formation des halos (zone d'inhibition), autour des disques imprégnés par les biosurfactants de *Bacillus sp*, *Saccharomyces cerevisiae* et *Lactobacillus bulgaricus* signifie une activité antifongique positive.
- Très faible prolifération de champignon comparé à la boîte témoin.

1.7. Résultats de l'observation macro/microscopique des billes :

1.7.1. Observation macroscopique :

Les observations macroscopiques sont récapitulées dans le tableau suivant :


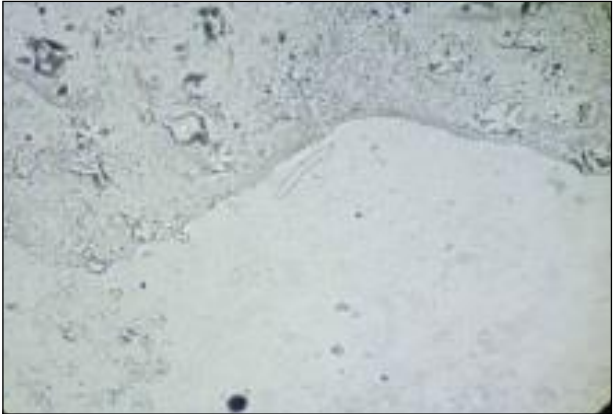

Tableau 11 : L'aspect macroscopique.

Nom	Photos des boites	Aspect macroscopique
Les billes		<ul style="list-style-type: none">• Ils apparaissent sous forme des microbilles
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>		<ul style="list-style-type: none">• Des colonies aplaties de couleur blanche.
<i>Lactobacillus bulgaricus</i>		<ul style="list-style-type: none">• Des colonies aplaties rugueuse.• Couleur blanche.

1.7.2 Observation microscopique :

Les observations microscopiques sont récapitulées dans le tableau suivant :

Tableau 12 : L'aspect microscopique de l'état frais des microorganismes encapsulés.

Nom	Observation microscopique	Aspect microscopique
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>		<ul style="list-style-type: none"> • Cellule eucaryote immobile isolée
<i>Lactobacillus bulgaricus</i>		<ul style="list-style-type: none"> • Des bacilles immobiles isolés
<i>Bacillus sp.</i>		<ul style="list-style-type: none"> • Des bacilles isolés • Présence de spore • Mobile

2. Discussion

Selon le résultat des études macroscopiques et microscopique (**tableau 5**) et l'identification des isolats, le genre du phytopathogène peut être rattaché à *Alternaria sp.*

Ce résultat corrobore avec ceux lui de **Chelahi & Benguerba (2021)** qui ont pu isoler à partir des tubercules de pomme de terre *Alternaria sp.*

Benada (2010) a confirmé également la présence d'*Alternaria sp.* dans les cultures des carottes, des tomates et des céréales. Elles se présentent sous forme de filaments cloisonnés et de longues conidies ramifiées.

Le résultat de l'observation macroscopique des feuilles de la vigne malade (**figure 3**) concorde avec l'observation constaté par **Kaba (2018)** dans son étude ; la présence de symptômes d'*Alternaria sp.* sous forme des taches brunes à noires éparpillées le long de la feuille de pomme de terre.

Et pour l'identification de l'antagoniste ; les résultats de l'observation macroscopique (**tableau 8**) et microscopique (**tableau 9**) ainsi que les résultats de la coloration de Gram nous permet de le rattacher au genre *Bacillus sp.*

Ce résultat concorde avec l'étude de **Bentayeb & Boufekhed (2021)**, qui ont isolé l'antagoniste de la rhizosphère de tomate.

Et concernant le Test de confrontation ;

Les résultats du test d'antagonisme *Bacillus sp.* vis à vis d'*Alternaria sp.* (**Tableau 7**) montrent après 6 jours d'incubation une zone intermédiaire vide et croissance très faible de champignon observé à l'œil nu ; ceux-ci peut être expliqué par l'efficacité de l'activité antifongique de *Bacillus sp.* Contre *Alternaria sp.* Ce résultat corrobore avec celui de **Badji & Ait (2017)**.

Et pour le Test de contact indirect ;

Les résultats obtenus après 6 jours d'incubation ont montré un blocage de la croissance fongique de phytopathogène, bien qu'il n'y ait pas eu de contact direct entre le phytopathogène sélectionné et l'antagoniste. Ce dernier a pu exercer un effet inhibiteur sur le développement de la colonie phytopathogène, il a été démontré par l'étude de **Bentayeb & Boufekhed (2021)** que la croissance mycélienne du témoin été plus importante que celles en présence de l'agent antagoniste, et avec un ralentissement de la croissance mycélienne du phytopathogène.

Enfin, nous avons étudié la possibilité de la production de biosurfactant par des micro-organismes (*Saccharomyces cerevisiae*, *Lactobacillus bulgaricus*) et leurs effet antifongique Selon l'observation macroscopique de la boîte du test des disques (**figure 28**), la formation des halos autour les disques imprégné (zone d'inhibition) confirme l'activité antifongique des biosurfactant. Ce résultat corrobore l'étude de **Laieb & Terchoune (2018)**.

Conclusion

Cette étude consistait à identifier l'agent phytopathogène de la vigne (*Vitis vinefera* L.) infecté et préparer un traitement naturel pour la lutte biologique.

L'isolement de l'agent phytopathogène se fait à partir de l'écorce de la vigne et pour l'identification on a basé sur les caractères morphologiques macroscopiques et microscopiques. L'isolement antagoniste du genre *Bacillus* a été effectué à partir du sol non infecté.

Par les méthodes de confrontation directe et indirecte on a recherché l'effet antagoniste du *Bacillus sp.* sur le développement fongique de l'agent phytopathogène *Alternaria sp.*

Le test des disques a révélé la capacité des *Saccharomyces cerevisiae*, *Lactobacillus bulgaricus* et *Bacillus sp.* à produire des biosurfactants de activité antifongique qui bloque le développement du phytopathogène *Alternaria sp.*

Certains aspects de cette étude devraient être accomplis :

- L'identification moléculaire de l'antagoniste *Bacillus sp* et du phytopathogène *Alternaria sp.*
- Le suivi des résultats du traitement naturel (test in situ) comme contrôle biologique de l'arbre infecté en tant que point de départ pour s'investir dans le domaine de la microencapsulation tout en ciblant d'autres phytopathologies présentes dans le jardin botanique , des recherches innovantes en perspectives.

Références bibliographiques

A

- Agrios G.N., (2005). Plant pathology. 5 th ed. Elsevier Academic Press. USA UK.
- Ayad D., (2019). Recherche sur les agents responsables de l'Alternarios de la pomme de terre et de la tomate en Algérie. Analyse comparative de leur diversité phénotypique et génotypique selon les systèmes de culture et les étages bioclimatiques, Th D. (ENSA)El Harrach_ Algérie.

B

- Badji Tiziri & Ait Abdelmalek Celia, (2017). Activité antifongique des bactéries de genres Bacillus et pseudomonas et effet de leur inoculation en post chez la tomate _ université Tizi- Ouzou.
 - Benada M., (2010). Etude de la variabilité phénotypique du champignon Alternaria dauci pathogène des Apiacées en vue d'améliorer les méthodes de lutte. Magister.Université d'Oran - Sénia.
 - Benhouria, Azharul, Zaghouane-Boudiaf, Boutahala & Hameed, (2015). Calcium alginate– bentonite–activated carbon composite beads as highly effective adsorbent for methylene blue .Chemical Engineering Journal (270) Pages 621-630.
 - Benoit C., (2011).Reponses adaptatives d'alternaria brassicicola au stress oxydatif lors de l'interaction avec les brassicacees rôle du métabolisme du mannitol et des Glutathion-Stransférases,Th D. université d'Angers _ France.
 - Bentayeb Roumeissa Badraa & Boufekhed Maya, (2021). Antagonisme de Pseudomonas sp., de Bacillus sp. Et de Trichoderma sp. Vis-à-vis l'agent causal de la fusariose racinaire de la tomate,Université des Frères Mentouri Constantine 1 _ Algérie.
 - Bergey's Manual, (2004). Systematic of bacteriology, Taxonomic outline of the prokaryotes. Second edition. Garrity. G.M; Bell. J.A; Lilburn. T.G, Springer, New York Berlin Heidelberg.
 - Botton, B., Bretton A., Fever M., Gautier S., Guy Ph., Larpent J.P., Reymond, P., Sanglier,J., Vayssier Y & Veau P., (1990). Moisissures utiles et nuisibles, importance industrielle, (edn) Masson, Paris.
 - Blancard D., Laterrot H., Marchoux G. & Candresse T., (2012). A colour Handbook – TomatoDiseases: identification, biology and control. Manson Publishing Ltd. 688 pp.Pénétration mata talta.
 - Brigitte B & Matthias L., (2021).Colletotrichum acutatum une nouvelle maladie des Cultures de céleri branche, article Plantes Agroscope Fiche technique, (N° 112).
-

C

- Caulier S., Nannan C., Gillis A., Licciardi F., Bragard C. & Mahillon J., (2019). Overview of the Antimicrobial Compounds Produced by Members of the *Bacillus subtilis* Group *Front Microbiol.*, 10: 302.
- Catalogue of life, (2023). <https://www.catalogueoflife.org/data/taxon/SYV>.
- Chabasse D., Bouchara J.P., Gentile L., Brun S., Cimon B., & Penn P., (2002). Cahier de formation Biologie médicale, Les moisissures d'intérêt médical, France : Bioforma. 160p.
- Chalabi R., (2019). Identification et sauvegarde du patrimoine végétal des jardins de l'Université 20 Août 1955, Skikda, Algérie, ENAG éditions Algérie 2019, page (156).
- Champion R., (1997). Identifier les champignons transmis par les semences. Editions INRA, Paris.
- Chelahi C.M. & Benguerba K.I., (2021). Isolement et identification des moisissures phytopathogènes de la pomme de terre. mémoire de master. université des frères mentouri constantine.
- Christine J., (2000). Maladies, insectes nuisibles et utiles de la pomme de terre. Edition IRDA Saintefoy Québec. Page 16.).

D

- Das A., Kamal S., Shakil N.A., Sherameti I., Oelmüller R., Dua M., Tuteja N., Johri AK. & Varma A., (2012). The root endophyte fungus *Piriformospora indica* leads to early Flowering, higher biomass and altered secondary metabolites of the medicinal plant, *Coleus forskohlii*. *Plant Signal Behav*, 7, 103–112.
- Delarras C., (2014). Pratique en microbiologie de laboratoire. Recherche de bactéries et de Leveur – moisissures, édition Lavoisier, Paris.
- Downes F.P. & Ito K., (2001). Compendium of Methods for the Microbiological Examination of Foods, 4th Ed. APHA, Washington, D.C.

F

- Fries E M., (1832). *systema mycologium*. E Moritz, Greifswald. vol.3:261-524.
-

G

- Guezlane Tebibel N., Kahlouche B. & Athmani Guemouri S., (2008). Microbiologie, travaux pratiques. Office des publications universitaires, p 62-72.
- Guiraud Joseph-Pierre, (2003). Microbiologie alimentaire. Edition Dunod. p : 301.
- Grady E.N., MacDonald J., Ho, M.T., Weselowski, B., McDowell, T., Solomon O., Renaud J. & Yuan Z., (2019). Characterization and complete genome analysis of the surfactin-producing, plant-protecting bacterium *Bacillus velezensis* 9D-6. *BMC Microbiology*. 19(1) :5-6.
- Grogan, RG. Kimble, KA. Misaghi, L. (2000). A stem canker disease of tomato Caused by *Alternaria alternata* f.sp. *lycopersici*. *Phytopathology*. 65 :880-886.

H

- Harsh Pal Bais, Ray Fall, Jorge M. & Vivanco, (2004). Biocontrol of *Bacillus subtilis* against Infection of Arabidopsis Roots by *Pseudomonas syringae* is Facilitated by Biofilm Formation and Surfactin Production, *article wib*, 134(1): 307–319.
- Hibar, Daami-Remadi, Khiareddine & El Mahjoub, (2005). Effet inhibiteur in vitro et in vivo du *Trichoderma harzianum* sur *Fusarium oxysporum* f. sp. *radicislycopersici*. *Biotechnol.Agron.Soc.Environ.* (3), 163–171.
- Hentati D., (2018). Isolement et caractérisation des bactéries marines hydrocarbonoclastes, production des biosurfactants et étude de la biodiversité microbienne au sein de trois ports de Sfax, Tunisie. Th D, Biotechnologie et Microbiologie, Université de Montpellier.p84-85.

K

- Kaba H., (2018). Prospection, isolement et purification d'isolats D'*alternaria* sp., Sur la culture de pomme de Terre de saison dans la wilaya de Mostaganem, Mémoire master de fin d'études, Université Abdelhamid Ibn Badis-Mostaganem.
 - Khadiri Mohammed, Hassan Boubaker, Askarne Latifa, Ezrari Said, Radouane Nabil, Farhaoui Abdelaaziz, El Hamss Hajar, Tahiri Abdessalem & Ait Barka Essaid, Lahlali Rachid, (2023). *Bacillus cereus* B8W8 an effective bacterial antagonist against major postharvest fungal pathogens of fruit. *Postharvest Biology and Technology* Volume 200, 112315
 - Kinsinger R.F., Shirk MC. & Fall R., (2003). Rapid surface motility in *Bacillus subtilis* is Dependent on extracellular surfactin and potassium ion. *Journal of Bacteriology*, 185(18), 5627–5631.
-

L

- Laieb & Terchoune, (2018). Bioprospection de l'activité insecticide de champignons endophytes isolés à partir du ricin commun *Ricin communis* (Euphorbiaceae, Malpighiales) . université Moustganime.
- Leelasuphakul W., Sivanunsakul P. & Phongpaichit S., (2006). Purification, Characterization and synergistic activity of β -1,3- glucanase and antibiotic extract from An antagonistic *Bacillus subtilis* NSR.
- Liangliang L., Jiwen W., Dehai L., Lei L., Jing Z., Gao L., Baitao W. & Wenling Y., (2022). The antagonistic potential of peanut endophytic bacteria against *Sclerotium rolfsii* causing stem rot *Brazilian Journal of Microbiology* (2023) 54:361–370.

M

- Mebarki H. & Benakli L., (2017). Évaluation de l'activité antagonistes de deux bactéries *pseudomonas* SP et *Bacillus* vis à vis des champignons phytopathogène, Mémoire fin d'étude, Université Algérie. _Mutlu A., Kaspar C., Becker N., Bischofs I. B. (2020). A spore quality–quantity tradeoff favors diverse sporulation strategies in *Bacillus subtilis*. *The International Society for Microbial Ecology*, 14 : 27032714.
- Messiaen CM., Blancard D., Rouxel F. & Lafon R., (1991). Les Maladies des plantes maraichères, INRA. Paris, 552p.
- Minh Binh Tran, Trang Thi Kim Do, Linh Mai Do, Mui Thi Dinh b, Hanh-Dung Thai, Duc-Ngoc Pham & Van-Tuan Tran, (2023). *Heliyon* Volume 9, Issue 2, e13663 Research article Efficient control of the fungal pathogens *Colletotrichum gloeosporioides* and *Penicillium digitatum* infecting citrus fruits by native soilborne *Bacillus velezensis* strains, Get rights and content, (Volume 9), <https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2023.e133663>.
- Mutlu A., Kaspar C., Becker N. & Bischofs I.B., (2020). A spore quality–quantity tradeoff favors diverse sporulation strategies in *Bacillus subtilis*. *The International Society for Microbial Ecology*, 14: 2703-2714.

N

- Nees, Von Esenbeck, GG., (1817). *System der Pilze Urid Schwamme*, Wurzburg. 234 pp.3303/CET197 4247.

O

-
- Office National de Sécurité Sanitaire des Produits Alimentaires (OSSA), (2022). Index phyto Sanitaire. (Cité le 08 Août 2022). Disponible sur <http://eservice.onssa.gov.ma/Indpesticide.aspxS>.

R

- Ribeiro, B.G., Monteiro Dos, Santos, M., Pinto, I.S.M., Meira, H.M., Durval & I.J.B., (2019). Production and optimization of the extraction conditions of a biosurfactant of *Candida utilis* UFPEDA1009 with potential of application in the food industry. *Chem. Eng. Trans.* 74, 1477–1482. doi: 10.3303/CET197 4247.

S

- Sakhraoui N., Metallaoui S. & Chefrou A. Et Hadeif A., (2019). La flore exotique potentiellement envahissante d'Algérie : première description des espèces cultivées en pépinières et dans les jardins (23).
- Sherf A.F., Macnab A.A., (1986). *Vegetable Diseases and Their Control*. 2^{ème} (ed). Wiley-Interscience. Pénétration.
- Simmons E.G., (1993). *Alternaria* themes and variation (63-72). *Mycotaxon* 48, 109-140.
- Simmons, E.G., (2007). *Alternaria. An Identification Manual*. : CBS Biodiversity Series No. 6. CBS Fungal Biodiversity Centre, Utrecht, the Netherlands. 775 pp.
- Schulz Bohm K., Martín Sánchez L. & Garbeva P., (2017). Microbial Volatiles: Small Molecules with an Important Role in Intra- and Inter-Kingdom Interactions. *Front Microbiol.* 8 : 2484.

T

- Tahir H.A.S., Gu Q., Wu H., Niu Y., Huo R. & Gao X., (2017). Bacillus volatiles adversely affect the physiology and ultra-structure of *Ralstonia solanacearum* and induce systemic resistance in tobacco against bacterial wilt. *Sci Rep*, 7 :40481.
 - Tekiner N., Kotan R., Tozlu E. & Dadaşoğlu F, (2019). Determination of some biological control agents against *Alternaria* fruit rot in quince. *Alinteri Journal of Agriculture Science*, 34 : 25-31.
 - Tozlu E., Tekiner N., Kotan R. & Örtücü S., (2018). Investigation on the biological control of *Alternaria alternata*. *Indian Journal of Agricultural Sciences*, 88 : 1241-1247.
-

V

- *Vitis vinifera* L., (1753). subsp. *Vinifera* (Espèce CD_NOM = 142452).