

République Algérienne Démocratique et Populaire
Ministère de l'Enseignement Supérieure et de la Recherche Scientifique

Université Constantine-1

Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie

Département de Microbiologie

N° d'ordre : 37/Mag/ 2013

N° de série : 02/M Bio/ 2013

Mémoire présenté

En vue de l'obtention du diplôme de Magister en Biologie Appliquée

Option : Microbiologie appliquée

Contribution à l'étude des maladies bactériennes de la tomate (<i>Lycopersicon esculentum</i> Mill) cultivée en serres dans l'Est Algérien.
--

Présenté par :

Toufouti Zabida Hadjer

Devant le jury :

Président de jury : Mr. BOULAHROUF A.

Pr. Université Constantine 1

Rapporteur : Mr. KACEM CHAOUICHE N.

Pr. Université Constantine 1

Examineur : Mme. MIHOUBI I.

Pr. Université Constantine 1

Mr. DEHIMAT L.

Pr. Université Constantine 1

Année universitaire : 2012-2013

Remerciements

Je tiens d'abord à remercier Monsieur **KACEM CHAUCHE N.** professeur à la Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie, pour la confiance qu'il m'a accordée en acceptant de diriger ce mémoire et de m'avoir accueillie au sien de son laboratoire de Mycologie, de biotechnologie et de l'activité microbienne (LaMyBAM).

Je le remercie pour sa gentillesse, son soutien et pour le fait de m'avoir fait partager son expérience. Je lui exprime toute ma reconnaissance pour sa patience, sa disponibilité et sa participation active lors de la rédaction de ce mémoire.

Je tiens à remercier vivement Monsieur **BOULAHROUF A.** professeur à la Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie, de m'avoir fait l'honneur de présider le jury.

J'exprime également mes sincères remerciements à Mme **MIHOUBI I.** Professeur et Mr. **DEHIMAT L.** Professeur, à la Faculté des Sciences de la Nature d'avoir accepté de juger ce travail avec bienveillance, et nous en sommes très honorés.

Je remercie très sincèrement toute l'équipe du laboratoire de Mycologie, de biotechnologie et de l'activité microbienne (LaMyBAM).

Mes remerciements vont également à toute personne qui m'a aidé de près ou de loin à réaliser ce modeste travail.

Sommaire

1-Introduction.....	1
2-Revue bibliographique.....	3
2.1- La tomate	3
2.1.1- Origine et Historique.....	3
2.1.2- Nomenclature et classification.....	3
2.1.3- Description botanique de la tomate	4
2.1.4- Principales exigences écologiques et climatiques de la plante.....	5
2.1.5- Les variétés de tomate.....	6
2.1.6- Cultures de la tomate.....	7
2.1.7- Production et impotence économique dans le monde	8
2.1.8- Production et Importance économique de la tomate en Algérie.....	9
2.1.9- Importance de la tomate.....	10
2.2- Pathologie et ravageurs de la tomate.....	12
2.2.1- Pathologies non parasitaires.....	12
2.2.2- Pathologies parasitaires.....	13
2.2.2.1- Pathologies fongiques	13
2.2.2.2- Pathologies virales.....	14
2.2.2.3- Pathologies bactériennes	16
2.3- Cycle parasitaire des bactéries	19
2.3.1- Conservation et dispersion	19
2.3.2- L'infection.....	20
2.3.3- Les déterminants du pouvoir pathogène bactérien.....	20
3- Matériel et méthodes	27

3.1- Prospections	27
3.2- Evaluation de l'incidence de la maladie.....	28
3.3- Echantillonnage.....	28
3.4- Isolement de l'agent pathogène	28
3.5- Purification de l'agent pathogène.....	29
3.6- Conservation la souche sélectionnée	29
3.7- Identification de l'agent pathogène.....	29
3.7.1- Observation macroscopique	29
3.6.2- Observation microscopique.....	29
3.7.3- Caractères biochimiques.....	30
3.7.4- Identification moléculaire.....	35
3.7.5- Pathogénicité sur tomate.....	37
3.8- Sélection de souches antagonistes.....	37
3.8.1- Méthode de criblage	38
3.8.2- Méthode de diffusion sur agar.....	38
3.9- Identification des souches antagonistes.....	38
3.9.1- l'Observation macroscopique et microscopique	38
3.9.2- Caractères biochimiques.....	39
3.10 –Teste in vivo.....	39
4-Résultats	41
4.1- les prospections.....	41
4-2 Evaluation de l'incidence de la maladie.....	42
4.3- Isolement et identification de l'agent pathogène	43
4.3.1 Etude macroscopique.....	43
4.3.2- Etude microscopique.....	43

4.3.3- Etude des caractères biochimiques.....	44
4.3.4- Identification moléculaire.....	51
4.4- Test de Pathogénicité sur tomate	55
4.5- Sélection de souches Antagonistes.....	53
4.5.1- Identification de l'agent antagoniste	53
4.5.1.1- Etude macroscopique.....	53
4.5.2.2- Etude microscopique	55
4.5.3 Etude des caractères biochimiques	55
5-Discussion.....	59
6- Conclusion générale et perspectives.....	62
7- Résumé.....	63
8-Abstract.....	64
9-المخلص.....	65
10 -Références	66
Annexe	

Listes des figures

Figure 1 Représentation schématique du système Hrp (Boulanger, 2009).....	23
Figure 2 : modèle expliquant la pathogénicité bactérienne (Murillo et Sesma, 2001).	26
Figure 3 Serre de tomate (<i>Lycopersicon esculentum</i> Mill) prospectée.	27
Figure 4 Symptômes foliaires de la moucheture bactérienne sur les plantes de tomate.....	41
Figure 5 Aspect macroscopique de l'isolat F2 sur milieu LPG.....	43
Figure 6 Coloration de Gram de l'isolat F2 avec un grossissement X 100.....	43
Figure 7 Mise en évidence de la production de pyoverdines par l'isolat F2 sur milieu King B.	44
Figure 8 Test de la catalase de l'isolat F2	44
Figure 9 Test d'oxydase de l'isolat F2	45
Figure 10 Recherche de la nitrate réductase : A la bactérie F2 cultivée en bouillon nitraté ; B ajout du réactif de Griess ; C ajout du Zinc	45
Figure11 Recherche de l'arginine déshydrolase : A milieu möller (couleur jaune) ; B milieu möller avec l'arginine	46
Figure 12 Détermination de la voie d'attaque des glucides : A tube fermé; B tube ouvert ...	46
Figure 13 Test négatif de production d'indole.	47
Figure 14 Mise en culture de l'isolat F2 à différentes températures: A culture à 27 °C ; B culture à 37 °C ; C culture à 45 °C	47
Figure 15 Activité lipasique de l'isolat F2.	48
Figure 16 Test de mise en évidence de l'hydrolyse de l'amidon.	48
Figure 17 Test d'utilisation du saccharose.	49
Figure 18 Test d'hydrolyse de la gélatine : A milieu liquéfié par la bactérie; B milieu reste solidifier.....	49

Figure 19 Test d'activité levane sucrase.	50
Figure 20 Identification moléculaire de l'isolat F2 : A ; l'ADN extrait. B ; l'ARN-r 16S amplifié	51
Figure 21 Test de pathogénicité sur plante de tomate après inoculation artificielle.	52
Figure 22 Activité antagoniste des souches vis-à-vis de l'agent pathogène <i>P. syringae</i> : A Bactérie; B moisissure.....	53
Figure 23 Aspect des colonies bactériennes sur gélose nutritive	53
Figure 24 Coloration de Gram de l'isolat E1 (X 100)	54
Figure 25 Test catalase montrant que la bactérie E1 est catalase positive.....	54
Figure 26 Test oxydase montrant que la bactérie E1 est oxydase négative	55
Figure 27 Détermination de la voie métabolique des glucides: A tube ouvert; B tube fermé..	55
Figure 28 Teste de l'indole.	56
Figure 29 Test du Type respiratoire	56
Figure 30 Test citrate de citrate	57
Figure 31 Plantules de tomates traitées avec l'antagoniste et le pathogène.....	58
Figure 32 Plantules de tomates traitées avec de l'eau distillée.....	58
Figure 33 Plantes de tomate traitée avec le pathogène <i>Pseudomonas syringae</i>	58

Liste des tableaux

Tableau 1 production mondiale de la tomate en 2007 (Giove et Abis, 2007).....	8
Tableau 2 Evolution de la tomate maraichère en Algérie entre 2001-2009 (Anonyme2, 2009).....	9
Tableau 3 Teneurs en caroténoïdes pour 100g de tomate crue (Canene-Adams <i>et al.</i> , 2005).....	10
Tableau 4 Valeur nutritionnelle moyenne pour 100g de tomate crue (Favier <i>et al.</i> , 2003).....	11
Tableau 5 Estimation de l'incidence (de la maladie) de la moucheture bactérienne (IC %) au stade de floraison et de fructification sur serre prospectées.....	42
Tableau 6 Récapitulatif des résultats obtenus de la souche pathogène.....	50
Tableau 7 Résultat de l'identification de la souche bactérienne F2 fourni par Genbank suite à la demande de comparaison de la séquence de l'isolat F2.....	52
Tableau 8 Récapitulatif des résultats obtenus de la souche antagoniste.....	57

1-Introduction

La tomate (*Lycopersicon esculentum* Mill) fait partie de la grande famille des solanacées aux côtés de la pomme de terre, de l'aubergine, du poivron et du piment. Considérée comme premier légume après la pomme de terre et deuxième ressource alimentaire mondiale après les céréales. Elle est adaptée à des conditions de culture très variées et destinée à la consommation en frais ou à la transformation industrielle (Causse *et al.*, 2000).

La production de tomate n'a cessé de progresser régulièrement ces dernières décennies dans le monde, elle est passée de 48 millions de tonnes en 1978 à 124 millions en 2006 (Blancard *et al.*, 2009). Pour son importance elle est amenée à croître dans les prochaines années, notamment, du fait de l'incitation à consommer d'avantage de fruits et de légumes.

La plante est cultivée sous serre et en plein champ, sur une superficie d'environ 3 millions d'hectares, ce qui présente près de 1/3 des surfaces mondiales consacrées aux légumes. La tomate a donné lieu au développement d'une importante industrie de transformation, pour la production de concentrés, de sauces, de jus et de conserves. Compte tenu de son importance économique, elle est l'objet de nombreuses recherches scientifiques servant comme plante modèle en génétique. Elle a donné naissance à la première variété génétiquement transformée autorisée à la consommation commercialisée aux États-Unis dans les années 1990 (Anonyme1, 2010).

La culture de la tomate occupe une place prépondérante dans l'économie agricole algérienne et près de 33 000 ha sont consacrés annuellement à sa culture (maraîchère et industrielle), donnant une production moyenne de 11 millions de quintaux et des rendements moyens d'environ 311 Qx/ha (Anonyme 2, 2009).

Malgré les dispositions prises et les techniques utilisées, le rendement reste toujours faible et assez éloigné de ceux enregistrés dans d'autres pays du bassin méditerranéen (Tunisie, Maroc, Espagne, France, Italie) où les rendements varient entre 350 Qx/ha à 1500 Qx/ha (FAO, 2008).

Actuellement, 1/3 de la production agricole mondiale est anéantie d'une année à une autre à cause de différentes maladies (bactériennes, fongiques, etc.) et ravageurs tels que les insectes qui causent d'énormes dégâts, de la culture du semis, jusqu'à leur commercialisation (Guenoui, 2008).

Plusieurs agents pathogènes bactériens, comme *Pseudomonas syringae*, *Xanthomonas campestris*, *Clavibacter michiganensis*, peuvent affecter la tomate et provoquer plusieurs maladies, à savoir : la moucheture bactérienne, la tache bactérienne et le chancre bactérien. Elles sont favorisées par une humidité relative forte et une température élevée.

De ce fait, l'objectif de ce travail est une contribution à l'étude des maladies bactériennes de la tomate cultivée en serres dans l'est Algérien. En effet le travail porte sur :

- Localisation des zones de cultures ;
- Prospections et observation de maladies bactériennes (prise d'échantillons) ;
- Isolement des bactéries pathogènes ;
- Identification des agents pathogènes ;
- Recherche d'agents antagonistes en vue d'une lutte biologique ;
- Contribution à la mise en évidence de l'effet antagoniste *in vivo*.

2- Revue bibliographique

2.1- La tomate

2.1.1- Origine et Historique

La tomate (*Lycopersicon esculentum* Mill) est originaire des Andes d'Amérique du Sud, dans une zone allant du sud de la Colombie au nord du Chili et de la cote Pacifique, aux contreforts des Andes (Equateur, Pérou). Elle fut domestiquée au Mexique, puis introduite en Europe au XVI^{ème} siècle par les Espagnols avant même la pomme de terre et le tabac (Shankara, 2005). Le genre *Lycopersicon* comprend neuf espèces, dont une seule ; *Lycopersicon esculentum* sous sa forme sauvage ceraciforme qui pourrait être directement à l'origine des autres variétés, a émigré vers le Sud de l'Amérique du Nord (Chaux et Foury, 1994).

Au départ, les européennes l'exploitèrent pour un usage purement ornemental et évitèrent sa consommation, à cause des liens de parenté botanique très étroits avec certaines espèces végétales connues comme plantes vénéneuses en l'occurrence, *Hyocinus niger*, *Lycopersicon atropa* (Kolev, 1976). En effet, elle a été longtemps considérée comme une plante toxique, au même titre que sa cousine « la mortelle Belladone ». Ce n'est que vers les années 1920-1930 qu'elle commença à être largement commercialisée (Menard, 2009).

En Algérie, ce sont les cultivateurs du Sud de l'Espagne (Tomateros), qui l'ont introduite en raison des conditions climatiques qui sont propices pour sa culture. Quant à sa consommation, elle a commencée dans la région d'Oran en 1905 puis, elle s'étendit vers le centre, notamment au littoral algérois (Latigui, 1984).

2.1.2- Nomenclature et classification

Les botanistes modifièrent à plusieurs reprises les noms de genre et d'espèce attribués à la tomate. Elle a été classée par Linné en 1753, comme *Solanum lycopersicon*, d'autre botanistes lui ont attribué différents noms : *Solanum lycopersicon*, *Solanum esculentum*, *Lycopersicon licopersicum* ; c'est finalement *Lycopersicon esculentum* attribué par Philipe Mille en 1754, qui a été retenu (Munroe et Small, 1997).

Le nom de genre « *Lycopersicon* » est gréco-latin, il signifie « pêche de loup » et la partie « *esculentum* » complétant le nom de l'espèce vient du latin et qui signifie « comestible ». Cette comestibilité ne concerne ni le feuillage, ni les jeunes fruits verts car ils contiennent des

alcaloïdes toxiques (tomatine, solanine). Ces derniers disparaissent des fruits au cours du mûrissement (Blancard *et al.*, 2009).

Cronquist (1981) ; Gaussen *et al.* (1982) proposèrent la classification de la tomate qui est largement suivie :

Règne..... Plantae
Sous règne.....Trachenobionta
Embranchement.....Magnoliophyta
Classe.....Magnoliopsida
Sous-classe.....Asteridae
Ordre.....Solanales
Genre*Solanum ou lycopersicon*
Espèce *lycopersicon esculentum* Mill.

2.1.3- Description botanique de la tomate

La tomate est une plante herbacée annuelle, appartenant au groupe des légumes-fruits (Baba Aissa, 1999).

- **Le système racinaire:** forte racine pivotante qui pousse jusqu'à une profondeur de 50 cm ou plus. La racine principale produit une haute densité de racines latérales et adventices (Shankara, 2005).
- **La tige:** le port de croissance varie entre érigé et prostré. La tige pousse jusqu'à une longueur de 2 à 4 m, pleine, fortement poilue et glandulaire, se ramifie souvent pour donner un arbuste large et empli.
- **Le feuillage:** feuilles disposées en spirale, 15 à 50 cm de long et 10 à 30 cm de large. Les folioles sont ovées à oblongues, couvertes de poils glandulaires. Les grandes folioles sont parfois pennatifides à la base. L'inflorescence est une cyme formée de 6 à 12 fleurs. Le pétiole mesure entre 3 et 6 cm.
- **Les fleurs:** Bisexuées, régulières et entre 1.5 et 2 cm de diamètre. Le tube du calice est court et velu, les sépales sont persistants. En générale, il y a six pétales qui peuvent atteindre une longueur de 1 cm, jaunes et courbées lorsqu'elles sont mûres et six étamines et les anthères ont une couleur jaune vif entourant le style qui a une extrémité

stérile allongée. L'ovaire est supère doté de deux à neuf carpelles. Souvent, la plante est autogame, mais la fécondation croisée peut avoir lieu où les abeilles et les bourdons sont les principaux pollinisateurs.

- **Le fruit:** Baie charnue, de forme globulaire ou aplatie avec un diamètre de 2 à 15 cm. Lorsqu'il n'est pas encore mûr, le fruit est vert et poilu, en revanche, la couleur des fruits mûrs varie du jaune au rouge en passant par l'orange. Le fruit à maturité peut se présenter soit, rond et régulier ou côtelés.
- **Les graines:** Nombreuses, en forme de rein ou de poire, poilues, beiges, de 3 à 5 mm de long et de 2 à 4 mm de large. L'embryon est enroulé dans l'albumen. Le poids de mille graines est en moyenne de 3 g (Shankara, 2005).

Le cycle de la graine à la graine, est variable selon les variétés et les conditions de culture, il est en moyenne de 3.5 à 4 mois (7 à 8 semaines de la graine à la fleur et 7 à 9 semaines de la fleur au fruit) (Gallais et Bannerot, 1992).

2.1.4- Principales exigences écologiques et climatiques de la plante

Le *Lycopersicum esculentum* Mill a des exigences particulières: sensible au froid, craint beaucoup le gel, les vents chauds et très exigeant en température (Polese, 2007).

2.1.4.1- La température

La tomate demande un climat relativement frais et sec pour fournir une récolte abondante et de qualité. Les températures optimales pour la plupart des variétés se situent entre 21 et 24°C. Les plantes peuvent surmonter un certain intervalle de températures, mais en dessous de 10 °C et au dessus de 38°C les tissus végétaux sont endommagés. L'équilibre et l'écart entre température diurne et nocturne, semblent nécessaire pour obtenir une bonne croissance et une bonne nouaison de la tomate (Shankara, 2005).

2.1.4.2- La lumière

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

2.1.4.3- Eau et humidité

La plante est très sensible à l'hygrométrie, elle ne tolère pas les sols engorgés ni l'humidité élevée (plus de 80%) et une hygrométrie relativement ambiante de 60% à 65% soit la meilleure pour la fécondation. En effet, lorsque l'humidité est trop élevée, le pollen est difficilement libéré. Par ailleurs, le développement des maladies cryptogamiques est fortement lié à des fortes humidités accompagnées de la chaleur (Laumonier, 1979). Il est essentiel de prévoir un apport d'eau suffisant pendant la fructification. Le stress causé par une carence d'eau et les longues périodes arides fait tomber les bourgeons et les fleurs et provoque le fendillement des fruits (Munro et small, 1998).

2.1.4.4- pH

La tomate tolère modérément un large intervalle de valeurs du pH, mais, pousse le mieux dans des sols où la valeur du pH varie entre 5.5 et 6.8 (Shankara, 2005).

2.1.4.5- Sol

La tomate pousse bien sur la plupart des sols minéraux qui ont une bonne capacité de rétention de l'eau, une bonne aération et qui sont libres de sels. Elle préfère les terres limoneuses profondes et bien drainées (Shankara, 2005).

2.1.5- Les variétés de tomate

Les tomates peuvent être classées d'après leurs caractères morphologiques et botaniques. Les variétés sont très nombreuses. A cet effet, ces dernières peuvent être classées selon leur croissance qui peut être du type indéterminé ou du type déterminé (Polese, 2007).

2.1.5.1- Les variétés à port indéterminé: sont les plus nombreuses. Elles continuent de pousser et de produire des bouquets de fleurs tant que les conditions leur conviennent. Comme leur développement est exubérant, leur tige doit être attachée à un tuteur sous peine de s'affaisser au sol. Il est également nécessaire de les tailler et de les ébourgeonner régulièrement. Elles ont une production plus étalée et sont plus productives en général que les tomates à port déterminé. Parmi ce type de croissance, il existe:

- les variétés fixées: il existe plus de 500 variétés dont les caractéristiques génotypiques et phénotypiques se transmettent pour les générations descendantes. Elles sont sensibles aux maladies, mais donnent des fruits d'excellente qualité gustative (Polese, 2007). Les variétés les plus utilisées en Algérie sont la Marmande et la Saint Pierre (Snoussi, 2010).

- Les variétés hybrides : sont plus d'un millier. Elles sont relativement récentes puisqu'elles n'existent que depuis les années 1960, qui, du fait, de l'effet hétérosis, présentent la faculté de réunir plusieurs caractères d'intérêt (bonne précocité, bonne qualité de résistance aux maladies et aux attaques parasitaires et donc bon rendement). Ces hybrides ne peuvent être multipliés vu qu'ils perdent leurs caractéristiques dans les descendances (Polese, 2007). Les plus utilisés en Algérie sont ACTANA, AGORA, BOND, NEDJMA, TAFNA, TAVIRA, TOUFAN, TYERNO et ZAHRA (Snoussi, 2010).

2.1.5.2- Les variétés à port déterminé : sont des variétés naines. Leur croissance s'arrête une fois la plante a produit un nombre déterminé de bouquets de fleurs (en générale trois ou quatre). C'est dans ce type de tomate que l'on trouve, le plus souvent, les variétés industrielles de conserverie, cultivées en plein champ. Pour ce type de croissance également, on retrouve des variétés fixées et des hybrides (Polese, 2007). Les hybrides suivants sont les plus utilisés en Algérie FAROUNA, JOKER, LUXOR, SUPER RED, TOMALAND, TOP 48, SUZANA, ZIGANA ZERALDA. Tandis que les variétés fixées : la variété AICHA (Snoussi, 2010).

2.1.6- Cultures de la tomate

La tomate est cultivée selon deux systèmes principaux qui sont:

2.1.6.1- La culture de plein champ

Ce système de culture est le plus répandu. Si l'irrigation est disponible, les plantations peuvent être faites en saison sèche. La mécanisation est souvent réduite à la préparation du sol (Cirad et Gret, 2002).

2.1.6.2- La culture sous abris

Ce système de culture vise à produire les tomates au long de l'année. Il permet de développer des productions hydroponiques, supprimant ainsi certaines contraintes liées au sol (Cirad et Gret, 2002). La culture sous abri fournit aujourd'hui une part essentielle du marché de frais pour les légumes-fruits tels que la tomate (Jeannequin *et al.*, 2005).

2.1.7- Production et importance économique dans le monde

L'importance économique de la tomate devient réellement évidente au travers de l'évolution de sa production mondiale au cours du temps. La production mondiale de tomates a progressé régulièrement au cours du XX^e siècle et s'est accrue considérablement durant les trois dernières décennies. Elle est passée de 74 millions de tonnes en 1978 à 89 millions en 1998 et atteint 124 millions en 2006. Les deux premiers pays producteurs mondiaux sont la Chine avec 25,34% suivie des Etats-Unis avec 08,84%. La Turquie occupe le troisième rang mondial. De nombreux pays tels que l'Egypte, L'Inde, l'Iran, le Brésil, le Maroc et la Grèce produisent également chaque année plus d'un million de tonnes de tomates. Le tableau1 détaille la production mondiale de la tomate pour les différents pays du monde.

Tableau 1 Production mondiale de la tomate en 2007 (Giove et Abis, 2007)

pays	Production 10 ³ tonnes	%	pays	Production 10 ³ tonnes	%
Monde	124 875	100%	Maroc	1 206	00,96%
Chine	31 644	25,34%	Portugal	1 085	00,86%
USA	11 043	8,48%	Neigerai	1 057	00,84%
Turquie	10050	08,04%	Algérie	1 023	00,81%
Inde	8 586	06,87%	Tunisie	960	00,76%
Egypte	7 600	06,08%	Syrie	946	00,75
Italie	7 187	05,75%	Canada	839	00, 67%
Iran	4 781	03,82%	Cuba	803	00,64%
Espagne	4 651	03,72%	France	790	00,63%
Brésil	3 453	02,76%	Japon	758	00,60%
Mexique	2 800	02,24%	Argentine	660	00,52%
Fédération Russe	2 296	01,83%	Hollande	660	00, 52%
Grèce	1 712	01,37%	Roumanie	627	00,50%
Ukraine	1 472	01,17%	Autres	14869	12,06%
Ouzbékistan	1 317	01,05%			

Selon les statistiques de l'organisation des Nations unies pour l'alimentation et l'agriculture, la production mondiale de tomates s'élevait en 2007 à 126,2 millions de tonnes pour une surface

de 4,63 millions d'hectares, soit un rendement moyen de 27,3 tonnes par hectare. Ces chiffres ne tiennent toutefois compte que de la production commercialisée, et n'incluent pas les productions familiales et vivrières qui peuvent être non négligeables dans certaines régions (FAO-STAT, 2009).

Echanges internationaux :

En 2006, les exportations de tomates fraîches ont porté sur un peu plus de 6 millions de tonnes, soit 4,8 % de la production mondiale de l'année. Les trois premiers pays exportateurs (environ 1 million de tonnes chacun) sont le Mexique, la Syrie et l'Espagne. Le Mexique fournisseur essentiel des États-Unis et l'Espagne fournit l'Union européenne (FAO-STAT, 2009). Pour la même année les premiers pays importateurs de tomates fraîches sont dans l'ordre; les États-Unis, l'Allemagne, la France, le Royaume-Uni et la Russie (Anonyme1). En revanche, en 2006 pour la tomate transformée (pâte et purée) les principaux pays exportateurs sont la Chine, l'Union européenne, les États-Unis, le Chili et la Turquie (Anonyme, 2010).

2.1.8- Production et Importance économique de la tomate en Algérie

La tomate (*Lycopersicum esculentum* Mill) occupe une place privilégiée dans le secteur maraicher en Algérie. Elle est considérée à juste que la pomme de terre, l'ail et l'oignon, qui forment un groupe d'espèces prioritaires. Sa production est en plein expansion, à la faveur de nombreux programmes mis en place par le Ministère de l'agriculture et du développement rural. A cet effet, de nouvelles techniques de productions sont introduites ces dernières années permettant plus de rendement à l'hectare (Tableau 2) (FAO, 2008).

Tableau 2 : Evolution de la tomate maraichère en Algérie entre 2001-2009 (Anonyme 2, 2009).

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

Les statistiques de l'année 2009 établie par le Ministère de l'agriculture font état d'une superficie globale de tomate maraichère cultivée de 21 320 Ha avec un rendement de 6.5 millions de quintaux et les wilayas potentielles pour la production de cette catégorie de la tomate sont Skikda, Annaba, El Taref et Guelma. Pour rappel, la culture de la tomate

industrielle constitue l'espèce la plus importante parmi celles cultivées comme le tabac, l'arachide et autres. Elle a démarré dans les années 1920, dans la région de l'est avec la création de la première conserverie TOMACOOOP à Bône (actuellement Annaba). Les surfaces consacrées à la tomate industrielle ont, également, augmenté, pour passer de 100 hectares en 1930 à 2 000 en 1960, pour arriver à une fourchette comprise entre 24 000 et 31 000 hectares ces dernières années (Anonyme3, 2010). Sa production est de 3.822731Qx équivalent à 95,57% de la production totale des cultures industrielles (Snoussi, 2010).

2.1.9- Importance de la tomate

La tomate tient une place importante dans l'alimentation humaine, elle est consommée soit crue, soit cuite, ou comme un produit transformé tels que jus de fruits, sauces, Ketchup et de conserves. Dans les dernières décennies, la consommation de tomate a été associée à la prévention de plusieurs maladies comme le cancer ou les maladies cardiovasculaires (Sharoni et Levi, 2006; Wilcox *et al.*, 2003). Cet effet protecteur a été principalement attribué à ses précieux composants bioactifs avec propriétés antioxydants (Borguini et Torres, 2009) comme les carotènes (lycopène qui donne leur couleur rouge aux tomates ainsi que β -carotène), l'acide ascorbique, tocophérol et les composés phénoliques (Martinez-Valverde *et al.*, 2002; Periago *et al.*, 2009) (Tableau 3). Le lycopène le plus puissant antioxydant caroténoïdien a montré d'autres effets bénéfiques sur la santé tels que l'induction de la communication entre les cellules, la modélisation des hormones du système immunitaire et d'autres voies métaboliques. Il neutralise, plus efficacement, le radical libre, particulièrement agressif, dérivé de l'oxygène. Alors que les composés phénoliques présentent un large éventail de propriétés physiologiques comme des anti-allergéniques, anti-inflammatoires, anti- microbien, antithrombotique, anti- athérogène et effets cardioprotecteurs et vasodilateurs (Balasundram *et al.*, 2006).

Tableau 3: Teneurs en caroténoïdes pour 100g de tomate crue (Canene-Adams *et al.*, 2005).

β -carotène	449 μ g
α -carotène	101 μ g
Lycopène	25573 μ g
Lutein _ zeaxanthin	123 μ g
Phytoene	1860 μ g
Phytofluene	830 μ g

La tomate est un aliment diététique, très riche en eau (93à 95%), en éléments minéraux et en oligo-éléments (Tableau 4). Parmi les minéraux de la tomate, le potassium domine largement, suivi par le chlore, le phosphore et le magnésium. Parmi les oligo-éléments, on peut noter des teneurs non négligeables en fer et en zinc, ainsi que des traces de cobalt, de nickel, de fluor, de bore et de sélénium. Les vitamines du groupe B sont assez abondantes et toutes représentées y compris la vitamine B8 et l'acide folique (B9). Par contre, ce fruit ne renferme que de faibles quantités de glucides (3%), de protéines (moins de 1 %) et seulement des traces de lipides. De ce fait, elle est pauvre en calories (15 Kcal pour 100 g, soit 63 kJoules) (Favier *et al.*, 2003).

Tableau 4: Valeur nutritionnelle moyenne pour 100g de tomate crue (Favier *et al.*, 2003).

Eau		93.8g
Eléments énergétiques	Protides	0.8g
	Glucides	3.5g
	Lipides	0.3g
Vitamines	Provitamine A	0.6mg
	Vitamine B1	0.06mg
	Vitamine B2	0.05mg
	Vitamine B6	0.08mg
	Vitamine C	18mg
	Vitamine PP	0.6mg
Minéraux	Fer	0.4mg
	Calcium	9mg
	Magnésium	11mg
	Phosphore	24 mg
	Potassium	226mg
	Sodium	5mg
Fibres		1.2g

2.2- Pathologie et ravageurs de la tomate

Il y a lieu de noter que l'aspect maladies et ravageurs des cultures représente un facteur très important dans leur conduite avec une production économiquement viable et respectueuse de l'environnement et surtout pour la santé humaine. Le nombre des maladies affectant la tomate est important : plusieurs centaines de bioagresseurs, plus de 50 affections non parasitaires, sans compter les nouvelles pathologies émergeant avec une fréquence inquiétante (Blancard, 2009).

2.2.1- Pathologies non parasitaires

Elles sont nombreuses et peuvent concerner les racines et le collet, la tige, le feuillage, aussi bien que les fruits (Messiaen *et al.*, 1993). Elles sont généralement provoquées par des carences au niveau des éléments nutritifs et par des conditions climatiques défavorables (Shankara, 2005) et parmi les plus répandues on note :

La pourriture apicale, provoquée par une carence en calcium;

Le fendillement des fruits suite à de grandes fluctuations dans la teneur en humidité du sol ou de la température;

L'asphyxie racinaire, causée par des irrigations trop abondantes ou des pluies excessives;

La tige boursouflée, suite à une alimentation azotée excessive;

L'altération des fruits, due aux coups de soleil ou à des fentes de croissance.

Les ravageurs de la tomate :

▪ Les nématodes

Les nématodes des racines noueuses présentent un problème important. Ils provoquent des galles (des tumeurs cancéreuses) sur les racines des plantes on peut citer *Meloïdogyne icognita*, *Meloïdogyne arenaria* et *Meloïdogyne javanica*. Les plantes atteintes restent petites de taille et sont sensible aux maladies fongiques et bactériennes transmises par le sol (Shankar, 2005).

▪ Les insectes

Tous les insectes qui piquent et qui sucent, tels que les thrips, les pucerons, et les mouches blanches, ne provoquent des dommages mécaniques que lorsqu'ils surviennent

en grands nombres, mais les virus qu'ils peuvent transmettre, provoquent des dommages bien plus importants (Shankara, 2005).

2.2.2- Pathologies parasitaires

2.2.2.1- Pathologies fongiques

- **Le Mildiou:** causé par *Phytophthora infestans*, anciennement classé parmi les mycètes. Cette maladie peut dévaster les cultures de tomates durant les périodes fraîches et pluvieuses. Le mildiou peut s'attaquer à tous les organes aériens de la plante. Il se manifeste par des taches nécrotiques, irrégulières, d'extension rapide, entourées d'une marge livide. Sur les tiges on voit des plages brunes pouvant les ceinturer. Les fruits mildiousés bruns marbrés, irrégulièrement bosselés en surface (Blancard, 1991).
- **L'alternariose :** le mycète responsable est *Alternaria tomatophila*. Il s'attaque à tous les organes aériens de la tomate et à tous les stades de croissances de la plante. Il occasionne surtout, des taches foliaires vert sombres, puis deviennent rapidement brunes à noires. Sur les tiges des taches assez comparables sont aussi constatées. Sur les fruits des taches concaves, peut se couvrir d'une moisissure noire, veloutée. Les lésions sur fruits peuvent engendrer leur chute (Blancard, 2009).
- **Moisissure grise :** causé par *Botrytis cinerea*, la pourriture grise est une maladie répandue dans les cultures de tomate sous abris. Les symptômes observable sur fleurs, fruits, tiges, feuilles, se traduisent généralement par un pourrissement des tissus infectés, suivi par l'apparition d'un feutrage gris due a une production importante de spores. *Botrytis cinerea* peut entraîner des pertes de rendements importantes en affaiblissant les plantes et en les détruisant (Williamson *et al.*, 2007).
- **Septoriose :** cette maladie causée par *Septoria lycopersici*, se manifeste sous forme de petites taches à contours angulaires, pâles au centre, bordées d'une ligne brune. De petits points noirs présentés par des pycnides se trouvent à leur surface. Les feuilles atteintes s'enroulent d'abord, puis se dessèche et tombent ce qui amène à une végétation fortement entravée (Bovey, 1972).
- **Oïdium :** causé par *Oïdium neolycopersici* qui provoque des taches sur feuilles assez caractéristiques des oïdiums. Celle –ci sont poudreuses et blanche et couvrent plutôt la face supérieure des folioles de tomate. Les tissus touchés deviennent chlorotiques,

brunissent localement et finissent par se nécroser. Des taches comparables peuvent être observées sur la tige. Les fruits ne semblent pas affectés (Blancard, 2009).

- **Fusariose** : provoqué par *Fusarium oxysporum f.sp. lycopersici*. Ce mycète ne s'attaque qu'à certains cultivars. Les plantes infectées par ce mycète du sol présentent un jaunissement des feuilles et un flétrissement se propageant à partir de la base de la tige. Au départ, les symptômes ne sont visibles que sur une seule moitié de la surface des feuilles, des branches ou des plantes, avant de se propager à l'ensemble de la plante (Messiaen *et al.*, 1993).
- **Verticilliose** : causée par *Verticillium albo-atrum* et *Verticillium dahliae*. Tout comme la fusariose, cette maladie se manifeste en premier lieu au niveau des feuilles inférieures et progresse vers la partie supérieure de la plante. Contrairement à la fusariose, les symptômes de la Verticilliose se manifestent sur l'ensemble de la surface des feuilles, des branches ou des plantes (Ruocco *et al.*, 2011).
- **Cladosporiose** : causée par *Pasalora fulva* très spécifique de la tomate est mondialement répandu. Ce mycètes, parasite essentiellement foliaire, provoque des taches vert clair à jaune pâle. Les tissus situés au centre des taches brunissent, se nécrose et se dessèche tandis que les feuilles s'enroulent. La tige peut aussi être affectée (Blancard, 2009).
- **Racine liégeuses** : le responsable de cette maladie est *Pyrenochaeta lycopersici* s'attaque essentiellement au système racinaire de la tomate. Les racines révèlent, localement, des altérations brunes et lisses. Les plantes attaquées voient la taille de leur système racinaire plus ou moins limitée (Blancard, 2009).
- **L'Anthracnose** : causée par le mycète pathogène *Colletotrichum coccodes*. Les symptômes se manifestent sur les fruits mûrs ou arrivant à maturation sous forme de petites tâches rondes creusées dans la peau. Lorsque ces tâches s'étendent, leur centre prend une couleur sombre ou développe des anneaux concentriques mouchetés produisant des spores (Ruocco *et al.*, 2011).

2.2.2.2- Pathologies virales

- **CMV (*Cucumber Mosaic Virus*)**: le CMV, virus transmis par pucerons, est présent dans le monde entier. Il peut être à l'origine de trois principaux types de symptômes: des marbrures, mosaïque sur les jeunes folioles, déformation des folioles qui prennent l'aspect d'une feuille de fougère ou celui d'un l'ace de chaussure car très filiformes,

altération nécrotiques commençant sur les folioles, s'étendant à la tige et à l'apex de la plante (Blancard, 2009).

- **ToCV (*Tomato Chlorosis Virus*)**: transmis par plusieurs espèces d'aleurodes selon le mode de semi- persistant, on peut observer des marbrures chlorotiques irrégulières, un jaunissement et une nécrose du limbe. Des déformations foliaires sont également visibles, notamment un enroulement du limbe. Les plantes affectées précocement sont peu vigoureuses. La production en fruits peut être fortement réduite (Blancard, 2009).
- **ToMV (*Tomato mosaic virus*)** : cause de graves maladies dans la culture de la tomate. Les symptômes comprennent des feuilles tachetées vert-jaunes, des feuilles enroulées, une croissance chétive et des décolorations au niveau des fruits. Le vecteur naturel du TMV n'est pas connu. Le virus transmis par contact et par les graines (Shankara, 2005).
- **TSWV (*Tomato Spotted Wilt Virus*)** : ou virus de la maladie bronzée de la tomate. Il est à observer des mouchetures en mosaïque avec une décoloration des feuilles. Sur les tiges et pétioles, il y a apparition des taches nécrotiques. Par contre, sur les fleurs, on observe un nanisme, une déformation et une décoloration. La maladie peut entraîner un rabougrissement du plant. Le virus est transmis par différents espèces de *thrips* (Messiaen *et al.*, 1993).
- **TYLCV (*Tomato Yellow Leaf Curl Virus*)** : ou maladie des feuilles jaunes en cuillères de la tomate. Les symptômes caractéristiques apparaissent quinze jours à trois semaines après inoculation du virus. La croissance des plantes atteintes est fortement perturbée. Les feuilles sont de tailles réduites et présentent un jaunissement et/ou un enroulement en forme de cuillères. Plus l'inoculation du virus est précoce, plus les dégâts sont graves. En cas d'infection précoce, les plantes sont naines et ne produisent plus de fruits. Le virus est transmis par la mouche blanche *Bemisia tabaci*. Toute une récolte peut être détruite si les plants sont contaminés en pépinières (Shankara, 2005).
- **PVY (*Potato virus Y*)** : il est probablement présent dans toutes les zones de culture de pomme de terre du monde entier. Le virus provoque diverses anomalies de coloration de traduisant par la présence sur les jeunes feuilles de marbrures d'abord discrètes, évoluant progressivement en mosaïque verte (Blancard, 2009).
- **RepMV (*Pepino mosaic virus*)**: Très fréquemment, le virus peut être présent sans induire de symptômes visibles. Le symptôme le plus caractéristique est l'apparition de taches angulaires de couleur jaune vif sur les feuilles. Plus rarement, les plantes

infectées montrent des lésions nécrotiques, taches ou stries, sur les feuilles et les tiges. Sur les tiges florales, elles peuvent provoquer l'avortement des fleurs (Blancard, 2009).

2.2.2.3- Pathologies bactériennes

La tomate a, souvent, fait l'objet d'attaque de plusieurs bactéries qui développent des symptômes multiples, parmi les plus graves

2.2.2.3.1- La tache bactérienne

La tache bactérienne de la tomate causée par *Xanthomonas campestris* pv *vesicatoria* est l'une des maladies les plus graves dans de nombreux domaines (Sherf et MacNab, 1986; Scott *et al.*, 1989; Ward et O'Garro, 1992; Uys *et al.*, 1996). Elle est considérée comme un important contrainte à la production de tomates dans le monde entier (Pohronezny et Volin, 1983 ;Zitter, 1985; Watterson, 1986; Scott *et al.*, 1989; Yu *et al.*, 1995; Venette *et al.*, 1996) .

Symptômes

Les symptômes de la maladie apparaissent sur les feuilles, les fleurs, les tiges et les pétioles. Elles sont comparables à ceux décrits pour *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* des petites lésions graisseuses et translucides apparaissant au hasard sur les folioles ou en bordure du limbe et donnant lieu à des taches brunes à noires qui finissent par se nécroser et se dessécher. Des lésions comparables sont visibles sur les pétioles, la tige, les pédoncules et les sépales. Sur les fruits des lésions graisseuses de couleur verte à noir donnent lieu à des pustules liégeuses en relief, craquelées, pouvant atteindre 1 cm de diamètre (Blancard, 2009).

L'agent pathogène et la bactérie *Xanthomonas vesicatoria* qui se présente sous la forme de bâtonnets, aérobies strictes et mobiles, Gram négatifs, simples ou par paires, de 0.4 – 0.7 µm de large et de 0.7- 1.8 µm de long, portant un flagelle polaire unique. Ces bactéries ont pour particularité de produire des caroténoïdes appelés xanthomonadines qui pigmentent les colonies en jaune. Elles sont oxydase négatif ou faible et positif pour la catalase, chimioorganotrophe, capable d'utiliser une variété d'hydrates de carbone et les sels d'acides organiques comme seule sources de carbone. D'autre part *Xanthomonas* est très étudiée pour sa capacité à produire un exopolysaccharide particulier, le xanthane qui donne un aspect mucoïde aux colonies, très utilisé comme agent épaississant dans les industries cosmétiques, agroalimentaires ainsi que dans le bâtiment (Bradbury, 1984). Ce genre regroupait dans les

années 90, plus de 170 espèces dont bon nombre sont des espèces phytopathogènes subdivisées en plus de 140 pathovars selon leurs plantes hôtes. Les membres du genre *Xanthomonas* infectent 124 espèces de plantes monocotylédones et 268 espèces de plantes dicotylédones (Leyns *et al.*, 1984).

Source d'inoculum et conditions favorables à son développement :

X. vesicatoria, se conserve pour peu de temps directement dans le sol. Il se maintient mieux sur les débris végétaux et les semences pour une période atteignant plusieurs mois, voire une année, certains auteurs parlent d'une dizaine d'année. Cet agent pathogène persisterait sur les racines du blé. Il peut aussi vivre à l'état d'épiphyte ou infecter plusieurs solanacées. Le *Xanthomonas* est avantage par des températures assez élevées (20°C à 35°C, température optimal 26°C) bien que ces espèces puissent croître sous des températures plus basses. Outre la température, ces bactéries ont besoin d'une humidité relative élevée afin d'induire la maladie sur la plante hôte (Blancard, 2009).

2.2.2.3.2-Chancre bactérien

Le chancre bactérien de la tomate causé par le *Clavibacter michiganensis subsp michiganensis* (Davis *et al.*, 1984), est une maladie importante et répandue, causant des pertes économiques graves dans les cultures de tomates dans le monde, qu'elles soient en serre ou en plein champ (Gleason *et al.*, 1993; Gartemann *et al.*, 2003).

Symptômes: *Clavibacter michiganensis subsp michiganensis* provoque sur tomate une maladie vasculaire qui se traduit par un flétrissement et chlorose des organes aériens. Des coupes longitudinales ou transversales à plusieurs niveaux de la tige révèlent des symptômes plus ou moins marqués en fonction du stade d'évolution de la maladie. Ainsi, on peut constater: de discrets jaunissement et brunissement des vaisseaux, mais surtout des tissus contigus. Un brunissement marqué du xylème et des tissus contigus, la moelle peut, dans certains cas, brunir ou être sèche et farineuse. La plantes fortement affectées produisent des fruits plus petits, mal colorés ou chutant prématurément (Blancard, 2009).

L'agent pathogène: *C. michiganensis subsp. michiganensis* est un bâtonnet aérobie, non mobile, Gram-positif, non sporulant et incurvé (Davis *et al.*, 1984). *C. michiganensis* est la seule espèce dans le genre *Clavibacter* et il est divisé en cinq sous-espèces en fonction de l'hôte. Ces bactéries sont tous des agents pathogènes vasculaires et de quarantaine dans de nombreux pays (Jahr *et al.*, 1999; Eichenlaub *et al.*, 2006).

Source d'inoculum et conditions favorables à son développement:

Les semences sont le principal vecteur de ce pathogène à longue distance; le commerce des semences a facilité la répartition mondiale de la maladie. Une fois introduit dans une parcelle de tomates située en plein champ ou dans une serre, *C. michiganensis* subsp. *Michiganensis* est capable de s'y maintenir aisément plusieurs mois, voir plus d'une année en fonction des conditions de température et d'humidité du sol. Les débris végétaux, surtout s'ils sont sec, contribuent à sa conservation jusqu'à 7 mois et au moins deux années lorsqu'ils sont en surface et elle pourrait aussi se conserver 2 années dans du compost. Un certain nombre d'hôtes alternatifs ont été signalés, comme le poivron, la pomme de terre, le tabac et plusieurs mauvaises herbes. On la trouve aussi sur le matériel et les outils utilisés. Cette bactériose est largement favorisée par les périodes climatiques humides. Elle se développe dans une plage comprise entre 12.8 et 33.7°C, son optimum entre 24 et 27°C, avec plus de 80% d'humidité (Blancard, 2009).

2.2.2.3.3- La moucheture bactérienne

Cette maladie est causée par *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* (Dye *et al.*, 1980). Elle est aujourd'hui largement répandue dans les zones de production de la tomate et très destructive dans le monde entier (Bazzi *et al.*, 1979; Yunis *et al.*, 1980; Smitley et Carter, 1982; Tamietti et Cugudda, 1987).

Symptômes

Les lésions de la moucheture bactérienne peuvent apparaître n'importe où sur le feuillage, les tiges ou les fruits. Sur les feuilles, la moucheture se manifeste par des petites taches graisseuses, sombres, prenant rapidement une teinte brune à noire. Ces lésions sont circulaires ou légèrement angulaires d'un diamètre de 2 à 3 mm et présentent un halo jaune plus ou moins large et marqué. En présence d'humidité, elles peuvent s'étendre et confluer altérant de larges secteurs du limbe qui finissent par se nécroser et se dessécher. Ces taches peuvent également se développer sur les tiges et les sépales floraux (Blancard, 2009).

Sur les fruits verts, l'infection se traduit par de petites pustules rondes de 0.5 à 2 mm relevées et légèrement superficielles et s'entourant d'une auréole jaune lors de la maturité. Ces lésions nécrotiques ressemblent à des mouchetures d'où le nom de moucheture de la tomate (Wilkie et Dye, 1974).

L'agent pathogène

L'agent pathogène *Pseudomonas syringae* appartient au groupe des *Pseudomonas* fluorescents phytopathogènes. Il est caractérisé par une grande variabilité génétique, physiologique et biologique qui s'exprime au travers 52 pathovars qui la composent. La cellule de *Pseudomonas* est un bâtonnet droit ou bacille de taille moyenne de 0.7-3µm de longueur et de 0.7-1µm d'épaisseur, ne retient pas la coloration de Gram (Gram négatif), isolé, en paires ou en chaînes, mobile par un à trois flagelles. *Pseudomonas syringae* est une bactérie aérobie stricte, chimiohétérotrophe, ne possède pas de cytochrome C, oxydase et arginine déshydrolase négative. La plupart des souches des différents pathovars cultivées sur milieu B de King produisent un pigment jaune verdâtre et fluorescent sous UV: il s'agit d'un pigment hydrosoluble (pyoverdine) (Gaignard et Luisetti, 1993).

Source d'inoculum et conditions favorables à son développement:

Pseudomonas syringae pv. *tomato* peut se conserver dans le sol, en association dans la rhizosphère des plants et en épiphyte sur de nombreux plants cultivés et sauvages (Bashan *et al.*, 1982 ; Bonn *et al.*, 1985). Il peut également se conserver 20 ans dans la semence sans perdre leur pouvoir pathogène (Bashan *et al.*, 1982). Des températures relativement basses comprises entre 13 et 28 °C et la présence d'humidité (85-90%) sont des conditions très propices aux épidémies de *Pseudomonas syringae* pv. *tomato*. Sous les conditions favorables du milieu, ce potentiel d'inoculum initie l'épidémie et présente ainsi des pertes économiques considérables après réduction de la qualité et de la quantité de la production (Blancard, 2009).

2.3- Cycle parasitaire des bactéries:

Le déroulement du cycle parasitaire impose l'existence d'une phase de conservation, de dispersion et de l'infection des bactéries.

2.3.1- Conservation et dispersion

La surface aérienne d'une plante constitue un site où les bactéries épiphytes (parasites ou saprophytes) sont naturellement présentes (phase résidente). Le sol de la rhizosphère représente une interface, particulièrement importante, pour la multiplication des bactéries phytopathogènes (Lepoivre, 2003).

2.3.2- L'infection

L'apport des bactéries au niveau des organes aériens des plantes résulte, très généralement, d'une rencontre aléatoire (aérosol, vent, insectes outils contaminés, eau d'arrosage de germes, résidus des plantes infectées, etc.). Occasionnellement, la rencontre entre bactérie et hôte peut être plus spécifique, notamment, lors de la transmission par certains vecteurs ou via un mouvement polarisé des bactéries (le chimiotactisme) induit par les exsudats radiculaire ou foliaire. La pénétration des bactéries dans les plantes se fait, le plus souvent, par des ouvertures naturelle ou via des blessures (Lepoivre, 2003)

- **Les stomates** : constituent un point de pénétration important; leur superstructure plus ou moins accessible ou leur fermeture peuvent influencer le processus de pénétration après lequel se détermine, au niveau de la chambre-sous stomatique, l'arrêt ou la poursuite de l'infection. Notons que certaines bactéries (notamment *Pseudomonas syringae* pv. Tomato) produisent des cutinases capable de dégrader les chaînes latérales de la cutine (Lepoivre, 2003)
- **Les lenticelles** : sont normalement protégées par une couche subérisée, qui se rompt en condition de forte humidité, permettant l'accès des bactéries aux couches sous adjacentes non subérisées où elles peuvent provoquer une macération (Lepoivre, 2003).
- **Les hydathodes** situés à l'extrémité des vaisseaux en périphérie des feuilles en excrétant l'eau vers l'extérieur peut permettre la pénétration des agents pathogènes (Lepoivre, 2003).
- **Les trichomes ou poils multicellulaires** présents sur les feuilles et les fleurs, se brisent aisément et permettent la pénétration de certaines bactéries, notamment chez la tomate (Lepoivre, 2003).

2.3.3- Les déterminants du pouvoir pathogène bactérien

2.3.3.1- L'adhésion

Une fois la bactérie pathogène entrée dans les tissus de l'hôte, elle peut se fixer aux cellules pour établir un centre d'infection à partir duquel elle va se disséminer. Cette étape d'adhérence implique des molécules bactériennes de surface appelées adhésines (Rostand et Esko, 1997). L'adhésion peut se faire à l'aide de pili (Tfp pour "*type IV pilus*") ou fimbriae,

qui est essentiellement constitué d'une unique protéine PilA, assemblée en un polymère pour former un filament polaire flexible (Craig *et al.*, 2004; Genin et Boucher, 2004).

L'importance et le rôle du Tfp dans la pathogénie des bactéries phytopathogènes semblent variables selon les organismes considérés. Chez *R. solanacearum*, une mutation dans le gène *pilA* se traduit par une diminution de la virulence de cet agent pathogène dans les plants de tomate (Kang *et al.*, 2002). En revanche, chez *X. campestris* pv. *vesicatoria* et *P. syringae* pv. *tomato*, des mutations dans le gène *fimA* (homologue de *pilA*) ont montré que celui-ci est, d'avantage, responsable de l'agrégation de cellule à cellule et de la protection contre le stress environnemental que de l'adhésion ou de la colonisation de la surface des plantes (Ojanen-Reuhs *et al.*, 1997; Roine *et al.*, 1998).

2.3.3.2- La mobilité et le chimiotactisme

Les bactéries mobiles peuvent être attirées par des substances nutritives comme les sucres, les acides aminés, l'oxygène, ou être repoussées par des substances nuisibles, ce phénomène est appelé le chimiotactisme. Les bactéries dirigent leur mouvement en fonction d'un gradient chimique impliquant plusieurs types de mobilité. La mobilité par « swarming » (nage en surface) et « swimming » (nage dans le liquide) sont réalisées généralement par le flagelle, long appendice protéique flexible et motorisé (Chevance et Hughes, 2008). La mobilité par « twitching » réalisée grâce aux pili de type IV (Craig et Li, 2008; Kaiser, 2007).

La mobilité cellulaire est un élément important dans la capacité de colonisation de la plante hôte et de la virulence de nombreuses bactéries phytopathogènes. Une étude récente a, néanmoins, montré que des mutations dans certains gènes *fli* (impliqués dans la biosynthèse du flagelle) chez *R. solanacearum*, se traduisaient par une réduction significative de la capacité des mutants à provoquer la maladie chez des plants de tomate inoculés (Tans-Kersten *et al.*, 2001), soulignant ainsi la contribution de ces flagelles dans la pathogénie des bactéries qui en sont dotées. Le chimiotactisme peut être important pour la formation de biofilm et pour la mise en place du pouvoir pathogène. Chez la bactérie phytopathogène *R. solanacearum* responsable du flétrissement bactérien de la tomate, il existe un système d'aérotaxie et d'énergie taxie permettant à la bactérie de se diriger vers les racines de tomate et des modifications par mutation dans ces systèmes retardent le développement de la maladie (Yao et Allen, 2007).

2.3.3.3- Les systèmes d'acquisition du fer

Le fer est un cofacteur essentiel à de nombreuses enzymes et par conséquent, participe à de nombreuses voies métaboliques que ce soit chez les procaryotes ou les eucaryotes. La capture du fer est restreinte à deux formes du fer, le fer ferreux Fe^{2+} et le fer ferrique Fe^{3+} . Les bactéries ont développé un système de capture du fer impliquant des molécules appelées sidérophores capables de complexer le fer ferrique avec une très grande affinité, des systèmes de transport spécifiques dits TonB-dépendants qui vont transporter les complexes fer/sidérophores dans la cellule et un système de régulation capable de percevoir le taux de fer intracellulaire via la protéine Fur (Braun et Killmann, 1999). Les sidérophores sont nécessaires à la virulence de nombreux pathogènes (Ratledge et Dover, 2000). Par exemple, chez *Erwinia chrysanthemi*, agent d'une trachéobactériose du saintpaulia, l'isolement de mutants déficients pour la production de sidérophores a permis de montrer que la possibilité de capter le fer était indispensable pour l'extension systémique de la bactérie via le système vasculaire (Expert, 2005).

2.3.3.4- les systèmes de sécrétion

Les systèmes de sécrétion protéiques contribuent de façon capitale à l'interaction et la survie des bactéries dans leur environnement et l'exploitation des ressources du milieu ainsi que l'expression de la pathogénie. Chez les bactéries Gram négatif, ils sont nécessaires à la sécrétion ou l'export dans le milieu extracellulaire des facteurs de virulence au travers de la double membrane cellulaire, constituée d'une membrane externe et d'une membrane interne, ou cytoplasmique, séparées par le périplasme (Salmond, 1994). Jusqu'à ce jour, quatre systèmes de sécrétion protéiques majeurs et deux systèmes de sécrétion potentiellement impliqués dans la virulence des bactéries Gram négatif ont été décrits.

➤ Système de sécrétion de type III

Le système de sécrétion de type III (TTSS pour "*type three secretion system*") des bactéries Gram négatif a fait l'objet de nombreux travaux de recherche au cours des 15 dernières années en raison du rôle prépondérant qu'il joue dans la pathogénie de nombreux pathogènes très divers (Genin et Boucher, 2004). Ce système de sécrétion est impliqué dans la réponse d'hypersensibilité exprimée par les plantes lors de l'infection par l'agent pathogène dans le cas d'une interaction incompatible (Salmond, 1994). Il permet l'injection directe dans la cellule de

la plante hôte de nombreux facteurs de virulence, encore appelés effecteurs, *via* un pilus rattaché à la membrane externe de la bactérie. Les protéines du TTSS sont codées par un ensemble de gènes, les gènes *hrp* ("*hypersensitive response and pathogenicity*") et *hrc* ("*hrp conserved*"), qui sont organisés en groupements de gènes (généralement 20-40 kb) dans le génome de la plupart des bactéries pathogènes (Salmond, 1994). Les protéines Hrc sont les protéines qui forment le corps basal du T3SS et sont très conservées. Le corps basal se prolonge par un pilus extracellulaire creux reliant la bactérie et la cellule hôte, appelé pilus Hrp. Il est composé d'une protéine, la piline, comme HrpA chez *P. syringae* (Guttman *et al.*, 2006), HrpY chez *R. solanacearum* (Van Gijsegem *et al.*, 2000) ou encore HrpE chez *X. axonopodis* pv. *vesicatoria* (Weber et Koebnik, 2005, 2006). Son diamètre mesure environ 6 à 8 nm chez *P. syringae* pv. *tomato* (Roine *et al.*, 1997) et il peut atteindre plusieurs μm de long chez les bactéries phytopathogènes leur permettant de traverser la paroi végétale et d'atteindre la membrane plasmique. Le pilus Hrp est terminé par un translocon formant un pore dans la membrane plasmique végétale permettant le passage des effecteurs de type III du pilus vers le cytosole de la cellule eucaryote.

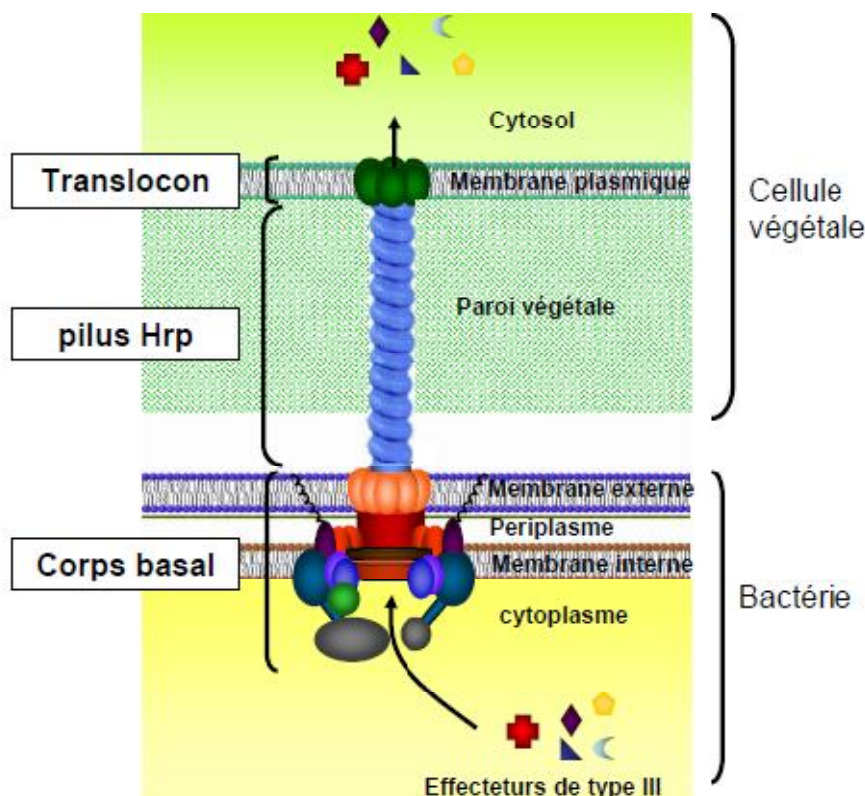


Figure 1 Représentation schématique du système Hrp (Boulanger, 2009).

2.3.3.5-Les effecteurs ou éliciteurs de type III

Les protéines effectrices ou les effecteurs de type III (TTSS) sont des protéines qui sont transférées dans la cellule de l'hôte grâce au TTSS et qui vont interférer dans certaines fonctions de la cellule eucaryote. Nombre de ces effecteurs sont impliqués dans l'altération de la réponse basale de l'hôte mais peuvent également altérer la voie de signalisation hormonale de la plante, interférer dans la HR et dans la résistance non hôte [pour revue (Grant *et al.*, 2006; Zhou and Chai, 2008)], et ce grâce à différentes fonctions et des domaines ayant des caractéristiques de protéines eucaryotes. Les effecteurs les mieux étudiés sont désignés comme des protéines d'avirulence « Avr » car elles sont détectées par les plantes non-hôtes et induisent un phénotype d'avirulence (Keen, 1990; Staskawicz *et al.*, 1984). Ces effecteurs ont été nommés Hop pour « Hrp outer protein » chez *Pseudomonas* (Alfano et Collmer, 1997), Xop pour « *Xanthomonas* outer protein » chez *Xanthomonas* (Noel *et al.*, 2001) ou Pop pour « *Pseudomonas* outer protein » chez *Ralstonia* (qui faisait partie du groupe *Pseudomonas* à l'époque de cette identification) (Arlat *et al.*, 1994). L'importance du rôle des effecteurs de type III dans la pathogénie des bactéries phytopathogènes est variable et dépend du type d'effecteur considéré. Ainsi, chez *P. syringae*, de larges délétions dans le génome de la souche *P. syringae* pv. *tomato* a permis de mettre en évidence un "locus d'effecteurs conservés", essentiel pour l'expression de la pathogénie, ainsi qu'un "locus d'effecteurs échangeables" moins conservé, jouant un rôle mineur dans la croissance et le développement de la bactérie dans l'hôte (Collmer *et al.*, 2000).

2..3.3.6-Les enzymes de dégradation de la paroi cellulaire

Une fois dans les tissus de la plante, les bactéries pathogènes dégradent la paroi des cellules végétales. Cette dégradation entraînera une libération de nutriments qui seront utilisés comme source de carbone et d'énergie par les bactéries, mais permettra aussi, une dissémination des agents pathogènes dans les tissus. Les enzymes extracellulaires impliquées dans la dégradation de la paroi des cellules de la plante hôte (PCWDE pour "*plant cell-wall degrading enzymes*") sont très répandues parmi les agents phytopathogènes. Elles ont pour rôle essentiel la dégradation des polysaccharides (cellulose, hémicellulose et pectine) et de la lignine qui composent les parois cellulaires des végétaux. Des gènes codant pour ces enzymes de dégradation extracellulaires ont été mis en évidence chez toutes les bactéries Gram négatif dont les génomes ont été séquencés récemment (Van Sluys *et al.*, 2002). Ces gènes codent

pour des pectine estérases, des polygalacturonases, des xylanases, des pectate lyases, des cellulases ou encore des pectinases (Simpson *et al.*, 2000; Da Silva *et al.*, 2002; Salanoubat *et al.*, 2002; Monteiro-Vitorello *et al.*, 2004; Lee *et al.*, 2005).

2.3.3.7-Les phytohormones

Les plantes produisent les auxines et les cytokinines comme des hormones impliquées à différents niveaux de la croissance et du développement des plantes, telles que l'élongation, la division cellulaire, la différenciation des tissus ou encore la dominance apicale (Costacurta et Vanderleyden, 1995). La biosynthèse et la reconnaissance des hormones bactériennes par les cellules de la plante hôte s'avèrent déterminantes pour la croissance cellulaire végétale notamment dans la stimulation de la croissance des racines, ainsi que pour la différenciation vers les deux types d'interactions, pathogénie ou symbiose (Van Sluys *et al.*, 2002). La production de phytohormones a été montrée et très étudiée chez de nombreuses bactéries phytopathogènes, notamment chez certains *Xanthomonas* et différents pathovars de *P. syringae* (Rudolph, 1993; Glickmann *et al.*, 1998). La production d'auxine et particulièrement, l'acide indole-3- acétique (IAA pour « *Indole-3-acetic acid* » Figure 22), confère un meilleur taux de survie à *P. syringae* pv. *savastanoi* durant l'infection (Gardan *et al.*, 1992). La production d'auxine au cours de l'infection a également été suggérée chez *R. solanacearum* (Salanoubat *et al.*, 2002).

2.3.3.8-Les phytotoxines

De nombreuses bactéries pathogènes, et notamment les bactéries pathogènes de plantes, produisent des toxines nocives pour l'hôte qui sont impliquées dans l'expression des symptômes et le développement de la maladie. Les phytotoxines bactériennes les plus connues sont celles produites par *P. syringae*, comme la coronatine qui mime l'action du jasmonate et induit la chlorose des tissus de la plante ainsi que l'ouverture des stomates (Melotto *et al.*, 2008), et qui est coréglée avec les gènes *hrp* ; la syringomycine et la syringopeptine qui forment des pores dans la membrane plasmique des cellules végétales et induisent une fuite d'électrolytes ; la tabtoxine et la phaseolotoxine qui sont de bons agents antimicrobiens et antifongiques. La plupart des phytotoxines de *P. syringae* possèdent des analogies structurelles avec des antibiotiques connus. Si ces phytotoxines ne sont pas essentielles pour l'expression de la pathogénie des bactéries qui les produisent, elles fonctionnent, en général, comme des facteurs de virulence dont la production accentue

l'intensité de la maladie. En effet, les phytotoxines produites par *P. syringae* peuvent contribuer au mouvement systémique de la bactérie dans la plante, à la taille des lésions, ou encore à la multiplication de l'agent pathogène dans l'hôte. Elles peuvent en outre, augmenter de façon significative, la virulence des différents pathovars qui les produisent (Bender *et al.*, 1999).

2.3.3.9-Les Exopolysaccharides (EPS)

De nombreuses bactéries sont capables de synthétiser des polymères de sucres qui seront ensuite sécrétés dans le milieu extracellulaire. Ces EPS resteront associés à la cellule sous forme de capsule ou d'une couche plus fluide. Les EPS sont extrêmement variables dans leur composition et par conséquent, dans leurs propriétés chimiques et physiques (Leigh et Coplin, 1992). Chez plusieurs agents phytopathogènes et notamment chez les genres *Pseudomonas*, *Erwinia* et *Xanthomonas*, les EPS jouent un rôle important dans la pathogénie en favorisant la survie à long terme des bactéries, en provoquant l'induction du flétrissement par blocage des membranes cellulaires chez certaines hôtes, ou encore en provoquant le détrempeage ou la rétention d'eau dans le milieu intercellulaire (phénomène connu sous le nom de "water-soaking") qui est nécessaire à la colonisation bactérienne (Rudolph, 1993).

Durant la phase de vie saprophyte ou épiphyte, ils protègent les bactéries de la dessiccation et des UV, réduisent le contact avec des macromolécules hydrophobes ou chargées et permettent une meilleure adhésion aux surfaces. La synthèse d'EPS peut être contrôlée par le quorum sensing ou d'autres signaux environnementaux.

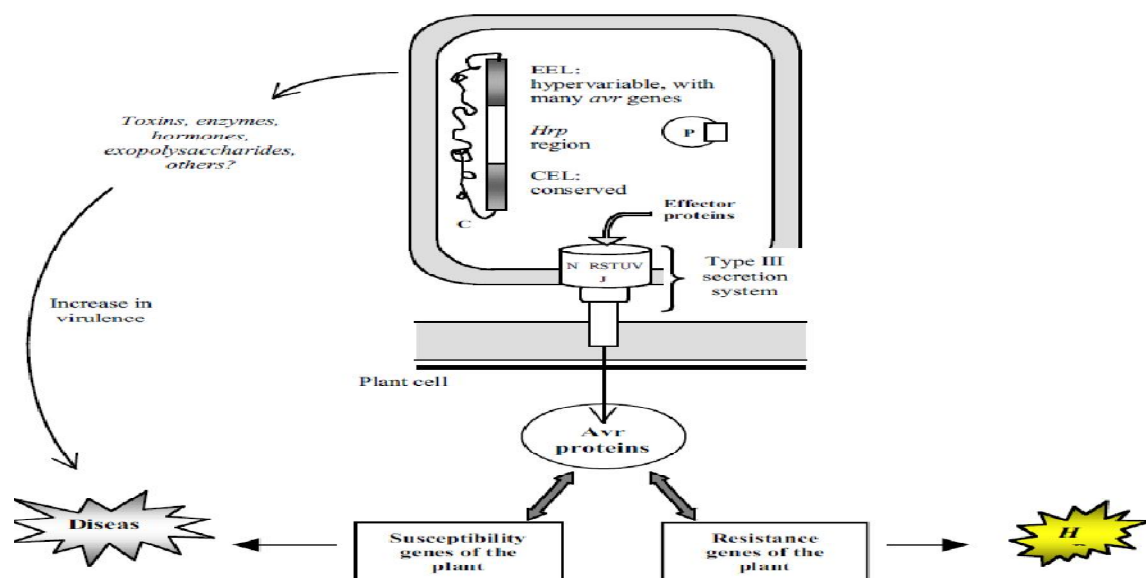


Figure 2 Modèle expliquant la pathogénicité bactérienne (Murillo et Sesma, 2001).

3- Matériel et méthodes

Ce travail est réalisé au laboratoire de Mycologie, de biotechnologie et de l'activité microbienne (LaMyBAM), Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie, UC-1. Notre objectif, est une contribution à l'identification des agents pathogènes des maladies bactériennes de la tomate cultivée en serre dans l'est Algérien. Il se propose dans une première étape une localisation des zones de culture par des prospections et une observation des maladies bactériennes. Dans une deuxième étape un isolement de l'agent pathogène, et son identification. Enfin, la recherche d'agents antagonistes et la réalisation d'études *in vivo* en vue d'une lutte biologique.

3.1- Prospections

La prospection sur terrain ainsi que la récolte d'échantillons de tomate se sont déroulées dans la région de Collo, une ville côtière à vocation maraîchère importante, située au nord-est de l'Algérie à environ 70 km à l'ouest de Skikda et 120 km au nord de Constantine. Son climat est méditerranéen, doux en hiver et assez chaud en été. A cause de son climat marin, l'humidité est très forte et les précipitations sont abondantes en automne.

Une dizaine de serres ont été prospectées, chacune occupe une superficie de 400 m², à sol sableux, contenant 900 plantes de tomate (*Lycopersicon esculentum* Mill). Les techniques culturales utilisées dans les serres sont le labour, le binage, le désherbage, l'irrigation par rigole. Des traitements phytosanitaires ont été appliqués: des fongicides (en particulier contre le mildiou), des insecticide et des herbicide (ex: le Mocap), des nématocides et des pièges à eau et phéromones contre la mineuse de la tomate. Les échantillons prélevés sont destinés à l'isolement et l'identification de l'agent pathogène.



Figure 3 Serre de tomate (*Lycopersicon esculentum* Mill) prospectée.

3.2- Evaluation de l'incidence de la maladie sur serres:

L'approche statistique de la maladie de la moucheture bactérienne consiste en un système de comptage du nombre d'unités infectées par rapport à la totalité des plantes, permettant ainsi d'en tirer un pourcentage en appliquant la formule suivante :

$$\text{IC \%} = \frac{\text{Nombre de plantes malades}}{\text{Nombre totale des plantes}} \times 100$$

Au niveau des serres examinées, trois endroits différents ont été choisis pour évaluer l'incidence de la maladie (rangée droite, rangée médiane et rangée gauche).

3.3- Echantillonnage

Le matériel végétal utilisé provient de la variété de tomate (Tavira). Les prélèvements des échantillons sont effectués à partir de différentes plantes de tomates qui présentent des symptômes typiques de la moucheture bactérienne. Les échantillons prélevés ont été placés dans des sacs en papier et transportés au laboratoire pour l'isolement et l'identification de l'agent pathogène.

3.4- Isolement de l'agent pathogène

L'isolement de l'agent pathogène a été réalisé sur des milieux de culture gélosés, selon la méthode de Goszczynska *et al.* (2000). Les feuilles de tomate présentant des symptômes typiques sont lavées à l'eau du robinet pour éliminer les débris de surface avant de procéder à l'isolement. Les parties infectées du tissu végétal sont coupées à la limite (zone saine/zone malade) à l'aide d'un scalpel stérile. Ces morceaux de feuilles ont été lavés dans de l'eau distillée stérile puis sectionnées en deux et placées dans de l'eau physiologique stérile (NaCl 0.85%) pendant 30 minutes, afin que les bactéries diffusent dans la solution. La suspension est ensemencée à l'aide de l'anse de platine sur des boîtes de Pétri contenant le milieu LPGA (Levure Peptone Glucose Agar) (annexe1). Ensuite, les boîtes ont été incubées à une température de 27 °C pendant 48 à 72 h, la croissance est vérifiée quotidiennement.

3.5- Purification de l'agent pathogène

Après développement et à la lecture des boîtes, les colonies présentant les caractères culturels du pathogène sont purifiées par réensemencement sur boîtes, selon la méthode de stries. À l'aide d'une boucle d'inoculation, un frottement est prélevé à partir de la boîte de Pétri qui contient plusieurs colonies et étalé sur la surface d'une autre boîte en suivant un motif défini. À certains moments, des cellules isolées se détachent de la boucle en mouvement et se développent en colonies séparées (Prescott *et al.*, 2007). L'incubation est effectuée à 27 °C jusqu'à l'obtention de colonies apparentes (48 h).

3.6- Conservation de l'isolat

Après purification, les jeunes colonies bactériennes sont aseptiquement transférées et ensemencées dans des tubes à essai contenant de la gélose nutritive inclinée ensuite, incubés à 27 °C pendant 48h puis conservés au réfrigérateur à 4 °C. En outre, une autre méthode de conservation a été suivie et qui consiste à prélever les colonies jeunes afin de les mettre dans des tubes contenant une solution de 20 % de glycérol et les congeler à -20 °C (Botton *et al.*, 1990).

3.7- Identification de l'agent pathogène

3.7.1- Observation macroscopique

L'aspect macroscopique des colonies est observé directement sur la gélose après purification, il permet de connaître la forme, le contour, la texture, la couleur et la viscosité. Ces observations sont aussi déterminées à l'aide du grossissement X4 du microscope (Guiraud, 1998).

3.7.2- Observation microscopique

- **Observation à l'état frais**

Une préparation à l'état frais, par l'application de la technique de la goutte pendante, permet de déterminer la mobilité, d'observer les bactéries vivantes et de déterminer leur mobilité, leur morphologie, et leur mode de regroupement. Elle consiste à déposer une goutte de culture contenant des bactéries vivantes, non colorées, sur une lamelle et de recouvrir la lamelle par une lame creuse, puis inverser la lame de la manière à obtenir une goutte pendante, puis retourner l'ensemble à examiner au microscope optique à l'objectif (40X) puis à immersion (100X) (Singleton, 2005).

- **Coloration de Gram**

La coloration de Gram est un aspect important et essentiel pour l'identification d'une bactérie isolée et la vérification de la pureté de l'isolat. A partir d'une colonie de 24h, un frottis est fixé à la chaleur puis recouvert par le violet de Gentiane pendant une minute, ensuite il est éliminé par l'ajout du Lugol pendant une minute. Le frottis est ensuite décoloré avec de l'éthanol jusqu'à ce que le colorant cesse de s'échapper librement du frottis. A ce stade, les cellules Gram négatives seront incolores et les cellules Gram positives violettes. Ensuite, le frottis est soumis à une contre coloration de 30 secondes à la fuchsine, pour colorer les cellules Gram- présentes. Après un bref rinçage, le frottis est séché au papier buvard puis examiné, consécutivement, à l'objectif 40X et à immersion 100 X (Singleton, 2005).

3.7.3- Caractères biochimiques

Les tests biochimiques constituent une approche classique pour l'identification des bactéries, et la détermination de certaines espèces, ainsi que de connaître certaines caractéristiques du métabolisme des bactéries isolées (Goszczyńska *et al.*, 2000).

3.7.3.1- Pigmentation et coloration des colonies

Les bactéries pathogènes des plantes produisent une variété de couleurs et de pigments, qui leur sont caractéristiques (Gitatis *et al.*, 1987).

- **Croissance et production de pigment fluorescent sur milieu King B**

Ce test permet la mise en évidence de la pyoverdine des *Pseudomonas* du groupe fluorescent (Lelliott *et al.*, 1966). La méthode consiste à ensemercer les souches à tester à l'aide d'une anse à inoculer stérile dans une boîte de Pétri contenant le milieu King B. les boîtes sont incubées à 28°C pendant 72h (Maury, 1987). Après incubation, la boîte est passée sous une lampe de wood émettant une lumière ultraviolette (UV). La production du pigment fluorescent bleu ou vert se fait en comparaison avec une boîte nonensemencée (Guiraud, 1998).

3.7.3.2- Test catalase

Le test catalase sert à démontrer si la bactérie possède l'enzyme catalase servant à décomposer le peroxyde d'hydrogène ou l'eau oxygénée (H₂O₂) en eau et en oxygène. Elle permet sa mise en évidence par contact de la culture avec une solution fraîche d'eau oxygénée (Singleton, 2005).

La technique consiste à transférer un peu de matériel bactérien au moyen d'une boucle d'anse stérile dans une goutte d'eau oxygénée 3% déposée sur une lame (Prescott *et al.*, 2007). Une réaction positive se traduit par l'apparition de bulles (Singleton, 2005).

3.7.3.3- Test oxydase

Le test oxydase permet de mettre en évidence la présence de l'enzyme capable d'oxyder le substrat employé et ne signifie pas la présence d'une oxydase particulière (Guiraud, 1998). Le substrat utilisé dans ce test est sous forme d'un disque de papier filtre pré-imprégné par le réactif qui est l'oxalate de diméthyl-paraphénylène-diamine. Le disque est placé sur une lame puis une petite quantité de matériel bactérien est étalée à sa surface au moyen d'une boucle de platine. La présence de l'oxydase se manifeste par une coloration violette après 30 secondes, lorsque la bactérie est oxydase + (Singleton, 2005).

3.7.3.4- Recherche du nitrate réductase

Ce test détecte si un organisme est capable de réduire le nitrate. la recherche de la nitrate réductase (NR) est réalisé sur un bouillon nitraté par les réactifs de Griesse (annexe 2), qui permet de détecter le nitrite.

Le test consiste à cultiver l'organisme dans un bouillon nitraté à 28°C pendant 48h à 72h. Après incubation le milieu est examiné pour savoir s'il y a réduction des nitrates en nitrites. Pour détecter la présence du nitrite, 0.5 ml de réactif 1 et 0.5 ml du réactif 2 de Griesse sont ajoutés. Ces réactifs se combinent à tout nitrite présent pour former un colorant rouge azoïque soluble. L'absence de coloration rouge peut signifier, soit que le nitrate n'a pas été réduit, soit que le nitrite s'est formé mais a été ensuite réduit, soit, en azote, soit et en ammoniac.

Pour distinguer entre ces deux possibilités, une trace de poudre de zinc permettant de réduire le nitrate en nitrite est ajoutée. Si du nitrate existe encore, un virage de couleur vers le rouge sera observé car le nitrite nouvellement formé se combinera avec les réactifs du milieu (Singleton, 2005).

3.7.3.5- Recherche de l'arginine déshydrolyase

Ce test permet de détecter la capacité d'un organisme à produire de l'arginine déshydrolyase (ADH), enzymes qui décarboxyle l'acide aminé arginine en agmatine.

Pour ce faire, un tube contenant du bouillon möller plus l'acide aminé arginine est inoculé par la bactérie au même temps que le tube témoin (contenant milieu möller uniquement). Le

bouillon est recouvert d'une couche d'huile de vaseline stérile (pour l'isoler de l'air) car l'anaérobiose est obligatoire pour la recherche des décarboxylases. L'incubation est effectuée à 28°C pendant 48h à 72h. Après incubation, les tubes; y compris le témoin (sans acide aminé) présentent une coloration mauve.

Le test continue en versant goutte à goutte une solution de tampon à pH 4 dans le tube témoin en agitant quelques secondes après chaque goutte jusqu'au virage au jaune (acide) pour pallier l'absence de fermentation du glucose chez les bactéries Gram- aérobies stricts à métabolisme oxydatif.

Le tube contenant du bouillon möller plus l'acide aminé arginine est additionné du même nombre de gouttes de la solution tampon à pH 4 ajouté au tube témoin en plus des trois gouttes supplémentaires suivi d'agitation pendant 15 secondes. Si le tube persiste mauve l'alcalinité due à la décarboxylation de l'acide aminé est présente (présence de décarboxylase). Par contre, si le tube vire au jaune, il y a absence de décarboxylase (Joffin et Leyral, 2001).

3.7.3.6- Détermination de la voie d'attaque des glucides

Le milieu de Hugh et leifson appartient aux milieux MEVAG (milieux d'études de la voie d'attaque des glucides), contenant un indicateur de pH, permet de déterminer la voie métabolique empruntée par les différentes espèces bactériennes (la voie oxydative ou fermentaire) (Guiraud, 1998). La technique consiste à :

- Préparation du milieu : faire fondre dans un bain marie bouillant deux tubes de milieu MEVAG cette phase consiste à éliminer l'oxygène dissous.
- Refroidir vers 45-50°C et rajouter aseptiquement dans chaque tube quelques gouttes (6 à 7 gouttes) de solution aqueuse stérile de glucose à 30% pour obtenir une concentration finale de 1%. Mélanger par agitation douce sans renversement.
- Ensemencer par piqûre centrale au fil droit à partir d'une culture de 18 à 48 heures les deux tubes dont l'un est recouvert d'une couche d'huile de vaseline stérile, c'est le tube dit «fermé», l'autre est le tube dit « ouvert ». Ensuite ils sont incubés.

Au terme de la période d'incubation, trois catégories de bactéries sont distinguées : les bactéries fermentatives, qui donnent acidification rapide et égale dans les deux milieux qui deviennent jaune en 24h sur toute la hauteur de la pique d'inoculation, dans le cas où il y a

production du gaz, celui-ci est visible, sous la couche d'huile. Les bactéries oxydatives, qui révèlent dans le tube fermé peu ou pas de culture, et pas d'acidification (après plusieurs jours, même en l'absence de culture visible, la couleur du milieu peu virer vers des teintes orangées si l'huile utilisée est acide, quant au tube ouvert il y'a acidification modérée et assez lente, débutant à la surface, en 24-48 heures ou parfois d'avantage, jamais de gaz. Enfin pour les bactéries inactives il y'a peu ou pas de culture dans le tube fermé, quant au tube ouvert, il y' a culture sans modification du pH (pas d'acidification) ou avec une alcalinisation plus ou moins forte en surface (virage au rouge violet) (Maury, 1987).

3.7.3.7- Production d'indole

Le test de l'indole permet de savoir si un organisme peut produire de l'indole à partir de tryptophane. Il consiste à faire croître l'organisme étudié dans de l'eau peptonée pendant 48 heures à 27°C. A la suite de l'incubation, 3 gouttes du réactif de Kovac sont ajoutées et la réaction est lue immédiatement après agitation. La présence d'un anneau rouge en surface indique la formation d'indole, et si l'anneau est brunâtre (couleur du réactif) la réaction indole est considérée négative (Singleton, 2005).

3.7.3.8- Température de croissance

Une culture bactérienne de 48 heures estensemencée dans des boîtes de Pétri contenant du milieu LPGA. Ensuite les boîtes sont incubées à différentes températures 27, 37 et 45°C. Ces dernières sont préconisées par Hilderbrand *et al.*, (1940). L'incubation des boîtes se prolonge jusqu'à 10 jours.

3.7.3.9- Test de l'activité Tween-estérase

Il a pour but de déterminer si un organisme doué d'activité lipasique, capable d'hydrolyser les ester d'acide gras à longue chaîne carbonée. A l'aide de l'anse à inoculer prélever de la culture bactérienne âgée de 24 à 48 heures et ensemencer en strie sur boîte de Pétri contenant un milieu gélosé au Tween 80. Incuber pendant 72 heures à 27°C. L'activité lipasique se traduit par un halo clair autour des colonies. Le halo est dû à la précipitation des sels de calcium et les acides gras (Schaad *et al.*, 2001).

3.7.3.10- Test de mise en évidence de l'hydrolyse de l'amidon

Ce test détecte la présence d'une enzyme, l'amylase qui hydrolyse l'amidon en glucose. Pour ce test on ensemence en stries une boîte de Pétri contenant du milieu amidon avec une culture bactérienne âgée de 24 heures à 48 heures. Après incubation à 27°C pendant environ 72 heures les colonies sont grattées avec une lamelle puis une solution de lugol est ajoutée sur le milieu. Lorsqu'il se forme un halo clair autour de la colonie, le test est positif et si le milieu reste inchangé, le test est négatif (Schaad *et al.*, 2001).

3.7.3.11- Test de mise en évidence de la digestion de la caséine

Le test permet de détecter la présence d'une protéase qui hydrolyse la caséine du lait. Une boîte de Pétrie contenant une gélose au lait est ensemencée en stries à partir d'une culture bactérienne de 24 heures à 48 heures. Incuber jusqu'à 7 jours à 27°C. le test est positif lorsqu'on observe une zone clair autour de la culture et il est négatif quant le milieu reste inchangé (Schaad *et al.*, 2001).

3.7.3.12- Test d'utilisation du saccharose

Le test sucrose sert à déterminer si la bactérie transforme le sucrose en substances réductrices. A l'aide d'une anse à inoculer stérile, inoculer les tubes qui renferment 5ml du bouillon transformation du sucrose en substances réductrices (RS). Après incubation à 27°C pendant 1 à 2 jours, 2,5 ml du réactif de Bénédict est ajouté. Les tubes sont ensuite déposer dans un bécher de 250 ml, ajouter de l'eau et maintenus au bain marie bouillant pendant 10 mn puis dans de l'eau froid. Le dépôt au font du tube d'un précipite brun est une réaction positive (Schaad, 1988).

3.7.3.13- Hydrolyse de la gélatine

Ce test permet de détecter l'activité protéolytique forte des bactéries et la capacité de produire une gélatinase. La gélatinase ou collagénase est une protéase qui hydrolyse le collagène en acides aminés ou en peptides. A l'aide de l'anse à inoculer, une culture bactérienne est ensemencée par piqure centrale au fil droit au centre du culot de gélatine. Après 15 jours d'incubation à 27°C, les tubes sont mis pendant 10 mn dans le réfrigérateur à 4°C pour favoriser la prise en gel. La liquéfaction indique la gélatinolyse et si aucune hydrolyse ne se produisait le milieu demeurera un gel (Goszczyńska *et al.*, 2000).

3.7.3.14- Activité levane sucrase

Le test levane sucrase sert à déterminer si la bactérie polymérise le fructose en polyfructose. A l'aide de l'anse à inoculation, inoculer le milieu de culture levane par stries avec une

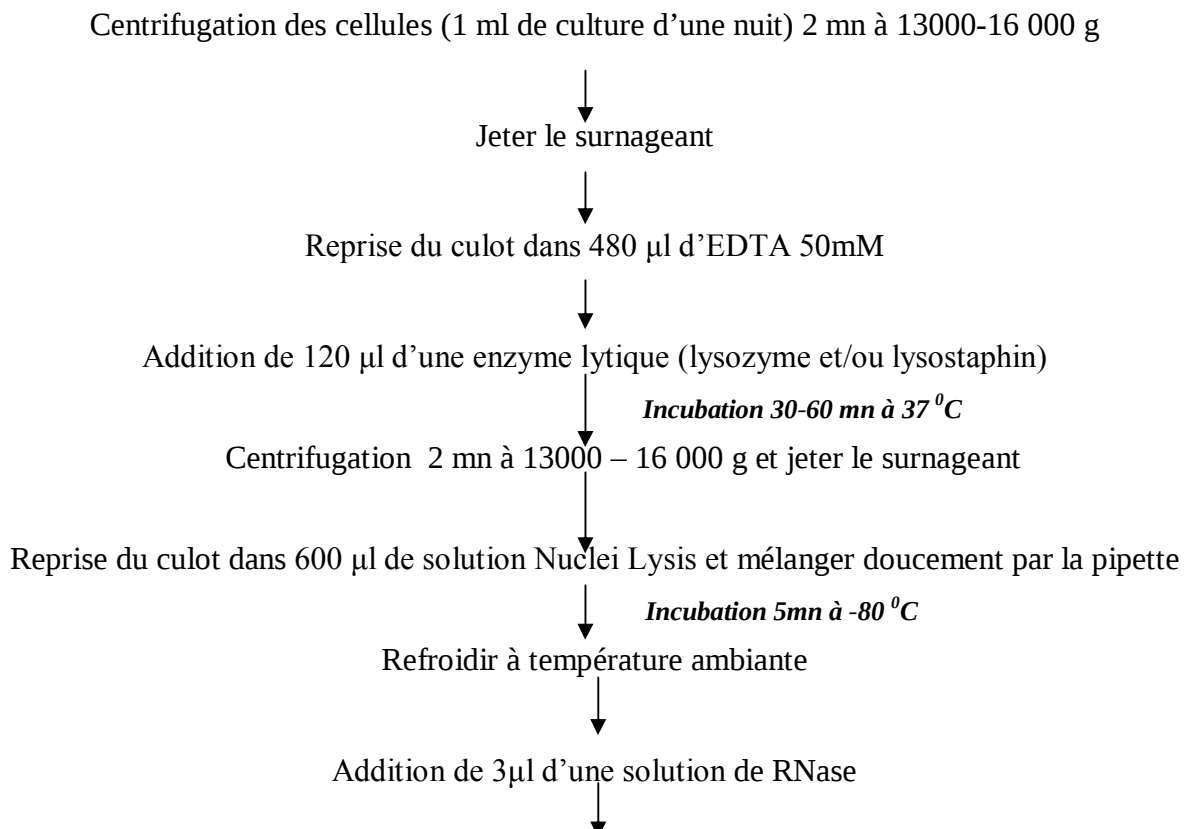
culture bactérienne jeune. Après 3 jours d'incubation à 27°C, l'apparition d'une culture abondante, bombée, muqueuse et brillante indique que la bactérie possède une levane sucrase (Goszczyńska *et al.*, 2000).

3.7.4- Identification moléculaire

L'identification de la souche bactérienne sélectionnée a été réalisée par analyse de l'ARN-r 16S. Cette analyse a été effectuée au Centre wallon de Biologie Industrielle (CWBI) Université de Liège, Belgique. La détermination de l'identité d'un microorganisme nécessite la réalisation de plusieurs étapes, à savoir : l'extraction d'ADN ; l'amplification du gène désiré par PCR ; purification du produit de la PCR ; le séquençage du gène étudié et enfin la comparaison de la séquence obtenue avec les séquences du même gène déposées dans une banque de donnée comme GenBank,

3.7.4.1- Extraction d'ADN

L'ADN total a été extrait à partir d'une culture liquide de la souche bactérienne sélectionnée, par le kit « wizard genomic DNA purification : Promega ». Le protocole d'extraction d'ADN est illustré dans le schéma 1.



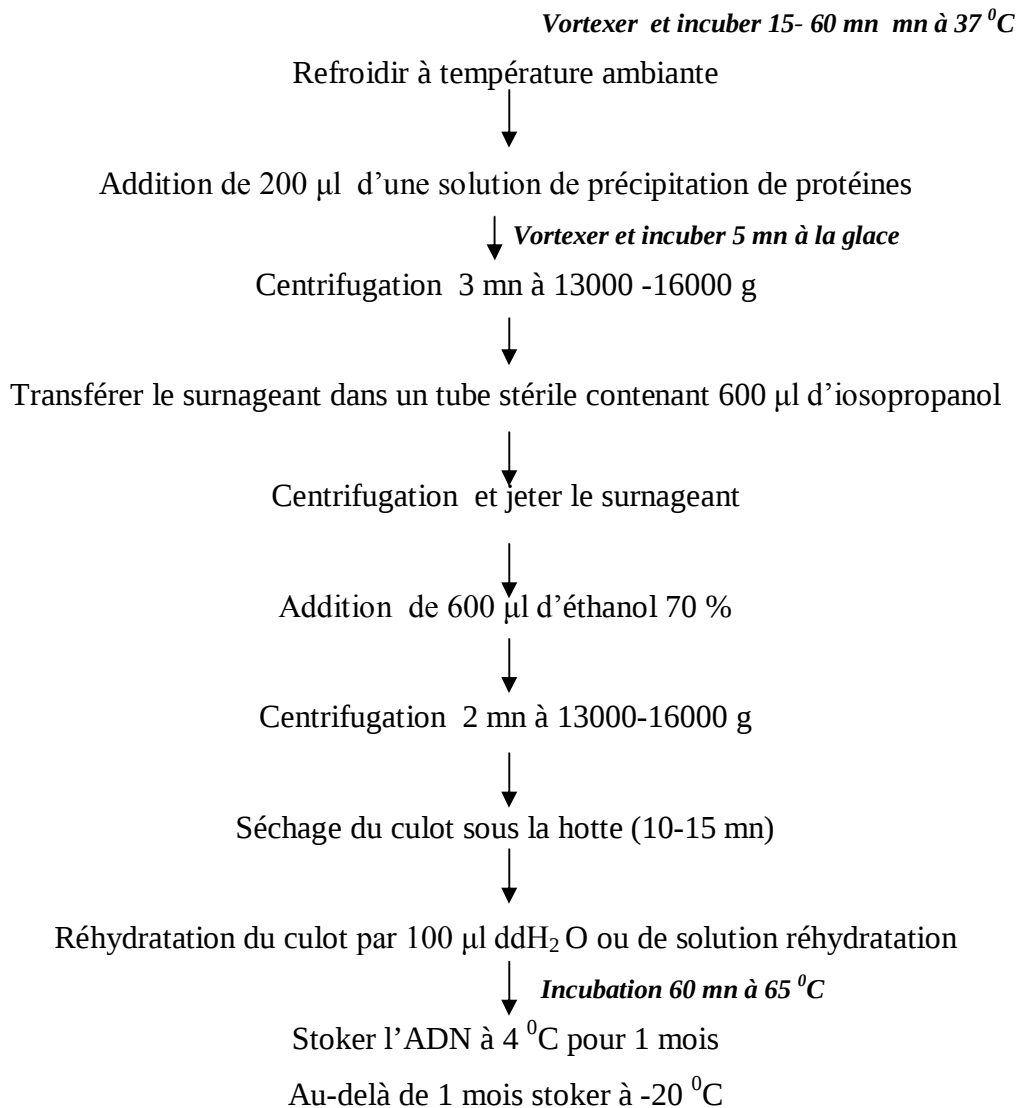


Schéma 1 Méthode d'extraction de L'ADN des bactéries

3.7.4.2- Amplification de l'ARNr 16S

Les amorces utilisées pour l'amplification de l'ARNr 16S sont les primers universels : 16SP0 5'- GAA GAG TTT GAT CCT GGC TCAG-3' et 16SP6 5'-CTA CGG CTA CCT TGTTAC GA-3'. 2 µl d'ADN extrait ont été ajoutés au mélange réactionnel du volume final de 25µl qui contient : 10xtaq buffer (2,5 µl), 25mM Mgcl₂ (1,5 µl), 10 mM de dNTP (0.4 µl) 1,25µl de chaque primers, 0.25 µl de taq polymérase et 15,85 d'eau distillée. La réaction de PCR a été réalisée dans le thermocycler (Thermal Cycler PTC-200, MJ Research), en utilisant 26 cycles du programme suivant : 95 °C (30 sec), 50 °C (30 sec), et 72 °C (2mn) et après 1 cycle de 72 °C pour 10 mn. La vérification du bon déroulement de la réaction de PCR a été

effectuée par électrophorèse du produit PCR obtenu sur gel d'agarose 1% supplémenté au bromure d'éthidium (10 µl). La visualisation des bandes d'ADN se fait sous lumière UV.

3.7.4.3- Purification du produit de la PCR et séquençage

Le produit de la PCR a été purifié par le kit de purification « GFX PCR DNA and Gel Band Purification ». Le produit de l'AND purifié a été séquençé en utilisant les mêmes primers décrits ci-dessus. Les séquences obtenues ont été corrigées par le programme « Bioedit », puis comparées aux séquences déposées dans Genbank en utilisant le programme Blast NCBI.

3.7.5- Pathogénicité sur tomate

- ***Les graines et la croissance des semis :***

Les semences de tomate (*L. esculentum* Mill) de la variété Tavira ont été semées dans un terreau commercial mélangé avec de la terre dans des pots en plastique. Les pots sont placés dans la serre à une température comprise entre 22 et 25°C. Ils sont arrosés au besoin pour garder le sol humide jusqu'à la croissance des semis au stade d'inoculation (3 à 5 feuilles).

- ***Préparation de l'inoculum et l'inoculation :***

Une suspension bactérienne de 10^8 CFU/ml est préparée à partir d'une culture bactérienne de 48 h cultivée sur milieu B de King, (Jones *et al.*, 1984). En effet, Les plantules de tomate sont inoculées par pulvérisation foliaire sur la partie supérieure et inférieure des feuilles. Les pots sont déposés dans la serre. Les symptômes de la maladie ont été observés après 1 à 2 semaines de l'inoculation. Les plantules inoculées avec de l'eau distillée stérile servent comme contrôle négatif (témoin).

3.8- Sélection des souches antagonistes

Le test d'antagonisme consiste à chercher l'activité biologique des souches sur le développement de l'agent pathogène. Ce test est réalisé par la méthode de diffusion sur gélose suivant deux techniques : technique de criblage pour les bactéries, et technique des disques pour les mycètes. Une partie des souches bactériennes utilisées dans ce test ont été isolées à partir du sol de la rhizosphère des plantes de tomate de la serre prospectée, tandis que la deuxième partie des souches (bactéries, mycètes) a été fournie par le Laboratoire de Mycologie, de Biotechnologie et de l'Activité Microbienne (LaMyBAM).

3.8.1- Méthode de criblage

La technique consiste à déposer 0.1 ml de la suspension bactérienne standardisée, et l'étalée à la surface d'une boîte de Pétri contenant le milieu LPGA, après séchage de la surface, des prélèvements de bactéries sont effectués à partir de culture de 48 h et ensemencés par des piqures en utilisant des cure-dents stériles, les boîtes sont incubées à 27°C pendant 24 à 48 h. les diamètres des zones d'inhibition sont mesurés au millimètre près (Prescott *et al.*, 2007).

3.8.2-Méthode de diffusion sur agar

Après l'étalement de 0.1ml de la suspension bactérienne standardisée sur la surface du milieu LPGA, un disque est prélevé à partir de la boîte contenant la souche pure du mycète à tester, et est déposé soigneusement au centre de la boîte d'une manière de mettre le mycète au contact avec le pathogène. Les résultats sont observés après incubation des boîtes à 27°C pendant 24h.

3.9- Identification de la souche antagoniste

L'identification de la souche bactérienne isolée à partir du sol de la rhizosphère des plantes de tomate de la serre prospectée ou bien fournis préalablement par le laboratoire (LaMyBAM) est effectuée par l'observation macroscopique et microscopique avec l'étude des caractères biochimiques, ainsi que l'observation du mycélium et fructification quand il s'agit d'un mycète. L'identification se fait nécessairement sur des cultures pures.

3.9.1- Observation macroscopique et microscopique

L'observation macroscopique sert à déterminer les caractères culturels des souches bactériennes tandis que l'observation microscopique aboutit à la détermination de leur morphologie, de leur mode de regroupement, et surtout, de leur mobilité éventuelle (Guiraud, 1998 ; Singleton, 2005). Par ailleurs, l'observation microscopique des mycètes permet de révéler la présence du thalle, s'il est septé ou non, la nature de la reproduction, et les caractéristiques des fructifications, des conidiophores, et des spores (Cahagnier et Richard-Molard, 1998). Ces constatations sont mises en évidence grâce à la technique de coloration avec le lactophénol.

3.9.2- Caractères biochimiques

Les tests biochimiques tels que le test de catalase, oxydase, nitrate réductase, détermination de la voie d'attaque des glucides et la production d'indole ont été effectués selon les méthodes décrites dans la partie: caractères biochimiques de l'agent pathogène (p.)

3.9.2.1-Etude des rapports avec l'oxygène

Ce test permet de mettre en évidence le type respiratoire du germe à étudier. La recherche classique s'effectue en tube étroit et profond, rempli aux 2/3 d'une gélose viande foie (VF). La méthode consiste à ensemencer le milieu préalablement fondu et maintenu à 45°C par une goutte de suspension du germe le tube est ensuite fermé et maintenu en position verticale, puis imprimé à bout de bras, dans un plant horizontal, un mouvement vigoureux dont le trajet dessine un 8 de chiffre. Le tube est placé dans de l'eau froide jusqu'à solidification, après incubation et selon le niveau où se manifeste la culture, quatre types respiratoires sont distingués (Carbonnelle *et al.*, 1987).

3.8.2.2- le test de citrate

Il a pour but de déterminer si un organisme peut utiliser le citrate comme seule source de carbone. L'inoculation du milieu se fait à partir d'une culture sur milieu gélosé un ou deux jours. L'apparition d'une culture avec virage de l'indicateur coloré qui passe du vert au bleu indique que le test est positif (Carbonnelle *et al.*, 1987).

3.9- Test in vivo

Après la sélection de la souche antagoniste et la mise en évidence de son effet inhibiteur sur le développement de l'agent pathogène (test *in vitro*). La détermination de l'efficacité de l'antagoniste, pouvant présenter un effet protecteur pour les plantes de tomates, contre la bactérie pathogène du genre *Pseudomonas* a été étudiée.

Le traitement a été appliqué sur des plantules de tomate âgées de trois semaines. A partir d'une culture bactérienne de 24 heures des deux souches pathogènes et antagonistes, une suspension bactérienne est préparée avec de l'eau désionisée et ajustée à 1×10^8 CFU/ml. Des plantules de tomates sont pulvérisées dans un premier temps par l'agent antagoniste, 24 heures plus tard, l'agent pathogène a été inoculé aussi par pulvérisation. D'autres plantules sont inoculées uniquement avec l'agent pathogène. Enfin, une autre partie de plantules inoculées avec de l'eau distillée stérile a servi d'un contrôle négatif. Les pots sont placés

dans la chambre de culture et le développement de la maladie a été noté après 7 à 14 jours du traitement (El Hindawy *et al.*, 1998).

4-Résultats

Le présent travail est une contribution à l'identification des maladies bactériennes de la tomate (*Lycopersicon esculentum* Mill) cultivée en serre dans l'Est Algérien et à la recherche d'agents antagonistes et la réalisation des tests *in vivo* en vue d'une lutte biologique. Ce travail est réalisé au laboratoire de Mycologie, de Biotechnologie et de l'Activité Microbienne (LaMyBAM), Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie, Université Constantine1.

4.1- Prospections

Les prospections réalisées au niveau des serres, ont permis de déceler la présence des bactérioses provoquées par des bactéries phytopathogènes sur les plantes de tomate. L'examen visuel qui se repose sur l'observation des symptômes caractéristiques des bactérioses est complété par des recherches plus approfondies pour confirmer la présence de la maladie en question, et ce ci par une série d'examens au laboratoire.

Au cours de nos prospections, Les symptômes caractéristiques de la moucheture bactérienne ont été observés. En effet, les plantes infectées étaient à l'âge adulte en période de floraison et de fructification. L'infection touchait les feuilles, en particulier, celles de la base en début de sénescence, ce qui rend la plante plus vulnérable à la maladie. Les symptômes typiques de la moucheture bactérienne sont manifestés au niveau des feuilles sous forme de petites taches brunes de forme irrégulières entourées d'un halo jaune d'un diamètre variable atteignant 3mm (figure 4). Ces taches sont moins fréquentes sur les tiges, les sépales de fleurs et les fruits verts.

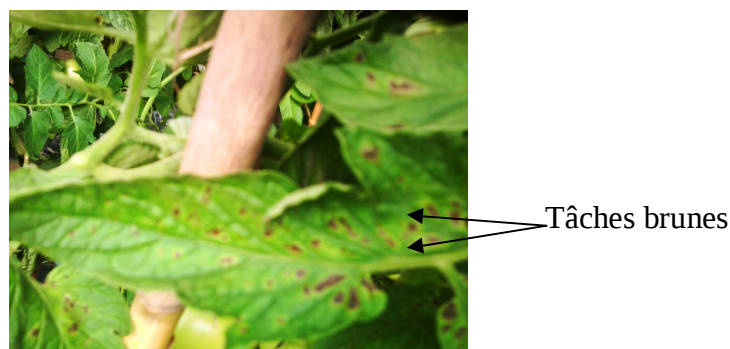


Figure 4 Symptômes foliaires de la moucheture bactérienne sur les plantes de tomate

4.2- Evaluation de l'incidence de la maladie sur serre

Au niveau des serres prospectées, nous avons procédé a des examens de plantes infectées par rapport au totale des plantes et ce, à des fins statistiques.

La méthode retenue pour l'estimation de l'incidence de la maladie se repose sur l'examen de 3 rangés situées dans trois endroits différents (coté droit, le milieu et coté gauche). Les résultats de cette estimation sont consignés dans le tableau suivant:

Tableau 5 Estimation de l'incidence (de la maladie) de la moucheture bactérienne (IC %) au stade de floraison et de fructification sur serre prospectées

Serres	Nombre total des plantes	Nombre de plantes infectées	IC%
1	540	292	54.07
2	540	310	57.40
3	540	327	60.55
4	540	314	58.14
5	540	299	55.37
6	540	307	56.85
7	540	267	49.44
8	540	316	58.51
9	540	275	50.92
10	540	261	48.33

4.3- Isolement et identification de l'agent pathogène

4.3.1- Aspect macroscopique

Un seul type de colonies bactériennes a été obtenu sur milieu LPGA et présente les mêmes caractères cultureux de l'agent pathogène recherché (colonies de consistance crémeuse, de couleur crème, à bord entier et profil légèrement relevé et ridé à la périphérie) (figure 5).

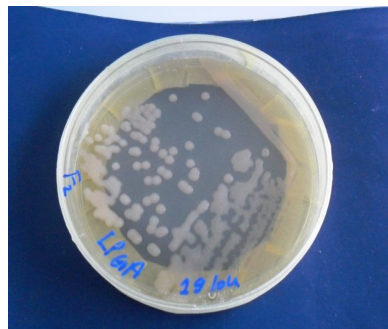


Figure 5 Aspect macroscopique de l'isolat F2 sur milieu LPGA

4.3.2- Aspect microscopique

4.3.2.1- Observation à l'état frais

L'observation de l'état frais de l'isolat montre que la bactérie F2 est un bacille mobile.

4.3.2.2- Coloration de Gram

Le test de coloration de Gram a montré que l'isolat F2 est de coloration rose, il s'agit, de ce fait, d'un bacille Gram négatif (figure 6).

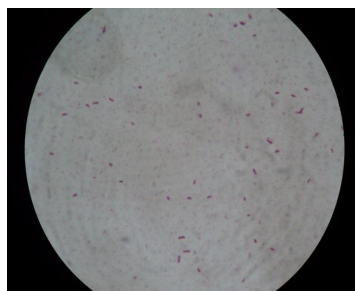


Figure 6 Coloration de Gram de l'isolat F2 (X 100)

4.3.3- Etude des caractères biochimiques

4.3.3.1-Croissance et production de pigment fluorescent sur milieu King B

La culture de l'isolat F2 sur milieu King B a montré un pigment jaune verdâtre (pyoverdines) diffusible dans l'agar et fluorescent sous les rayons ultra violet (UV). Apriori, la bactérie appartient au genre *Pseudomonas* du groupe fluorescent (figure7).

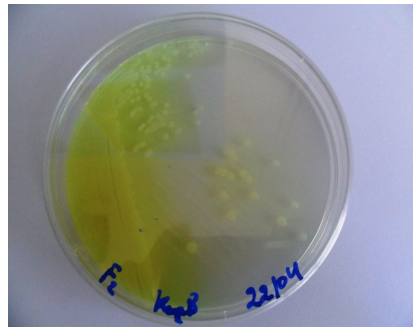


Figure 7 Mise en évidence de la production de pyoverdines par l'isolat F2 sur milieu King B

4.3.3.2- Test de catalase

Le test de la catalase a montré que l'isolat F2 est catalase positive, car elle a dégagé des bulles après le dépôt du peroxyde d'hydrogène (H_2O_2) sur la colonie de l'isolat (figure 8).



Figure 8 Test de la catalase de l'isolat F2

4.3.3.3-Test de l'oxydase

L'étalement de l'isolat F2 sur le disque pré-imprégné par le réactif Oxalate de diméthyl-paraphénylène-diamine est resté incolore, ce qui signifie que le test oxydase est négatif (figure 9).



Figure 9 Test oxydase de l'isolat F2

4.3.3.4- Recherche de nitrate réductase

Le test de nitrate réductase révèle que l'isolat F2 ne possède pas une nitrate réductase car après le dépôt des réactifs 1 et 2 de Griess, la bactérie n'a pas donné de couleur rouge ce qui signifie l'absence d'ion nitrite combinés au réactif. Après avoir ajouté la poudre de Zinc au tube, la bactérie a développé une couleur rouge (figure 10).

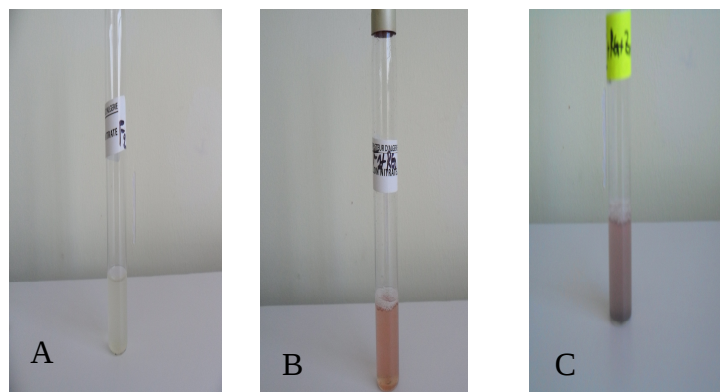


Figure 10 Recherche de la nitrate réductase : **A** la bactérie F2 cultivée en bouillon nitraté ; **B** ajout du réactif de Griess ; **C** ajout du Zinc

4.3.3.5- Recherche de décarboxylase

L'absence de l'arginine déshydrolyase (ADH) est constatée chez la bactérie F2, ce qui est justifié par le virage de la couleur au jaune (figure 11).



Figure 11 Test de l'arginine déshydrolase : **A** milieu möller (couleur jaune) ; **B** milieu möller avec l'arginine

4.3.3.6- Détermination du métabolisme des glucides

Le test du métabolisme des glucides a révélé que l'isolat F2 possède un métabolisme oxydatif (acidification à la surface du milieu ouvert provoquant son jaunissement) (figure 12).



Figure 12 Détermination de la voie métabolique des glucides : **A** tube fermé; **B** tube ouvert

4.3.3.7- Production d'indole

Le test de production de l'indole a révélé un résultat négatif après l'ajout du réactif de Kovac, montrant que l'isolat F2 ne produit pas de l'indole à partir du tryptophane (figure 13).



Figure 13 Test de production de l'indole

4.3.3.8-Température de croissance

La culture de la bactérie F2 à différentes températures a montré que l'optimum de sa croissance se situe à 27°C, en outre, elle n'a manifesté aucun développement à 37°C et par conséquent, à 45°C (figure 14).

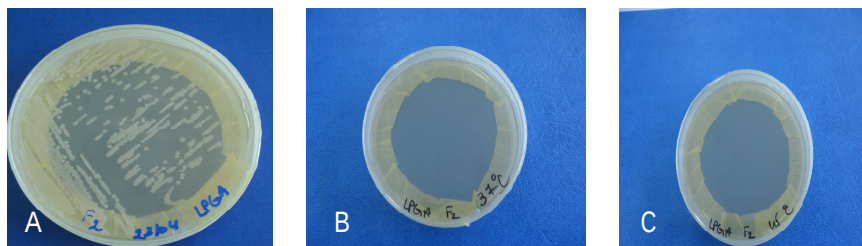


Figure 14 Mise en culture de l'isolat F2 à différentes températures: **A** culture à 27 °C ; **B** culture à 37 °C ; **C** culture à 45 °C

4.3.3.9-Test de l'activité Tween-estérase

Le test de l'activité Tween-estérase révèle la présence d'un halo clair autour des colonies (figure 15), révélant que l'isolat F2 possède une activité lipasique.

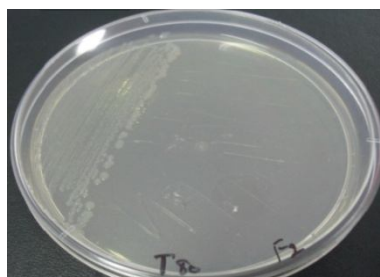


Figure 15 Activité lipasique de l'isolat F2

4.3.3.10-Test de production de l'amylase

Le test de mise en évidence de l'hydrolyse de l'amidon a révélé l'absence de l'amylase qui hydrolyse l'amidon en glucose, car après l'ajout de la solution de lugol, le milieu est resté inchangeable (figure16).

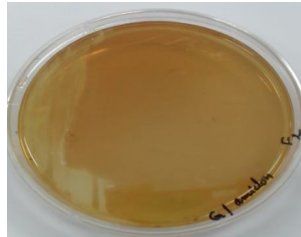


Figure 16 Test de mise en évidence de l'hydrolyse de l'amidon

4.3.3.11- Test de mise en évidence de la digestion de la caséine

Les résultats obtenus après incubation des boîtes à 27°C n'ont pas montré une formation de zone de lyse sur le milieu lacté, inoculé par l'isolat F2, ce qui signifie que cette bactérie n'est pas capable d'hydrolyser la caséine.

4.3.3.12- Test de consommation du saccharose

Le test d'utilisation du saccharose a montré que la bactérie F2 transforme le saccharose en substances réduites. Cela est justifié par l'apparition d'un précipité brun au fond du tube (figure 17).



4.3.3.13- Hydrolyse de la gélatine

Le test d'hydrolyse de la gélatine a révélé la présence d'une gélatinase car après la mise des tubes dans le réfrigérateur à 4°C, pour favoriser la prise en gel, la liquéfaction du milieu a lieu dans le tube où il y a la bactérie (figure18).



Figure 18 Test d'hydrolyse de la gélatine: **A** milieu liquéfié par la bactérie; **B** milieu reste solidifier

4.3.3.14-Activité levane sucrase

Le test d'activité de la levane sucrase a montré que l'isolat F2 polymérise le fructose en polyfructose, car, il y a apparition d'une culture abondante, bombée, muqueuse et brillante (figure 19).



Figure 19 Activité levane sucrase

Au terme de ces tests, l'identification de l'isolat penche, avec une probabilité importante, vers le genre *Pseudomonas* (tableau 6). En revanche, plusieurs espèces peuvent partager les mêmes résultats, ce qui rend la prononciation en faveur d'une espèce donnée est loin d'être atteinte, d'où la nécessité de recourir à la technique moléculaire est indispensable.

Tableau 6 Récapitulatif des résultats obtenus de la souche pathogène

Caractères	Résultat de la souche isolée
Forme de la cellule	Bacille moyen
Gram	-
Mobilité	Mobile
Fluorescence sur milieu King B	+
Catalase	+
Oxydase	-
Nitrate réductase	-
Décarboxylase (ADH)	-
Métabolisme des glucides	oxydatif
Indole	-
Croissance à 27, 37 et 45 °C	+ - -
Activité Tween-estérase	+
Hydrolyse de l'amidon	-
Digestion de la caséine	-
Utilisation du saccharose	+
Hydrolyse de la gélatine	+
Activité levane sucrase	+

+ : test positif, - : test négatif

4.3.4- Identification moléculaire de la souche F2

Le bon déroulement de l'extraction d'ADN et de l'amplification de l'ARN-r 16S par PCR, a été vérifié par migration des échantillons sur gel d'agarose d'électrophorèse. Le profil d'ADN extrait et celui de l'ARN-r 16S amplifié sont illustrés dans la figure 20. Ainsi, la bande

d'ADN extrait qui correspond à tous l'ADN génomique migre à une courte distance (figure 20-a). Alors que la séquence d'ADN amplifiée de l'ARN-r 16S migre plus loin pour atteindre une distance équivalente à celle d'une séquence de 1500 pb de longueur (figure 20-b).

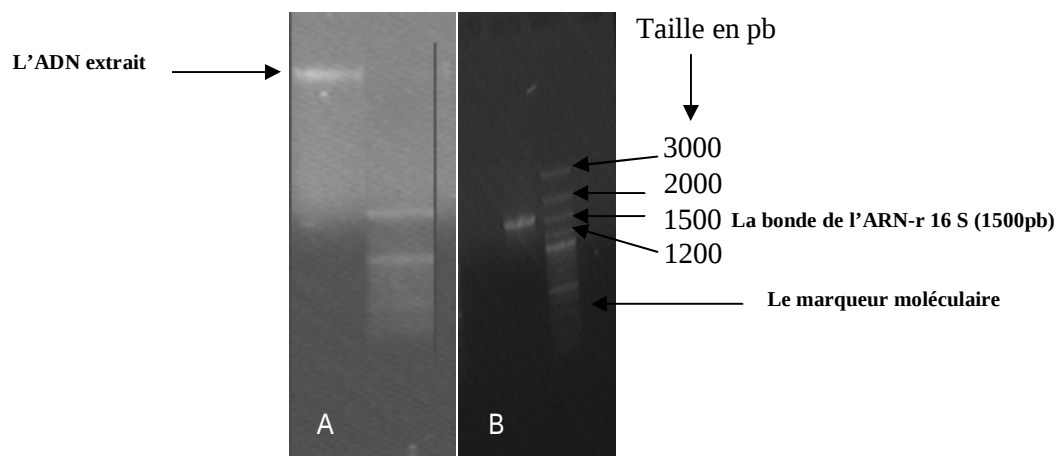


Figure 20 Identification moléculaire de l'isolat F2 : A ; l'ADN extrait. B ; l'ARN-r 16S amplifié

Le séquençage du ARN-r 16S a donné la séquence suivante :

« GTAGCACGTGTGTAGCCCAGGCCGTAAGGGCCATGATGACTTTGACGTCATCCC
CACCTTTCCTCCCGGTTTTGTCACCGGCAGTCTCCCTTAGAGTGCCCACCATAATG
TGCTGGTAACTAAGGACAAGGGTTTGCGCTCGTTACGGGACTTAACCCAACATCT
CACGACACGAGCTGACGACAGCCATGCAGCACCTGTCTCAATGTTCCCGAAGGCA
CCCATCCATCTCTGGAAAGTTCATTTGGATGTCAAGGCCTGGTAAGGTTCTTCGCG
TTGCTTCGAATTAAACCACATGCTCCACCGCTTGT ».

La comparaison de cette séquence avec les séquences publiées dans Genbank, en utilisant le programme N-Blast, a montré que le *Pseudomonas sp.* est étroitement lié à trois espèces à savoir : *P. syringae*, *P. lutea* et *P. tremae* (tableau 7).

Tableau 7 Résultat de l'identification de la souche bactérienne F2 fourni par Genbank suite à la demande de comparaison de la séquence de l'isolat F2

	Description	Max score	Total score	Query cover	E value	Max ident	Accession
☐	Pseudomonas syringae 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	529	529	100%	6e-147	98%	KC311253.1
☐	Pseudomonas sp. Tigray 2 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	529	529	100%	6e-147	98%	KC150861.1
☐	Pseudomonas syringae strain SQYB-1 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	529	529	100%	6e-147	98%	JX876901.1
☐	Pseudomonas lutea strain B-1 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	529	529	100%	6e-147	98%	JQ890536.1
☐	Pseudomonas tremae strain Ht3-25 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	529	529	100%	6e-147	98%	JF899280.1

Suite aux résultats globaux de l'identification de l'isolat F2 en l'occurrence ; tests microbiologiques, biochimiques et moléculaires, l'agent responsable de la moucheture de la tomate isolé dans ce travail est *Pseudomonas syringae*.

4.4-Test de pathogénicité sur tomate

Après 7 jours d'inoculation, l'isolat a produit les symptômes typiques de la maladie sur les feuilles inoculées artificiellement. La plante témoin maintenue dans les mêmes conditions n'a manifesté aucun indice de la maladie (figure 21).

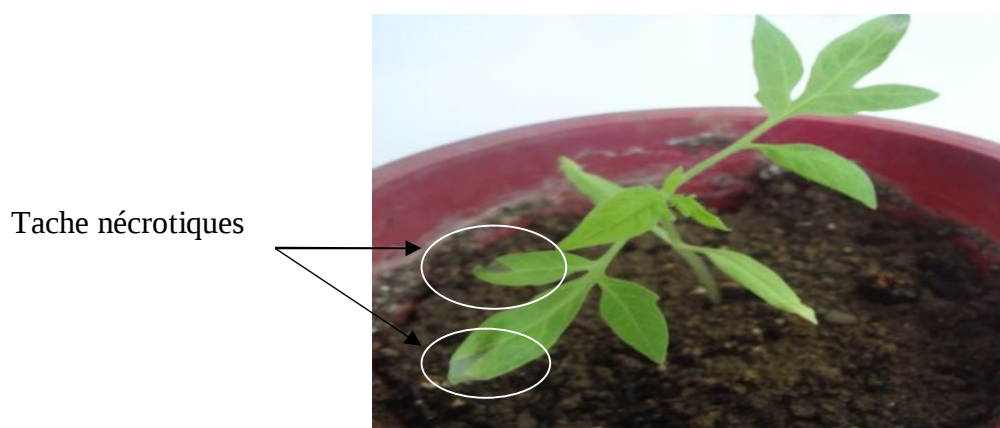


Figure 21 Test de pathogénicité sur la plante de tomate après inoculation

4.5- Sélection de souches antagonistes

Parmi les isolats testés sur l'agent pathogène, seulement 2 souches (une bactérie et un champignon) ont présenté un effet positif sur *P. syringae*. La zone d'inhibition développée est de l'ordre de 5mm pour l'isolat fongique et 14 mm pour l'isolat bactérien (figure 22).

La bactérie utilisée dans le présent travail a été isolée à partir du sol de la rhizosphère d'une palmeraie, tandis que la moisissure a été fournie par le Laboratoire de Mycologie de Biotechnologie et de l'Activité Microbienne (LaMyBAM).

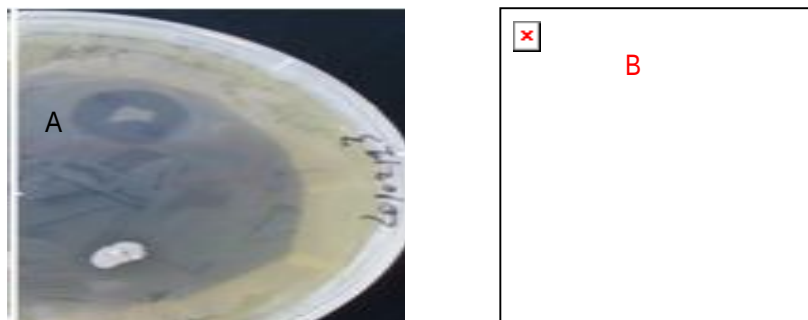


Figure 22 Activité antagoniste des souches vis-à-vis de l'agent pathogène *P. syringae* : **A** Bactérie; **B** moisissure

4.5.1-Identification de la bactérie antagoniste

La souche bactérienne (E 1) qui a révélée un pouvoir inhibiteur significativement élevé a fait l'objet d'une identification préliminaire par des tests morphologiques et biochimiques.

4.5.1.1- Etude macroscopique

La culture de la souche E1 sur milieu GN a révélé un bon développement après 48 heures d'incubation, les colonies sont petites, d'une couleur crème, planes, de forme ovale irrégulière (figure 23).

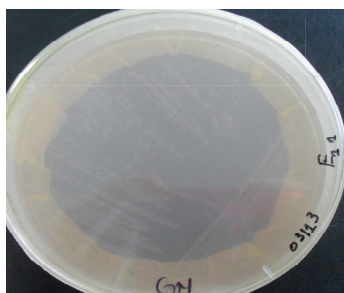


Figure 23 Aspect des colonies bactériennes sur gélose nutritive

4.5.2.2- Etude microscopique

- **Observation à l'état frais**

L'observation à l'état frais a montré que l'isolat E1 est un cocci immobile.

- **Coloration de Gram**

Après avoir effectuer une coloration de Gram, la bactérie E1 a révélé une coloration rose, signifiant qu'elle est **Gram -** (figure 24).

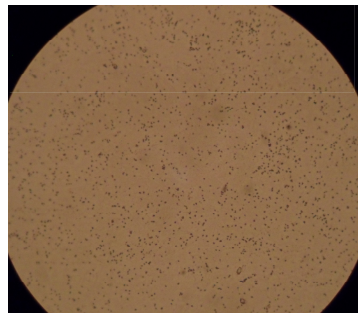


Figure 24 Coloration de Gram de l'isolat E1 (X 100)

4.5.2.3- Test de catalase

Le test de catalase a montré que la bactérie E1 est catalase positive, car elle a dégagé des bulles après le dépôt du peroxyde d'hydrogène H_2O_2 sur la colonie (figure 25).

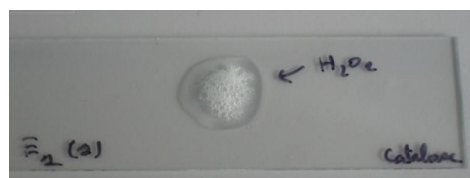


Figure 25 Test catalase montrant que la bactérie E1 est catalase positive

4.5.2.4- Test d'oxydase

L'étalement de la souche sur le disque pré-Imprégné par l'oxalate de diméthyl-paraphénylène-diamine a présenté une coloration violette ce qui signifie que l'isolat E1 est oxydase négative (figure 26).

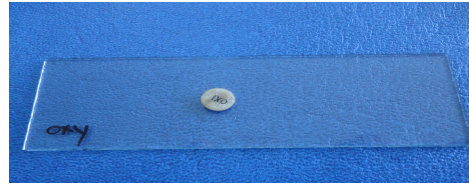


Figure 26 Test oxydase montrant que la bactérie E1 est oxydase négative

4.5.2.5- Détermination de la voie métabolique des glucides

Le test métabolique des glucides révèle que l'antagoniste E1 possède un métabolisme oxydatif (acidification à la surface du milieu ouvert provoquant son jaunissement) (figure 27).

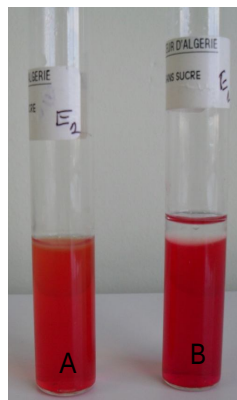


Figure 27 Détermination de la voie métabolique des glucides: **A** tube ouvert; **B** tube fermé

4.5.2.6- Production d'indole

Le test de production d'indole a révélé un résultat négatif après l'ajout du réactif de Kovac, montrant que la bactérie ne produit pas de l'indole à partir de tryptophane (figure 28).



Figure 28 Test de l'indole

4.5.2.7- Test du Type respiratoire

Ce test a révélé que le type respiratoire de l'isolat E1 est aérobic strict, car la culture s'est manifestée juste à la surface du milieu de culture (figure 29).



Figure 29 Test du type respiratoire

4.5.2.8- Test de citrate

Ce test a montré que la bactérie E1 n'utilise pas le citrate comme source de carbone, car il n'y a aucun développement ni changement d'indicateur de couleur vers le bleu (test négatif) (figure 30).



Figure 30 Test de citrate

L'analyse des résultats morphologiques et biochimiques (tableau 6) montre que l'antagoniste bactérien E1 est une espèce appartenant au Genre: *Acinetobacter*.

Tableau 8 Récapitulatif des résultats obtenus correspondants à l'antagoniste bactérien

Caractères	Résultat de la souche E1
Forme de la cellule	Coccoïde
Gram	-
Mobilité	Immobile
Catalase	+
Oxydase	-
Métabolisme des glucides	Oxydatif
Indole	-
Utilisation du Citrate	-
Type respiratoire	Aérobie strict

+ : test positif, - : test négatif

4.6- Test *in vivo*

L'application foliaire de la souche antagoniste E1 sur les plantules de tomates a montré l'absence des symptômes de la maladie (figure 31).



Figure 31 Plantules de tomates traitées avec l'antagoniste et le pathogène

La même observation a été notée chez les plantules inoculées par l'eau distillée (figure 32).



Figure 32 Plantules de tomates traitées avec de l'eau distillée

Par contre, le résultat d'inoculation de *Pseudomonas syringae* a révélé l'apparition des symptômes sur les feuilles de la plante (figure 33).



Figure 33 Plantes de tomate traitée avec le pathogène *Pseudomonas syringae*

5-Discussion

En Algérie, les bactérioses des Solanacées maraichères, en particulier, la tomate (*Lycopersicon esculentum* Mill), connaissent depuis quelques années, une importance grandissante sans cesse. Cette situation résulte vraisemblablement de l'intervention de plusieurs facteurs : intensification de la culture de la tomate, importation de la semence, absence de variétés commerciales résistantes, mauvaises pratiques agricoles et moyens de lutte inadéquats.

Lors de nos prospections effectuées dans des serres de tomate (*Lycopersicon esculentum* Mill) et en se basant sur l'étude symptomatologique (Blancard, 2009), la moucheture bactérienne communément appelée « bacterial Speck », a été observée dans la plupart des plantes de tomates. Cette moucheture est selon Yuong *et al.*, (1978), causée par *Pseudomonas syringae* pv. *tomato*. Cette bactérie affecte différents organes aériens de la plante. En effet, dans ce travail, la moucheture bactérienne s'est manifestée sur les feuilles de l'hôte par des taches brunes-noirâtres, bordées par une auréole jaune de forme polygonale et d'un diamètre de 0.2 à 4.0 mm. Ces observations corroborent celles décrites par Okon *et al.*, (1978); Tamietti et Cugudda, (1987).

Les symptômes rencontrés sur les plantes de tomate ne permettent pas d'identifier définitivement la cause de la maladie car plusieurs bactérioses produisent des lésions nécrotiques lorsqu'elles attaquent la plante de tomate. Ainsi, une confusion peut être faite entre *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria*, *Pseudomonas viridiflava*, *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* et *Pseudomonas syringae* pv. *tomato*. Du point de vue physiologique le *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* est, aussi, difficilement distinguable des autres pathovars de l'espèce *Pseudomonas syringae*, particulièrement, *Pseudomonas syringae* pv. *syringae*. Selon Wilkie et Dye, (1974); Jones *et al.*, (1984), les taches nécrotiques qui lui sont attribuées peuvent être séparées de celles des autres pathogènes du groupe *Pseudomonas* par la présence du halo jaune. Pour ce faire, une analyse plus profonde est donc, indispensable à la détermination de l'agent causal de la maladie observée.

Cette analyse débute par l'observation de l'agent pathogène lui-même. L'isolement de l'agent pathogène associé aux taches brunes de la tomate à partir des tissus infectées a abouti à l'apparition d'un seul type de colonies bactériennes. Ces dernières, se sont développées après

72 heures d'incubation sur milieu LPGA. Le même résultat a été obtenu par Goszczynska *et al.*, (2000) qui ont indiqué que les colonies des bactéries phytopathogènes apparaissent plus lentement que les colonies des bactéries saprophytes.

Par ailleurs, l'aspect des colonies obtenues était semblable à celui obtenu par Tamietti et Cugudda (1987), qui ont suggéré que la bactérie *Pseudomonas syringae*, agent causale de la moucheture bactérienne se développe lentement sur milieu nutritif, lors de son isolement, pour donner des colonies de consistance crémeuse, de couleur crème, à bord entier et profil légèrement relevé et ridé à la périphérie.

La souche isolée a produit, sur le milieu King B, un pigment coloré diffusible dans l'agar et fluorescent sous UV (pyoverdine). Ce résultat est conforme à ceux obtenus par Lelliott *et al.*, (1966) ; Palleroni, (1984) ; bultreys *et al.*, (2003).

L'observation microscopique et la coloration de Gram confirme que l'isolat est un bacille Gram négatif mobile. Plusieurs auteurs, dans la littérature, ont montré que les cellules de *Pseudomonas syringae* se présentent sous forme de bâtonnets, Gram négatifs et mobiles (Prévot, 1961 ; Murillo et Sesma, 1998; Joffin et Leyral, 1998 ; Murillo et Sesma, 1998 ; Kvitko *et al.*, 2009).

Les tests biochimiques réalisés ont montré que l'isolat est catalase positive, oxydase négative, ne possède ni de nitrate réductase ni de l'arginine déshydrolase, a un métabolisme oxydatif et assimile le glucose et le saccharose. La bactérie est aussi levane positive, indole négatif, douée d'activité lipasique et hydrolyse la gélatine, cependant, elle n'hydrolyse pas l'amidon et la caséine. Ces résultats sont conformes au profil physiologique de *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* décrit par plusieurs études (Samson et Saunier, 1958 ; Hildebrand *et al.*, 1972 ; Bashan et Okon, 1982; Murillo et Sesma, 2001). La bactérie s'est bien développée à 27°C, ce résultat a été, déjà, indiqué par (Okon *et al.*, 1978 ; Blancard, 2009) qui ont démontré que la température optimale de croissance de cette bactérie est entre 25 et 30°C.

Le test de pathogénéité effectué avec l'isolat sur des plantules saines de la tomate a révélé que, son développement, produit des taches nécrotiques sur les feuilles semblables à celles causées, habituellement, par *Pseudomonas syringae* (lelliott *et al.*, 1966 ; Okon *et al.*, 1978 ; Phoronezney *et al.*, 1979 ; Hildebrand *et al.*, 1988).

L'identification moléculaire de l'agent pathogène par des analyses d'ARN-r 16S s'avérait insuffisante car, elle montrait que la souche est à 98% similaire avec plusieurs souches du

genre de *Pseudomonas* ; *Pseudomonas syringae*, *P. lutea* et *P. tremae*. La confirmation de l'identification est tranchée en faveur de *Pseudomonas syringae* grâce à l'analyse ultérieure du gène de la topoisomérase *gyrase B*.

Plusieurs souches microbiennes (fongiques et bactériennes) fournies par le laboratoire LaMyBAM (U. Constantine 1) ont été testées pour leur pouvoir d'inhiber *P. syringae in vitro*. Une seule bactérie inhibait le développement du phytopathogène. Les résultats des tests microbiologiques et biochimiques réalisés sur cette bactérie étaient cohérents avec ceux obtenus par (Joffin et leyrat, 1998 ; Singleton, 2005) et qui ont montré que cette bactérie appartient au genre *Acinetobacter*. Cette bactérie pourrait faire l'objet d'une utilisation ultérieurement comme agent de lutte biologique pour protéger les plantes de tomate contre *P. syringae*. En effet, Plusieurs espèces microbiennes ont montré leur efficacité dans la promotion de la croissance et la protection des plantes de tomates contre les différents ennemis de cultures. A titre d'exemple, le traitement préalable des plantes de tomates avec le *Bacillus subtilis* a, significativement, réduit leur flétrissement (Phea *et al.*, 1992).

L'effet *in vitro* été confirmé par le test *in vivo*. En effet, l'application foliaire de la souche antagoniste sur les plantules de tomates en présence de l'agent pathogène a abouti à l'absence des symptômes de la maladie. La plupart des stratégies de lutte biologique utilise des agents de lutte biologique qui suppriment les pathogènes des plantes, soit par la production de substances inhibitrices (Glick et Bashan, 1997 ; El Hendawy *et al.*, (2005) ; Prescott *et al.*, 2007), ou, par compétition (Janisiewicz, et Marchi, 1992 ; Wilson et Lindow, 1994; Völksch et May, 2001). Récemment, le mécanisme l'ISR (Induced systemic resistance) est mis en évidence, en rapport avec la lutte biologique, Il s'agit de la stimulation des mécanismes de défense chez la plante contre les agents pathogènes (Ryu *et al.*, 2004).

6-Conclusion et perspectives

La tomate (*Lycopersicon esculentum* Mill) de la famille des Solanacées, est l'un des légumes les plus populaires dans le monde entier. En revanche, sa culture a été limitée et affaiblie par une panoplie de maladies microbiennes d'origines variables. La moucheture bactérienne dont l'agent pathogène est *Pseudomonas syringae* pv. *Tomato* est parmi les bactérioses aériennes les plus courantes, qui menacent les plantes de tomate en stade de floraison et de fructification. L'isolement réalisé à partir des plantes de tomates infectées a permis d'obtenir un seul type de colonies bactériennes. Les différents tests morphologique, biochimique, microbiologique et moléculaire ont montré que la souche isolée appartient à l'espèce *Pseudomonas syringae*.

Le test de pathogénicité effectué sur des feuilles saines de tomate a produit des taches brunes correspondant aux symptômes provoqués par la maladie de la moucheture bactérienne.

L'approche de la lutte biologique reposait sur le test, *in vitro*, de certains microorganismes (bactéries et moisissures) puisés de la collection du laboratoire (LaMyBAM) par rapport à leur effet vis-à-vis de l'agent pathogène. Ce test a permis de sélectionner une seule possédant un effet inhibiteur important. L'identification de la souche antagoniste basée sur l'étude morphologique et biochimique a montré qu'il s'agit d'une bactérie appartenant au genre *Acinetobacter*. Le test, *in vivo*, réalisé par pulvérisation d'une suspension de cette bactérie a sur les plantules de tomates a montré qu'elle réduit l'effet du *Pseudomonas syringae*.

Au terme de cette ébauche, nous avons jugé utile de se fixer certains points comme objectifs à développer:

- Approfondir l'étude de la Bactérie antagoniste par :
 - La Confirmation de l'effet de l'antagoniste dans différentes conditions ;
 - L'identification moléculaire complète ;
 - La Compréhension des mécanismes d'effet ;
 - La préparation de biofertilisant et biocontrôle par la production de la biomasse de l'antagoniste.
- Mise en évidence des mécanismes moléculaires d'interactions: plantes de tomates-*P.syringae* et tomate-bactérie antagoniste.

7- Résumé

La moucheture bactérienne (Bacterial speck), causée par *Pseudomonas syringae* pv. *tomato*, continue d'être une maladie économiquement importante de la tomate (*Lycopersicon esculentum* Mill) à travers le monde. Elle est favorisée par des températures basses et une humidité relativement élevée.

Les prospections des cultures de tomates en serres dans la région de l'Est algérien ont permis de constater la présence de la maladie, identifiée par des symptômes typiques de la moucheture bactérienne, qui se manifeste sur les feuilles par des taches brunes de 0.2 à 4 mm entourées d'une auréole jaune.

L'étude subséquente au laboratoire a permis, quant à elle, l'isolement de l'agent pathogène à partir des fragments de feuilles atteintes par la maladie. Son identification par des tests biochimiques préliminaires a révélé qu'il appartient au genre *Pseudomonas* et l'étude moléculaire a montré qu'il s'agit de *Pseudomonas syringae*.

Le test de pathogénicité effectué par inoculation artificielle sur la partie aérienne des plantules de tomate saines est traduit par l'apparition des symptômes typiques de la maladie, similaires à ceux, observés au niveau des serres prospectées.

Le test d'activité antagoniste vis-à-vis de *Pseudomonas syringae* réalisé d'abord, *in vitro*, a abouti à la sélection d'une souche bactérienne développant une zone de lyse importante qui se traduit par l'inhibition de la croissance de la bactérie pathogène.

Les tests *in vivo*, qui visaient à inhiber le développement de la maladie au moyen de microorganisme sélectionné ont donné des résultats intéressants néanmoins, ils nécessitent un approfondissement pour se prononcer sur l'approche de la lutte biologique.

Mots clés : *Pseudomonas syringae*, Tomate, Moucheture bactérienne, Antagonisme, Lutte biologique.

8 - Abstract

Bacterial speck, caused by *Pseudomonas syringae* pv. *tomato*, continues to be an important economic worldwide disease of tomato (*Lycopersicon esculentum* Mill). It is favored by low temperatures and relative high humidity.

The surveys of tomato crops in greenhouses of eastern region of Algeria revealed the presence of the disease, identified by the typical symptoms of bacterial speck, which occurs on the leaves with brown spots from 0.2 to 4 mm surrounded by a yellow halo.

Subsequent laboratory study had permitted the isolation of the pathogen from fragments of leaves affected by the disease agent. Preliminary identification by biochemical tests revealed that it belongs to the genus *Pseudomonas* and molecular study showed that it is *Pseudomonas syringae*.

The pathogenicity test performed by artificial inoculation on the aerial part of healthy tomato's seedlings, resulted in the appearance of the typical symptoms of the disease, similar to those, observed in greenhouses surveyed.

The activity of test antagonist towards *Pseudomonas syringae*, performed first *in vitro*, resulted in selection of bacterial strain developing a large lysis area, which, results in the inhibition of growth of pathogenic bacterium.

The *in vivo* tests, which designed to inhibit the development of the disease, by the selected microorganism, yielded interesting results; however, they need further development to decide on the approach of biological control.

Keywords: *Pseudomonas syringae* Tomato, Bacterial Speck, Antagonism, Biological Control.

الملخص

يعد مرض Moucheture Bactérienne للطماطم, و **تتسبب** بوجوده البكتيريا المسماة بـ *Pseudomonas syringae* pv. *tomato*, من بين الأمراض البكتيرية المهمة اقتصاديا حول العالم . حيث تعتبر الحرارة المنخفضة و الرطوبة العالية من بين العوامل المحفزة له.

أظهرت الاستكشافات أن نباتات الطماطم الموجودة في البيوت البلاستيكية في منطقة الشرق الجزائري معرضة للمرض, حيث ظهرت الأعراض المميزة للمرض على سطح الأوراق في شكل بقع بنية اللون تتراوح بين 0.2 الى 4 ملم ,محاطة بهالة صفراء.

وقد أدت الدراسة المخبرية إلى عزل العامل الممرض حيث سمح التشخيص عن طريق اختبارات الكيمياء الحيوية انه ينتمي الى جنس *Pseudomonas* و الدراسة الجزيئية إلى *Pseudomonas syringae*.

بين اختبار الأمراض الذي اجري على أوراق سليمة لشتلات نبات الطماطم أن هذه الأخيرة أبدت حساسية اتجاه العامل الممرض , حيث ترجم بظهور أعراض نموذجية للمرض, مماثلة لتلك التي لوحظت في المواقع التي شملها الاستطلاع.

اظهرت نتائج الاختبار البيولوجي (اختبارات التضاد) في المخبر (in vitro) نتائج مهمة حيث تم اختيار عزلة بيكتيرية لها القدرة على إفراز مواد مثبطة لنمو العامل الممرض في ظروف المختبر. كما اظهر الاختبار (in vivo) تحتم التدقيق حول موضوع المحاربة البيولوجية

الكلمات المفتاحية: *Pseudomonas syringae*, الطماطم, Moucheture Bactérienne , اختبارات التضاد, المحاربة البيولوجية.

1. Alfano J.R. et Collmer A. (1997). The type III (Hrp) secretion pathway of plant pathogenic bacteria: trafficking harpins, Avr proteins, and death. *J. Bacteriol.* **179**: 5655-5662.
2. **Anonyme 1. (2012). La tomate <http://fr.Wikipedia.org/wiki/tomate>.**
3. Anonyme 2. (2009). Ministère de l'Agriculture et du Développement Rural, Direction des statistiques.
4. Anonyme 3. (2010). **Association Méditerranéenne Internationale de la Tomate. La tomate d'industrie en Algérie [archive]. 2P. Site officiel : <http://www.amitom.org>.**
5. Arlat M., Van Gijsegem F., Huet J.C., Pernollet J.C. et Boucher C.A. (1994). PopA1, a protein which induces a hypersensitivity-like response on specific *Petunia* genotypes, is secreted via the Hrp pathway of *Pseudomonas solanacearum*. *Embo J.* **13**: 543-553.
6. Baba Aissa F. (1999). Encyclopédie des plantes utiles, flore d'Algérie et de Maghreb. ed. librairie moderne, Rouiba : 278-279p.
7. Balasundram N., Sundram K. et Samman S. (2006). Phenolic compounds in plants and agri-industrial by-products: Antioxidant activity, occurrence, and potential uses. *Food Chemistry.* **99**:191–203.
8. Bashan Y., Okon Y. et Henis Y. (1986). Log- term survival of *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* and *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* in tomato and pepper seeds. *Phytopathology.* **72**:1143-1144.
9. Bazzi C., Fantini Pucci M. G. et Martini M. (1979). Gravittachi di « macciettatura batteria » del pomodoro in Emilia. *Inf. Tore. Agrario.* **7**: 4657-4658.
10. Bender C.L., Alarcon-Chaidez F. et Gross D.C. (1999). *Pseudomonas syringae* phytotoxins: mode of action, regulation, and biosynthesis by peptide and polyketide synthetases. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **63**: 266-292.
11. Blancard D., Laterrot H., Marchoux G. et Candresse T. (2009). Les maladies de la tomate. ed. INRA.
12. Bonn W. G., Gitaitis R. D., et Niell B. H. Mc. (1985). Epiphytic survival of *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* on tomato transplant shipped from Georgia . *Plant disease.* **69** :58-60.
13. Borguini R. et Torres E. (2009). Tomatoes and tomato products as dietary sources of antioxidants. *Food Rev. Int.* **25**: 313–325.

14. Botton B., Bretton A., Fever M., Gautier S., Guy Ph., Larpen J.P., Sanglier J.J., Vayssier Y. et Veau P. (1990). Moisissures utiles et nuisibles, importance industrielle. ed. Masson, Paris.
15. Boulanger A. (2009). Analyse d'un nouveau système CUT impliqué dans l'acquisition et l'utilisation du *N*-acétylglucosamine par *Xanthomonas campestris* pathovar *campestris*. Thèse Doctorat. Université de toulouse. pp 54.
16. Bovey R. (1972). La défense des plantes cultivées traité pratique de phytopathologie et de zoologie agricole. 6^{ème} ed. Payot Lausanne. pays
17. Bradbury R.F. (1984). Genus II *Xanthomonas* Dowson 1939. In: Krieg, R., Holt, J.G. Eds. Bergey's Manual of Systematic Bacteriology. Vol. 1. Williams & Wilkins Co., Baltimore: 199–210 p.
18. Braun V. et Killmann H. (1999) Bacterial solutions to the iron-supply problem. *Trends Biochem. Sci.* **24**: 104-109.
19. Bultreys A., Ghysen I., Wathélet B., Maraite H. et Hffmann E. (2003). High-performance liquid chromatography analyses of pyoverdine siderophores differentiate among phytopathogenic fluorescent *Pseudomonas* species. *Applied and Environmental microbiology*. **69** (2): 1143-1153.
20. Cahagnier B. et Richard-Molard D. (1998). Analyse mycologique in “ Moisissures des aliments peu hydrates” (edn) , Tec and Doc, p : 140-158.
21. Canene-Adams K., Campbell JK. Zaripheh S., Jeffery EH. et Erdman JW. (2005). The tomato as a functional food. *J. Nutr.* **135**: 1226–1230.
22. Carbonnelle B., Denis F., Marmonier A., Pinon G. et Vargues R. (1987). Bactériologie médicale Technique usuelles. SIMPE SA. Paris, France.
23. Chaux C.L. et Foury C.L. (1994). Culture légumière et maraîchère. Tome 3 : légumineuses potagères, légumes fruit. Tec et Doc. Lavoisier, Paris : 563 p.
24. Chevance, F.F. et Hughes K.T. (2008). Coordinating assembly of a bacterial macromolecular machine. *Nat. Rev. Microbiol.* **6**: 455-465.
25. Cirad (Organisme, France Ministère des affaires étrangères, Cirad, centre de coopération internationale en recherche agronomique pour le développement France, et Gret, groupe de recherche et d'échanges technologique, ministère des affaires étrangères). (2002). Mémento de l'agronomie. (ed). Quae. p.1045-1046.
26. Collmer A., Badel J. L., Charkowski A. O., Deng W.-L., Fouts D. E., Ramos A. R. (2000). Comparative genomic analysis of plant-associated bacteria. *Annual Review of Phytopathology*. **40**:169-189.

27. Costacurta A. et Vanderleyden J. (1995). Synthesis of phytohormones by plant-associated bacteria. *Critical Reviews in Microbiology*. **21**:1-18.
28. Craig L. et Li J. (2008) Type IV pili: paradoxes in form and function. *Curr. Opin. Struct. Biol.* **18**: 267-277.
29. Craig L., Pique M.E. et Tainer J.A. (2004). Type IV pilus structure and bacterial pathogenicity. *Nat Rev Microbiol* **2**: 363-378.
30. Cronquist A., (1981). An integrated system of classification of following plants. Colombia University : 1256p.
31. Da Silva, A. C. R., Ferro, J.A., Reinach, F.C., Farah, C.S., Furlan, L.R., Quaggio, R.B., Monteiro-Vitorello, C.B., Van Sluys, M.A., Almeida, N.F., Alves, L.M., do Amaral, A.M., Bertolini, M.C., Camargo, L.E., Camarotte, G., Cannavan, F., Cardozo, J., Chambergo, F., Ciapina, L.P., Cicarelli, R.M., Coutinho, L.L., Cursino-Santos, J.R., El-Dorry, H., Faria, J.B., Ferreira, A.J., Ferreira, R.C., Ferro, M.I., Formighieri, E.F., Franco, M.C., Greggio, C.C., Gruber, A., Katsuyama, A.M., Kishi, L.T., Leite, R.P., Lemos, E.G., Lemos, M.V., Locali, E.C., Machado, M.A., Madeira, A.M., Martinez- Rossi, N.M., Martins, E.C., Meidanis, J., Menck, C.F., Miyaki, C.Y., Moon, D.H., Moreira, L.M., Novo, M.T., Okura, V.K., Oliveira, M.C., Oliveira, V.R., Pereira, H.A., Rossi, A., Sena, J.A., Silva, C., de Souza, R.F., Spinola, L.A., Takita, M.A., Tamura, R.E., Teixeira, E.C., Tezza, R.I., Trindade dos Santos, M., Truffi, D., Tsai, S.M., White, F.F., Setubal, J.C., and Kitajima, J.P.(2002). Comparison of the genomes of two *Xanthomonas* pathogens with differing host specificities. *Nature*. **417**:459-463.
32. Davis MJ, Gillaspie AG Jr., Vidaver AK. et Harris RW. (1984). *Clavibacter*: A new genus containing some phytopathogenic coryneform bacteria, including *Clavibacter xyli* subsp. *Xyli* sp. nov., subsp. nov. and *Clavibacter xyli* subsp. *Cynodontis* subsp. nov., pathogens that cause ratoon stunting disease of sugarcane and bermudagrass stunting disease. *International Journal of Systematic Bacteriology*. **34**: 107–117.
33. Drancourt M. (1998). Outil Moléculaires d'identification en bactériologie. *Med. Mal. Infect.* **28S** : 380-382p.
34. Dye D.W., Bradbury J.F., Goto M., Hayward A. C., Lelliott R. A. et Schorth M. N. (1980). International standards for naming pathovars of phytopathogenic bacteria and a list of pathovar names and pathotype strains. *Rev. Plant disease*. **66** :993-994.

35. Eichenlaub R., Gartemann K. H. et Burger A. (2006). *Clavibacter michiganensis*, a group of Gram-positive phytopathogenic bacteria. In Gnanamanickam SS, ed. Plant-associated bacteria. Dordrecht, the Netherlands: Springer, 385-421.
36. El-Hendawy H.H., Mohamed E., Osman N. et Sorour M. (2005). Biological control of bacterial spot of tomato caused by *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* by *Rahnella aquatilis*. *Microbiol. Res.* **160**:343–352.
37. El-Hendawy H.H., Zeid I.M. et Mohamed Z.K. (1998). The biological control of soft rot disease in melon caused by *Erwinia carotovora* subsp. *carotovora* using *Pseudomonas fluorescens*. *Microbiol. Res.* **153**:55–60.
38. Expert D. (2005). Genetic regulation of iron in *Erwinia chrysanthemi* as pertains to bacterial virulence. *Barton LL, Abadia J (eds) Iron nutrition in plants and rhizospheric microorganisms.*: 215-227.
39. Favier J., Ireland-Ripert J., Toque C. et Feinberg. (2003). Répertoire générale des aliments. Ed. Ciquel : 40-48p.
40. FAOSTAT (2009). World tomatoes, all production by country, 1990-2005.
41. FAO. (2008). L'actualité agricole en Méditerranée. Ed. Ciheam, 33p.
42. Gagnard J L., Luisetti J. (1993). *Pseudomonas syringae*, bactérie épiphyte, glaçogène et pathogène. *Pathologie végétale.* **13** : 333-370.
43. Gallais A. et Bannerot H. (1992). Amélioration des espèces végétales cultivées. Objectifs et critères de sélection. Ed. INRA. Paris.
44. Gardan L., David C., Morel M., Glickmann E., Abu-Ghorrah M., Petit A. et Dessaux, Y. (1992). Evidence of a correlation between auxin production and host plant species among strains of *Pseudomonas syringae* subsp. *savastanoi*. *Applied and Environmental Microbiology.* **85**:1780-1783.
45. Gartemann K. H., Kirchner O., Engemann J., Grafen I., Eichenlaub R. et Burger A. (2003). *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*: first steps in the understanding of virulence of a Gram-positive phytopathogenic bacterium. *Journal of Biotechnology.* **106**: 179–191.
46. Gaussen H., Lefoy J. et Ozenda P. (1982). Précis de Botanique. 2^{ème} ed. Masson, Paris : 172p.
47. Genin, S. et Boucher C. (2004). Lessons learned from the genome analysis of *Ralstonia solanacearum*. *Annual Review of Phytopathology.* **42**:107-134.
48. Genin S. et Boucher C. 2004. Lessons learned from the genome analysis of *Ralstonia solanacearum*. *Annual Review of Phytopathology.* **42**:107-134.

49. Giove R. et Abis S. (2007). Place de la méditerranée dans la production mondiale de fruits et légumes. Ed. Institut Agronomique Méditerranéen de Bari : 22p.
50. Gleason M.L., Gitaitis R.D. et Rickert, M.D. (1993). Recent progress in understanding and controlling bacterial canker of tomato in Eastern North America. *Plant Dis.* **77**:1069–1076.
51. **Glick B. R. et Bashan Y.** (1997). Genetic manipulation of plant growth-promoting bacteria to enhance biocontrol of phytopathogens. *Biotechnol. Adv.* **15**:353-378.
52. Glickmann E., Gardan L., Jacquet S., Hussain S., Elasri, M. Petit, A. et Dessaux Y. (1998). Auxin production is a common feature of most pathovars of *Pseudomonas syringae*. *Molecular Plant-Microbe Interaction.* **11**:156-162.
53. Goszczynska T., Serfontein J. J., Serfontein S. et Safrinet. (2000). Introduction to practical phytopathology: A manual for phytobacteriology. ISBN: 0-620-25487-4. Ultra litho (Pty) Ltd, Heriotdale. Johannesburg.
54. Grant S.R., Fisher E.J., Chang J.H., Mole, B.M., Dangl J.L. (2006). Subterfuge and manipulation: type III effector proteins of phytopathogenic bacteria. *Annu Rev Microbiol* **60**: 425-449.
55. Guiraud J. P. (1998). Microbiologie alimentaire. Ed. Dunod. Paris.
56. Guttman, D.S., Gropp S.J., Morgan R.L. et Wang, P.W. (2006) Diversifying selection drives the evolution of the type III secretion system pilus of *Pseudomonas syringae*. *Mol. Biol. Evol.* **23**: 2342-2354.
57. Hildbrand D. C. (1972). Identification of the fluorescent *Pseudomonas*. Proc. 3^{er} ed. In Conf. Plant Bact. Wageningen: 281-287p.
58. Jahr H., Dreier J., Meletzus D., Bahro R. et Eichenlaub R. (2000). The endo- β -1,4 glucanase CelA of *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* is a pathogenicity determinant required for induction of bacterial wilt of tomato. *Molecular Plant-Microbe Interactions.* **13**(7): 703–714.
59. Janisiewicz W. J. et Marchi A. (1992). Control of storage rots on various pear cultivars with a saprophytic strain of *Pseudomonas syringae*. *Plant Dis.* **76**:555-560.
60. Jean- Noel J. et Guy L. (2001). Microbiologie technique. Tome 1. Dictionnaire des techniques CNDP. France.
61. Jeannequin B., Dosba F. et Amiot-carlin MJ. (2005). Fruits et légumes caractéristiques et principaux enjeux. Collection « un point sur les filières ».INRA. Paris.
62. Jones J.B., Carter S. M. Mc. et Stal R. E. (1984). *Pseudomonas viridiflava* : causal agent of bacterial leaf blight of tomato. *Plant diseas.* **68**: 341-342.

63. Kaiser D. (2007) Bacterial swarming: a re-examination of cell-movement patterns. *Curr. Biol.* **17**: 561-570.
64. Kang Y., Liu H., Genin S., Schell M.A. et Denny T.P. (2002) *Ralstonia solanacearum* requires type 4 pili to adhere to multiple surfaces and for natural transformation and virulence. *Mol. Microbiol.* **46**: 427-437.
65. Keen N.T. (1990) Gene-for-gene complementarity in plant-pathogen interactions. *Annu. Rev. Genet.* **24**: 447-463.
66. Kolev N. (1976). Les cultures maraichères en Algérie. Tome1. Légumes fruits. Ed. Ministère de l'agriculture et des reformes Agricoles :52p.
67. Kvitko BH., Park DH., Velásquez AC., Wei C-F., Russell AB., Martin G.B., Schneider D. J., Collmer A . (2009). Deletions in the Repertoire of *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* DC3000 Type III Secretion Effector Genes Reveal Functional Overlap among Effectors. *PLoS Pathog* 5(4).
68. Latigui A., (1984). Effects des différents niveaux de fertilisation potassique sur la fructification de la tomate cultivée en hiver sous serre non chauffée. Thèse de magister. INRA El-Harrach, Algérie.
69. Laumonier R. (1979). Culture légumières et maraichère. Tome III. Ed. Baillier, Paris: 279p.
70. Leigh J. A. et Coplin D. L. (1992). Exopolysaccharides in plant-bacterial interactions. *Annual Review of Microbiology.* **46**:307-346.
71. Lelliott R. A., Billing E. et Hayward A. C. (1966). A determinative scheme for the fluorescent plant pathogenic *Pseudomonas*. *Journal App. Bacterial.* **29**: 470-489.
72. Lepoivre P. (2003). Phytopathologie bases moléculaires et biologiques des pathosystème et fondements des stratégies de lutte. 1^{ère} ed. Beock Université.
73. Leyns F., De Cleene M., JS. and J, D.L. (1984) The host range of the genus *Xanthomonas*. *Bot. Rev.* **50**: 308-355.
74. Martínez-Valverde I., Periago M. J., Provan G., Chesson A. (2002). Phenolic compounds, lycopene and antioxidant activity in commercial varieties of tomato (*Lycopersicum esculentum*). *Journal of the Science of Food and Agriculture.* **82**: 323–330.
75. Maury M. (1987). Milieux et réactifs du laboratoire Pasteur. Paris, France.
76. Melotto M., Underwood W., He,S.Y. (2008) Role of stomata in plant innate immunity and foliar bacterial diseases. *Annu. Rev. Phytopathol.* **46**: 101-122.

77. Messiaen C.M., Blancard D., Rouxel F. et Lfon R. (1993). les maladies des plantes maraichieres. 3^{ème} ed. INRA, Paris.
78. Monteiro-Vitorello, C. B., Camargo L E., Van Sluys M. A., Kitajima J.P., Truffi D., do Amaral A.M., Harakava R., de Olivera J.C., Wood D. (2004). The genome sequence of the Gram-positive sugarcane pathogen *Leifsonia xyli* subsp. *xyli*. *Molecular Plant-Microbe Interaction* **17**:827-836.
79. Munro D B., Small E. (1998). Les legumes du Canada .NRC Research Press.
80. Murillo J. et Sesma A. (2001). The biochemistry and molecular genetics of host range definition in *Pseudomonas syringae* . phytopatolo. Mediterr. **40**: 3-26.
81. Noel L., Thieme F., Nennstiel D. et Bonas U. (2001). cDNA-AFLP analysis unravels a genome-wide hrpG-regulon in the plant pathogen *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria*. *Mol. Microbiol.* **41**: 1271-1281.
82. Ojanen-Reuhs T., Kalkkinen N., Westerlund-Wikstrom B., van Doorn J., Haahtela K., Nurmiaho-Lassila E.L., Wengelnik K., Bonas U. et Korhonen T.K. (1997). Characterization of the *fim A* gene encoding bundle-forming fimbriae of the plant pathogen *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria*. *J. Bacteriol.* **179**: 1280-1290.
83. Okon Y., Bashan Y. et Henis Y. (1978). Studies of bacterial speck of tomato caused by *Pseudomonas tomato*. Proc. 4th ed. Conf. plant. Path. Bact. Angers: 699-702p.
84. Periago M. J., García-Alonso J., Jacob K., Olivares A. B., Bernal A. J., Iniesta M. D. (2009). Bioactive compounds, folates and antioxidant properties of tomatoes (*Lycopersicum esculentum*) during vine ripening. *International Journal of Food Science and Nutrition.* **60** (8):694–708.
85. Plleroni N. J. (1984). Genre 1 *Pseudomonas* Migula. Bergey's Manual of systemic Bacteriology. Krieg NR. Holt JG. Ed. Vol. **1**: 141-199p.
86. Pohronezny K. et Volin, R.B. (1983). The effect of bacterial spot on yield and quality of fresh market tomatoes. *Hort Science.* **18** : 69–70.
87. Polese K.M. (2007). La culture de tomate. Ed. Artémis :95p.
88. Prescott., Harly. et Kelin. (2007). Microbiologie. 2th Ed. Boeck-wesmael. Bruxelles.
89. Prévot A. R. (1961). Traité de systématique bactérienne. Dunod, Paris.
90. **Rachedi M.F (2004). Cultures maraichères et industrielle in collection études sectorielle : agroalimentaire en Algérie. [Cabinet Tiers Consult](#).169-178p.**
91. Ratledge C., Dover, L.G. (2000). Iron metabolism in pathogenic bacteria. *Annu Rev Microbiol* **54**: 881-941.

92. Rehm A. H., Anderson D. M., Schneewind O., van Dijk K. et Alfano J. R. 2000. *Pseudomonas syringae* Hrp type III secretion system and effector proteins. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. **97**:8770-8777.
93. Roine E., Raineri D.M., Romantschuk M., Wilson M. et Nunn D.N. (1998). Characterization of type IV pilus genes in *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* DC3000. *Mol. Plant Microbe Interact.* **11**: 1048-1056.
94. Roine E., Wei W., Yuan J., Nurmiaho-Lassila E.L., Kalkkinen N., Romantschuk M. et He S.Y. (1997). Hrp pilus: an *hrp*-dependent bacterial surface appendage produced by *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* DC3000. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. **94**: 3459-3464.
95. Rostand K.S. et Esko J.D. (1997). Microbial adherence to and invasion through manipulation: type III effector proteins of phytopathogenic bacteria. *Annu. Rev. Microbiol.* **60**: 425-449.
96. Rudolph K. J. G. Swings et E. L. Civerolo. (1993). Infection of the plant by *Xanthomonas*. in *Xanthomonas*. Ed. Chapman & Hall, London, U. K.193-264p.
97. Ruocco M. L., Massimo G., Oscar A., Bernard B. et Jurgen K. (2010). Food quality safety. Lutte biologique .Tome2. CNR, Italie, UE.104p.
98. Ryu, C.M., Farag, M.A., Hu, C.H., Reddy, M.S., Kloepper, J.W., Pare, P.W. (2004) Bacterial volatiles induce systemic resistance in *Arabidopsis*. *Plant Physiology*. **134**:1017-1026.
99. Salanoubat M., Genin, S., Artiguenave, F., Gouzy, J., Mangenot, S., Arlat, M., Billault, A., Brottier, P., Camus, J.C., Cattolico, L., Chandler, M., Choise, N., Claudel-Renard, C., Cunnac, S., Demange, N., Gaspin, C., Lavie, M., Moisan, A., Robert, C., Saurin, W., Schiex, T., Siguier, P., Thebault, P., Whalen, M., Wincker, P., Levy, M., Weissenbach, J., and Boucher, C.A. (2002). Genome sequence of the plant pathogen *Ralstonia solanacearum*. *Nature*. **415**:497-502.
100. Salmond G. P. C. (1994). Secretion of extracellular virulence factors by plant pathogenic bacteria. *Annual Review of Phytopathology*. **32**:181-200.
101. Schaad N. (1988). Laboratory guide for identification of plant pathogenic bacteria. 2nd ed. The American phytopathological Society: 53p.
102. Schaad N. W., Jones. J. B. et Chun W. (2001). Laboratory guide for identification of plant pathogenic bacteria. APS press. 3rd ed. ST Paul, Minnesota (US): 373p.

- 103.Scott, J.W., Somodi, G.C. et Jones, J.B.(1989). Resistance to bacterial spot fruit infection in tomato. *Hort Science*. **24**:825–827.
- 104.Shankara N., Van lidt de jeud J., de Goffau M., Hilmi M., Van Dam B. et Florijin. A. (2005). La culture de la tomate : production, transformation et comercialisation. 5^{eme} (ed).foundation agromisa et CTA, Wageningen.
- 105.Sharoni Y. et Levi Y. (2006). Cancer prevention by dietary tomato lycopene and its molecular mechanisms. In A. V. Rao. Ed. Tomatoes, lycopene & human health. Barcelona: Caledonian Science Press: 111–125p.
- 106.Shenge K. C., Mabagala R. B. et Mortensen C. N. (2010). Current status of bacterial -speck and -spot diseases of tomato in three tomato-growing regions of Tanzania. *Journal Agricultural Extention and Rural Development* .**2**(5):84-88.
- 107.Sherf, A.F. et MacNab A.A. (1986). Vegetable Diseases and Their Control. Wiley, New York. Singleton P. (2005). Bactériologie pour la médecine, la biologie et les biotechnologies. 6th ed. DUNOD. Paris.
- 108.Sivamani E. et Gwanamanickam S.S. (1988). Biological control of *Fusarium oxysporum* f.sp. cubense in banana by inoculation with *Pseudomonas fluorescens*. *Plant Soil*. **107**: 3–9.
- 109.Smitley D. R. et Carter S. M. Mc. (1982). Spread of *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* and the role of epiphytic populations and environmental conditions in disease development. *Plant disease*. **66**:713-717.
- 110.Snoussi S. A. (2010). Rapport de mission : Eude de base sur la tomate en Algérie. Ministère de l’Agriculture et du développement rural, Direction des statistiques. (MRAD).
- 111.Staskawicz B.J., Dahlbeck D. et Keen N.T. (1984) Cloned avirulence gene of *Pseudomonas syringae* pv. *glycinea* determines race-specific incompatibility on Glycine max (L.) Merr. *Proc. Natl. Acad Sci. USA*. **81**: 6024-6028.
- 112.Tamietti G. et Cugudda L. (1987). Note sur les épidémies causées en Italie par deux bactéries phytopathogènes dans les cultures de tomates sous abri. Bulletin OEPP/EPPO. **27**: 295-297.
- 113.Tans-Kersten J., Huang H. et Allen C. (2001). *Ralstonia solanacearum* needs motility for invasive virulence on tomato. *Journal of Bacteriology*. **183**:3597-3605.
- 114.Tsiantos J. (1987). Transmission of bacterium *Corynebacterium michiganense*pv. *michiganense*by seeds. *J. Phytopathol*. **119**: 142–146.

115. Uys M.D.R., Thompson A.H. et Holz G. (1996). Diseases associated with tomato in the main tomato growing of South Africa. *J. S. Afr. Soc. Hort. Sci.* **6**: 78–81.
116. Van Gijsegem F., Vasse J., Camus J.C., Marenda M. et Boucher C. (2000). *Ralstonia solanacearum* produces *hrp*-dependent pili that are required for PopA secretion but not for attachment of bacteria to plant cells. *Mol. Microbiol.* **36**: 249-260.
117. Van Sluys M. A., Monteiro-Vitorello C. B., Camargo L. E. A., Menck C. F. M., da Silva A. C. R., Ferro J. A., Oliveira M. C., Setubal J. C., Kitajima J. P. et Simpson A. J. (2002). Comparative genomic analysis of plant-associated bacteria. *Annual Review of Phytopathology.* **40**: 169-189.
118. Venette JR, Lamey HA et Smith RC. (1996). Bacterial spot and bacterial speck of Tomato. North Dakota State University Extension Services: 2p.
119. Völksch B. et May R. (2001). Biological control of *Pseudomonas syringae* pv. *glycineaglycinea* by epiphytic bacteria under field conditions. *Microb. Ecol.* **41**:132-139.
120. Ward H.P. et O'Garro L.W.(1992). Bacterial spot of pepper and tomato in Barbados. *Plant Dis.* **76**:1046–1048.
121. Watterson JC. (1986). Tomato diseases. In: Atherton, J.G. and Rudich, J. ed. (1986). The Tomato crop: A Scientific Basis for Improvement. Champion and Hall Ltd. Lond: 661p.
122. Weber, E., Koebnik, R. (2005) Domain structure of HrpE, the Hrp pilus subunit of *campestris* pv. *vesicatoria*. *J Bacteriol* **187**: 6175-6186.
123. Weber E. et Koebnik R. (2006) Positive selection of the Hrp pilin HrpE of the plant pathogen *Xanthomonas*. *J. Bacteriol.* **188**: 1405-1410.
124. Wilcox, J. K., Catignani, G. L. et Lazarus, S. (2003). Tomatoes and cardiovascular health. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 43: 451-463.
125. Wilkie J. P. et Dye D. W. (1974). *Pseudomonas tomato* in new Zeland N. *J. Agric. Res.* **17**:131-135.
126. Williamson B., Tudzynski B., Tudzynski P. et Van Kan JAL.(2007). Botrytis cinerea: the cause of grey mould disease. *Molecular Plant Pathology.* **8**: 561–580.
127. Wilson M. et Lindow S. E. (1994). Ecological similarity and coexistence of epiphytic ice-nucleating (Ice⁺) *Pseudomonas syringae* strains and a non-ice-nucleating (Ice⁻) biological control agent. *Appl. Environ. Microbiol.* **60**:3128-3137.

128. Yao J. et Allen C. (2007). The plant pathogen *Ralstonia solanacearum* needs aerotaxis for normal biofilm formation and interactions with its tomato host. *J Bacteriol.* **189**: 6415-6424.
129. Yu ZH, Wang JF, Stall RE. et Vallejos CC. (1995). Genomic localization of tomato genes that control a hypersensitive reaction to *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* (Doidge). *Dye. Genetics.* **141**: 675-682.
130. Yunis H., Bashan Y., Okon Y. et Henis Y. (1980). Weather dependence, yield losses and control of bacterial speck of tomato caused by *Pseudomonas tomato*. *Plant diseases.* **64**:937-939.
131. Zhou J.M. et Chai J. (2008). Plant pathogenic bacterial type III effectors subdue host responses. *Curr. Opin. Microbiol.* **11**: 179-185.
132. Zitter TA. (1985). Bacterial diseases of tomato. Cooperative Extension, Cornell University, New York, USA: 6p.

Annexe 1

Milieux de culture

Gélose nutritive

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

Peptone	10
Extrait de viande	5
Chlorure de sodium	5
Gélose	15

pH 7.2, autoclaver 20 minutes à 120 °C (Guiraud, 1998).

Milieu Levure Peptone Glucose Agar (LPGA).

La composition chimique du milieu en g/L est :

Glucose	7
Peptone	7
Extrait de levure	7
Agar	15

Le pH entre 7.2 et 7.3. Autoclaver à 121 °C pendant 15 minutes (Lelliott et Stead., 1987).

Milieu Levane

La composition chimique théorique de ce milieu en g/L d'eau purifier est :

Extrait de levure	2
Peptone	5
Chlorure de sodium	5
Saccharose	50
Agar	15

pH 7.2, autoclaver 15 minutes à 121 °C (Goszczyńska *et al.*, 2000).

Milieu à la gélatine

La composition chimique de ce milieu en g/L d'eau distillée est la suivante :

Extrait de levure	3
Peptone	5
Gélatine	120

pH 7.0, stériliser 15 minutes à 121 °C (Goszczyńska *et al.*, 2000).

Milieu Tween 80

La composition chimique de ce milieu en g/L d'eau distillée est la suivante :

Peptone	10
NaCl	5
CaCl ₂	0.1
Agar	15

Le milieu est stérilisé 20 minutes à 120 °C, puis 10 ml de Tween 80 stérile est incorporé (Goszczyńska *et al.*, 2000).

Milieu Amidon

La composition chimique de ce milieu en g/L d'eau distillée est la suivante :

Ajouter 2% d'amidon soluble au gélose nutritif (Goszczyńska *et al.*, 2000).

Bouillon transformation du sucrose en substances réductrices (SRS).

La composition chimique du bouillon en g/L est la suivante :

Extrait de levure	5
Peptone	10
Saccharose	40

Le pH 7.0, autoclaver à 121 °C pendant 15 minutes (Schaad, 1988).

Nom : Toufouti Prénom : Zabida Hadjer	Date de soutenance : / /2013
--	--

Annexe 2

Réactifs de griess

Réactif 1

Acide sulfamique 0.8g

Acide acétique 5 N 100 ml

Réactif 2

Diméthyl α Naphtylamine ou α Naphtylamine 0.5 g

Acide acétique 5 N 100 ml (Guiraud, 1998).

Réactif de Benedict

g/L

Citrate de sodium ($\text{Na}_3\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7 \cdot \text{H}_2\text{O}$) 173.0

Carbonate de sodium (Na_2CO_3) 85.5

Sulfate de cuivre ($\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$) 17.3

Dissoudre les produits dans de l'eau distillée et conserver à la noirceur (bouteille ambrée)
(Schaad, 1988).

Thème : Contribution à l'étude des maladies bactériennes de la tomate (<i>Lycopersicon esculentum</i> Mill) cultivée en serres dans l'est Algérien.	
Résumé : La moucheture bactérienne (Bacterial speck), causée par <i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>tomato</i>, continue d'être une maladie économiquement importante de la tomate (<i>Lycopersicon esculentum</i> Mill) à travers le monde. Elle est favorisée par des températures basses et une humidité relativement élevée. Les prospections des cultures de tomates en serres dans la région de l'Est algérien ont permis de constater la présence de la maladie, identifiée par des symptômes typiques de la moucheture bactérienne, qui se manifeste sur les feuilles par des taches brunes de 0.2 à 4 mm entourées d'une auréole jaune. L'étude subséquente au laboratoire a permis, quant à elle, l'isolement de l'agent pathogène à partir des fragments de feuilles atteintes par la maladie. Son identification par des tests biochimiques préliminaires a révélé qu'il appartient au genre <i>Pseudomonas</i> et l'étude moléculaire a montré qu'il s'agit de <i>Pseudomonas syringae</i>. Le test de pathogénicité effectué par inoculation artificielle sur la partie aérienne des plantules de tomate saines est traduit par l'apparition des symptômes typiques de la maladie, similaires à ceux, observés au niveau des serres prospectées. Le test d'activité antagoniste vis-à-vis de <i>Pseudomonas syringae</i> réalisé d'abord, <i>in vitro</i>, a abouti à la sélection d'une souche bactérienne développant une zone de lyse importante qui se traduit par l'inhibition de la croissance de la bactérie pathogène. Les tests <i>in vivo</i>, qui visaient à inhiber le développement de la maladie au moyen de microorganisme sélectionné ont donné des résultats intéressants néanmoins, ils nécessitent un approfondissement pour se prononcer sur l'approche de la lutte biologique.	
Mots clés : <i>Pseudomonas syringae</i>, Tomate, Moucheture bactérienne, Antagonisme, Lutte biologique.	
Laboratoire de recherche : laboratoire de Mycologie, de biotechnologie et de l'activité microbienne (LaMyBAM), Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie, UC-1.	
Devant le jury :	
Président de jury :	Mr. BOULAHROUF A.
Rapporteur :	Mr. KACEM CHAOUICHE N.
Examineur :	Mme. MIHOUBI I.
	Mr. DEHIMAT L.
	Pr. Université de Constantine 1
	Pr. Université de Constantine 1
	Pr. Université de Constantine 1
	Pr. Université de Constantine 1

