

الجمهورية الجزائرية الديمقراطية الشعبية

République Algérienne Démocratique et Populaire

وزارة التعليم العالي والبحث العلمي

Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique

المدرسة الوطنية العليا للفلاحة

Ecole Nationale Supérieure Agronomique d'El Harrach - Alger



**Thèse**

**En vue de l'obtention du diplôme de Doctorat  
en sciences Agronomiques**

**Thème**

**Essais de lutte biologique contre le mildiou de la pomme de terre en  
Algérie : Effets antifongiques des extraits de plantes et effets antagonistes  
de quelques isolats du genre *Trichoderma* sur *Phytophthora infestans*  
(Mont.) de Bary.**

Présentée par Mme Messgo ep Moumene Saïda

Devant le jury :

**Président** Mr. Bellal M.M. Professeur ENSA El Harrach

**Directeur de Thèse** Mr Bouznad Z. Professeur ENSA El Harrach

**Examineurs :**

- Mr Chemat F. Professeur Université d'Avignon et des  
pays de Vaucluse (France)

- Mr Sabaou N.E. Professeur ENS Kouba

- Melle Boutekedjiret C. Professeur ENP El Harrach

- Melle Boureghda H. Maître de  
conférences A ENSA, El Harrach

Année Universitaire 2014/2015

# *Dédicaces*

*A*fin d'être reconnaissante envers ceux qui m'ont appuyée et encouragée à effectuer ce travail de recherche, je dédie ce mémoire :

*À la mémoire de mes très chers parents*

*A* toi particulièrement Ma mère, enfin j'ai pu réaliser ton rêve, malgré tous les obstacles que j'ai rencontrés après ton absence. Tu resteras toujours gravée dans mon esprit pour ta personnalité et tes qualités, pour tous les sentiments d'affection et d'amour qui représentent pour moi le pilier de tous mes efforts.

*A* mon très cher mari Khaled et mes très chers enfants : Nadjib, Rym et Faten qui n'ont cessé de me combler par leur amour et leur tendresse ; ils m'ont soutenu dans les moments les plus difficiles et se sont montrés patients en m'encourageant à réaliser ce travail.

*A* tous les membres de ma famille sans aucune exception.

*A* mes très chers collègues enseignants de l'université de Blida 1 qui m'ont encouragé à achever mes travaux de recherche et à tous ceux qui ont souhaité ma réussite.



## *Remerciements*

Cette thèse de Doctorat a été réalisée dans le cadre d'une convention de cotutelle entre le laboratoire de recherche des plantes Médicinales et Aromatiques de la Faculté des Sciences de la Nature et de la vie, Université de Blida 1 et l'Institut National de la Protection des Végétaux (INPV). Les recherches qui font l'objet de ce mémoire ont été réalisées au niveau de quatre sites à savoir la station régionale de l'INPV de Boufarik, Le laboratoire de recherche des plantes Médicinales et Aromatiques à l'Université de Blida 1. En France le laboratoire de Green extraction d'Avignon et l'unité de biologie moléculaire au département des écosystèmes et bioressources durables de Fondation Edmund Mach à San Michele, all'Adige, Italie.

*Par* ces quelques lignes, je tiens à remercier toutes les personnes qui ont participé de près ou de loin au bon déroulement de cette thèse, en espérant n'avoir oublié personne...

*Je* tiens à remercier particulièrement mon directeur de thèse **Pr Zouaoui Bouznad** d'avoir cru en mes capacités, pour le temps et la patience qu'il m'a accordés tout au long de ces années. Je garderai dans mon cœur sa générosité, sa compréhension et son efficacité qu'il en soit assuré de ma profonde gratitude.

*Je* tiens à remercier **Dr Khaled Moumene** Directeur général à l'INPV de m'avoir autorisée à réaliser mes travaux de recherche au niveau de la station régionale de Boufarik en compagnie de l'équipe de jeunes chercheurs que j'ai encadrés avec munitie et beaucoup de sérieux dans cette thématique: Kamilia Bachir, Meriem laidani, Sabrina Zanoune, Dounia Saddek, Khadidja Bencheikh, Mohamed Bellatreche et Rym Boukhalfa.

*Je* tiens à remercier mon chef d'option de Biotechnologie des PAM ; ma directrice de laboratoire de recherche des PAM, **Pr Zahia Houmani** de m'avoir bien accueillie dans son laboratoire et m'avoir encouragée sur la valorisation des PAM. Merci pour votre gentillesse,

vosre patience et vos précieux conseils. J'ai beaucoup apprécié travailler à vos côtés tant sur le plan scientifique que sur le plan humain. Je garde toujours beaucoup de plaisir à discuter avec vous et à bénéficier de vos conseils.

*Je* remercie pertinemment notre fierté **Pr Farid Chemat** à l'Université d'Avignon, en France, qui m'accompagné dans les analyses chimiques des huiles essentielles et avec qui j'ai appris comment réussir une publication. Vos remarques pertinentes et vos conseils précieux m'ont beaucoup aidée à améliorer la qualité de ce travail. Qu'il soit assuré de mon estime et de ma profonde gratitude. C'est un réel plaisir de travailler avec lui. Je le remercie également pour avoir accepté d'examiner ce travail. Que vous soyez assuré de mon entière reconnaissance.

*Il* m'est particulièrement agréable d'exprimer ma profonde gratitude et mes sincères remerciements à **Dr Ilaria Pertot** chef de département des Ecosystèmes et de Bioressources pour l'Agriculture durable à Edmund Fondation Mach à San Michèle all'Adige, Italie, pour m'avoir offert l'opportunité de compléter la caractérisation moléculaire pour l'identification de nos isolats antagonistes en améliorant ainsi la qualité de mon travail. Je la remercie pour m'avoir apporté toutes les facilités en vue de réaliser mon stage dans les meilleures conditions au sein de l'unité de biologie moléculaire, en compagnie avec **Dr Claudia Longa** qui m'a fait profiter de son savoir et de ses compétences dans ce domaine. Leur disponibilité, leur compétence et leur gentillesse m'ont beaucoup marquées.

*Je* tiens à remercier vivement Monsieur le **Professeur Mohand Mouloud Bellal** de l'ENSA d'El Harrach, pour m'avoir fait l'honneur de présider le jury. Qu'il me soit permis de lui présenter le témoignage de ma vive reconnaissance.

*Je* remercie également Monsieur le **Pr. Nasreddine Sabaou** de L'ENS de Kouba pour l'intérêt qu'il m'a témoigné en acceptant de juger ce travail. Qu'il soit assuré de mon profond respect.

*Merci* également Madame le **Professeur Chahrazed Boutekdjiret** à l'Ecole Polytechnique d'El Harrach qui a accepté de juger ce travail en tant qu'examineur. Je lui adresse mes sentiments les plus respectueux.

*Je* suis très obligée de remercier également **Melle Houda Boureghda** MCA à ENSA d' El Harrach d'avoir accepté de juger le travail.

*Je* ne saurai oublier d'exprimer ma reconnaissance à **Mr Lyes Beninal** du CNCC pour sa disponibilité et sa gentillesse. Qu'il trouve ici mes sincères remerciements.

*Je* remercie aussi tous les membres du Laboratoire de Recherche des Plantes Médicinales et Aromatiques pour la sympathie et l'aide qu'ils m'ont témoignées durant ces années de dur labeur.

*Je* voudrai aussi adresser ma reconnaissance particulière à **Melle Reguieg zahia**, pour ses qualités humaines, sa disponibilité et ses encouragements illimités.

*Un* grand merci aussi pour mes amis Tunisiens : **Si Mohamed AMMAR** à l'INAT ; **Si Slim Tounsi**, **Si Hafedh Belguith**, **Kaïs Jamoussi** et **Lobna jlaiel** du CBS de Sfax et l'équipe de chercheurs de l'Unité moléculaire de Edmund Fondation Mach de San Michele all'Adige, Italie : Claudia, Kamila, Selena, Gerardo, Andrea et Stephan pour leur aide et leur soutien avec mes sincères vœux de réussite.

## Résumé

### **Essais de lutte biologique contre le mildiou de la pomme de terre en Algérie : Effets antifongiques des extraits de plantes et effets antagonistes du genre *Trichoderma* sur *Phytophthora infestans* Mont. de Bary.**

Le mildiou de la pomme de terre connaît une recrudescence, suite à l'apparition récente de souches agressives de *Phytophthora infestans* résistantes aux fongicides systémiques du groupe des phenylamides dont la matière active est le metalaxyl. Dans le cadre de la recherche de méthodes alternatives contre cette maladie, ce présent travail a porté sur le pouvoir antifongique de plantes et leurs extraits, ainsi que l'activité antagoniste de 11 isolats d'Algérie du genre *Trichoderma*; sept proviennent de la rhizosphère des zones de production de la pomme de terre et quatre à partir des masses d'œufs de nématodes du genre *Meloïdogyne*, prélevées des galles racinaires des plants de tomate collectées de différentes localités. En effet, les préparations à base de plantes testées sont représentés par les huiles essentielles de trois espèces d'agrumes à savoir, l'orange, le citron, la bergamote et celle de la sauge ainsi que, les extraits aqueux et les poudres d'une gamme de plantes à savoir ; l'ortie, la prêle des champs, la sauge, le pacanier, le romarin, le pistachier lentisque, la menthe odorante, et la posidonie de Méditerranée.

Les résultats ont affirmé l'efficacité de certaines préparations à base de ces plantes et de certains isolats antagonistes par la réduction de l'inoculum et celle du développement de la maladie, selon certains modes d'application. L'étude de l'activité antifongique et l'analyse chimique par CG-SM des huiles essentielles d'agrumes confirme l'efficacité de l'huile essentielle de bergamote par ses composés minoritaires dont les monoterpènes oxygénés représentés par le nerol, neral, geraniol et geranial. Il serait important d'optimiser leur rendement par d'autres méthodes d'extraction ou choisir un matériel végétal plus riche en ces composés pour la formulation de biofongicides à base de ses principes actifs contre le *P. infestans*. En revanche, le pouvoir antifongique de l'huile essentielle de sauge s'avère moins important que celui de ses poudres et de ses extraits aqueux. Dans ce sens, une forte activité antifongique est enregistrée pour l'ensemble des poudres et des extraits aqueux de la gamme de plantes testée. On peut recommander à titre préventif, l'utilisation particulière des extraits aqueux du pistachier lentisque, du pacanier, de la menthe à feuilles rondes, de la sauge et du romarin par arrosage ou la production et l'incorporation dans le sol d'un biocompost à base de poudres de toute la gamme de plantes testée. Par ailleurs, l'analyse moléculaire en utilisant les ITS5 a permis l'identification, après séquençage et le blast dans le NCBI, d'une souche de *T. atroviride* et dix souches de *T. asperellum* qui ont affirmé un potentiel antagoniste très intéressant et peuvent être préconisés comme agents de lutte biologique contre le mildiou de la pomme de terre, selon différents modes d'application. Il serait notamment plus judicieux de recommander l'incorporation des isolats suivants : T2, T4, T5, T6, T7, T8, T9, T10 et T11 dans le sol, avant plantation.

**Mots clés :** *Trichoderma atroviride*, *T. asperellum*, *Phytophthora infestans*, Activité antifongique, Activité antagoniste.

## ملخص

محاولات محاربة البياض الزغبي لنبات البطاطا في الجزائر : بفعل المستخلصات النباتية  
وبفعل التضاد الحيوي للتريكودارما ضد الفيتوفثورا انفستانس

البياض الزغبي(الميلديو) لنبات البطاطا عرف نموا ،تبعاً لظهور سلالات عدائية من الفيتوفثورا  
انفستانس المقاومة للمادة الفعالة المتمركزة في الميتالاكسيل.  
وفي اطار البحث عن طرق بديلة لمحاربة المرض، قمنا من خلال هذا العمل بدراسة القدرة الضد فطرية  
لبعض النباتات ومستخلصاتها، خاصة التضاد ل11 سلالة فطرية جزائرية من نوع التريكوودارما ضد  
الفيتوفثورا انفستانس منها 07 سلالات عزلت من جذور مناطق منتجة للبطاطا و04 عزلت من كتلات  
بيوض الديدان الخيطية من نوع الميلو دوجينيا منزوعة من كتل جذرية لنبات الطماطم من مختلف  
المناطق. في الواقع التحضيرات المعتمدة على النباتات المختبرة تتمثل في استخدام الزيوت الاساسية  
للحمضيات ، الليمون ،البرغموت، وزيت المرمية وكذلك مستخلصات ومساحيق عدة نباتات مثل:  
القراص ،ذيل الحصان ،المرمية ،البقان ،اكليل الجبل، الضرو، النعناع العطري، بوسيدونيا البحر  
المتوسط. بينت النتائج المتحصل عليها فعالية بعض عزلات التريكوودارما وبعض مستخلصات النباتات  
المختبرة وفقاً لمختلف الطرق المطبقة للتقليل من حدة المرض وتطوره.

للزيوت الاساسية للحمضيات GC-MS دراسة النشاط الضد فطري التحليل الكيمائية ب  
تؤكد فعاليتها خاصة الزيت الاساسي للبرغموت وهذا لأهمية مكوناته مثل المينورييتارمن المنوتاريان  
والمؤكسج ، الممثل ب النيروول والنيرال ، الجيرانبول والجيرانيال ،سيكون من المهم تحسين انتاجها  
وتطوير أساليب استخراج أخرى أو اختيار المزيد من المواد النباتية الغنية بهذه المركبات في صياغة ضد  
فطر بيولوجي استناداً على مكوناتها النشطة ضد الفيتوفثورا انفستانس.

وفي المقابل فان القدرة الضد فطرية لزيت الاساسي للمرمية ظهرت اقل فعالية مقارنة بفعالية مستخلصات  
النباتات المختبرة. في هذا السياق، يتم تسجيل نشاط ضد فطري قوي لجميع المساحيق والمستخلصات  
النباتات المجربة.وبالتالي من المهم استعمال مستخلصات ومساحيق نباتات الضرو، البقان، النعناع  
العطري ،المرمية ، اكليل الجبل عن طريق السقي بمستخلصاتها او استعمالها بالردم الطبيعي في الحقول  
كإجراء وقائي. سيكون من المهم ان تحسين مردوديتها بواسطة طرق اخرى للاستخراج او اختيار مواد  
نباتية غنية بهذه المكونات لصياغة ادوية ضد فطرية بيولوجية ضد الفيتوفثورا انفستانس.

NCBI سمح بمعرفة بعد التسلسل والتقسيم في ITS5 التحليل الجزيئي باستخدام  
سلالة تريكوودارما اتروفيريدي وعشر سلالات من تريكوودارما اسبارلوم.حيث سلالات التريكوودارما اثبتت  
قدرتها العالية الضد الفطرية ولذا ينصح باستعمال التريكوودارما كعامل ضد فطري حيوي بتحديد استعمال  
ينصح بوضعها في التربة قبل الغرس. T2, T4, T5, T6, T7, T8, T9, T10 et T11

## الكلمات الدالة :

النشاط الضد فطري، التضاد الحيوي ، *Trichoderma asperellum*, *Phytophthora infestans*,

*Trichoderma atroviride*,

## Abstract

### **Trials on biocontrol against a late blight of potato in Algeria: Antifungal effects of plant extracts and antagonistic effects of the genus *Trichoderma* on *Phytophthora infestans* (Mont.) De Bary.**

Late blight of potato is experiencing a resurgence following the recent emergence of aggressive strains of *Phytophthora infestans* resistant to systemic fungicides of phenylamides group whose active ingredient is a metalaxyl. In the research framework for alternative methods against this disease, this study focused on antifungal power plants and their extracts, and antagonistic activity of 11 Algerian isolates, genus *Trichoderma* whose, seven are isolated from the rhizosphere of potato's production area and four from egg masses of nematods genus *Meloïdogyne*, taken from the root galls of tomato's plants, collected from different localities. Indeed, the basic test plants preparations are represented by essential oils of three species namely citrus, orange, lemon, bergamot and that of the sage and the aqueous extracts and powders of a range of plants namely; nettle, horsetail, sage, pecan, rosemary, *Pistacia lentiscus*, Fragrant mint and the Mediterranean *Posidonia*. The results have affirmed the effectiveness of certain preparations tested plants and some antagonist isolates by reducing the inoculum and the development of the disease, according to some modes of application. The study of the antifungal activity and chemical analysis by GC-MS of citrus essential oils confirm the effectiveness of the bergamot essential oil according its minority compounds, including oxygenated monoterpenes presented by nerol, neral, geraniol and geranial. It would be important to optimize their performance by other extraction methods, or choose a more plant material rich in these compounds for the formulation of biofungicides against the *P. infestans*. However, the antifungal power of the sage essential oil is less than that of its powder and its aqueous extracts. In this sense, an important antifungal power is recorded for all powders and aqueous extracts of the range of the tested plants. A preventive measure can be recommended particularly, the use of aqueous extracts of *Pistacia lentiscus*, pecan, Fragrant mint, sage and rosemary by watering or the production and incorporation into the soil of a biocompost based on powders of the range of tested plants. Moreover, molecular analysis using the ITS5 allowed the identification, after the sequencing and the blast in NCBI, only one strain of *T. atroviride* and ten strains of *T. asperellum* that reported a very interesting antagonist potential and may be recommended as biological control agents against a late blight of potato, according different methods of application. It would be wiser to recommend the incorporation of the following isolates: T2, T4, T5, T6, T7, T8, T9, T10 and T11 in the soil before planting.

**Keywords :** *Trichoderma atroviride*, *Trichoderma asperellum*, *Phytophthora infestans*, Antifungal activity, Antagonistic activity.



# Sommaire

	Pages
<b>INTRODUCTION</b> .....	23
<b>1. SYNTHESE BIBLIOGRAPHIQUE</b> .....	27
1.1 Généralités sur la pomme de terre .....	28
1.1.1 Origine et historique .....	28
1.1.2 Données botaniques .....	28
1.1.3 Cycle de développement de la culture .....	29
1.1.4 Conditions de développement de la culture .....	30
1.1.5 Importance économique .....	30
1.1.6 Situation de la culture de pomme de terre en Algérie .....	31
1.1.7 Principaux problèmes phytosanitaires de la pomme de terre .....	33
1.2 Généralités sur la maladie .....	33
1.2.1 Historique .....	33
1.2.2 Symptômes .....	34
1.2.3 Importance économique de la maladie .....	35
1.2.4 Cycle biologique de la maladie .....	36
1.3 Généralités sur l'agent pathogène .....	37
1.3.1 Systématique .....	37
1.3.2 Aspect cultural de <i>Phytophthora infestans</i> .....	38
1.3.3 Morphologie .....	38
1.3.4 Spécificité parasitaire .....	39
1.4 Contrôle du mildiou de la pomme de terre .....	40
1.4.1 Méthodes préventives et prophylactiques .....	40
1.4.2 Lutte chimique .....	40
1.4.3 Lutte génétique .....	41
1.4.4 Lutte biologique .....	41
1.5 Utilisation des plantes dans la lutte biologique .....	42
1.6 Utilisation des <i>Trichoderma</i> spp. dans la lutte biologique .....	44
1.6.1 Généralités sur <i>Trichoderma</i> .....	44
1.6.2 Historique sur le genre <i>Trichoderma</i> .....	45
1.6.3 Taxonomie des genres <i>Hypocrea</i> et <i>Trichoderma</i> .....	46

1.6.4 Importance des <i>Trichoderma</i> .....	49
1.6.5 Biocontrôle par <i>Trichoderma</i> .....	49
1.6.6 Modes d'action des <i>Trichoderma</i> spp .....	54
<b>2. MATERIEL ET METHODES</b> .....	56
2.1 Activité antifongique des plantes et de leurs extraits .....	57
2.1.1 Activité antifongique des huiles essentielles d'agrumes et de sauge à l'égard du mildiou de la pomme de terre .....	57
2.1.2 Activité antifongique d'une gamme de préparations à base de plantes à l'égard du mildiou de la pomme de terre .....	64
2.2 Recherche d'isolats antagonistes du genre <i>Trichoderma</i> à l'égard du mildiou de la pomme de terre .....	70
2.2.1 Isolement, caractérisation et Identification des isolats de <i>Trichoderma</i> spp. ....	70
2.2.2 Activité antagoniste des isolats du genre <i>Trichoderma</i> spp. sur <i>Phytophthora infestans</i> .....	72
2.3 Analyse statistique .....	76
<b>3. RESULTATS ET DISCUSSION</b> .....	77
3.1 Activité antifongique des plantes et de leurs extraits à l'égard de <i>Phytophthora infestans</i> agent du mildiou de la pomme de terre .....	78
3.1.1 Activité antifongique des huiles essentielles d'agrumes sur <i>Phytophthora infestans</i> .....	78
3.1.2 Activité antifongique de l'huile essentielle de sauge sur <i>Phytophthora infestans</i> ..	87
3.1.3 Activité antifongique d'une gamme de préparations à base de plantes sur <i>Phytophthora infestans</i> .....	99
3.2 Recherche de <i>Trichoderma</i> spp. agents antagonistes du mildiou de la pomme de terre .....	131
3.2.1 Isolement, caractérisation et identification des isolats de <i>Trichoderma</i> spp. ....	131
3.2.2 Activité antagoniste des isolats de <i>Trichoderma</i> spp. sur <i>Phytophthora infestans</i>	139
<b>4. CONCLUSION GENERALE ET PERSPECTIVES DE RECHERCHE</b> .....	164
<b>REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES</b> .....	171
<b>ANNEXES</b> .....	198

## Liste des abréviations

<b>(A)</b>	:	Technique de confrontation directe
<b>ATCG...</b>	:	Bases azotées de l'ADN (A : Adénine, T : Thymine, C : Cytosine, G : Guanine)
<b>A</b>	:	isolats antagonistes
<b>A1, A2</b>	:	Formes sexuelles de <i>Phytophthora infestans</i>
<b>ADN</b>	:	Acide désoxyribonucléique
<b>ARNr</b>	:	Acide ribonucléique ribosomique
<b>B</b>	:	Bergamote
<b>BDNFF</b>	:	Base de données nomenclaturale de la flore de France
<b>CL</b>	:	Collet
<b>C</b>	:	Citron
<b>C.B.S</b>	:	Centre de Biotechnologie de Sfax, Tunisie
<b>C.N.C.C</b>	:	Centre national de contrôle et de certification de semences et des plants
<b>CET</b>	:	Complexe touristique de Tipaza « Corne d'Argent ».
<b>CG-SM</b>	:	Chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse
<b>CIL</b>	:	Concentration inhibitrice létale
<b>CIP</b>	:	CIP : Surface foliaire infectée du témoin en %.
<b>CMD</b>	:	Low nutrient medium or cornmeal dextrose (CMD) agar medium.
<b>CMI</b>	:	Concentration minimale inhibitrice
<b>Cns</b>	:	Conidies sombres
<b>Cnv</b>	:	Conidies vertes
<b>Cph</b>	:	Conidiophore
<b>C Phs</b>	:	Courtes phialides
<b>D</b>	:	Déformation des sporanges
<b>ddl</b>	:	Degré de liberté
<b>DRDPA</b>	:	Direction de la régulation et de la production agricole

<b>Dt</b>	:	Croissance mycélienne des isolats fongiques développés dans le milieu en présence d'huile essentielle
<b>DT</b>	:	Croissance mycélienne des isolats fongiques témoins
<b>EA</b>	:	Eau- agar
<b>Edit</b>	:	Edition
<b>EDTA</b>	:	Ethylene diamine tetra-acetate.
<b>Ev</b>	:	Electron volt
<b><i>f.sp</i></b>	:	Forme spéciale
<b>F</b>	:	Fraction
<b>FAO</b>	:	Food and agriculture organization
<b>(F.C)</b>	:	Technique des antagonistes et leurs filtrats de cultures
<b>FEM</b>	:	Fondazione Edmond Mach, Italie
<b>FEMS</b>	:	Federation of European Microbiological Societies
<b>G</b>	:	Guanine
<b>GC</b>	:	Glomérules de conidies
<b>gi</b>	:	Code des souches de références identifiées et classées dans les banques de gènes
<b>GLM</b>	:	Generalized linear model
<b>H.E</b>	:	Huile essentielle
<b><i>H.</i></b>	:	<i>Hypocrea</i>
<b>I</b>	:	Taux d'inhibition de la croissance mycélienne des isolats fongiques
<b>ICTF</b>	:	International commission of the taxonomy of fungi
<b>IGS</b>	:	Intergenic non-transcribed spacer
<b>INA</b>	:	Institut national agronomique
<b>INAT</b>	:	Institut National Agronomique de Tunisie
<b>Inf</b>	:	Taux d'inhibition d'infection des disques foliaires
<b>nft</b>	:	Surface infectée des disques foliaires traités par les huiles essentielles d'agrumes
<b>INPV</b>	:	Institut national de la protection des végétaux
<b>INRA</b>	:	Institut national de la recherche agronomique
<b>IPS</b>	:	Taux d'inhibition de la sporulation (De la production des sporanges)

<b>IS</b>	:	Taux d'inhibition de la sporulation
<b>ISTH</b>	:	International subcommission of trichoderma and hypocrea taxonomy
<b>ITCF</b>	:	Institut technique des céréales et des fourrages
<b>ITS</b>	:	Intergenic transcribed spacer
<b>L Cph</b>	:	Long conidiophore
<b>Lys</b>	:	Lyse et vésiculation mycélienne
<b>M</b>	:	Mycélium
<b>MA</b>	:	Mode d'application des antagonistes
<b>MADR</b>	:	Ministère de l'agriculture et du développement rural
<b>MCL</b>	:	Approche de vraisemblance maximale composite
<b>MEA</b>	:	Malt extract- agar medium
<b>MEGAG</b>	:	Molecular evolutionary genetic analysis
<b>Mth</b>	:	Menthe
<b>NCAT</b>	:	National center for appropriate technology
<b>NCBI</b>	:	National Center for Biotechnology Information
<b>NIVAP</b>	:	Netherlands Potato Consultative Foundation
<b>NSPt</b>	:	Nombre moyen de sporanges par surface du disque foliaire inoculé par le pathogène et traité par l'extrait de plante
<b>O</b>	:	Orange
<b>Ort</b>	:	Ortie
<b><i>P. infestans</i></b>	:	<i>Phytophthora infestans</i>
<b>P</b>	:	Probabilité
<b>Pac</b>	:	Pacanier
<b>Pb</b>	:	Paire de base
<b>PCR</b>	:	Polymerase chain reaction
<b>PDA</b>	:	Potato dextrose agar medium
<b>Phs</b>	:	Phialides
<b>Pis</b>	:	Pistachier lentisque
<b>PNTTA</b>	:	Bulletin mensuel d'information du transfert de technologie en agriculture
<b>Pos</b>	:	Posidonie

<b>pp</b>	:	Nombre de pages
<b>PPA</b>	:	Petit pois agar
<b>Prl</b>	:	Prêle
<b>RI</b>	:	Indice de rétention
<b>RM</b>	:	Réduction de la maladie
<b>rom</b>	:	Romarin
<b>rpm</b>	:	Rotation per minute
<b>S</b>	:	Sporanges
<b>S. C. E</b>	:	Somme des carrés des écarts
<b><i>S. demissum</i></b>	:	<i>Solanum demissum</i>
<b>SIPPOM</b>	:	Simulator for integrated pathogen population management
<b>SIT</b>	:	Surface foliaire infectée du témoin
<b>SIt</b>	:	Surface foliaire infectée traitée
<b>SNA</b>	:	Salt water Nutrient agar medium.
<b>ST</b>	:	Concentration en sporanges de l'inoculum témoin
<b>St</b>	:	Concentration en sporanges de l'inoculum traité par les huiles essentielles
<b>Sug</b>	:	Sauge
<b>T-</b>	:	Témoin négatif
<b>T+</b>	:	Témoin positif
<b><i>T.harzianum</i></b>	:	<i>Trichoderma harzianum</i>
<b>TBE</b>	:	Solvant commun pour acide nucleique Tris/Borate/EDTA
<b>USB</b>	:	Universal serial bus
<b>V</b>	:	Variétés

## Liste des tableaux

	Pages
<b>Tableau 1.</b> Bilan de la culture de pomme de terre de consommation en Algérie durant la Campagne 2011/2012 (DRDPA, 2012) .....	33
<b>Tableau 2.</b> Données sur les isolats de <i>Trichoderma</i> spp. issus d'Algérie .....	71
<b>Tableau 3.</b> Analyse chimique par CG – SM des huiles essentielles d'agrumes extraites par hydro distillation .....	85
<b>Tableau 4.</b> Données sur les isolats de <i>Trichoderma</i> spp. issus d'Algérie .....	138

## Liste des figures

	Pages
<b>Figure 1.</b> Symptômes du mildiou sur plants de pomme de terre au champ à Bourkika (Tipaza) (Moumene et <i>al.</i> , 2012b) .....	35
<b>Figure 2.</b> Cycle de développement du mildiou de la pomme de terre d'après : <a href="http://www.eucablight.org">http://www.eucablight.org</a> . .....	37
<b>Figure 3.</b> Aspect cultural des isolats A1 et A2 de <i>Phytophthora infestans</i> issus d'Algérie, sur milieu gélosé à base de petit pois (Messgo-Moumene et <i>al.</i> , 2012 et Moumene et <i>al.</i> , 2012) .....	38
<b>Figure 4.</b> Morphologie de la forme asexuée (a) et de la forme sexuée (b) d'un isolat de <i>Phytophthora infestans</i> provenant de la région de Ain Defla, Algérie (G : X 500) (Moumene et <i>al.</i> , 2012) .....	39
<b>Figure 5.</b> Schéma de l'unité de transcription ribosomique de l'ADNr chez les champignons filamenteux (Dlauchy et <i>al.</i> , 1999 ; Fernandez- Espinar et <i>al.</i> , 2000) .....	47
<b>Figure 6.</b> Sections systématiques des genres téléomorphes ( <i>Hypocrea</i> : <i>H.</i> ) et anamorphes : ( <i>Trichoderma</i> : <i>T.</i> ), <i>International sub commission on Trichoderma and Hypocrea (ISTH)</i> ( <a href="http://isth.info/biodiversity/index.php">isth.info/biodiversity/index.php</a> ) .....	48
<b>Figure 7.</b> Morphologie des principales espèces du genre <i>Trichoderma</i> agents de biocontrôle des maladies fongiques .....	53
<b>Figure 8.</b> Morphologie des fruits des trois espèces d'agrumes .....	58
<b>Figure 9.</b> Aspect morphologique de la partie aérienne de <i>Salvia officinalis</i> L. ....	58
<b>Figure 10.</b> Morphologie du matériel végétal utilisé .....	65
<b>Figure 11.</b> Effet des huiles essentielles d'agrumes sur la croissance mycélienne des isolats de <i>Phytophthora infestans</i> .....	79
<b>Figure 12.</b> Effet des huiles essentielles d'agrumes sur la sporulation des isolats de <i>Phytophthora infestans</i> .....	80
<b>Figure 13.</b> Effet des huiles essentielles d'agrumes sur la morphologie des isolats de <i>Phytophthora infestans</i> , au grossissement (X125) .....	81
<b>Figure 14.</b> Effet des huiles essentielles d'agrumes sur le pouvoir pathogène des isolats de <i>Phytophthora infestans</i> .....	83
<b>Figure 15.</b> Effet des huiles essentielles d'agrumes sur le pouvoir pathogène des isolats de <i>Phytophthora infestans</i> selon les concentrations et les isolats pathogènes .....	84



<b>Figure 16.</b> Effet de l'huile essentielle de sauge sur la croissance mycélienne des isolats de <i>Phytophthora infestans</i> .....	88
<b>Figure 17.</b> Effet de l'huile essentielle de sauge sur la sporulation des isolats de <i>Phytophthora infestans</i> selon les concentrations.....	88
<b>Figure 18.</b> Effet de l'huile essentielle de sauge sur la morphologie des isolats de <i>Phytophthora infestans</i> , au grossissement (X500) .....	92
<b>Figure 19.</b> Effet de l'huile essentielle de sauge sur le pouvoir pathogène des isolats de <i>Phytophthora infestans</i> .....	94
<b>Figure 20.</b> Taux d'infection du mildiou après traitements par l'huile essentielle de sauge selon les concentrations en HE, les isolats pathogènes et les modes de traitements .....	95
<b>Figure 21.</b> Effet de l'huile essentielle de sauge sur le pouvoir pathogène des isolats de <i>Phytophthora infestans</i> selon les concentrations .....	96
<b>Figure 22.</b> Pouvoir inhibiteur des extraits aqueux de plantes sur la croissance mycélienne des isolats de <i>Phytophthora infestans</i> .....	100
<b>Figure 23.</b> Effet des extraits aqueux de plantes sur l'inhibition de la croissance mycélienne des isolats de <i>Phytophthora infestans</i> selon les concentrations et les isolats pathogènes .....	101
<b>Figure 24.</b> Concentrations minimales inhibitrices des extraits aqueux de plantes sur la croissance mycélienne des isolats de <i>Phytophthora infestans</i> .....	102
<b>Figure 25.</b> Effet des extraits aqueux de plantes sur l'inhibition de la sporulation des isolats de <i>Phytophthora infestans</i> selon les concentrations et les isolats pathogènes ...	103
<b>Figure 26.</b> Effet des extraits aqueux de plantes sur la germination des isolats de <i>Phytophthora infestans</i> selon les concentrations et les isolats pathogènes .....	104
<b>Figure 27.</b> Effet de l'extrait aqueux de romarin sur la morphologie des isolats de <i>Phytophthora infestans</i> , (grossissement X 500) .....	105
<b>Figure 28.</b> Pouvoir fongicide <i>in vitro</i> des extraits aqueux de plantes sur la reprise de la croissance mycélienne des isolats de <i>Phytophthora infestans</i> .....	107
<b>Figure 29.</b> Concentrations inhibitrices létales (CIL) des extraits aqueux de plantes sur les isolats de <i>Phytophthora infestans</i> .....	108
<b>Figure 30.</b> Effet des modes d'application des préparations à base de plantes sur la période d'incubation du mildiou sur disques foliaires de pomme de terre .....	109

<b>Figure 31.</b> Périodes d'incubation du mildiou sur disques foliaires de pomme de terre selon les modes d'application, les extraits aqueux de plantes, les variétés de pomme de terre et les isolats pathogènes .....	110
<b>Figure 32.</b> Effet des modes d'application des préparations à base de plantes sur le pouvoir pathogène des isolats de <i>Phytophthora infestans</i> .....	112
<b>Figure 33.</b> Effet des modes d'application des préparations à base de plantes sur le pouvoir pathogène des isolats de <i>Phytophthora infestans</i> selon les variétés de pomme de terre .....	113
<b>Figure 34.</b> Effet des préparations de plantes sur le pouvoir pathogène des isolats de <i>Phytophthora infestans</i> selon les isolats pathogènes .....	114
<b>Figure 35.</b> Effet des préparations à base de plantes et leur modes d'application sur le développement des symptômes du mildiou de la pomme de terre .....	116
<b>Figure 36.</b> Effet des préparations à base de plantes sur le pouvoir pathogène des isolats de <i>Phytophthora infestans</i> selon leur modes d'application .....	118
<b>Figure 37.</b> Effet des extraits aqueux de plantes sur le pouvoir pathogène des isolats de <i>Phytophthora infestans</i> selon leurs concentrations .....	119
<b>Figure 38.</b> Effet des modes d'application des préparations à base de plantes sur l'inhibition <i>in vivo</i> de la sporulation des isolats de <i>Phytophthora infestans</i> .....	121
<b>Figure 39.</b> Effet des modes d'application des préparations à base de plantes sur l'inhibition <i>in vivo</i> de la sporulation des isolats de <i>Phytophthora infestans</i> selon les variétés de pomme de terre .....	122
<b>Figure 40.</b> Effet des préparations à base de plantes sur l'inhibition <i>in vivo</i> de la sporulation des isolats de <i>Phytophthora infestans</i> selon les modes de leur application et les isolats de <i>P. infestans</i> .....	123
<b>Figure 41.</b> Effet des préparations à base de plantes sur l'inhibition <i>in vivo</i> de la sporulation des isolats de <i>Phytophthora infestans</i> selon les modes de leur application ..	124
<b>Figure 42.</b> Effet des concentrations des extraits aqueux de plantes sur l'inhibition <i>in vivo</i> de la sporulation des isolats de <i>Phytophthora infestans</i> selon les modes de leur application .....	125
<b>Figure 43.</b> Cultures des isolats de <i>Trichoderma</i> issus d'Algérie âgées d'une semaine sur milieu PDA .....	132
<b>Figure 44.</b> Morphologie des isolats de <i>Trichoderma</i> issus d'Algérie.....	133

<b>Figure 45.</b> Gels d'électrophorèse montrant les extraits d'ADN des isolats de <i>Trichoderma</i> issus d'Algérie et celui du marqueur moléculaire .....	135
<b>Figure 46.</b> Gels d'electrophorèse montrant l'amplification des ITS des isolats de..... <i>Trichoderma</i> spp. issus d'Algérie , et ceux de <i>Trichoderma atroviride</i> , <i>Trichoderma brevicompactum</i> (FEM) et du marqueur moléculaire .....	135
<b>Figure 47.</b> Arbre phylogénique obtenu par la méthode de vraisemblance maximale (Maximum Likelihood method) .....	137
<b>Figure 48.</b> Pouvoir inhibiteur <i>in vitro</i> des isolats du genre <i>Trichoderma</i> sur la croissance mycélienne de <i>Phytophthora infestans</i> , selon la méthode de confrontation directe après six jours d'incubation .....	140
<b>Figure 49.</b> Effet inhibiteur des isolats de <i>Trichoderma</i> spp. sur la croissance mycélienne, la sporulation et la germination des isolats de <i>Phytophthora infestans</i> selon la méthode de confrontation directe et celle du contact direct avec leurs filtrats de cultures.....	142
<b>Figure 50.</b> Modifications morphologiques des isolats de <i>Phytophthora infestans</i> sous l'effet d'activité antagoniste <i>in vitro</i> des isolats de <i>Trichoderma</i> spp. (grossissement × 125) .....	143
<b>Figure 51.</b> Inhibition de la reprise de croissance <i>in vitro</i> des isolats de <i>Phytophthora infestans</i> .....	144
<b>Figure 52.</b> Symptômes du mildiou sur les disques foliaires de pomme de terre inoculés par les isolats de <i>Phytophthora infestans</i> .....	151
<b>Figure 53.</b> Activité antagoniste <i>in vivo</i> des isolats du genre <i>Trichoderma</i> sur la période d'incubation du mildiou sur disques foliaires de pomme de terre selon les modes d'application des isolats antagonistes et les variétés de pomme de terre .....	152
<b>Figure 54.</b> Effet des modes d'application des isolats antagonistes du genre <i>Trichoderma</i> sur le pouvoir pathogène des isolats de <i>Phytophthora infestans</i> .....	156
<b>Figure 55.</b> Activité antagoniste <i>in vivo</i> des isolats de <i>Trichoderma</i> spp. sur le pouvoir pathogène des isolats de <i>Phytophthora infestans</i> selon les modes de leur application, les variétés de pomme de terre et les isolats antagonistes .....	158
<b>Figure 56.</b> Activité antagoniste <i>in vivo</i> des isolats du genre <i>Trichoderma</i> sur la sporulation des isolats de <i>Phytophthora infestans</i> selon les modes d'application, les isolats antagonistes et les isolats pathogènes .....	159
<b>Figure 57.</b> Pouvoir pathogène des isolats de <i>Phytophthora infestans</i> , témoins et ceux préalablement inhibés par l'activité antagoniste des isolats de <i>Trichoderma</i> spp. ....	160

## Liste des annexes

	<b>Pages</b>
<b>Annexe 1 :</b> Composition des milieux de culture (Dellaras, 2014)	199
Annexe 1.1: Milieu à base de petits pois-agar	199
Annexe 1.2: Milieu Extrait de Malt-agar	199
<b>Annexe 2.</b> Analyse de la variance (ANOVA) des taux d'inhibition de la croissance mycélienne des isolats de <i>Phytophthora infestans</i> selon les HE d'agrumes, les concentrations et les solats pathogènes	199
<b>Annexe 3.</b> Test de Comparaison (one-way ANOVA) des taux d'inhibition de la croissance Mycélienne des isolats de <i>Phytophthora infestans</i> selon les HE d'agrumes	199
<b>Annexe 4.</b> Analyse de la variance (ANOVA) des taux d'inhibition de la sporulation (%) des isolats de <i>Phytophthora infestans</i> selon les H.E des agrumes et leurs concentrations	200
<b>Annexe 5.</b> Analyse de la variance (ANOVA) des taux d'inhibition d'infection des isolats de <i>Phytophthora infestans</i> selon les huiles essentielles, leurs concentrations et les isolats pathogènes	200
<b>Annexe 6.</b> Test de Comparaison test (one-way ANOVA) des taux d'inhibition d'infection des isolats de <i>Phytophthora infestans</i> selon les huiles essentielles	200
<b>Annexe 7.</b> Analyse de la variance (ANOVA) des taux d'inhibition de la croissance mycélienne des isolats de <i>Phytophthora infestans</i> selon l'HE de sauge et ses concentrations	200
<b>Annexe 8.</b> Taux de sporulation des isolats de <i>Phytophthora infestans</i> sous l'effet d'huile essentielle de sauge	201
<b>Annexe 9.</b> Analyse de la variance (ANOVA) des taux d'inhibition de la sporulation de <i>Phytophthora infestans</i> selon l'huile essentielle de sauge et les concentrations	201
<b>Annexe 10.</b> Analyse de la variance (ANOVA) des taux d'infection des isolats de <i>Phytophthora infestans</i> selon les modes de traitements, les isolats pathogènes et les concentrations en HE de sauge	201

<b>Annexe 11.</b> Analyse de la variance (ANOVA) des taux d'inhibition de la croissance mycélienne des isolats de <i>Phytophthora infestans</i> selon les extraits aqueux de plantes, leurs concentrations et les isolats pathogènes	202
<b>Annexe 12.</b> Analyse de la variance (ANOVA) des CMI des extraits aqueux de plantes selon leur nature et les isolats de <i>Phytophthora infestans</i>	202
<b>Annexe 13.</b> Analyse de la variance (ANOVA) des taux d'inhibition de la sporulation des isolats de <i>Phytophthora infestans</i> selon les extraits aqueux de plantes et les isolats pathogènes	202
<b>Annexe 14.</b> Analyse de la variance (ANOVA) des taux d'inhibition de la germination des isolats de <i>Phytophthora infestans</i> selon les extraits aqueux de plantes, leurs concentrations et les isolats pathogènes	203
<b>Annexe 15.</b> Analyse de la variance (ANOVA) des taux d'inhibition de la reprise de croissance mycélienne des isolats de <i>Phytophthora infestans</i> préalablement inhibés selon les extraits aqueux de plantes, leurs concentrations et les isolats pathogènes	203
<b>Annexe 16.</b> Analyse de la variance (ANOVA) des concentrations inhibitrices létales (CIL) des isolats de <i>Phytophthora infestans</i> traités par les extraits de plantes	203
<b>Annexe 17.</b> Analyse de la variance (ANOVA) des périodes d'incubation du mildiou selon les modes d'application des traitements, les variétés de pomme de terre, les isolats pathogènes, les préparations à base de plantes et les concentrations des extraits aqueux de plantes	204
<b>Annexe 18.</b> Analyse de la variance (ANOVA) des taux de réduction de la maladie selon les modes d'application des préparations à base de plantes, les variétés de pomme de terre, les isolats pathogènes et les concentrations des extraits aqueux de plantes	205
<b>Annexe 19.</b> Analyse de la variance (ANOVA) des taux d'inhibition de la production de sporanges <i>in vivo</i> selon les préparations à base de plantes, les concentrations des extraits aqueux de plantes, les variétés de pomme de terre et les isolats de <i>Phytophthora infestans</i>	206
<b>Annexe 20.</b> Séquences linéaires des ITS des isolats <i>Trichoderma</i> spp. et ceux des espèces de <i>T. atroviride</i> , <i>T. brevicompactum</i> et du <i>Pgem</i>	207
<b>Annexe 21.</b> Analyse de la Variance (ANOVA) des taux d'inhibition des paramètres biologiques des isolats de <i>Phytophthora infestans</i> selon les techniques de confrontation directe avec les isolats de <i>Trichoderma</i> spp. et le contact direct avec leurs filtrats de cultures	210

<b>Annexe 22.</b> Analyse de la variance des périodes d'incubation du mildiou selon les modes d'application des antagonistes, les variétés de pomme de terre, les isolats de <i>Phytophthora infestans</i> et les isolats antagonistes de <i>Trichoderma</i> spp.	211
<b>Annexe 23.</b> Analyse de la variance des taux de réduction de la maladie selon les modes d'application des isolats antagonistes de <i>Trichoderma</i> spp., les variétés testées, les isolats de <i>P. infestans</i> et les isolats antagonistes de <i>Trichoderma</i> spp.	212
<b>Annexe 24.</b> Analyse de la variance (ANOVA) des taux d'inhibition de la production des sporanges des isolats de <i>Phytophthora infestans</i> selon les modes d'application des antagonistes de <i>Trichoderma</i> spp. , les variétés de pomme de terre, les isolats pathogènes et les isolats antagonistes	213

# **INTRODUCTION**

## INTRODUCTION

Parmi les produits agricoles de base, la pomme de terre (*Solanum tuberosum* L.), occupe une place prépondérante dans les régimes alimentaires de nombreux pays. Au marché mondial et européen, elle occupe la cinquième place après la Canne à sucre, le maïs, le riz et le blé sur le plan de consommation (FAO, 2012).

La pomme de terre est cultivée dans 170 pays qui regroupent plus de trois quarts de la population mondiale. L'Asie et l'Europe sont les plus grands pays producteurs de la pomme de terre, représentant plus de 80 % de la production mondiale, où la Chine et l'Inde sont les leaders avec le 1/3 de la production mondiale. Cette dernière a augmenté de 20 % au cours des vingt dernières années, pour atteindre 369 millions de tonnes en 2012 pour 20 millions d'hectares (FAO, 2013).

En Algérie, son utilisation en alimentation humaine, en plus de sa valeur énergétique élevée comparée à d'autres aliments, en fait qu'elle soit le légume le plus recherché au niveau de nos marchés. Sa consommation est en constante augmentation et sa demande est de plus en plus forte, alors que sa production n'avoisine que 4.219.476 tonnes sur une superficie d'environ 139 000 ha (FAO, 2014b).

En culture, la pomme de terre fait l'objet d'attaques de plusieurs agents phytopathogènes et ravageurs notamment des champignons, des bactéries, des virus et des nématodes, pouvant soit occasionner des pertes sévères de rendement, soit détériorer la qualité des productions (Mulder et Turkensteen, 2005).

En effet, le mildiou ou brûlure tardive de la pomme de terre, causé par l'oomycète *Phytophthora infestans* Mont de Bary., est considéré comme la maladie la plus redoutable sur la culture de pomme de terre en abaissant sa qualité et son rendement, lorsque les conditions climatiques sont favorables (Fry et Goodwin, 1997 ; Ghorbani et al., 2004 ; Mizubuti et al., 2007).

En outre, cette maladie n'a pas cessé de faire couler l'encre depuis son apparition dramatique en Irlande en 1845-1846 où elle a engendré une grande famine qui a entraîné la mort de plus d'un million et demi d'habitants et la migration de 2 millions et demi de personnes (Andriveau, 1995 ; Andriveau, 1996 ; Fry et al., 1993, Fry et Goodwin, 1997).

Cette maladie se manifeste là où la culture existe partout dans le monde et aujourd'hui encore, elle reste le principal facteur la limitant à l'échelle mondiale (Duvauchelle et Andriveau, 1996). Les épidémies causées par cet agent phytopathogène sont extrêmement



rapides en conditions favorables à cause du nombre très important de sporanges qui sont produits et la courte période d'incubation (Mizubuti et *al.*, 2007). En zone tempérée, les conséquences économiques sont fréquentes et graves. Une attaque précoce peut entraîner des baisses de rendement de plus de 50 % mais peut aller jusqu'à la perte totale de la récolte. Une attaque plus tardive détériore la qualité des tubercules (Goodwin et *al.*, 1995; Zwankhuizen, 1998).

Aussi, des souches agressives de l'agent causal de cette maladie, la plupart résistantes aux fongicides systémiques courants, ont fait leur apparition ces dernières années, créant de nouveaux défis pour les producteurs de pomme de terre (Kuepper et Sullivan, 2005).

Jusqu'à présent, la lutte chimique reste le moyen de contrôle le plus utilisé contre le mildiou de la pomme de terre, classant la culture parmi celles utilisant le plus de fongicides (Rakotonindraina, 2008).

En effet, la lutte contre le mildiou de la pomme de terre repose essentiellement sur l'utilisation par alternance de fongicides de contact et d'autres systémiques selon les conditions climatiques. Toutefois, l'utilisation massive de fongicides systémiques a conduit à la sélection d'isolats résistants à ces matières actives, qui appartiennent principalement au groupe des phénylamides tel que le métalaxyl (Gisi et Cohen, 1996).

Cependant, l'utilisation des fongicides a rencontré plusieurs contraintes qui s'expliquent aussi bien par leur coût élevé, que par leurs effets néfastes sur l'environnement et sur la santé des consommateurs. Ainsi, la création d'une nouvelle stratégie de lutte contre le développement des maladies des plantes, pour satisfaire la demande publique dans la réduction d'utilisation de pesticides est nécessaire. Depuis quelques années le monde agricole s'oriente vers une agriculture durable et raisonnée en développant le concept de protection biologique intégrée dite lutte biologique, par la recherche de méthodes alternatives à la lutte chimique (Bekepe et *al.*, 2006).

Dans ce sens, les travaux de recherche se sont orientés sur les dérivés des plantes et leurs métabolites secondaires à pouvoir antifongique. Leur application possible dans l'agriculture est intensifiée en développant la recherche moderne en agrochimie (Costa et *al.*, 2000 ; Negi et *al.*, 2005).

L'aromathérapie s'avère une voie intéressante pour la phytoprotection où de nombreux extraits de plantes se sont affirmés efficaces pour leurs propriétés antibactériennes, antifongiques et insecticides. Des produits naturels isolés de ces végétaux semblent être l'une

des alternatives de produits chimiques et surtout qu'on connaît qu'ils n'ont aucun impact sur l'environnement et sur l'homme (Varma et Dubey, 1999).

Dans ce contexte, des travaux ont porté sur l'activité antifongique de certains extraits et huiles essentielles de plantes contre *P. infestans* (Rashid et al., 2004 ; Krebs et al., 2006).

En parallèle, de nombreux agents fongiques et bactériens ont été largement utilisés dans la lutte biologique contre de nombreux agents phytopathogènes (Sharma et Pandey, 2009).

Certaines espèces de *Trichoderma* ont été évaluées pour leur potentiel antagoniste et hyperparasite (Harman et al., 2004; Benitez et al., 2004; Ávila-Miranda et al., 2006). Elles ont été utilisées contre un large spectre d'agents phytopathogènes. Leur antagonisme se manifeste généralement par une compétition, un mycoparasitisme ou encore par une antibiose. Ces mécanismes peuvent intervenir seuls, en association ou séquentiellement (Lepoivre, 2003).

Notre objectif dans ce présent travail est de proposer la recherche de méthodes alternatives contre le mildiou de la pomme de terre causé par *Phytophthora infestans* Mont. De Bary., en se basant sur l'utilisation des plantes et leurs extraits ainsi que des antagonistes fongiques du genre *Trichoderma*. Notre approche s'articule donc sur deux principaux volets :

- La recherche de plantes et leurs extraits pouvant avoir des activités antifongiques sur *Phytophthora infestans*.
- La recherche des isolats du genre *Trichoderma* de différentes localités d'Algérie et l'étude de leurs effets antagonistes sur *Phytophthora infestans*,

Les résultats obtenus permettront l'identification de biomolécules à partir de plantes pour la production de biofongicides et la sélection d'isolats antagonistes du genre *Trichoderma* à l'égard de *P. infestans*. Ils détermineront leurs doses propices et leurs modes d'utilisation judicieux pour leur utilisation dans la gestion du mildiou de la pomme de terre.

# *Chapitre 1*

## **SYNTHESE BIBLIOGRAPHIQUE**

# **1. SYNTHÈSE BIBLIOGRAPHIQUE**

## **1.1 Généralités sur la pomme de terre**

### **1.1.1 Origine et historique**

La pomme de terre existe depuis plus de 8000 ans. Elle est originaire d'Amérique du sud, plus exactement près du lac Titicaca dans les hauts plateaux andins de la cordillère des Andes au sud du Pérou et au nord de la Bolivie (Spooner et *al.*, 2005). Elle fut introduite en Europe par l'Espagne, il y a plus de quatre siècles en 1534, puis en France et en Angleterre. Propagée aussi bien par les anglais que par les espagnols, la pomme de terre a gagné le reste de l'Europe. Depuis, elle s'est répandue dans le monde entier (Robuchon, 1994 ; Rousselle et *al.*, 1996).

En Algérie, son introduction fut réalisée par les français à partir de 1856 ; en 1898, le pays était déjà exportateur de pomme de terre (Starostins, 1977), sachant que durant les années 40, elle était productrice de plants de pomme de terre destinés à couvrir ses besoins en semences. Le blocus en méditerranée pendant la seconde guerre mondiale n'a pas permis les approvisionnements à partir de la Bretagne française, d'où le fait que la nécessité de produire les plants était de nouveau ressentie ; et le premier programme de l'Algérie indépendante avait démarré en 1969. La période de 1970 à 1973 a permis de maîtriser les techniques de multiplication avec la formation des contrôleurs et l'encadrement de la production (Haddad, 2008).

### **1.1.2 Données botaniques**

La pomme de terre *Solanum tuberosum* est une plante herbacée avec un port dressé, qui peut atteindre 0.6 à 1.0 m de hauteur plus ou moins étalé avec l'âge. C'est une vivace grâce à ses tubercules, à condition que le climat leur permettent de survivre à la saison froide, mais qui est cultivée comme une plante annuelle (Arvy et Gallouin, 2007).

Son système racinaire est fasciculé et très ramifié ; il a tendance à s'étendre superficiellement mais peut s'enfoncer jusqu'à 0.8 m de profondeur. Il est constitué de racines adventives qui apparaissent à la base des bourgeons du tubercule ou sur les nœuds des tiges enterrées (Rousselle et *al.*, 1996).

La pomme de terre présente deux types de tiges :

Des tiges aériennes, à section circulaire ou angulaire, sur lesquelles sont disposées les feuilles qui naissent à partir de bourgeons présents sur le tubercule utilisé comme semence.

Elles sont herbacées, succulentes et peuvent atteindre de 0,6 à 1,0 m de long (Arvy et Gallouin, 2007).

Des tiges souterraines, qui sont les stolons, sur lesquelles apparaissent les tubercules (Rousselle et *al.*, 1996).

Les feuilles sont caduques, alternes de 10 à 20 cm de long. Elles sont insérées sur la tige selon une phyllotaxie spiralée, de rapport 5/13. Elles sont composées et comptent 7 à 9 folioles de forme lancéolée et de taille hétérogène, de toutes petites folioles s'intercalant par paires entre les plus grandes ; les feuilles basales peuvent parfois être entières. Elles présentent des poils à leur surface, en quantité variable selon les cultivars (Bock, 2012).

L'inflorescence est une cyme qui naît à l'extrémité de la tige, pouvant compter 1 à 30 fleurs, et 7 et 15 en moyenne. Le nombre d'inflorescences et le nombre de fleurs par inflorescence varient fortement selon les cultivars. Les fleurs, d'un diamètre de 3 à 4 cm, sont régulières, à symétrie pentamère et de couleur jaune clair ou jaune verdâtre (Bock, 2012).

Les fruits de la pomme de terre sont des baies non comestibles, groupées en grappes terminales et de formes sphériques, allongées ou ovoïdes. Leur diamètre varie de 1 à 3 cm et leur couleur peut virer du vert au vert jaunâtre, ou du marron rougeâtre à violet (Huamán, 1986).

Les tubercules sont comestibles, de tailles variables et de formes oblongues, plus ou moins allongés, cylindriques, lisses ou bosselés selon les variétés. A leur surface, on peut observer des yeux alignés sur cinq génératrices et disposés selon une courbe hélicoïdale qui court depuis la cicatrice basale jusqu'à l'apex. La couleur de la peau est généralement jaune, mais peut être rouge, noire, ou rosée. La couleur de la chair est blanche, jaune plus ou moins foncée, rose ou violette selon les variétés (Bock, 2012).

### 1.1.3 Cycle de développement de la culture

Le cycle de développement de la culture de pomme de terre dure environ trois à quatre mois, depuis le semis jusqu'à la destruction de l'appareil végétatif (Martin, 2004). Il se déroule en trois phases principales :

- **Phase de germination**, dite de croissance : Lorsqu'un tubercule germé est planté en terre, ses germes se transforment en tiges feuillées qui donnent, au-dessus du sol, des rameaux, et en dessous des stolons (Madec, 1966 in Montarry, 2007),
- **Phase de tubérisation** : Elle commence par l'arrêt de l'élongation des stolons et la formation des ébauches des tubercules, qui une fois différenciés, vont grossir en emmagasinant des substances de réserve formées à partir des métabolites synthétisés par

la plante au niveau du feuillage. La maturation des tubercules se traduit par un jaunissement du feuillage suivi d'un dessèchement total du système aérien (Jolivet, 1969 in Montarry, 2007),

- **Phase de repos végétatif** : Après la récolte, les tubercules même placés dans des conditions optimales de température et d'humidité, leurs bourgeons sont incapables de croître pour produire des germes.

A la fin du repos végétatif, le germe entre en croissance s'il n'y a pas de dormance induite par les conditions du milieu (Madec, 1966 in Montarry, 2007).

#### **1.1.4 Conditions de développement de la culture**

La pomme de terre s'accommode à tous les types de sols, à l'exception des sols salés et alcalins. Elle préfère les sols profonds, fertiles et meubles. Elle s'adapte aussi bien aux régions tropicales qu'aux régions plus froides ; elle réussit le mieux sous les climats tempérés humides et brumeux (Bamouh, 2003).

La température représente donc un facteur climatique très important pour le développement et la croissance de la pomme de terre. Cette croissance est ralentie à moins de 10°C et ses parties foliacées gèlent à moins de 1°C. La température optimale pour la végétation semble se situer entre 15,5 et 21°C (Clarys, 2005).

Cette plante est très exigeante en azote, en phosphore et en potassium. D'ailleurs, une bonne alimentation en potassium améliore la qualité des tubercules et réduit leur sensibilité aux agressions que subissent les racines. L'acide phosphorique est un facteur de précocité qui favorise le développement racinaire. L'azote favorise le développement du feuillage ainsi que, la formation et le grossissement des tubercules (Rousselle et *al.*, 1996).

#### **1.1.5 Importance économique**

La Pomme de terre est une culture stratégique par excellence, que ce soit dans les pays développés ou ceux en voie de développement. Elle est d'une valeur énergétique considérable ; et elle constitue l'une des plus grandes cultures vivrières dans le monde.

Cette plante est essentiellement connue pour ses utilisations diverses dans l'alimentation de l'homme, l'animal et dans les industries de transformation (FAO, 2008 ; FAO, 2012). La pomme de terre est cultivée dans 170 pays qui regroupent plus de trois quarts de la population mondiale.

Sa production mondiale a augmenté de 20 % au cours des vingt dernières années, pour des superficies cultivées de 20 millions d'hectares, pour atteindre 325 millions de tonnes en

2010 (Barat et Bernabé, 2012), 375.1 millions de tonnes en 2011, 370.6 million de tonnes en 2012 et 376.5 millions de tonnes en 2013 (FAO, 2014a).

<http://www.potatopro.com/world/potato-statistics>.

L'Asie et l'Europe sont les plus grands pays producteurs, représentant plus de 80% de production mondiale. La Chine et l'Inde sont les leaders représentant le un tiers de production mondiale (Bova, 2012).

L'Algérie est classée parmi les pays peu producteurs comme, l'Afrique du Sud, l'Égypte, le Maroc et le Malawi qui totalisent plus des trois quarts de la récolte du continent africain (Kouamé, 2003).

### **1.1.6 Situation de la culture de pomme de terre en Algérie**

Parmi les filières stratégiques en Algérie, la pomme de terre est classée deuxième après les céréales avec des productions respectives de  $42.5 \times 10^6$  qx et  $38.5 \times 10^6$  qx, viennent ensuite les filières agrumicole, phoenocicole et oléicole avec des productions respectives de  $11.1 \times 10^6$  qx,  $7.24 \times 10^6$  qx et  $6.1 \times 10^6$  qx (Minagri, 2012).

Elle est classée deuxième en superficies propres à la culture de la pomme de terre après l'Égypte et dernière, c'est-à-dire quatrième après le Maroc, la Tunisie et l'Égypte par rapport au rendement de sa production, mais également se distingue par son exportation insignifiante qui la classe également dernière par rapport à ces trois pays du Maghreb. (Lefki, 2008).

La pomme de terre est cultivée sur tout le territoire, y compris dans les oasis du sud du pays, avec l'apparition récente du bassin spécifique d'El Oued, où la pomme de terre est devenue une spéculation majeure en quelques années. En effet, si l'on retient les quinze wilayate où elle occupe plus d'un millier d'hectares, on pourra alors distinguer dans les zones du littoral et du sublittoral, trois bassins de production représentés à l'Ouest par les wilayate de Tlemcen, Mostaganem et Chlef, au Centre par les wilayate d'Ain Defla, Tipaza, Alger, Boumerdes, Bouira et Tizi- Ouzou, à l'Est par la wilaya de Skikda sur le littoral et de Guelma, Setif, Mila et Batna à l'intérieur. Les wilayas d'El oued, Mascara, Mostaganem et Ain Defla sont les principales zones productrices (Chehat, 2008).

Les variétés Spunta, Désirée, Kondor, Batina, Timate et Atlas sont les plus cultivées en Algérie (MADR, 2011) ; la variété Spunta reste la plus demandée sur le marché national en raison de sa production abondante grâce à son couvert végétal intense, et malgré sa sensibilité à plusieurs maladies fongiques tel que le mildiou (Ouamar, 2012).

La plasticité culturale et la courte période de croissance et de développement de cette culture permet la réalisation de trois récoltes par an (Chehat, 2008).

En terme d'importance, les cultures de saison (plantation janvier-mars) sont dominantes, suivies par les cultures d'arrière-saison (plantation juillet-août), et enfin viennent les cultures de primeur (plantation octobre-novembre) (Chehat, 2008).

Cette filière demeure fragilisée par une dépendance accrue au marché extérieur de la semence à l'amont et par un dysfonctionnement de la mise en marché de sa production en aval (Omari, 2008).

Le déficit en semences est chronique car l'Algérie importe la majorité de ses besoins en semences de pomme de terre d'Europe, qui couvrent généralement, une partie de la primeur et toute la culture de saison. Pour les besoins de l'arrière-saison en matière de semences, ils sont assurés par la production nationale dans leur totalité (Amrar, 2005).

En effet, la quantité de semences de pomme de terre importée est passée de 90 000 tonnes en 2009 à plus de 100 000 tonnes en 2010 et de 113 000 tonnes en 2011 à plus de 130 000 tonnes en 2012 avec 80% de cette quantité qui passe par le port de Mostaganem, et le reste est réparti entre les ports d'Oran, d'Alger et Ténès (Ouamar, 2012).

Par ailleurs, la production de pomme de terre de consommation est de 4.219.476 tonnes sur une superficie d'environ 139 000 ha en 2012 (FAO, 2013).

Un bilan détaillé de production et superficie de pomme de terre de consommation en Algérie a été élaboré par le DRDPA, durant la période 2011-2012, selon les différentes régions et les types de cultures de pomme de terre (Tableau 1). En effet, la production globale a atteint 3725882 tonnes sur une superficie de 119710 ha avec la plus grande part pour la pomme de terre de saison qui couvre un maximum de besoins en terme de superficie ou en terme de consommation avec 53.33% en superficie et 57.2% en terme de production au niveau surtout des plaines intérieures, les sud, littoraux et sublittoraux et hauts plateaux (DRDPA, 2012).



**Tableau 1. Bilan de la culture de pomme de terre de consommation en Algérie durant la Campagne 2011/2012 (DRDPA, 2012).**

Types de cultures Régions	Primeur		Saison		A / Saison		Total	
	Superficie (Ha)	Production (q)	Superficie (Ha)	Production (q)	Superficie (Ha)	Production (q)	Superficie (Ha)	Production (T)
Hauts Plateaux	-	-	13 637	3 545 225	4 799	1 102 426	18 436	<b>65</b>
Plaines Intérieures	-	-	22 320	7 697 502	21 131	6 174 659	43 451	<b>1 387 216</b>
Littoral et Sublittoral	4 821	1 050 012	14 498	4 647 141	5 924	1 215 153	25 243	<b>691 230</b>
Sud	-	-	13 395	5 456 393	19 185	6 370 320	32 580	<b>1 182 671</b>
<b>Total</b>	<b>4 821</b>	<b>1 050 012</b>	<b>63 850</b>	<b>21 346 261</b>	<b>51 039</b>	<b>14 862 558</b>	<b>119 710</b>	<b>3 725 882</b>
%	<b>4.02</b>	<b>2.8</b>	<b>53.33</b>	<b>57.2</b>	<b>42.63</b>	<b>39.89</b>	<b>100</b>	<b>100</b>

### 1.1.7 Principaux problèmes phytosanitaires de la pomme de terre

La production de pomme de terre est confrontée à de nombreux stress abiotiques et biotiques, comme les attaques de divers pathogènes et ravageurs, notamment les champignons, les bactéries, les virus, les insectes et les nématodes (Mulder et Turkensteen, 2005). En effet, les maladies phytopathogènes peuvent soit occasionner des pertes sévères de rendement, soit détériorer la qualité des productions (Harmel et *al.*, 2008).

Parmi les maladies, le mildiou causé par *P. infestans*, est la maladie la plus redoutable de la pomme de terre et même de la tomate non seulement dans les régions tempérées, mais pratiquement dans toutes les zones de production de ces cultures dans le monde (Fry et *al.*, 1993).

## 1.2 Généralités sur la maladie

### 1.2.1 Historique

En Amérique du nord, le mildiou de la pomme de terre fut observé pour la première fois en 1843 près de Philadelphie aux Etats-Unis (Lacroix, 1999), alors que, la première épidémie en Europe remonte à 1845. Elle démarra en Belgique, puis se propagea, vers la Suisse, la France, le sud de l'Angleterre et en Irlande où elle provoqua une catastrophe alimentaire sans

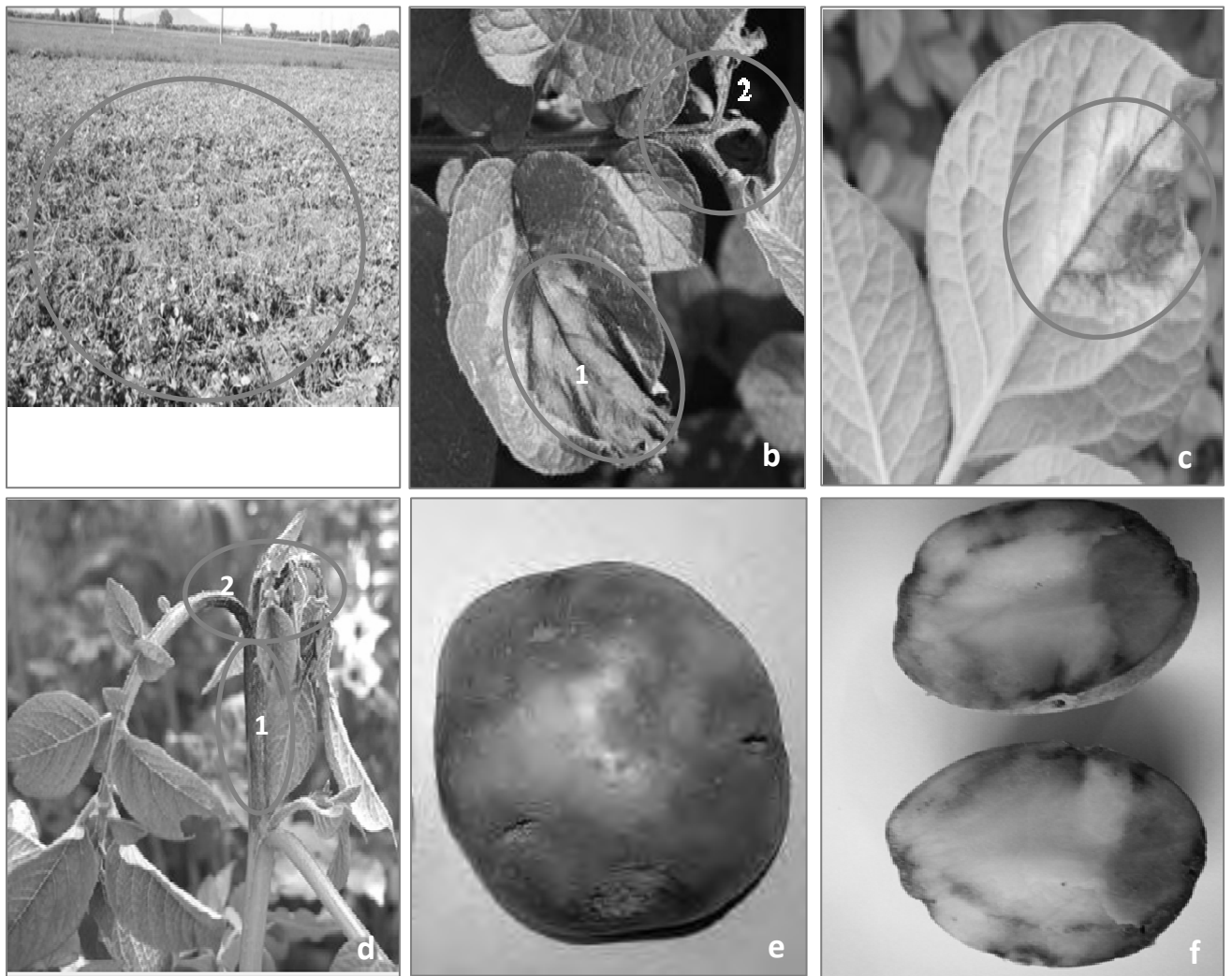
précédent. En Irlande, en 1845 et 1846, la dévastation totale des récoltes de pommes de terre par le mildiou fut lourde de conséquences. Un million et demi d'Irlandais moururent de faim, et deux millions et demi furent contraints d'émigrer aux USA et au Canada (Woodham-Smith, 1962. *in* Austin Bourke, 1964 ; Hampton, 1992, Fry et *al.*, 1993). En Afrique, la maladie a été détectée pour la première fois en 1941 (Sediqui et *al.*, 1997).

### **1.2.2 Symptômes**

Le mildiou, causé par *Phytophthora infestans* attaque toutes les parties de la plante (Figure 3a), les jeunes pousses, les feuilles (Figures 1b1 et 1c), les pétioles (Figure 1d2), les bouquets terminaux (Figure 1b2), les tiges (Figure 1 d1) et les tubercules (Figures 1e et 1f). Ses symptômes développés trois à cinq jours après l'infection, se manifestent par des taches aqueuses circulaires ou irrégulières aux extrémités des feuilles basales, décolorées et entourées d'un halo jaune sur la face supérieure des feuilles, elles s'agrandissent et prennent une coloration brunâtres foncées. Sur la face inférieure des feuilles; et en conditions humides, les fructifications du champignon apparaissent sur le pourtour des taches sous forme d'un duvet blanchâtre (Paitier, 1980).

Sur tige, le symptôme typique est une nécrose brunâtre violacée, s'étendant sur 2 à 10 cm à partir d'un nœud. Par temps humide, cette nécrose se couvre d'une pulvérulence blanche ou grisâtre, formant des organes de multiplication du pathogène (Rousselle et *al.*, 1996).

L'infection des tubercules se manifeste sur la peau par des lésions grisâtres irrégulières tandis que, la chair présente une altération de couleur brunâtre avec une texture souvent granuleuse. Il en résulte une pourriture sèche du tubercule (Thurston et Shultz, 1981 ; Henfling, 1987).



**Figure 1. Symptômes du mildiou sur plants de pomme de terre au champ à Bourkika (Tipaza) (Moumene et al., 2012)**

**a** : Dégénérescence des plants au champ ; **b** et **c** : Symptômes foliaires respectivement sur la face supérieure (b1) et sur la face inférieure (c) ; **d1** : symptômes sur tige ; **d2** : sur Pétioles ; **3b2** sur les bouquets terminaux ; **e** et **f** : Symptômes respectivement sur la peau et sur la chair des tubercules.

### 1.2.3 Importance économique de la maladie

Le mildiou est une maladie fongique redoutable de la pomme de terre. Ces dernières années, des souches extrêmement agressives, la plupart résistantes aux fongicides synthétiques courants ont fait leur apparition, créant de nouveaux défis pour les producteurs de pommes de terre et de tomates. Elle peut détruire toute une récolte et se traduire par une perte complète de rendement (Kuepper et Sullivan, 2005).

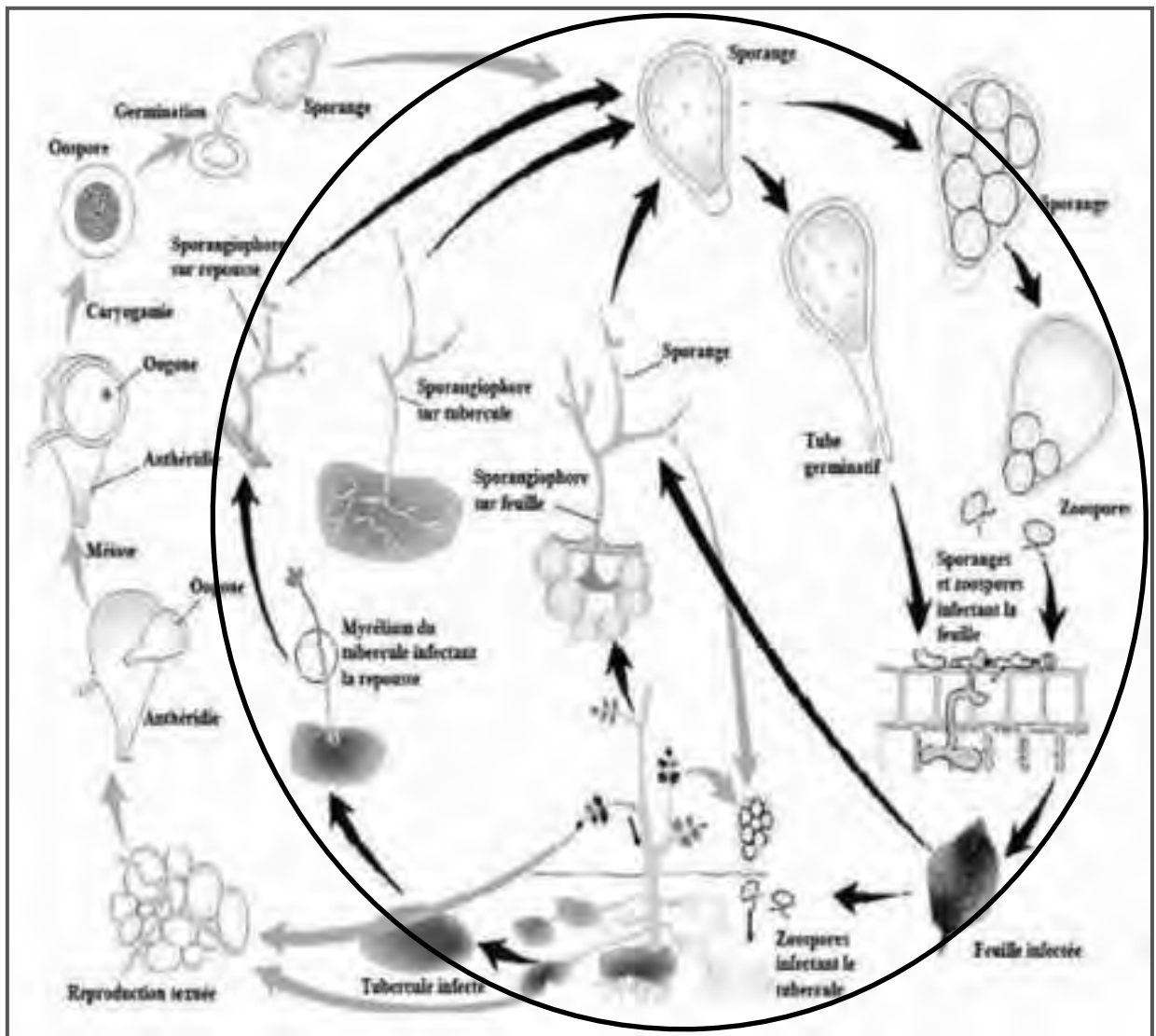
En effet, en moins de trois semaines, une culture de pomme de terre peut être entièrement détruite (Gaucher et al., 1998). Les attaques précoces induisent une diminution de la photosynthèse, alors que les attaques tardives conduisent à une baisse de la qualité des tubercules (Radtke et Rieckmann, 1991 ; Dubois et al., 1996).

#### 1.2.4 Cycle biologique de la maladie

Le cycle biologique de *P. infestans* comprend un cycle sexué et un cycle asexué (Figure 2). Ce dernier est la force motrice assurant les épidémies polycycliques rapides, qui peuvent être observées dans les cultures de pomme de terre pendant la saison de croissance (Kessel et Förch, 2006).

Les sporocystes constituent l'unité de la reproduction asexuée. Ils germent selon la température, soit par la libération de zoospores ou directement par émission d'un ou de plusieurs tubes germinatifs (Harrison et Lowe, 1990). Ces propagules seront à l'origine des contaminations secondaires. L'infection des tubercules se fait souvent par les zoospores de *P. infestans* qui sont facilement drainées avec l'eau d'irrigation ou des précipitations. Le pathogène infecte les tubercules au niveau des lenticelles, des yeux, des stolons ou des blessures mais ne pénètre jamais à travers le périoderme (Swiezynsky et *al.*, 2001).

On distingue trois périodes dans le cycle du mildiou durant une année : la survie hivernale, l'installation de l'inoculum primaire au printemps et la multiplication des cycles et une extension de la maladie en été. Le champignon passe l'hiver sur les débris de récolte puis, réapparaît à l'air libre au printemps suivant. Il émet des spores qui vont se propager sur d'autres plants si les conditions sont favorables à savoir une humidité élevée et une température d'environ 20°C. La propagation est alors rapide, le feuillage se dessèche, les spores tombent au sol et se fixent au tubercule pour l'infecter (Figure 2).



- Cycle asexué - Cycle sexué

Figure 2. Cycle de développement du mildiou de la pomme de terre d'après :

<http://www.eucablight.org>.

### 1.3 Généralités sur l'agent pathogène

#### 1.3.1 Systématique

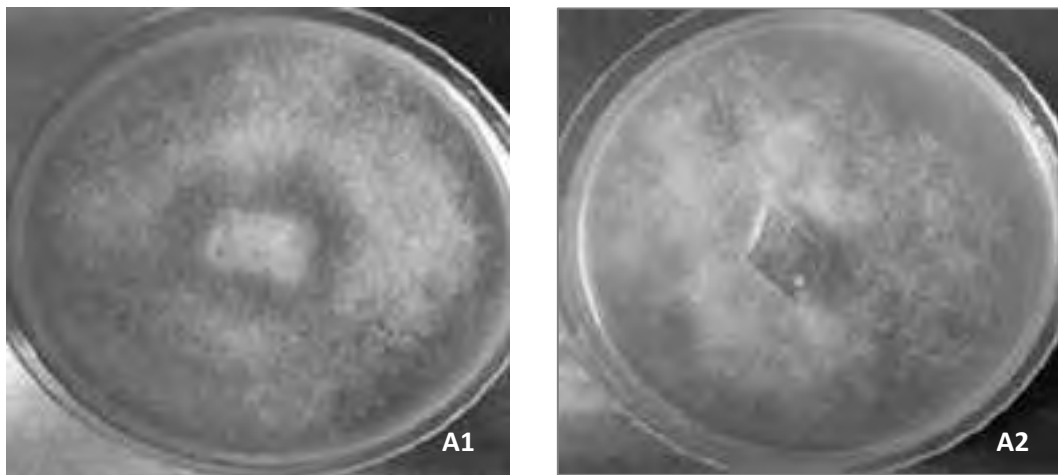
Le genre *Phytophthora* signifie destructeur de plantes. Il regroupe environ 35 espèces, appartenant à la classe des *oomycètes* qui sont essentiellement terrestres, mais en présence d'eau, elles produisent des zoospores mobiles.

Ils forment un genre important responsable de nombreuses maladies de plantes au sein de la famille des *Pythiacées*, et de l'ordre des *Péronosporales*. *Phytophthora infestans*, a été longtemps considéré comme tous les *oomycètes* un champignon, cependant il a été classé dans

le Règne des Straminopila. Les *oomycètes* présentent une croissance filamenteuse qui les fait ressembler à des champignons mais les connaissances actuelles sur leur structure amène à les apparenter plutôt aux algues bien que, contrairement à ces dernières, ils n'aient pas de chlorophylle (Legemle, 2008).

### 1.3.2 Aspect cultural de *Phytophthora infestans*

*P. infestans* se comporte dans la nature comme un biotrophe obligatoire (Isaac, 1992 ; Kosack et Parker, 2003), sans capacité de survie saprophytique, mais il peut tout de même être isolé et cultivé en milieu de culture artificiel. En culture, les colonies de *P. infestans* sont aériennes, blanchâtres et à aspect laineux (Andrivon, 1995) (Figure 3).



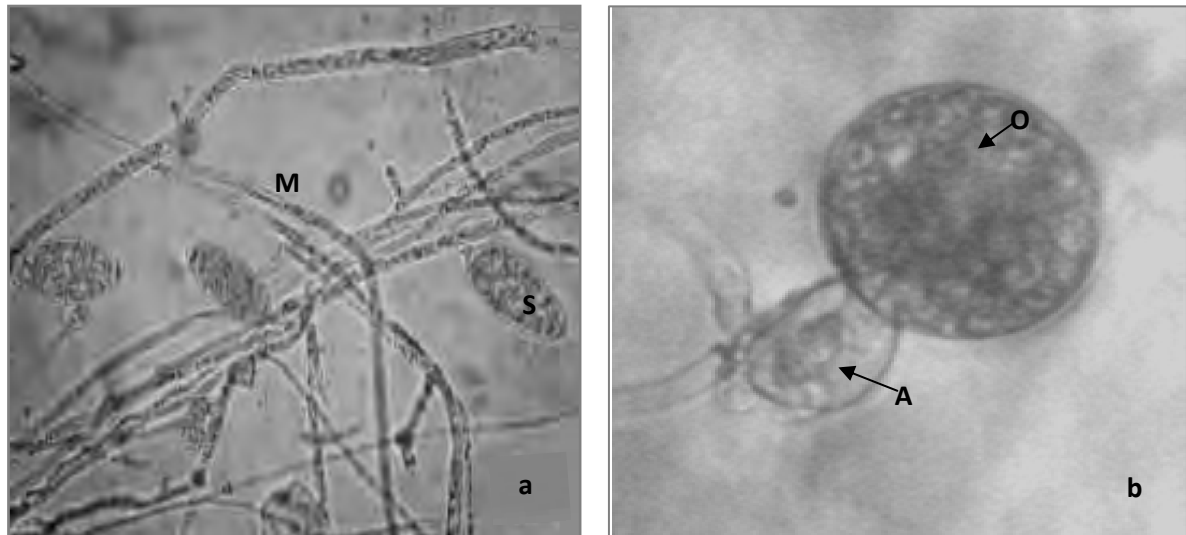
**Figure 3.** Aspect cultural des isolats (A1 et A2) de *Phytophthora infestans* issus d'Algérie, sur milieu gélosé à base de petit pois (Messgo-Moumene et *al.*, 2012 et Moumene et *al.*, 2012)

### 1.3.3 Morphologie

*P. infestans* possède un mycélium coenocytique hyalin et un développement endogène (Chamont, 2010). Le caractère morphologique principal de ce pathogène est la présence de renflement ou de gonflement au niveau des sites de ramification en particulier aux points de la formation des sporocystes (Thurston et Schultz, 1981) (Figure 4a). Ces derniers en position terminale ont une forme et une taille variable selon les isolats.

Les sporanges citrifformes présentant une papille apicale, renferment des cellules mobiles appelées zoospores qui assurent la reproduction asexuée. Ces zoospores se déplacent grâce à deux flagelles dissemblables (Bouchet et *al.*, 2000). Les oospores sont pour la plupart de

forme aplérotique avec un diamètre moyen d'environ 30  $\mu\text{m}$  (Gallegly et Hong, 2008) (Figure 4b). Les oogones sont globuleuses, d'un diamètre de 37  $\mu\text{m}$ , alors que les anthéridies sont amphigynes et généralement de forme allongée (Gallegly et Hong, 2008).



**Figure 4. Morphologie de la forme asexuée (a) et de la forme sexuée (b) d'un isolat de *Phytophthora infestans* provenant de la région de Ain Defla, Algérie (G : X 500) (Moumene et al., 2012)**

M : Mycélium, S : Sporange, O : Oospore, A : Anthéridie

#### 1.3.4 Spécificité parasitaire

Le genre *Phytophthora* regroupe 100 espèces différant par leur physiologie et leur spectre d'hôtes. *P. infestans* est responsable du mildiou de la pomme de terre et de la tomate. A l'inverse, certaines espèces telluriques comme *P. capsici* ou *P. parasitica* présentent des gammes d'hôtes beaucoup plus larges, intégrant la plupart des solanacées maraîchères. Comparativement aux études menées sur le mildiou de la pomme de terre, peu de données sont disponibles concernant la nature, la structure et l'évolution des populations de *P. infestans* attaquant la tomate. Cependant, elles mettent en évidence une certaine adaptation, voire spécialisation, de *P. infestans* à la tomate, ainsi qu'une structuration différente des populations isolées sur une culture ou l'autre (Legard et al., 1995 ; Lebreton et Andrivon, 1998 ; Vega-Sanchez et al., 2000 ; Knapova et Gisi, 2002, Wangsomboondee et al., 2002).

Les populations pathogènes sur tomate semblent encore plus dynamiques que celles attaquant la pomme de terre, et des épidémies observées sur cette culture peuvent provenir de la dissémination d'une seule lignée clonale éphémère qui ne sera pas forcément observée

ailleurs. De plus, elles présentent un cycle biologique sensiblement différent de celui observé sur pomme de terre, caractérisé par un stade biotrophe plus prononcé (moins de biomasse, peu ou pas de nécroses), et une sporulation précoce et abondante (Fry *et al.*, 2009).

## **1.4 Contrôle du mildiou de la pomme de terre**

Plusieurs méthodes de lutte sont préconisées contre le mildiou de la pomme de terre.

### **1.4.1 Méthodes préventives et prophylactiques**

Le meilleur moyen préconisé actuellement contre le mildiou de la pomme de terre est d'abord l'utilisation de tubercules sains puis, limiter au maximum les sources d'inoculum primaire en éliminant principalement les tas de déchets, et en effectuant des rotations culturales pour éviter les infections par les oospores.

La prophylaxie contre cette maladie doit se raisonner à long terme. Il faudrait que l'ensemble des producteurs, évite de laisser pendant l'hiver, des organes contaminés susceptibles de rester vivants le pathogène et de se développer au printemps suivant (Legemble, 2008).

### **1.4.2 Lutte chimique**

L'utilisation des fongicides de contact, dont la matière active est le cymoxanil ou des fongicides systémiques pour lesquels le métalaxyl remplacé plus tard par le mefenoxam représente la matière active la plus importante et reste la principale mesure de lutte contre le mildiou de la pomme de terre (Duvauchelle et Andrivon, 1996 ; Andrivon et Lebreton, 1997).

Toutefois, l'utilisation massive des fongicides systémiques a conduit à sélectionner des isolats résistants à ces matières actives, qui appartiennent principalement au groupe des phénylamides. De plus, les effets nocifs de l'emploi des pesticides sur la santé des consommateurs et sur l'environnement amènent aujourd'hui à les utiliser d'une façon plus raisonnée. Ainsi, des systèmes de prévisions des risques ont été développés afin de rationaliser l'utilisation des traitements chimiques préventifs (Montarry, 2007). Cependant, la lutte contre le mildiou de la pomme de terre reste basée sur l'utilisation par alternance de produits chimiques de contact et systémiques, en tenant compte des conditions climatiques (Gisi et Cohen, 1996).



### 1.4.3 Lutte génétique

La meilleure alternative à l'utilisation des fongicides est la lutte génétique. De nombreux programmes reposant sur l'introduction de gènes de résistance ont été engagés, pour la sélection de variétés de bonne valeur agronomique et une bonne résistance au mildiou. Ces programmes se sont longtemps basés sur l'introduction de résistances spécifiques, à caractère monogénique. Actuellement, onze de ces gènes ont été identifiés et introduits chez *Solanum tuberosum* à partir de *S. demissum*.

Des gènes similaires ont également été identifiés chez d'autres espèces apparentées à *S. tuberosum*, telles que *S. bulbocastanum*, *S. berthaultii* ou *S. phureja*. Cependant, ces gènes sont très rapidement contournés par les populations parasites et ne peuvent constituer à eux seuls une méthode de lutte durable. Les sélectionneurs s'orientent vers la recherche de résistances polygéniques (Montarry, 2007).

### 1.4.4 Lutte biologique

Au cours des deux dernières décennies, de nombreux travaux ont été menés dans le but de rechercher des méthodes de protection du rendement plus respectueuses de la santé humaine et de l'environnement (Ngamo et Hance, 2007).

Avec l'avènement des techniques de biologie moléculaire et dans le cadre de la recherche de méthodes alternatives de protection des cultures, plusieurs laboratoires académiques et publics ainsi que des entreprises privées dans le monde, se sont intéressés au développement de la lutte biologique, associée souvent à l'utilisation de biopesticides. En effet, leur développement dont l'usage des phytopesticides, produits de la biodiversité locale, se présente aujourd'hui comme une alternative prometteuse. Dans ce sens, différents essais ont déjà mis en évidence l'action de certains extraits végétaux et des huiles essentielles contre l'agent pathogène du mildiou de la pomme de terre (Blaeser et Steiner, 1998; Neuhoff et *al.*, 2002).

Par ailleurs, le comportement de plusieurs espèces de *Phytophthora* est influencé par les micro-organismes du sol induisant soit la stimulation soit l'antagonisme (Malajczuk, 1983). Ainsi, des bactéries antagonistes de *P. infestans* telles que *Xenorhabdus bovienii* (*Enterobacteriaceae*), *Bacillus* sp., *Pseudomonas* sp. et *Streptomyces* sp., pourraient contribuer à limiter l'infection du feuillage ou des tubercules de pomme de terre (Lacey, 1965 ; Malajczuk, 1983 ; Andrivon, 1994). Selon ces auteurs, les différents mécanismes d'antagonisme mis en évidence *in vitro* ou dans le sol vis à vis du *P. infestans* sont la fongistase, la lyse structurale du champignon et la production des antibiotiques. Néanmoins,

les études de l'activité antagoniste de plusieurs bactéries, virus et champignons vis à vis du pathogène sont passés à l'expérimentation en plein champ.

Dans ce sens, l'étude menée en Allemagne par, Blaeser et Steiner (1998), a montré l'efficacité de 35 extraits de plants vis à vis du mildiou de la tomate cultivée sous serre. Ces auteurs ont rapporté que 32% des extraits ont une efficacité comprise entre 50 et 80%, alors que 5 % de ces extraits sont capables de réduire l'infection à des taux supérieurs à 80%. Les meilleurs résultats ont été obtenus avec les extraits de *Potentilla erecta* (90%) et *Salvia officinalis* (83%).

## **1.5 Utilisation des plantes dans la lutte biologique**

Les plantes ont développé des mécanismes de défense naturelle pour se protéger, bien avant que l'homme ne joue un rôle actif pour leur protection. Elles synthétisent une variété de groupes de composés bioactifs dans leurs tissus végétaux comme métabolites secondaires (Castillo *et al.*, 2010).

Le recours au monde végétal et aux molécules qui ont permis aux plantes de se protéger contre les bioagresseurs devient donc indispensable. Les substances de défense synthétisées par les végétaux sont des sources d'inspiration de plus en plus fréquentes pour la recherche de nouveaux produits phytosanitaires. Les produits naturels ou biopesticides sont de plus en plus recherchés pour une agriculture durable (Regnault-Roger, 2008).

Le choix de la lutte biologique par l'utilisation des extraits de plantes, de leurs huiles essentielles ou bien de leurs principes actifs est une solution prometteuse permettant d'éviter les effets secondaires causés par les produits chimiques (Arras et Piga 1994; Wilson *et al.*, 1997 ; Wedge *et al.*, 2000). Plusieurs travaux ont montré que beaucoup d'extraits possèdent des activités biologiques diverses, y compris antibactériennes, antifongiques, antivirales, insecticides et anti oxydantes (Sattar *et al.* 1995 ; Marinkovic et Knezevic, 2002 ; Obreshkova et Oplachenova, 2003). De nombreux auteurs ont prouvé leur pouvoir antifongique contre les agents phytopathogènes telluriques (Mazzola *et al.*, 2001 ; Smolinska *et al.*, 2003). La plupart des composés extraits des végétaux ont montré des effets sur la croissance mycélienne de plusieurs champignons phytopathogènes et sur leur sporulation et leur germination, soit à la limite un effet fongistatique pour compléter l'inhibition (Castillo *et al.*, 2010).

En effet, le pouvoir antifongique et antibactérien des extraits d'alliacées est lié principalement aux composés phénoliques et organo-sulfurés. Ainsi, l'activité antifongique des extraits à base d'ail et d'oignon était remarquable sur de nombreux champignons phytopathogènes tels que *Alternaria tenuis*, *Aspergillus niger*, *Verticillium albo-atrum* et divers *Fusarium* parmi lesquels *Fusarium oxysporum* et *Fusarium poae*.

Dans ce sens, plusieurs plantes ont été valorisées dans le cadre de la lutte contre *P. infestans* mais, les extraits à base de ciboulette chinoise (*Allium tuberosum*) étaient très efficaces contre cet agent pathogène (Blaeser et Steiner, 1998; Neuhoff *et al.*, 2002 ; Heinz *et al.*, 2006).

Les composés à large spectre antifongique appartiennent à trois grandes familles chimiques: les phénylpropanoïdes et les substances phénoliques (Cakir *et al.*, 2004; Chuang *et al.*, 2007), les terpénoïdes et les stéroïdes (Grande *et al.*, 1992), les alcaloïdes et les composés azotés (Cowan, 1999).

Il a été rapporté que cette activité dépend aussi d'autres métabolites secondaires tels que les saponosides et les huiles essentielles (Morris *et al.*, 1997; Youssef et Tawil, 1980 ; Bajpai *et al.*, 2007).

Les huiles essentielles sont obtenues par entraînement à la vapeur d'eau, par distillation sèche ou par procédés mécaniques. Elles se distinguent par leur volatilité. Leurs constituants appartiennent, de façon quasi-exclusive, à deux familles chimiques : par ordre d'importance les terpénoïdes (mono et sesquiterpènes) puis, les phénylpropanoïdes. Quelquefois, des produits de dégradation de composés non volatiles y sont également identifiés (Bruneton, 1999).

Dans ce sens, l'analyse phytochimique et l'étude du pouvoir antimicrobien des huiles essentielles de *Hypericum maculatum*, *Hypericum hyssopifolium* et *Hypericum heterophyllum* par Gudzik *et al.* (2002) et Cakir *et al.* (2004) ont permis l'identification des principaux composés à fort potentiel antibactérien et antifongique. Il s'agit des monoterpènes, des hydrocarbures sesquiterpéniques et leurs dérivés oxygénés.

Par ailleurs, la composition chimique des huiles essentielles varie considérablement en fonction de plusieurs facteurs liés à la génétique de la plante comme l'existence de chémotypes, à sa physiologie car le métabolisme secondaire de la plante n'est pas identique à tous les stades de son développement, mais aussi aux conditions pédologiques et climatiques.

Enfin le facteur humain, avec le choix de protocoles analytiques, interfère sur les constituants des huiles essentielles (Bruneton, 1999).

## 1.6 Utilisation des *Trichoderma* dans la lutte biologique

### 1.6.1 Généralités sur *Trichoderma*

Le genre *Trichoderma* regroupe un ensemble de champignons filamenteux, imparfaits et saprophytes. Il est cosmopolite, très abondant dans les sols, les humus, sur les débris végétaux en décomposition et les organes aériens des plants. Bien qu'il soit considéré comme un contaminant universel, on le reconnaît facilement en culture grâce à la couleur généralement verdâtre de ses spores et le port typique de ses phialides en forme de quilles (Howell, 2003 ; Kredics et *al.*, 2003 ; Johanne, 2005).

L'apport et l'installation d'un agent antagoniste au sein d'un écosystème nécessitent la connaissance du microorganisme, ses modes d'action et ses exigences écologiques (Bellahcene et Chet, 1990). Les espèces de *Trichoderma* sont des champignons filamenteux cosmopolites, caractérisés par leur croissance rapide, leur capacité d'utiliser divers substrats et leur résistance à des agents chimiques nocifs (Klein et Eveleigh, 1998). Ils constituent les éléments prédominants de la mycoflore des sols de divers écosystèmes (Danielson et Davey, 1973; Roiger et *al.*, 1991 ; Smith, 1995 ). En effet, Domsch et *al.* (1993) ont rapporté que les *Trichoderma* peuvent se développer à des températures allant de 15 à 35°C. Cependant, la température optimale de croissance est variable selon les espèces. Elle est de 28 à 30°C pour *T. harzianum*, et 22 à 25 C° pour *T. viride* (Danielson et Davey, 1973).

Par ailleurs, Dommergues et Mangenot (1970) ont classé les *Trichoderma* spp. parmi les microorganismes indifférents, se développant dans une large gamme de pH, comme *T. viride* qui se développe bien entre les pH 2 et 8. Selon Bellahcene et Chet (1990), les sols acides favorisent mieux leur développement.

Cependant, ces antagonistes fongiques semblent mal résister à la dessiccation. Dans le sol, les populations décroissent rapidement lorsque la teneur en eau descend au-dessous de 10 à 20% de la capacité de rétention (Davet, 1983).

Par ailleurs, Alabouvette et *al.* (1984) ont affirmé que leur développement varie selon les quantités de carbone et d'azote offertes par le milieu. L'apport de matière organique dans les sols permet donc, aux *Trichoderma* spp. et autres agents antagonistes d'y exprimer leurs capacités antagonistes.

## 1.6.2 Historique sur le genre *Trichoderma*

De sa conception comme un genre par Persoon (1794) in Bisset (1991) Pers., *Trichoderma* était représenté uniquement par la seule espèce, *T. viride* Pers.

En 1939, Bisby in Rifai (1969) avait considéré *T. viride* Pers., pour une grande partie de sa vie comme un genre, la grande majorité des rapports de *Trichoderma* a visé à cette seule espèce.

En 1969, Rifai a examiné *Trichoderma* et a proposé une taxonomie avec neuf groupes d'espèces. Il a affirmé que la plupart de ces groupes constituaient probablement plus d'une espèce morphologiquement indiscernable, bien que ce fût un progrès par rapport à la seule espèce citée dans la taxonomie de Bisby.

Entre sa première description au début du 19<sup>ième</sup> siècle et en 1984, pas plus de neuf espèces ont été incluses par Bissett dans ce genre. Il s'agit de : *T. harzianum* Rifai., *T. polysporum* (Link) Rifai, *T. piluliferum* Webster & Rifai, *T. hamatum* (Bonord.) Bainier, *T. koningii* Oudem., *T. viride* Pers., *T. artroviride* Karst., *T. pseudokoningii* Rifai et *T. longibrachiatum* Rifai. (Bissett, 1984).

Entre 1984 et 1991, le même auteur a repris la taxonomie de *Trichoderma*. Les observations microscopiques critiques l'ont amené à reconnaître environ 35 espèces, qu'il distribuait parmi les cinq sections suivantes : Section *Pachybasium*, *Trichoderma*, *Hypocreum*, *Lone Lineages* et *Longibrachiatum* (Bissett, 1991).

Les travaux de Kuhls et al. (1997) ont affirmé que la taxonomie de *Trichoderma* établie par Bissett (1984) était une bonne approximation: il y'a certainement plus de neuf espèces, bien que certains de ses groupes basés sur la morphologie, ou sections, sont monophylétiques.

D'autres auteurs ont démontré la diversité dans l'ornementation des conidies et l'ADN mitochondrial et des plasmides parmi les souches ayant des conidies verruqueuses. Ils ont fait allusion à la nécessité d'une révision taxonomique (Meyer et Plaskowitz, 1989 ; Meyer, 1991).

Lieckfeldt et al. (1999) ont élargi les études de séquençage d'ADN pour renforcer les distinctions observées par les auteurs précédents et séparés *T. asperellum* Samuels, Liechf. & Nirenberg avec des conidies finement ornées de *T. viride* Pers., qui se manifestent par des conidies verruqueuses (Samuels et al., 1999). D'autres espèces ayant des conidies verruqueuses et des conidies subglobuleuses ont été proposées par la suite par Jaklitsch et al. (2006) et Hanada et al. (2008).

Au milieu des années 1990, l'analyse des séquences d'ADN a été appliquée pour la première fois à *Trichoderma*. Les séquences d'ADN fournissent les données qui permettraient une meilleure caractérisation et identification des espèces de *Trichoderma*.

Kubicek et *al.* (2001) ont comparé les séquences d'ADN des espèces de biocontrôle identifiées comme *T. harzianum*. Sur les huit souches étudiées, la moitié ont été réidentifiées et confirmées soit comme *T. atroviride* ou *T. asperellum*. En conclusion, le faible taux de réussite dans l'identification des espèces de *Trichoderma* basée sur la caractérisation morphologique n'est pas très surprenant.

Actuellement, l'analyse des séquences d'ADN est absolument essentielle pour la description et la caractérisation des espèces. Il est possible que *Trichoderma* est le seul genre où chaque espèce est représentée par au moins un gène partiellement séquencé dans la banque de gènes.

### 1.6.3 Taxonomie des genres *Hypocrea* et *Trichoderma*

Les *Trichoderma* se présentent sous deux formes :

- La **forme parfaite** dont le genre est *Hypocrea* appartenant à la classe des *Ascomycota*, l'ordre des *Hypocreales* et la famille des *Hypocreaceae* (Bissett, 1991).
- La **forme imparfaite ou anamorphe** représentée par le genre *Trichoderma*, appartenant à la classe des *Deuteromycota*, l'ordre des *Moniliales* et la famille des *Moniliaceae* (Bissett, 1991).

Cependant, la forme *Hypocrea* est rarement observée en culture (Samuels et *al.*, 1994 ; Chaverri et *al.*, 2001).

La taxonomie des formes téléomorphes (*Hypocrea*) et anamorphes (*Trichoderma*) est assez difficile et complexe en raison de la plasticité des caractères morphologiques.

En effet, les méthodes moléculaires, basées sur le polymorphisme des séquences d'ADN et leur amplification par PCR, se sont montrées très utiles dans la caractérisation des isolats de ce genre, tant dans les études d'identification (Hjeljord et Tronsmo, 1998) que dans l'élaboration de classifications phylogénétiques (Kullnig - Gradinger *al.*, 2002).

Les ADNr sont organisés en domaines d'unités invariables répétées en tandem. Une unité est constituée des trois plus grands gènes d'ARNr (18S, 5.8S, 28S) séparés par deux espaceurs internes transcrits (ITS). Chaque unité est séparée d'une autre unité par un espaceur intergénique non transcrit (IGS) (Figure 5) (Bruns et *al.*, 1991 ; Henson et French, 1993).

On retrouve entre 60 à 200 copies des répétitions en tandem par génome haploïde chez les champignons (Bruns et *al.*, 1991).

De grandes variations génétiques sont trouvées dans les ITS car leur évolution est plus rapide que les portions géniques. Les ITS permettent de différencier les espèces à l'intérieur d'un genre ou parmi une population. L'analyse des ITS de plusieurs espèces de champignons a permis de conclure à la validité ou non de l'emploi des critères morphologiques utilisés dans l'identification des espèces et la classification des champignons (Henson et French, 1993 ; White et *al.*, 1990).



**Figure 5. Schéma de l'unité de transcription ribosomique de l'ADNr chez les champignons filamenteux (Dlauchy et *al.*, 1999 ; Fernandez- Espinar et *al.*, 2000)**

Ainsi, l'utilisation de marqueurs moléculaires phylogénétiques a affiné la taxonomie des genres *Hypocrea* et *Trichoderma* de manière significative. On distingue 5 sections où chacune d'elles peut présenter 1 à 6 groupes, dont chacun peut renfermer les genres et les espèces téléomorphes et/ou anamorphes (Figure 6) (Druzhinina et Kubicek 2005).

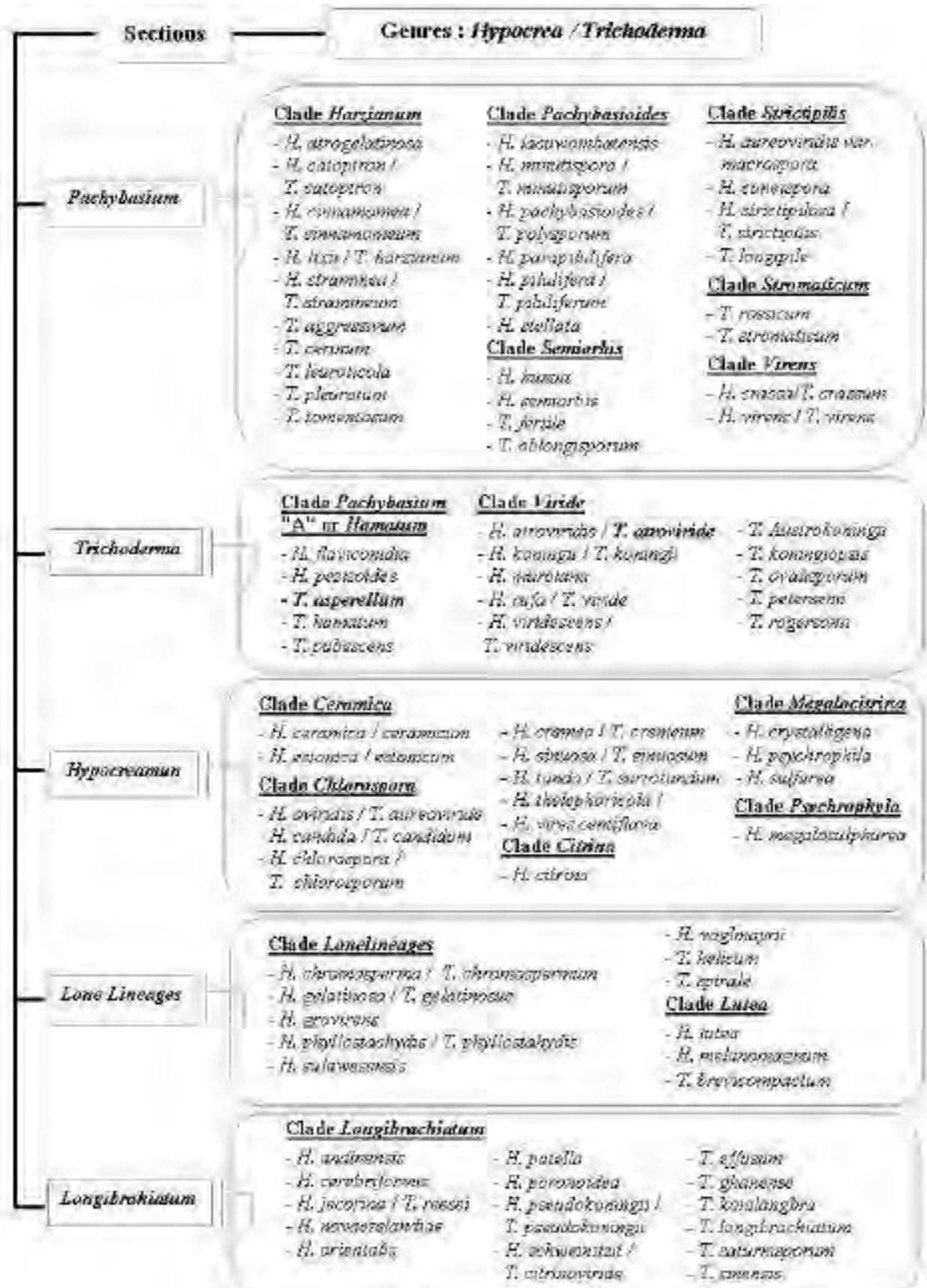


Figure 6. Sections systématiques des genres téléomorphes (*Hypocrea*: *H.*) et anamorphe : (*Trichoderma* : *T.*), International sub commission on Trichoderma and Hypocrea (ISTH) (isth.info/biodiversity/index.php »



#### **1.6.4 Importance des *Trichoderma***

Ce genre de champignons affiche un remarquable éventail de modes de vie et des interactions avec d'autres champignons, des animaux et des plantes.

Certaines espèces sont économiquement importantes par leur aptitude à la production d'enzymes industrielles (Sivasithamparam et Ghisalberti, 1998) et des antibiotiques (Harman et Kubicek, 1998). Dans ce sens, *Hypocrea jecorina* / *Trichoderma reesei* est un producteur d'importance économique de cellulases et d'hémicellulases. Elles sont utilisées pour l'expression de protéines hétérologues (Kubicek et Penttilä, 1998).

En revanche, il y'a aussi des effets négatifs de *Trichoderma*. En raison de leur potentiel élevé cellulolytique ; ils dégradent les tissus de coton. De même, des souches de *T. aggressivum* sont pathogènes sur les champignons commerciaux comme *Agaricus* et *Pleurotus* (Seaby, 1996). Plus récemment, *T. reesei* Simmons. a été signalé comme un agent pathogène opportuniste des mammifères y compris les humains immunodéprimés (Kredics et al., 2003).

D'autres espèces de *Trichoderma* ont prouvé leur capacité à parasiter les champignons pathogènes par la concurrence pour les nutriments et l'espace. Elles peuvent agir aussi par la production de métabolites secondaires toxiques, ou par des enzymes lytiques qui, décomposent les polysaccharides de la paroi cellulaire en oligomères courts. Par ce moyen, elles facilitent l'hyperparasitisme pour pénétrer dans le cytoplasme des champignons cibles.

Dans ce contexte, *H. lixii* Pat. / *T. harzianum* Rifai., *H. atroviridis* Dodd, Lieckf. & Samuels/ *T. atroviride* Karst. et *T. asperellum* Samuels, Lieckf. & Nirenberg. sont appliqués comme agents de lutte biologique contre les champignons pathogènes des plantes pour une grande variété de cultures et de climats (Hjeljord et Tronsmo 1998 ; Harman, 2000).

Par ailleurs, la colonisation racinaire des *Trichoderma* est largement démontrée pour améliorer aussi la croissance et le développement des racines, la productivité des cultures, leur résistance aux stress abiotiques et l'adoption et l'utilisation des nutriments (Kubicek et Harman, 1998).

#### **1.6.5 Biocontrôle par *Trichoderma***

Les propriétés antagonistes du genre *Trichoderma* sont connues depuis longtemps puisque la première publication qui en fait mention date de 1887 citée dans Krafft et al. (1981). Il a été utilisé comme agent de lutte biologique contre un large spectre de phytopathogènes. Son antagonisme se manifeste généralement soit par une compétition, par un mycoparasitisme, ou

par une antibiose. Ces mécanismes peuvent intervenir seuls, en association ou séquentiellement (Lepoivre, 2003).

La recherche sur les activités antagonistes du genre *Trichoderma* a progressé, depuis la découverte en 1932 de *T. lignorum* (révélé plus tard comme *T. atroviride*). Cette espèce agit comme un parasite sur d'autres champignons. De nombreuses autres espèces de *Trichoderma* principalement *T. harzianum* Rifai, *T. viride* Pers. et *T. asperellum* Samuels, Lieckf. & Nirenberg (Figure 7) sont utilisées dans la lutte biologique contre de nombreux champignons phytopathogènes (Weindling, 1932 in Schuster et Schmoll, 2010).

#### **1.6.5.1 *T. asperellum* Samuels, Lieckf. & Nirenberg**

Les colonies sont à croissance radiale de 7 à 64 mm de diamètre à 30°C après 72 h de croissance mycélienne à l'obscurité sur milieu PDA. Le mycélium est aérien avec absence de pigment jaune diffusant dans le milieu et aucune odeur dégagée par la culture. La sporulation est dense, organisée sous forme de 5 anneaux concentriques avec des conidies vert foncé vers le centre et d'autres qui, commencent à peine à se former vers la marge (Samuels et al., 1999).

La formation de pustules est abondante pour toute la colonie sur les milieux CMD et SNA après 5 jours à 20°C, en alternance de périodes égales d'obscurité et de la lumière blanche. Elles sont discrètes ou confluentes montrant des conidies d'abord jaunes pour devenir rapidement vertes. Leur diamètre est de 0,5 à 2,0 mm (Samuels et al., 1999).

Les conidiophores sont produits dans les pustules sur milieu CMD, rarement dans le mycélium aérien. Ils ont un aspect symétrique se terminant par deux ou plusieurs phialides.

Les branches primaires découlant au-dessous de la pointe sont souvent jumelés et en projetant près de 90° à l'axe principal. Il est de 1.7 à 7,0 µm de largeur (Samuels et al., 1999).

Les phialides sont généralement produites à l'extrémité des branches primaires, secondaires et tertiaires, rarement directement le long de la longueur des branches. Elles sont habituellement en verticilles de 2 à 4, droites, ampulliformes, seulement légèrement élargie au milieu, de (4.6- 27,5µm) x (2.0- 6.8µm) de dimensions. Les conidies sont de couleur vert foncé, globuleuses à subglobuleuses, finement spinuleuses (l'ornementation peut être difficile à voir avec un microscope optique), de (2.8-7,0) x (2,5-6,0) µm de dimensions (Figure 7c) (Samuels et al., 1999).

Les chlamydospores sont abondantes sur milieu CMD au cours de 7 jours, à 20 °C et à l'obscurité. Elles sont en position terminales ou rarement intercalaires, sur les hyphes

immergés, subglobuleuses à ovoïdes, lisses, vert pâle et de 4.5 à 15µm de diamètre (Samuels et *al.*, 1999).

#### **1.6.5.2 *T. harzianum* Rifai.**

Les colonies sont à croissance radiale de 51 à 57 mm de diamètre sur milieu PDA après 72 h à 25° C. La sporulation est très dense de couleur verte, abondante au centre et en anneaux concentriques ondulés vers le bord. Aucune pustule n'est formée (Morphological key- ISTH.info).

Sur milieu CMD, La boîte de Pétri est couverte de conidies de couleur vert foncé après 96 h de croissance mycélienne à 30 °C et à l'obscurité. Les spores sont dispersées de manière uniforme à l'exception du centre de la colonie qui reste stérile, peu tendance à former des pustules cotonneuses mal formées. La sporulation est d'abord jaune puis, devient jaune-vert; souvent avec pigment jaune diffusant dans le milieu.

Les conidiophores sont typiquement présentés en paires de branches formant plus de 150 µm de la longueur. Les branches terminales et les branches secondaires sont perpendiculaires à l'axe principal (Figure 7d1) (Morphological key- ISTH.info).

Les phialides sont généralement présentées en 2 à 4 verticilles perpendiculaires aux hyphes dont elles sont issues, ou solitaires, de (6,5-6,7)X(1.6-4,5) µm de dimensions. Celles en verticilles sont généralement en forme de bouteilles, agrandies au milieu, fortement resserrées au-dessous de la pointe pour former un col étroit et légèrement resserrées à la base. Les phialides terminales sont à la forme d'un cornet ou solitaires, généralement cylindriques (Figure 7 d1). Les conidies sont subglobuleuses à ovoïdes de (2.0-5,0) x (1.8-4,0) µm de dimensions, lisses et vertes (Figure 7 d2) (Morphological key- ISTH.info).

Les chlamydospores ne sont pas observées dans la plupart des cultures. Elles sont globuleuses à subglobuleuses terminales ou intercalaires de 4.0 à 15.0 µm de dimensions (Morphological key- ISTH.info).

#### **1.6.5.3 *T. atroviride* Karst.**

Les colonies sont à croissance radiale de 21.7 à 61,3mm de diamètre à 25°C après 72 h sur milieu PDA. Les cultures sont fortement délimitées avec un disque central plus ou moins dense au sein duquel la forme conidienne est plus abondante et aucune pustule n'est observée après 96 h d'incubation à 30 °C. La sporulation de couleur verte apparaît généralement dans les 57 et 66 heures mais, les pustules sont absentes ou peu fréquentes. Après 96 h, à l'obscurité et à 30 ° C sur milieu CMD, la sporulation se forme dans une zone de 4 cm de

diamètre de la colonie. Elle est uniformément dispersée, avec absence de pustules confluentes ou denses et absence de pigment diffusant dans la gélose. Une odeur douce de noix de coco est remarquée sur les milieux CMD et PDA (Morphological key- ISTH.info).

Les conidiophores présentent une ramification généralement unilatérale. Les paires de branches sont communes (Figure 7 a1). Les phialides sont de (4.2-15,0) X (1.8-4,8)  $\mu\text{m}$  de dimensions. Elles peuvent être droites ou sinueuses, parfois groupées en verticilles en nombre de 2 à 4, souvent solitaires. La phialide terminale est à un seul verticille. Celles qui sont solitaires, sont cylindriques et souvent rétrécies seulement en dessous de la pointe pour former un col étroit. Les phialides formées au-dessous de la partie terminale sont généralement en forme de bouteille agrandie au milieu, resserrée à la pointe et légèrement à la base. Les cellules de soutien des phialides sont légèrement plus larges que la base des phialides. On note l'absence de phialides intercalaires (Figure 7 a1) (Morphological key- ISTH.info).

Les conidies sont vertes, subglobuleuses à ovoïdes, faute d'une abscission basale une cicatrice est visible. Elles sont lisses et de (2.7-5,0) x (2.3-4,0)  $\mu\text{m}$  de dimensions (Figure 7 a2) (Morphological key- ISTH.info).

Les chlamydospores sont abondantes sur milieu CMD au 7<sup>ième</sup> jour. Elles sont globuleuses à subglobuleuses, terminales ou intercalaires de 5.2 à 16,3  $\mu\text{m}$  de diamètre (Morphological key- ISTH.info).

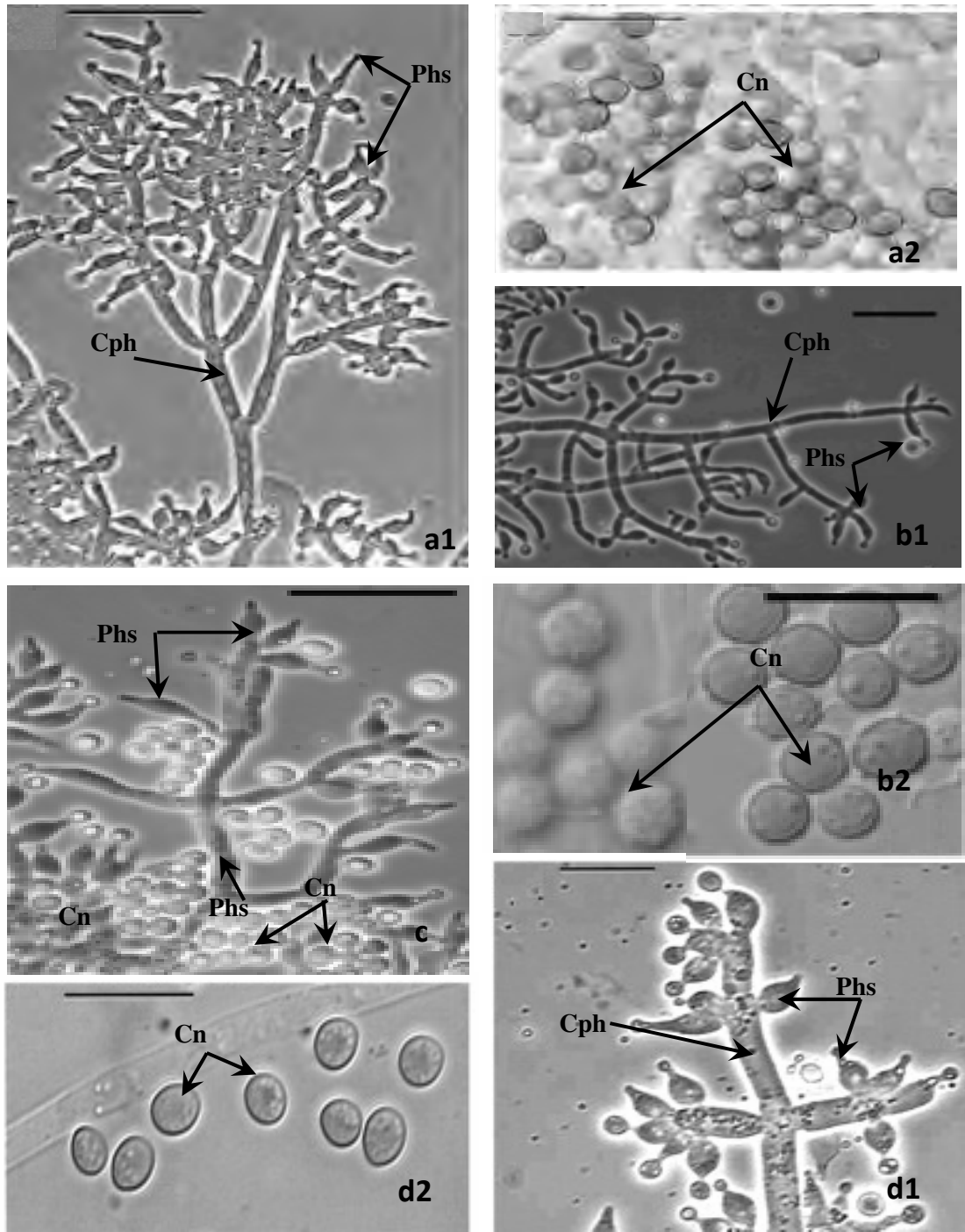
#### **1.6.5.4 *T. viride* Pers.**

Les colonies sont à croissance radiale d'un diamètre de 30 à 40 mm à 25 °C, à l'obscurité après 72h sur milieu PDA. La forme conidienne est abondante dans des anneaux concentriques bien visibles. On note l'absence de pigment diffusible. Parfois une odeur "de noix de coco douce est dégagée (Morphological key- ISTH.info).

Les conidiophores développés sur milieu CMD, présentent un axe central fertile de 100 à 150  $\mu\text{m}$  de long, avec des branches latérales appariées ou non et généralement liées à un angle près de 90 ° par rapport à sa branche d'appui. Les branches latérales sont parfois largement espacées près de la pointe du conidiophore (Figure 7 b1).

Les pustules présentent un diamètre de 0,5 à 1,0 mm sur milieu CMD. Elles sont de forme hémisphérique, à aspect cotonneux uniforme. Elles sont généralement en saillie des conidiophores terminales fertiles (Morphological key- ISTH.info). Les phialides découlant individuellement à partir de l'axe principal sont groupées en 2 à 3 en verticilles à l'extrémité des branches latérales ou à la pointe du conidiophore. L'axe central est de 1.7 à 4,5  $\mu\text{m}$  de largeur (Figure 7 b1). Les conidies sont de couleur vert foncé, subglobuleuses sur milieu

CMD, de  $(3,0-5,0) \times (2,7-4,8) \mu\text{m}$  de dimensions (Figure 7 b2) (Morphological key-ISTH.info). Les chlamydospores sont généralement absentes sur milieu CMD. Elles sont globuleuses à subglobuleuses de  $8,0$  à  $16,0 \mu\text{m}$  de diamètre (Morphological key-ISTH.info).



**Figure 7. Morphologie des principales espèces du genre *Trichoderma* agents de biocontrôle des maladies fongiques**

- a1 et a2 : *T. atroviride* - a1 :  $25 \mu\text{m}$ , a2 =  $10 \mu\text{m}$  (Samuels et al., 2002) – b1 et b2 : *T. viride*, b1 et b2 :  $10 \mu\text{m}$  (Jaklitsch, 2006) ; c : *T. asperellum*, c :  $20 \mu\text{m}$  (Samuels et al., 2010) - d1 et d2 : *T. harizianum*, d1 et d2 :  $10 \mu\text{m}$  (Samuels et al., 2002)

### **1.6.6 Modes d'action des *Trichoderma* spp.**

Les propriétés antagonistes de *Trichoderma* ont été associées à des mécanismes d'action tels que la production d'antibiotiques ( Ghisalberti et Sivasithamparam, 1991 ; Rubio et *al.*, 2009) des enzymes hydrolytiques (Benítez et *al.*, 2004), des métabolites volatiles et non-volatiles (Harman et *al.*, 2004 ; Vinale et *al.*, 2008; Stoppacher et *al.*, 2010). et la concurrence pour l'espace et les éléments nutritifs (Elad, 2000). Il est également connu que ces champignons ont la capacité d'interagir avec des plantes en, induisant leur résistance aux stress biotiques et abiotiques et la stimulation de leur croissance (Kuc, 2001; Harman et *al.*, 2004).

#### **1.6.6.1 Compétition pour les nutriments et l'espace**

*Trichoderma* spp. a une forte capacité à utiliser et métaboliser les nutriments du sol, qui le rend plus compétitif à de nombreux micro-organismes telluriques (Benitez et *al.*, 2004; Harman et *al.*, 2006).

#### **1.6.6.2 Mycoparasitisme**

Ce dernier se traduit par le chimiotropisme où *Trichoderma* sp. perçoit la présence de son hôte, ses hyphes se dirigent directement vers lui. La reconnaissance se manifeste par une adhésion du mycoparasite aux parois de son hôte.

La libération des oligomères de la paroi fongique du champignon cible sous l'effet des exochitinasés de l'agent antagoniste induit l'activité des endochitinasés qui attaqueront le champignon pathogène avant le contact (Viterbo et *al.*, 2004; Brunner et *al.*, 2003).

L'attachement se fait par la liaison d'une agglutine du champignon pathogène à certains glucides des parois de *Trichoderma* sp. Ce dernier s'enroule autour de l'agent pathogène et forme des appressoriums (Benitez et *al.*, 2004).

L'entrée des hyphes de *Trichoderma* dans les hyphes du parasite est favorisée par la production des enzymes lytiques et des peptaïbols. D'autres enzymes extracellulaires (lipases et protéases) sont également sécrétées pour faciliter la lyse et la digestion du contenu cellulaire de l'hôte (Howell, 2003).

#### **1.6.6.3 Antibiose et Métabolites secondaires**

L'antibiose est le processus de sécrétion des composés antimicrobiens par les champignons antagonistes (Verma et *al.*, 2007). Les *Trichoderma* sp. produisent des antibiotiques potentiels mais aussi des mycotoxines et plus de 100 métabolites à activité antibiotique, y compris des polycétides, pyrones, terpènes, des métabolites dérivés des acides aminés et des polypeptides.

Ces métabolites ont été classés en trois catégories par Ghisalberti et Sivasithamparam (1991) : les peptaïbols, les métabolites volatils et non volatils.

- **Les peptaïbols** sont des oligopeptides linéaires constitués de 12 à 22 acides aminés riches en acide  $\alpha$ -amino-isobutyrique, N-acétylé à l'extrémité N-terminale et contenant un amino-alcool (Pheol ou Trpol) à l'extrémité C-terminale (Le Doan et *al.*, 1986; Rebuffat et *al.*, 1989).

- **Les métabolites volatils** dont le plus important est le 6-n-pentyl-2H-pyran-2-one (6-PAP), un polyketide avec un doux arôme caractéristique de noix de coco et la plupart des dérivés d'isocyanure. D'autres métabolites volatils sont principalement affectés à des alcools, cétones, alcanes, furannes et mono- et sesquiterpènes (Vizcaino et *al.*, 2005, Stoppacher et *al.*, 2010).

- **Les métabolites non volatils** sont des composés solubles dans l'eau, à savoir l'acide heptelidique ou koningique (Blumenthal, 2004 ; Vinale et *al.*, 2008).

# *Chapitre 2*

## **MATERIEL ET METHODES**



## **2. MATERIEL ET METHODES**

L'étude de la lutte biologique contre le mildiou de la pomme de terre vise la sélection des plantes ou de leurs extraits ainsi que, les isolats antagonistes les plus performants sur *P. infestans*. Elle permet également le choix judicieux de leur forme et modes d'application pour leur utilisation dans la gestion du mildiou de la pomme de terre en Algérie. Elle est donc basée sur l'étude de l'activité antifongique des plantes et leurs extraits ainsi que l'activité antagoniste de quelques isolats de *Trichoderma* spp. d'Algérie, sur *P. infestans* (Mont.) de Bary.

### **2.1 Activité antifongique des plantes et de leurs extraits**

#### **2.1.1 Activité antifongique des huiles essentielles d'agrumes et de sauge à l'égard du mildiou de la pomme de terre**

Ce présent travail se base sur l'extraction et l'analyse des huiles essentielles puis, l'étude du pouvoir antifongique *in vitro* et *in vivo* des huiles essentielles sur *P. infestans*.

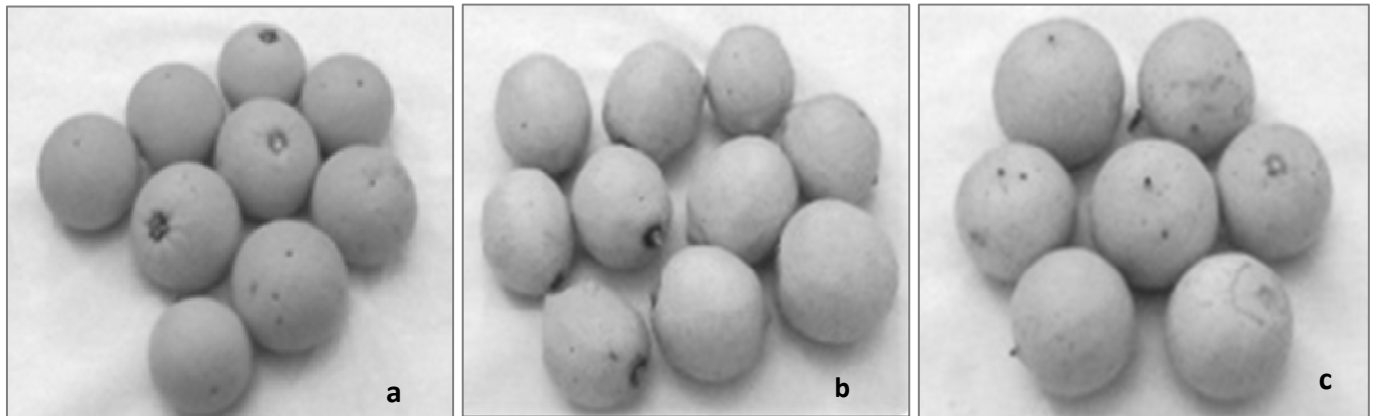
##### **2.1.1.1 Matériel biologique**

Le matériel biologique est composé d'un matériel végétal pour l'extraction des huiles essentielles d'agrumes et de sauge, des feuilles saines détachées de la variété «Spunta» de pomme de terre et du matériel fongique pathogène.

###### **2.1.1.1.1 Matériel végétal**

Les huiles essentielles d'agrumes et de sauge sont obtenues par hydro-distillation respectivement des péricarpes frais des trois espèces d'agrumes: *Citrus sinensis* Cadenera, *C. limon* Eureka et *C. bergamia* Castagnaro, prélevés du marché local de Boufarik (Figure 8) et de la partie feuillue de *Salvia officinalis* L. (Figure 9) récoltée du jardin de l'Université de Blida 1 durant le mois de Mars 2011, après séchage plusieurs semaines à la température ambiante, à l'air libre et à l'abri de la lumière. Le choix des plantes est basé sur les données rapportées par la bibliographie. Des travaux ont montré leur pouvoir antimicrobien contre des agents pathogènes dans le secteur médical ou parfois sur des agents pathogènes des plantes mais jamais sur le *P. infestans*. De même, l'évaluation de l'activité antifongique des huiles essentielles d'agrumes à partir des péricarpes de fruits frais représente un travail original. D'autant plus que leur analyse chimique par CG-SM révèle une composition chimique assez proche en ce qui concerne les éléments majeurs (Mishra et Dubey, 1994 ; Wilson et al., 1997 ;

Youssef et Tawil, 1980 ; Inouye et *al.*, 1998 ; Jazet-Dongmo et *al.* , 2002 ; Barra et *al.*, 2007; Demo et Oliva, 2008).



**Figure 8. Morphologie des fruits des trois espèces d'agrumes**  
a : *Citrus sinensis* Cadenera ; b : *Citrus limon* Eureka ; c : *Citrus bergamia* Castagnaro



**Figure 9. Aspect morphologique de la partie feuillue de *Salvia officinalis* L.**

En second lieu, des feuilles détachées de la variété *Spunta* de la pomme de terre, sont récoltées dans un champ expérimental de la station régionale de Boufarik, de l'Institut national de protection des végétaux.

#### **2.1.1.1.2 Matériel fongique**

Le matériel fongique est isolé à partir de feuilles malades de plants de pomme de terre prélevés et identifiés comme deux isolats de *Phytophthora infestans* A1 et A2, respectivement, des deux régions productrices de pomme de terre: El Abadia (Ain Defla) et Bourkika (Tipasa).

#### **2.1.1.2 Extraction et analyse des huiles essentielles d'agrumes**

L'extraction des huiles essentielles étudiées est réalisée au laboratoire de recherche des plantes médicinales et aromatiques du département des Biotechnologies de l'Université de Blida 1. Pour cela, 200 g de péricarpes de fruits frais des trois espèces d'agrumes et la partie aérienne séchée de la sauge sont soumis séparément à l'hydro-distillation avec un appareil de type Clevenger selon la Pharmacopée européenne et extraits avec 2000 ml d'eau pendant 3 heures (jusqu'à l'épuisement total des huiles essentielles dans le végétal). L'huile essentielle de chaque espèce végétale est recueillie, déshydratée par le sulfate de sodium anhydre et conservée à 4 °C jusqu'à son utilisation.

L'analyse chimique n'a pu être réalisée que pour les huiles essentielles d'agrumes au niveau du laboratoire de Recherche en Eco-extraction des produits naturels (Green), Université d'Avignon et pays de vaucluse.

Elle est faite par chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse (CG-SM) (système informatique Hewlett-Packard comprenant un chromatographe 6890 gazeuse couplée à un spectromètre de masse 5973A) en utilisant deux colonnes en verre de silice-capillaire avec différentes phases stationnaires. La colonne non polaire est HP5MSTM (30 m x 0,25 mm x 0,25 µm d'épaisseur de film) et la colonne polaire est constituée par un StabilwaxTMCarbodawaxTM-PEG (60 m x 0,2 mm x de 0,25 mm d'épaisseur de film). Les spectres CG-SM sont obtenus en utilisant les conditions suivantes:

Gaz porteur He ; débit de 0,3 mL/min ; split-Mode moins; volume d'injection de 1 ; température d'injection de 250 °C ; le programme de température du four est de 60 °C pendant 8 min a augmenté à 2 °C/min à 250 °C et maintenu à 250 °C pendant 15 min; le mode d'ionisation utilisé est l'impact électronique à 70 eV.

Le pourcentage relatif des composants est calculé par voie électronique à partir de surfaces de pic GC-FID. Un Hewlett-Packard 6890 GC-FID système est utilisé pour l'analyse de Chromatographie en phase gazeuse, muni d'une colonne de silice condensé avec un capillaire HP5MSTM de phase stationnaire apolaire (30 m x 0,25 mm x 0,25 µm d'épaisseur de film). Le programme de température de la colonne est de 60 °C pendant 8 min est à augmenter à 2 °C/min jusqu'à 250 °C pour le maintenir à cette température pendant 15 min. L'injection est effectuée à 250 °C au mode split-less où, 1 µl d'échantillon est injecté et un débit de 0,3 ml/min de gaz porteur (N2) est utilisé. La détection à ionisation de flamme est effectuée à 320 °C.

La plupart des électeurs sont provisoirement identifiés par comparaison de leurs indices GC Kovats de rétention (RI), déterminés en référence à une série homologue de C5-C28 n-alcanes et avec celles des normes authentiques disponibles dans le laboratoire d'analyse.

L'identification est confirmée lorsque cela est possible par comparaison de leurs modèles de fragmentation spectrales de masse avec ceux stockés dans la base de données MS (Institut National des Normes et de la Technologie et Bibliothèques Wiley) et avec les données de la littérature de spectres de masse.

### **2.1.1.3 Activité antifongique *in vitro* des huiles essentielles sur *Phytophthora infestans***

L'activité antifongique *in vitro* des huiles essentielles d'agrumes et de sauge repose sur leur pouvoir inhibiteur et leur pouvoir fongicide sur *P. infestans*. Elle est basée sur la technique de contact direct.

#### **2.1.1.3.1 Technique de contact direct**

Cette technique décrite par Pandey et *al.* (1982), consiste à préparer puis stériliser un milieu solide à base de petits pois agar, ainsi qu'une solution d'eau-agar à 0.2 %, avec laquelle on prépare des émulsions d'huiles essentielles étudiées aux dilutions 1/100<sup>ième</sup>, 1/10<sup>ième</sup>, et pures correspondant respectivement à D3, D2 et D1 pour les huiles essentielles d'agrumes et 1/100<sup>ième</sup>, 1/50<sup>ième</sup>, 1/10<sup>ième</sup>, et extrait pure désignés respectivement D1, D2, D3 et D4 pour l'huile essentielle de sauge.

De chaque émulsion d'huile essentielle, 1,5 ml sont prélevés et versés dans les boites de Pétri stériles dans lesquelles sont rajoutés 13,5 ml du milieu PPA en surfusion. L'ensemble des boites ainsi préparées sont légèrement agitées pour homogénéiser le milieu. D'autre part, des boites de Pétri contenant le milieu PPA frais seul constituent les témoins. En effet, cinq

répétitions sont prises en considération pour chaque émulsion d'huile essentielle préparée et chaque isolat phytopathogène. Après solidification du milieu contenant les principes volatiles des huiles essentielles, ainsi que les milieux des témoins, l'expérience est complétée par le repiquage séparément des deux isolats de *P. infestans* à traiter sur l'ensemble des boîtes.

Le repiquage consiste à prélever un explant de 5 mm de diamètre puis le déposer au centre des boîtes de Pétri; ces dernières sont entourées par du parafilm. Leur incubation se fait dans une étuve réglée à la température de 20°C.

### **2.1.1.3.2 Evaluation de l'activité antifongique *in vitro* des huiles essentielles**

La croissance mycélienne est déterminée après 7 jours, par la mesure du diamètre des colonies des isolats fongiques développés sur milieu PPA traité par les émulsions d'huiles essentielles et celui des témoins.

Les taux d'inhibition de la croissance mycélienne des isolats de *P. infestans* sont déterminés selon la formule de Pandey *et al.* (1982) et Greche et Hajjaji (2000) :

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

I : Taux d'inhibition de la croissance mycélienne des isolats fongiques en %.

DT : croissance mycélienne des isolats fongiques témoins (mm).

Dt : croissance mycélienne moyenne des isolats fongiques développés dans le milieu en présence d'huile essentielle (mm).

Après une période de croissance de 21 jours à la température de 20°C, dans chaque boîte de culture des isolats A1 et A2 de *P. infestans* développés sur milieux traités et témoins, 15 ml d'eau distillée stérile sont versés puis raclés à l'aide d'une pipette pasteur stérile pour récupérer séparément les suspensions sporangiales dans des tubes à essai stérilisés. Ces derniers sont soumis à l'agitation à l'aide d'un agitateur de tubes vortex. Les suspensions sporangiales des isolats A1 et A2 de *P. infestans* traités par les différentes huiles et aux différentes dilutions, ainsi que ceux des témoins ont fait l'objet de détermination de la concentration en sporanges à l'aide d'une cellule de Malassez. Ainsi, cinq répétitions sont réalisées pour chaque souche fongique, chaque huile essentielle et pour chaque concentration, afin de calculer les taux d'inhibition de la sporulation selon la formule de Pandey *et al.* (1982) et Greche et Hajjaji (2000) :

$$IS (\%) = \frac{(ST - St)}{ST} \times 100$$

- IS : Taux d'inhibition de la sporulation en %.
- ST : Concentration en sporanges de l'inoculum témoin (Nombre de sporanges/ml).
- St : Concentration en sporanges de l'inoculum traité par les huiles essentielles (Nombre de sporanges/ml).

En outre, des observations microscopiques directes des cultures sont réalisées au grossissement (X125) pour comparer les structures morphologiques des champignons témoins et ceux traités par les huiles essentielles d'agrumes et de sauge aux différentes concentrations.

Par ailleurs, le pouvoir fongicide des huiles essentielles d'agrumes et de sauge précédemment testées est évalué par la technique modifiée de Mahanta *et al.* (2007).

Ce test repose sur la reprise ou l'inhibition de la croissance mycélienne des isolats de *P. infestans* préalablement inhibées par ces huiles essentielles aux différentes concentrations. Cela consiste à remettre des explants des isolats de *P. infestans* précédemment inhibés sur milieu PPA frais en conservant les mêmes conditions d'incubation précédentes. La lecture est suivie quotidiennement et prolongée jusqu'à 20 jours (Greche et Hajjaji, 2000).

#### **2.1.1.4 Activité antifongique *in vivo* des huiles essentielles d'agrumes et de sauge sur *Phytophthora infestans***

Le pouvoir antifongique *in vivo* est basé sur le test des disques foliaires de pomme de terre. Il consiste à inoculer des disques foliaires traités séparément par trempage et par pulvérisation respectivement pour les émulsions d'huiles essentielles d'agrumes et l'huile essentielle de sauge, ainsi que les disques foliaires témoins, par chacun des deux isolats A1 et A2 de *Phytophthora infestans*.

Cette étude se déroule en trois étapes essentielles.

##### **2.1.1.4.1 Préparation des disques foliaires de pomme de terre**

Dans une petite parcelle expérimentale de culture de la pomme de terre de la station régionale de l'INPV de Boufarik, installée dans le cadre de la recherche sur le mildiou de la pomme de terre, des feuilles saines de même âge de la variété « Spunta » sont récoltées puis découpées à l'aide d'un emporte pièces en disques uniformes ayant un diamètre de 40 mm.

#### 2.1.1.4.2 Traitements et inoculations

Des suspensions sporangiales sont préparées à partir des cultures pures des deux isolats A1 et A2 de *P. infestans* âgées de trois semaines. La sporulation est déterminée pour chaque souche traitée ou témoin comme précédemment. Les suspensions ainsi préparées sont ajustées par de l'eau distillée stérile à une concentration de l'ordre de  $3 \times 10^5$  sporanges.ml<sup>-1</sup>.

Dans des boîtes en plastiques, transparentes et stériles, sont déposés, respectivement, du papier filtre préalablement stérilisé et du grillage en plastique à la taille des boîtes. Après avoir imbibé le papier filtre par de l'eau distillée stérile, les feuilles détachées de pomme de terre sont découpées en disques et placées en nombre de 5 par boîte.

Les disques foliaires de chaque boîte sont soumis au trempage dans les émulsions d'huiles essentielles d'agrumes durant une minute puis placés sur la face supérieure dans les boîtes préalablement préparées. En parallèle, d'autres disques foliaires de pomme de terre sont pulvérisés par les émulsions d'huile essentielle de sauge. Ainsi, l'inoculation se fait sur la face inférieure par le dépôt de 5µl de suspensions sporangiales de l'ordre de  $3 \times 10^5$  sporanges.ml<sup>-1</sup> des isolats A1 et A2 de *P. infestans*.

En outre, une boîte est consacrée aux témoins négatifs inoculés par de l'eau distillée stérile, et une autre boîte aux témoins positifs inoculés par les isolats fongiques. Après 24 heures d'inoculation, l'ensemble des disques foliaires sont retournés, la face supérieure vers le haut. L'incubation des boîtes se fait à 20°C pendant 4 jours.

#### 2.1.1.4.3 Evaluation *in vivo* de l'activité antifongique des huiles essentielles

La lecture des résultats a porté sur le pouvoir pathogène des isolats de *P. infestans* exprimé en pourcentage de superficie infectée par le mildiou de la pomme de terre. Ainsi, sont déterminés les taux d'inhibition d'infection selon la formule décrite par Notteghem et *al.* (1980) ; Hill et Nelson (1983) :

$$\text{Inf} (\%) = \frac{(\text{Inf T} - \text{Inf t})}{\text{Inf T}} \times 100$$

- Inf : Taux d'inhibition d'infection des disques foliaires en %.
- Inf T : Surface infectée des disques foliaires témoins en %.
- Inf t : Surface infectée des disques foliaires traités par les huiles essentielles d'agrumes en %.

## **2.1.2 Activité antifongique d'une gamme de préparations à base de plantes à l'égard du mildiou de la pomme de terre**

Cette étude se base sur l'activité antifongique *in vitro* et *in vivo* des préparations à base de plantes sur *P. infestans*. Elle nécessite l'utilisation d'un matériel biologique composé d'un matériel végétal pour la préparation des poudres et des extraits aqueux de plantes, des feuilles saines détachées de deux variétés de pomme de terre et d'un matériel fongique pathogène.

### **2.1.2.1 Matériel biologique**

#### **2.1.2.1.1 Matériel végétal pour le traitement**

Ainsi, les parties feuillues des huit espèces végétales à savoir; l'ortie (*Urtica dioica* L.), la prêle des champs (*Equisetum arvense* L.), la sauge (*Salvia officinalis* L.), le pacanier (*Carya illinoensis* L.), le romarin (*Rosmarinus officinalis* L.), le pistachier lentisque (*Pistacia lentiscus* L.), la menthe odorante (*Mentha suaveolens* L.), ainsi que la plante marine : la posidonie de Méditerranée (*Posidonia oceanica* L.) sont retenues pour notre étude (Figure 10). Le choix des plantes a été basé sur des travaux rapportés par la bibliographie dont, certains ont signalé leur pouvoir antimicrobien contre certains agents phytopathogènes autres que le *P. infestans* alors que, d'autres ont confirmé leur efficacité envers cet agent redoutable selon, des préparations et des modes d'application bien déterminés (Oumzil et al., 2002 ; Kordali et al., 2003 ; Mekuria et al., 2005 ; Bertrand et al., 2007 ; Webster et al., 2008 ; Hadizadeh et al., 2009 ; Hernández-Castillo et al., 2010 ; Dellavalle et al., 2011 ; Kouki et al., 2012).

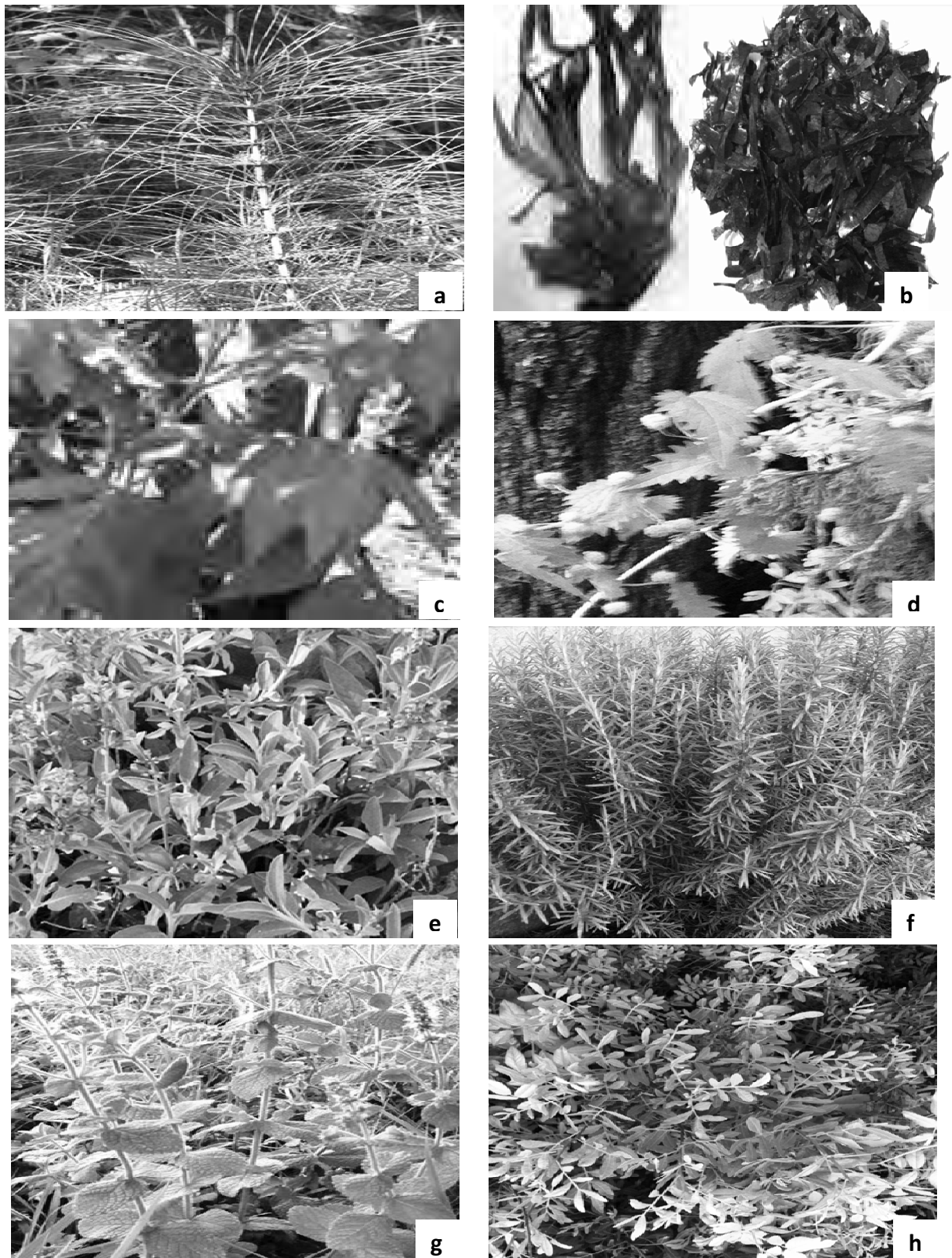
Leur récolte est effectuée au stade préfloraison en mois de mai 2011 dans différentes localités, de la commune de Médéa, dans les régions de Teniet el hadjer, Talaich, et M'sallah respectivement *Salvia officinalis*, *Urtica dioica*, et *Rosmarinus officinalis*, dans la commune de Tamezguida *Pistacia lentiscus*, dans la wilaya de Blida à Boufarik *Equisetum arvense*, *Mentha suaveolens* et *Carya illinoensis*.

Les feuilles brunies et âgées de posidonie sont collectées des banquettes formées au bord de la plage des Cornes d'Argent (C.E.T). Après la récolte, le matériel végétal est nettoyé, débarrassé de tous les débris associés à cette plante et lavé plusieurs fois à l'eau de robinet pour éliminer le sel.

En effet, le séchage des plantes se fait à l'air libre, à la température ambiante et à l'abri de la lumière. Elles sont broyées jusqu'à leur réduction en poudres, pesées et récupérées dans des



boites en plastic portant le nom de chacune et conservées à l'abri de la lumière et l'humidité pour des utilisations ultérieures.



**Figure 10. Morphologie du matériel végétal utilisé**

a : *Equisetum arvense* ; b : *Posidonia oceanica* ; c : *Carya illinoensis* ; d : *Urtica dioica* ;

e : *Salvia officinalis* ; f : *Rosmarinus officinalis* ; g : *Mentha suaveolens* ; h : *Pistacia lentiscus*

### **2.1.2.1.2 Matériel végétal pour l'inoculation**

Par ailleurs, deux variétés de pomme de terre homologuées, certifiées et largement cultivées en Algérie, à savoir Spunta et Kondor sont retenues pour l'étude du pouvoir antifongique *in vivo* des différentes préparations à base de plantes. Les tubercules de semences des deux variétés sont fournis par le Centre National de Contrôle et de Certification des semences et plants (C.N.C.C) d'El Harrach.

### **2.1.2.1.3 Matériel fongique pathogène**

En effet, les deux isolats phytopathogènes A1 et A2 de *P. infestans* prélevés respectivement d'El Abadia à Ain Defla et Bourkika à Tipaza et utilisées dans l'étude précédente sont entretenus par repiquage sur milieu à base de petits pois agar (PPA : Annexe 1.1) et incubés à 20 °C pendant 21 jours.

### **2.1.2.2 Activité antifongique *in vitro* des extraits aqueux de plantes**

Cette étude repose sur le pouvoir inhibiteur et fongicide des extraits aqueux de plantes sur les deux isolats de *P. infestans*. Elle est basée sur la technique de contact direct, décrite par Mishra et Dubey (1994).

#### **2.1.2.2.1 Préparation des extrais aqueux de plantes**

Les extraits aqueux sont obtenus par décoction de 100 g de chacune des huit espèces végétales sélectionnées dans 1 L d'eau distillée pendant 30 minutes. Cependant, cette opération est réalisée au niveau de l'autoclave à 100 °C pendant 30 minutes dans des fioles bien fermées. Les extraits aqueux ainsi préparés sont récupérés séparément dans des flacons en verre stériles hermétiquement fermés après filtration à travers le papier Wathman stérile et sous hotte aspirante pour la partie *in vitro*. Ces derniers sont conservés au réfrigérateur à 4 °C jusqu'à leur utilisation (pour une durée de 15 jours).

#### **2.1.2.2.2 Technique de contact direct**

En effet, quatre concentrations : 5%, 10%, 20% et 100% correspondant respectivement aux doses D1, D2, D3 et D4 sont retenues pour chaque extrait aqueux de plante à tester.

Pour chaque dilution, 5 ml d'extrait aqueux de plante est versé dans des boîtes de Pétri stériles de même diamètre (90 mm) à l'aide de micropipettes. Le milieu PPA maintenu en surfusion est ensuite coulé dans les boites contenant les extraits préparés à différentes

concentrations. Ces dernières sont légèrement agitées pour homogénéiser le milieu. En ce qui concerne les témoins, l'extrait est remplacé par l'eau distillée stérile. Cinq répétitions sont prises en considération pour chaque dilution et pour chaque isolat de *P. infestans*.

Ainsi, à l'aide de pipettes Pasteur stériles, un disque d'inoculum de 5 mm de diamètre de chaque isolat est prélevé séparément puis déposé au centre des boîtes de pétri. L'incubation des boîtes ainsi préparées se fait dans l'étuve réglée à la température de 20 °C pour évaluer la croissance mycélienne après 7 jours.

### **2.1.2.2.3 Evaluation de l'activité antifongique *in vitro* des extraits de plantes**

Les procédures microbiologiques et les concentrations minimales inhibitrices (CMI) des extraits aqueux sont déterminées selon la méthode de Paranagama et *al.* (2003).

L'inhibition porte sur la croissance mycélienne, la sporulation et la germination de cet agent pathogène. En effet, les taux d'inhibition de la croissance mycélienne sont calculés selon la formule décrite par Pandey et *al.* (1982) et Greche et Hajjaji (2000), citée dans la partie d'étude des huiles essentielles.

La concentration minimale inhibitrice de la croissance mycélienne (CMI) est également déterminée pour chaque extrait de plante et, pour chaque isolat de *P. infestans*.

L'effet des extraits aqueux de plantes sur la morphologie de l'agent responsable du mildiou de la pomme de terre est étudié par une description morphologique par réalisée après 7 jours d'incubation, par observation microscopique directe des cultures traitées et témoins des isolats A1 et A2 de *P. infestans* au grossissement (X125).

Après une période d'incubation de 21 jours à la température de 20°C, les isolats de *P. infestans* développés sur milieux traités à base d'extraits aqueux de plantes et témoins ont fait l'objet de préparations de suspensions sporangiales, comme cela est décrit dans la partie huiles essentielles, pour calculer les taux d'inhibition de la sporulation et ceux de la germination selon les formules précédemment utilisées.

Le pouvoir fongicide *in vitro* des extraits aqueux des végétaux est basé sur la technique modifiée de Mahanta et *al.* (2007), utilisée précédemment. Elle repose sur l'inhibition de la reprise de croissance mycélienne des isolats de *P. infestans* préalablement inhibés par les extraits aqueux de plantes testés à différentes concentrations.

Dans ce sens, les concentrations inhibitrices létales (CIL) sont évaluées pour chaque extrait aqueux de plante sachant que, la CIL correspond à la plus petite concentration de l'extrait

aqueux de plante pour laquelle, aucune reprise de croissance mycélienne de l'explant de *P. infestans* n'est observée *in vitro* au terme de 7 jours d'incubation (Paranagama et al., 2003).

### **2.1.2.3 Activité antifongique *in vivo* d'une gamme de préparations à base de plantes**

Cette étude consiste à tester les poudres et les extraits aqueux de plantes à l'état pur (brut) ou à la dilution de 20% (Grainage et Ahmed, 1988 ; Krebs et al., 2006) sur le pouvoir pathogène de *P. infestans*. Elle est basée sur le test antifongique sur disques foliaires de pomme de terre. Elle se déroule en plusieurs étapes:

#### **2.1.2.3.1 Préparation des plantules de pomme de terre**

Les tubercules prégermés de pomme de terre sont plantés dans des pots préalablement préparés à raison d'un tubercule par pot à une profondeur de 4 à 5 cm, dont le substrat est constitué par un mélange de 2/3 de sol non utilisé et 1/3 de tourbe (Compobello et al., 2002).

Les semis sont réalisés dans 102 pots dont 06 sont réservés aux témoins. Différents traitements sont effectués à raison de 3 répétitions par traitement pour chaque variété.

Les poudres végétales préalablement préparées sont incorporées dans le sol, à raison de 100 g par 2 kg de substrat par pot, au semis des tubercules pour 48 pots.

L'arrosage par les différents extraits aqueux de plantes dilués à 20% est effectué pour 48 pots, tous les trois jours jusqu'à ce que la terre soit bien humide depuis la plantation jusqu'à la préfloraison.

Quant aux pots témoins, ils sont irrigués à l'eau courante.

#### **2.1.2.3.2 Traitements et inoculations**

En effet, différents modes de traitements sont retenus pour notre étude :

- En application préventive par trempage des disques foliaires témoins dans les différents extraits aqueux purs et dilués à 20 % pendant 10 minutes. 24 h après le traitement, 100 µl de suspension sporangiale de l'ordre de  $10^5$  sporanges.ml<sup>-1</sup> sont déposés à l'aide d'une micropipette sur la face inférieure de chaque disque foliaire à raison de 5 répétitions par isolat fongique.

Par ailleurs, les disques foliaires des plants de pomme de terre préalablement cultivés sous l'effet de l'incorporation des poudres de plantes dans le sol ou l'arrosage par les extraits aqueux de ces dernières à 20 %, sont inoculées avec 100 µl de suspension sporangiale de l'ordre de 10<sup>5</sup> sporanges. ml<sup>-1</sup>. L'incubation des boîtes se fait à 20 °C pendant 10 jours.

- En application curative par l'inoculation des disques foliaires témoins par le dépôt de 100 µl de suspension sporangiale de l'ordre de 10<sup>5</sup> sporanges.ml<sup>-1</sup> sur leur face inférieure. Après 24h d'inoculation, des gouttelettes de 50 µl des extraits aqueux purs et dilués à 20 % sont déposées sur les feuilles préalablement inoculées.

- Les disques foliaires témoins sont séparément inoculés par l'eau distillée stérile, et les isolats A1 et A2 de *P.infestans* et sont considérés respectivement comme témoins négatifs et témoins positifs (Khair et Haggag, 2007).

### **2.1.2.3.3 Evaluation de l'activité antifongique *in vivo* des extraits aqueux de plantes**

L'évaluation *in vivo* du pouvoir antifongique des extraits aqueux de plantes vis-à-vis de *Phytophthora infestans* repose sur la détermination de la période d'incubation qui représente le temps nécessaire pour l'apparition de l'infection développée par *P.infestans* sur le disque foliaire de pomme de terre inoculé.

La réduction de la maladie ou % RM est exprimée par la surface foliaire infectée et calculée par la formule proposée par Notteghem et *al.* (1980) ; Hill et Nelson (1983) :

$$RM (\%) = \frac{(SIT - SIt)}{SIT} \times 100$$

- RM : Taux de réduction de la maladie en %.
- SIT : Surface foliaire infectée du témoin en %.
- SIt : Surface foliaire infectée traitée en %.

L'inhibition de la sporulation *in vivo* est déterminée après 10 jours d'incubation. Les disques foliaires infectés sont soigneusement trempés dans des tubes stériles contenant 10 ml d'eau distillée stérile puis soumis à l'agitation à l'aide d'un agitateur de tubes vortex pour libérer les sporanges formés. Le contenu de chaque tube fait l'objet de détermination de la concentration en spores à l'aide d'une cellule de Malassez sous microscope optique au grossissement (X125).

Les taux d'inhibition de la production de sporanges ou % IPC est calculé selon la formule proposée par Notteghem et *al.* (1980) et Hill et Nelsson (1983) :

$$\text{IPS (\%)} = \frac{(\text{NSP} - \text{NSPt})}{\text{NSP}} \times 100$$

- IPS : Taux d'inhibition de la sporulation en %.
- NSP : Nombre moyen de sporanges par surface du disque foliaire inoculée par le pathogène.
- NSPt : Nombre de sporanges par surface du disque foliaire inoculée par le pathogène et traitée par l'extrait.

## **2.2 Recherche d'isolats antagonistes du genre *Trichoderma* à l'égard du mildiou de la pomme de terre**

Cette étude vise d'abord l'isolement puis, l'identification des antagonistes du genre *Trichoderma* ainsi que l'étude de leur activité antagoniste vis-à-vis de *P. infestans*.

### **2.2.1 Isolement, caractérisation et identification des isolats de *Trichoderma* spp.**

#### **2.2.1.1 Isolement**

Les isolats de *Trichoderma* sont prélevés du sol de la rhizosphère des plants de pomme de terre et des galles racinaires développées sur les plants de tomates cultivés sous serre et engendrées par les *Meloïdogyne*. L'ensemble des échantillons sont prélevés de différentes localités de l'Algérie (Tableau 4). La méthode d'échantillonnage du sol proposée par Rapilly (1968) et Rodriguez-Zaragoza et *al.* (2005) et la méthode de dilution décrite par Davet et Rouxel, (1997) sont adoptées pour notre étude.

Une série de dilutions allant de  $10^{-2}$  et  $10^{-3}$  sont effectuées dans des tubes à hémolyse pour chaque échantillon de sol. Ainsi, 1 ml de chaque suspension est versé séparément dans la boîte de Pétri stérile, dans laquelle est ajouté le milieu Extrait de Malt- agar (MEA : Annexe 1.2) en surfusion. Cinq répétitions sont prises en considération pour chaque dilution et pour chaque échantillon. L'incubation se fait à l'obscurité et à la température de 25 ° C, pendant 7 jours.

En outre, les masses d'œufs de *Meloïdogyne* extraites à partir de galles des racines sont déposées dans des boîtes de Pétri contenant l'eau-Agar à 2% (EA), après stérilisation avec une solution d'hypochlorite de sodium à 2% et plusieurs rinçages à l'eau distillée stérile.

**Tableau 2. Données sur les isolats de *Trichoderma* spp. issus d'Algérie**

Localités d'isolement (Wilaya/ Région)	Substrats	Périodes de prélèvements	Codes des isolats
Alger, Staoueli	Masses d'oeufs de <i>Meloïdogyne</i>	2009	T1
Mostaganem, Stidia	Rhizosphère de pomme de terre	2011	T2
Alger, Zeralda	Rhizosphère de pomme de terre	2011	T3
Tipaza, Fouka	Masses d'oeufs de <i>Meloïdogyne</i>	2009	T4
Ain Defla, Amra	Rhizosphère de pomme de terre	2011	T5
Bechar, Abadla	Rhizosphère de pomme de terre	2011	T6
Tipaza, Bourkika	Rhizosphère de pomme de terre	2011	T7
Skikda, Collo	<i>Masses d'oeufs de Meloïdogyne</i>	2009	T8
Ain Defla, El Attaf	Rhizosphère de pomme de terre	2011	T9
El Oued, El Oued	Masses d'oeufs de <i>Meloïdogyne</i>	2008	T10
Ain Defla, El abadia	Rhizosphère de pomme de terre	2011	T11

### 2.2.1.2 Caractérisation et identification

Les fructifications conidiennes des champignons développés sur les masses d'œufs et celles des échantillons de sol sont cultivées puis, purifiées en cultures monosporales sur MEA et incubées dans les mêmes conditions décrites précédemment.

Les isolats de *Trichoderma* sont identifiés sur la base de l'analyse microscopique des hyphes et la morphologie des conidies rapportées par les clés d'identification des champignons filamenteux.

En effet, l'extraction d'ADN est réalisée pour tous les isolats de *Trichoderma* spp.

Par conséquent, leur séquences sont amplifiées par PCR en utilisant les amorces ITS5 (GGAAGTAAAAGTCGTAACAAGG) et ITS4 (TCCTCCGCTTATTGATATGC) (White et al., 1990). La PCR est effectuée dans un volume de réaction de 25µl contenant 12,5 µl de GoTaqH vert Master Mix (Promega, USA), 9,5 µl d'eau à la nucléase libre (Promega), 1 µl de chacune des amorces (à 0,40 µM de concentration finale) et 1 µl d'ADN extraite de chaque isolat.

Les PCR sont réalisées dans un thermocycleur Biometra en utilisant le programme suivant: la dénaturation initiale à 95 °C pendant 5 min; suivie par 25 cycles de dénaturation à 95 °C pendant 30 s, l'hybridation des amorces à 55 °C pendant 45 s et l'élongation à 72 °C pendant 1 min. L'élongation finale se fait à 72 °C pendant 10 min. 5 µl du produit d'amplification par PCR sont analysés par électrophorèse en gel d'agarose à 1%, dans un tampon de TBE (9 mM

de Tris-HCl, 9 mM d'acide borique et 0,25Mm d' EDTA à pH de 8,3). L'ADN est coloré avec SybrSafe (Invitrogen), et photographié sur un illuminateur Tran (Biorad). La précision de l'amplification par PCR est confirmée par la comparaison de la taille de la bande avec une échelle de marqueur moléculaire (100 pb Step Ladder, Promega).

Après amplification, les produits de PCR sont purifiés avec ExoSAP-IT (USB Corporation, Cleveland, OH, USA) selon les instructions du fabricant. Les amplicons sont séquencés par séquençage et génotypage au niveau de la Platform Fondazione Edmund (San Michele all'Adige, TN, Italie) sur un analyseur génétique ABI Prism XL 3130 (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) en utilisant le Kit de séquençage Big-Dye Terminator cycle de v3.1 (Applied Biosystems). Après le traitement informatique (logiciel chromas 162) du chromatogramme obtenu du séquenceur automatique, les séquences linéaires ITS d'ADN des isolats du genre *Trichoderma* sont soumises dans Blast™ pour la recherche des séquences analogues dans la base de données NCBI ([www.ncbi.nlm.nih.gov](http://www.ncbi.nlm.nih.gov)) où toutes les espèces de *Trichoderma* sont identifiées et considérées comme souches de références.

L'analyse phylogénétique moléculaire est déduite en utilisant la méthode de vraisemblance maximale (Maximum Likelihood method) basée sur le modèle Tamura-Nei (Tamura et Nei, 1993). Le pourcentage d'arbres dans lesquels les taxons associés sont regroupés est montré à côté des branches. Les arbres initiaux pour la recherche heuristique sont obtenus automatiquement en appliquant Neighbor-Joining et les algorithmes BioNJ à une matrice de distances par paires estimées en utilisant l'approche de vraisemblance maximale Composite (MCL), puis en sélectionnant la topologie avec la valeur de log de vraisemblance supérieure.

L'arbre est représenté à l'échelle, avec des longueurs de branche mesurées dans le nombre de substitutions par site. L'analyse portera sur les séquences de nucleotides des isolats retenus pour notre étude moléculaire et ceux de banque de gènes similaires à ces derniers . Toutes les positions contenant les lacunes et les données manquantes sont éliminées. Les analyses évolutives sont menées dans MEGA6 (Molecular evolutionary genetic analysis (Tamura et al., 2013) .

### **2.2.2 Activité antagoniste des isolats du genre *Trichoderma* sur *Phytophthora infestans***

Cette étude regroupe l'activité antagoniste *in vitro* et *in vivo* des antagonistes du genre *Trichoderma* vis-à-vis du *P. infestans*. Elle nécessite l'utilisation des isolats antagonistes collectés et le même matériel végétal et fongique pathogène utilisés et décrits dans l'étude du



pouvoir antifongique des préparations à base de plantes vis-à-vis du mildiou de la pomme de terre.

### **2.2.2.1 Activité antagoniste *in vitro* des isolats de *Trichoderma* spp.**

L'activité antagoniste *in vitro* des isolats du genre *Trichoderma* est basée sur la technique de confrontation directe de l'agent pathogène avec les isolats antagonistes et celle dite de non volatile ou de contact direct avec leurs filtrats de cultures. Elle repose sur leur pouvoir inhibiteur sur les paramètres biologiques et leur pouvoir fongicide sur *P. infestans*.

#### **2.2.2.1.1 Technique de confrontation directe**

Elle est décrite par Pandey et *al.* (1982) et consiste à placer dans une boîte de Pétri contenant le milieu PPA, deux explants de 5 mm de diamètre, l'un de l'inoculum phytopathogène et l'autre de celui de l'antagoniste, à 40 mm de distance l'un de l'autre, symétriquement par rapport au centre de la boîte. Pour le témoin, l'explant du pathogène est déposé au centre de la boîte de Pétri. L'incubation se fait dans une étuve réglée à 20 °C et à l'obscurité pendant 7 jours.

#### **2.2.2.1.2 Technique non volatile ou de contact direct des filtrats de cultures**

Elle est décrite par Dennis et Webster (1971). Elle consiste à placer dans chaque flacon contenant 125 ml de bouillon de Pomme de terre- dextrose stérile, 1000 µl de suspension conidienne de chaque isolat de *Trichoderma* sp. à une concentration de  $10^5$  conidies.ml<sup>-1</sup>. L'incubation des flacons se fait dans un shaker-agitateur sous une agitation de 120 rpm à 25°C et à l'obscurité pendant 15 jours. En effet, le filtrat de chaque culture d'isolat est récupéré à travers un filtre millipore de 0.20 µm de diamètre.

Ainsi, 5 ml de chaque filtrat d'isolat de *Trichoderma* sp. est versé séparément dans des boîtes de Pétri stériles aux quelles est ajouté le milieu PPA maintenu en surfusion. Une légère agitation est suivie pour une bonne homogénéisation.

Par la suite, un disque d'inoculum de 5 mm de diamètre de chacun des deux isolats A1 et A2 de *P. infestans* est prélevé séparément puis déposé au centre des boîtes préalablement préparées. L'incubation se fait à une température de 20 °C pendant 7 jours. Cinq répétitions sont prises en considération pour chaque isolat antagoniste, et/ou chaque filtrat de sa culture et chaque isolat de *P. infestans*.

### **2.2.2.1.3 Evaluation de l'activité antagoniste *in vitro* des isolats de *Trichoderma* spp.**

Elle repose sur les mêmes procédures et les mêmes formules que celles utilisées pour l'étude de l'activité antifongique des préparations à base de plantes et des huiles essentielles.

- Les taux d'inhibition sont calculés pour la croissance mycélienne, la sporulation et la germination des isolats A1 et A2 de *P. infestans*

- Le mycoparasitisme traduit les conséquences de l'activité antagoniste *in vitro* des isolats de *Trichoderma* spp. sur la morphologie des isolats de *P. infestans*, est également étudié comme pour les études précédentes.

- Le pouvoir fongicide des isolats antagonistes du genre *Trichoderma* est étudié *in vitro* par la technique modifiée de Mahanta et al. (2007) selon les procédures d'étude du pouvoir antifongique des préparations à base de plantes.

### **2.2.2.2 Activité antagoniste *in vivo* des isolats de *Trichoderma* spp.**

L'activité antagoniste *in vivo* est basée sur la technique des disques foliaires. Elle repose sur la réduction du pouvoir pathogène ainsi que l'inhibition de la sporulation des deux isolats de *P. infestans*.

#### **2.2.2.2.1 Préparation des plantules de pomme de terre**

Elle consiste à l'inoculation des disques foliaires des deux variétés de pomme de terre testées : "Spunta et Kondor", des témoins et ceux traités par les isolats antagonistes du genre *Trichoderma* selon les différents modes d'application et selon les deux isolats A1 et A2 de *P. infestans*. Cette étude comporte les étapes suivantes :

Les tubercules certifiés et pré-germés de deux variétés de pomme de terre "Spunta" et "Kondor" sont plantés dans des pots, placés dans une serre et arrosés avec de l'eau du robinet jusqu'à l'étape nécessaire pour l'inoculation de leurs disques foliaires.

#### **2.2.2.2.2 Traitements et inoculations**

La préparation des traitements à base d'isolats antagonistes et des isolats pathogènes pour les inoculations nécessitent la préparation de suspensions conidiennes des 11 isolats antagonistes ajustées à  $10^7$  conidies.ml<sup>-1</sup> (Caron et al., 2002) et celle des suspensions

sporangiales des isolats A1 et A2 de *P. infestans*, préparées à partir de cultures pures âgées de 20 jours et ajustées à  $10^5$  sporanges.ml<sup>-1</sup>.

Deux types de traitements sont appliqués sur des disques foliaires de plantes non traitées.

a. Le traitement préventif par trempage des disques foliaires dans les suspensions conidiennes de chaque isolat antagoniste pendant cinq minutes. Après 24 h d'incubation, 100 µl d'inoculum de *P. infestans* sont déposés sur la face inférieure de chaque disque foliaire.

b. Traitement curatif par inoculation des disques foliaires sur leur face inférieure avec 100 µl d'inoculum de *P. infestans*, ensuite avec 80 µl de suspensions conidiennes des antagonistes après 24 h d'incubation.

Par ailleurs, deux autres traitements sont effectués sur les disques foliaires des plants de pomme de terre traités:

c. Le traitement préventif par incorporation dans le sol des suspensions antagonistes, où chaque pot reçoit séparément 250 ml de suspension conidienne de chaque isolat de *Trichoderma* sp. deux semaines avant la plantation (Caron *et al.*, 2002).

d. Le traitement préventif par pulvérisation de suspension conidienne de chaque isolat antagoniste sur la partie aérienne des plantes une fois par semaine jusqu'au stade avant la floraison.

Les disques foliaires récupérés à partir de feuilles détachées des plantes ayant subi ces deux traitements sont inoculés directement sur leur face inférieure avec 100 µl d'inoculum de *P. infestans* et incubés à 20 ° C pendant 4 jours.

En outre, des boîtes dont les disques foliaires sont inoculés avec de l'eau distillée stérile et d'autres inoculés uniquement avec des isolats pathogènes sont respectivement considérés comme des témoins négatifs et des témoins positifs. Cinq répétitions sont considérées par traitement pour chaque variété et chaque mode d'application de l'inoculum. L'incubation des boîtes se fait à 20 ° C pendant 4 jours.

La sporulation est déterminée après 10 jours d'incubation selon les mêmes procédures décrites pour les préparations à base de plantes. Les taux d'inhibition de la production de sporanges ou % IPS sont calculés selon la formule proposée par Notteghem *et al.* (1980) et Hill et Nelsson (1983) :

### **2.2.2.2.3 Evaluation de l'activité antagoniste *in vivo* des isolats de *Trichoderma* spp.**

L'activité antagoniste *in vivo* est évaluée en se basant sur les mêmes procédures décrites pour le pouvoir antifongique des préparations à base de plantes, compte tenu de la période

d'incubation du mildiou, les taux de réduction de la maladie (% RM) et celui de l'inhibition de la sporulation (IS %) respectivement par les formules décrites par Hill et Nelson (1983) et par Notteghem *et al.* (1980).

Le pouvoir fongicide *in vivo* des isolats de *Trichoderma* spp. est étudié comme pour l'activité antifongique *in vivo* des extraits aqueux de plantes, selon la technique de Nyassé *et al.* (1995). L'inoculation des disques foliaires se fait par le dépôt d'inoculum préalablement inhibé *in vitro* par les isolats antagonistes. Les témoins sont inoculés par le dépôt d'inoculum non traité et / ou l'eau distillée stérile respectivement pour les témoins positifs et les témoins négatifs.

### 2.3 Analyse statistique

Pour chaque partie d'étude, des analyses statistiques ont été réalisées selon la version 12 du logiciel SYSTAT (SPSS Inc., Chicago, IL) où l'analyse de la variance par le test ANOVA, à la suite d'un test de comparaison multiple : One way test ANOVA - lorsque cela est nécessaire- et le modèle linéaire généralisé (GLM). Les différences sont significatives si la valeur de P est inférieure à 0,05 (Philippeau, 1989). Les Graphes sont produits en utilisant Origine Pro 7.5.

Les tests statistiques sont effectués pour:

- Evaluer et comparer l'efficacité des huiles essentielles d'agrumes et de sauge sur *P. infestans* selon les concentrations et les isolats A1 et A2 de *P. infestans* ;
- Tester l'efficacité *in vitro* et *in vivo* des préparations à base de plantes testées sur *P. infestans* et comparer leurs activité antifongique tout en considérant les variétés testées, les deux isolats A1 et A2 de *P. infestans*, et les paramètres déterminés *in vitro* et *in vivo* ;
- Vérifier l'efficacité des antagonistes du genre *Trichoderma* vis-à-vis de *P. infestans* ; comparer les différents modes de leur application tout en considérant les variétés testées, les deux isolats A1 et A2 de *P. infestans*, et les paramètres déterminés.

# *Chapitre 3*

## **RESULTATS ET DISCUSSION**

### **3. RESULTATS ET DISCUSSION**

#### **3.1 Activité antifongique des plantes et de leurs extraits à l'égard de *Phytophthora infestans* agent du mildiou de la pomme de terre**

##### **3.1.1 Activité antifongique des huiles essentielles d'agrumes sur *Phytophthora infestans***

###### **3.1.1.1 Activité antifongique *in vitro* des huiles essentielles d'agrumes**

Les huiles essentielles d'agrumes testées *in vitro* ont montré une variabilité dans l'inhibition de la croissance mycélienne des isolats de *Phytophthora infestans*.

L'analyse de variance de leur taux d'inhibition montre des différences hautement significatives entre les huiles essentielles des trois espèces d'agrumes ( $F = 36.334$ ,  $P = 0.000$ ) après une semaine d'incubation (Annexe 2), plus précisément entre les huiles essentielles de bergamote / citron ( $P = 0.000$ ) et orange / citron ( $P = 0.000$ ) (Annexe 3). Ces différences varient en fonction des concentrations d'huiles essentielles et des deux isolats de *P. infestans* ( $F = 11.879$ ,  $P = 0.000$ ) (Annexe 2).

Le pouvoir inhibiteur le plus important de la croissance mycélienne de *P. infestans* est obtenu par l'huile essentielle de bergamote (55%), suivi par celle de l'orange (53%) et enfin celle du citron (36%) (Figure 11a). Les huiles essentielles brutes (pures) sont plus efficaces que leurs dilutions (Figure 11b). En outre, leur activité est significativement plus élevée sur l'isolat A2 de *P. infestans*.

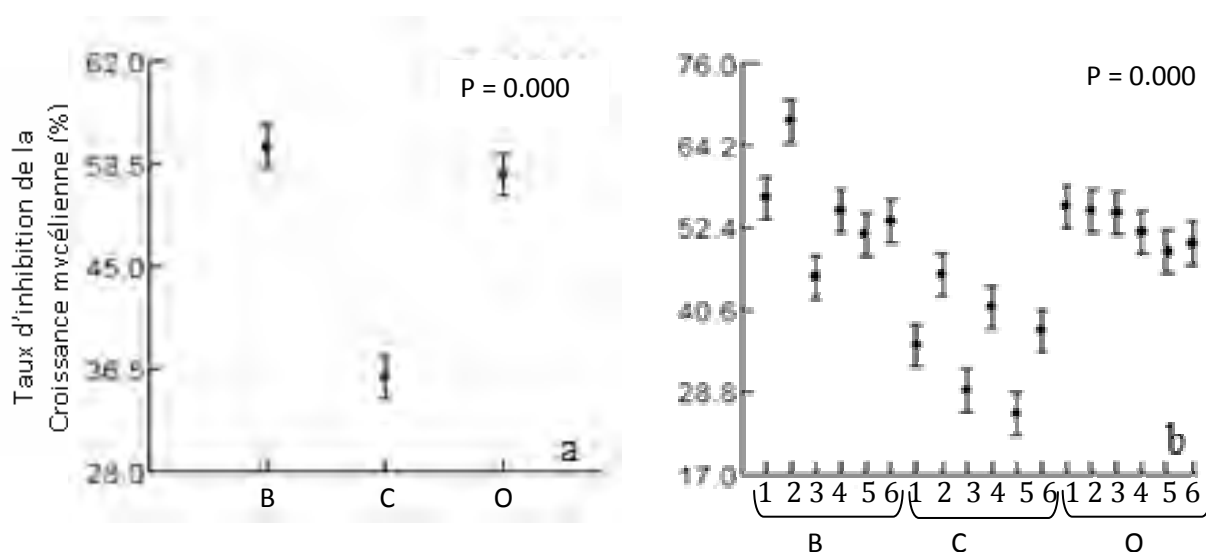
Cela signifie que l'isolat A1 d'El abadia est moins sensible aux huiles essentielles que l'isolat A2 de Bourkika ; ce dernier a montré une résistance moyenne aux trois huiles essentielles d'agrumes.

L'analyse de la variance des taux d'inhibition de la sporulation révèle une différence hautement significative entre les trois huiles essentielles d'agrumes testées ( $F = 92.142$ ,  $P = 0.000$ ) (Annexe 4). La sporulation des deux isolats de *P. infestans* pourrait également être réduite ou complètement inhibée par les huiles essentielles d'orange et de bergamote ainsi que par les extraits bruts ou dilués au 1/10 (Annexe 4).

Par rapport aux témoins, l'huile pure de bergamote et sa dilution au 1/10, favorisent l'inhibition complète de la sporulation avec 100 % d'efficacité sur les isolats de *P. infestans*.

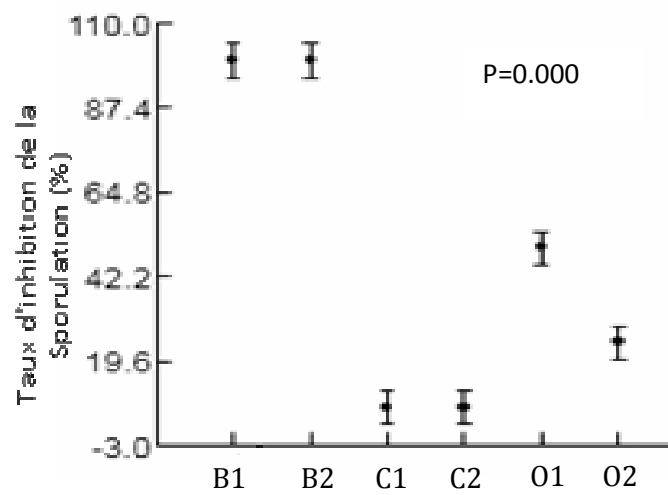
Elle est suivie par l'huile essentielle d'orange avec des taux d'inhibition de la sporulation plus élevés à son état pur (50%) que pour celle de sa dilution à 1/10 (27%). Enfin l'huile essentielle de citron pure et sa dilution n'ont montré aucun effet sur la sporulation des isolats de *P. infestans* (Figure 12).

Par ailleurs, les composés volatils des huiles essentielles d'agrumes ont affecté la morphologie des souches de *P. infestans*. Des modifications morphologiques se manifestent par la réduction du diamètre du mycélium, sa lyse, sa vésiculation, et même la déformation des sporanges qui pourraient interpréter l'inhibition de la croissance mycélienne et celle de la sporulation (Figure 13).



**Figure 11. Effet des huiles essentielles d'agrumes sur la croissance mycélienne des isolats de *Phytophthora infestans***

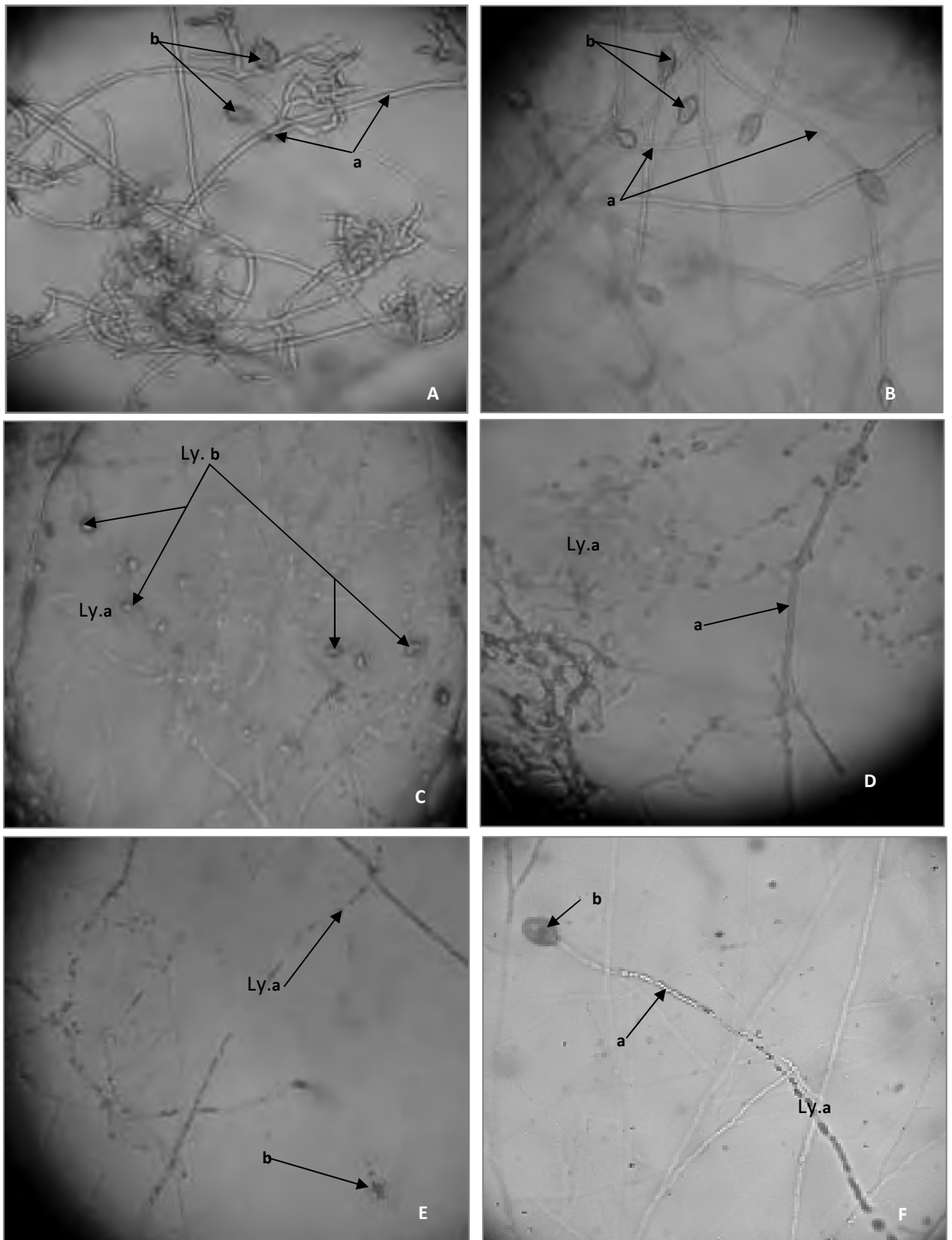
B : Bergamote ; C : Citron ; O : Orange ; 1 : D1A1 ; 2 : D1A2 ; 3 : D2A1 ; 4 : D2A2 ; 5 : D3A1 ; 6: D3A2 ; D1: H.E brute (pure) ; D2 : HE diluée à 1/10 ; D3 : HE diluée à 1/100 ; HE : huiles essentielles ; a : Inhibition selon les HE ; b : Inhibition selon les HE ; leur concentrations et les isolats A1 et A2 de *P. infestans*



**Figure 12. Effet des huiles essentielles d'agrumes sur la sporulation des isolats de *Phytophthora infestans***

**B** : Bergamote ; **C** : Citron ; **O** : Orange ; **HE** : huile essentielle ; **1** : H.E pure ; **2** : HE diluée à 1/10





**Figure 13. Effet des huiles essentielles d'agrumes sur la morphologie de *Phytophthora infestans*, au grossissement (X125)**

**a** : Mycélium ; **b** : Sporangies ; **Ly** : Lyse ; **A et B** : Souches témoins de *P. infestans* ; **C, D, E et F** : isolats de *P. infestans* traités par les huiles essentielles d'Agrumes

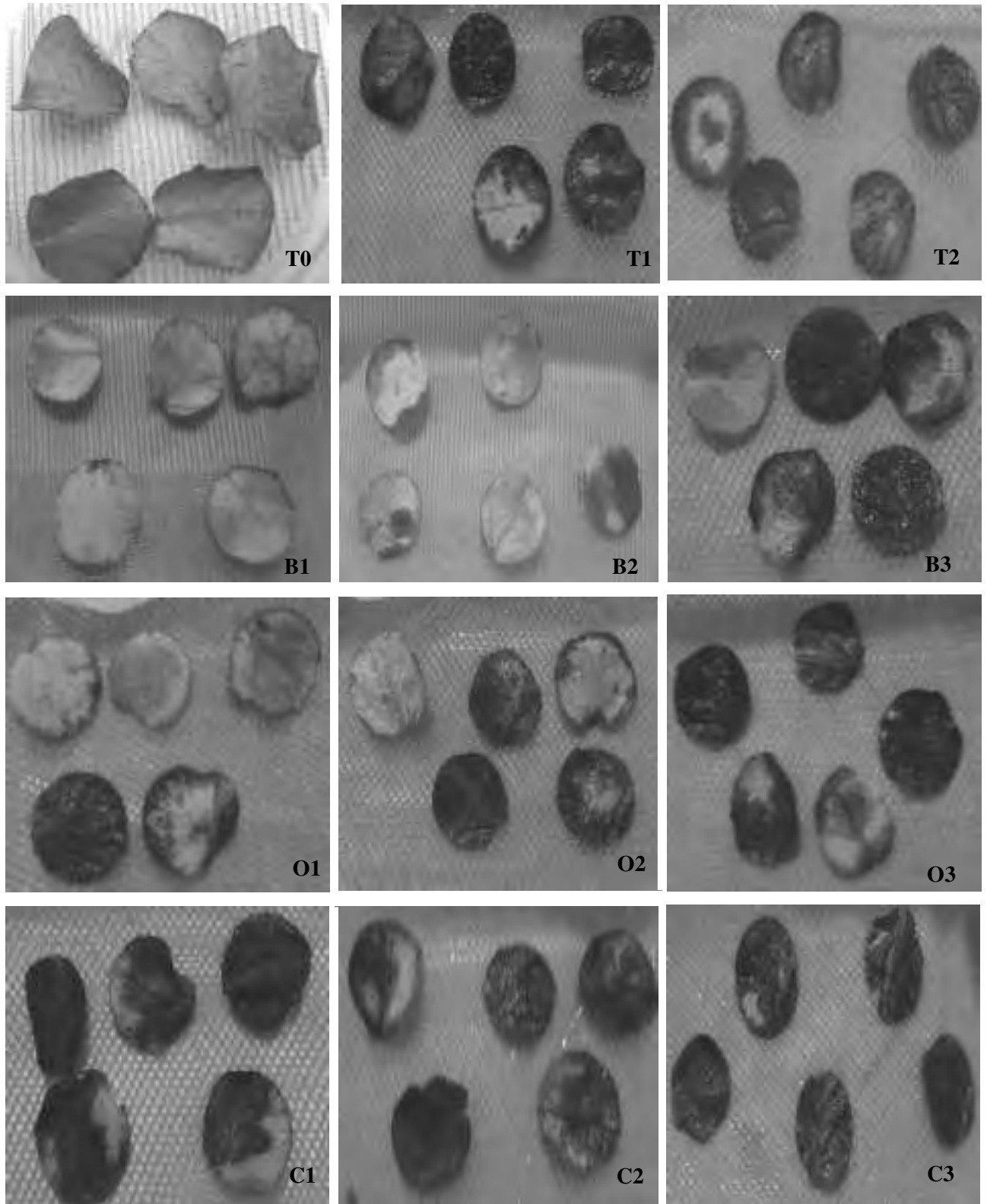
### **3.1.1.2 Activité antifongique *in vivo* des huiles essentielles d'agrumes sur le pouvoir pathogène des isolats de *Phytophthora infestans***

L'activité antifongique *in vivo* des huiles essentielles d'agrumes a révélé une variabilité dans l'expression des symptômes de mildiou sur disques foliaires de pomme de terre traités par trempage dans les émulsions d'huiles essentielles d'agrumes et inoculés par *Phytophthora infestans*. Une inhibition et une réduction de l'infection est induite respectivement par l'huile essentielle de bergamote et celle de l'orange (Figure 14).

La réduction des symptômes se traduit par le développement de faibles nécroses ou d'une chlorose accompagnée parfois d'un léger brunissement (Figure 14). L'inhibition du pouvoir pathogène par ces huiles essentielles brutes et diluées au 1/10 confirme leur pouvoir inhibiteur et fongicide sur *P. infestans* obtenu *in vitro*.

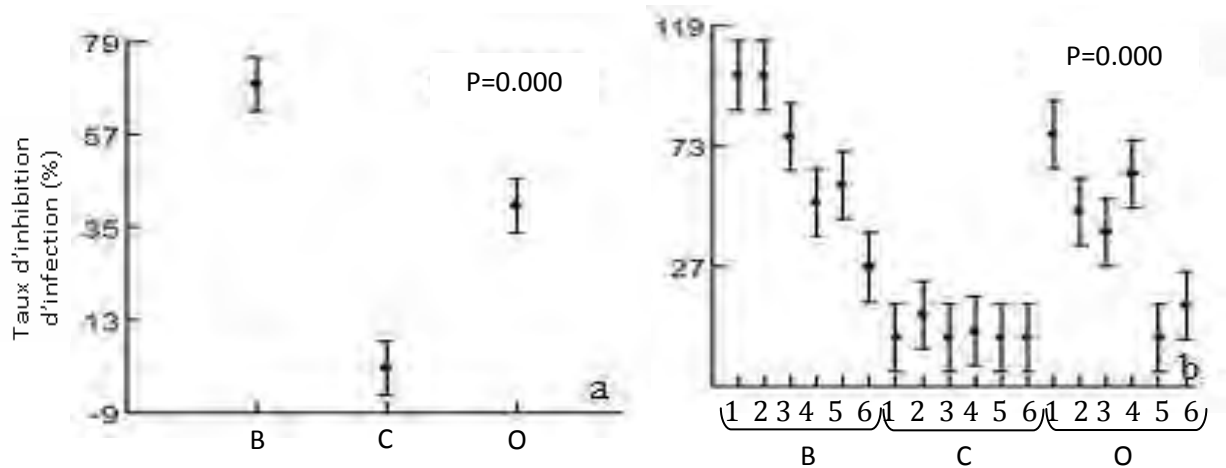
Ainsi, l'analyse de la variance des taux d'inhibition des infections montre une différence hautement significative entre les trois huiles essentielles d'agrumes ( $F = 28.344$ ,  $P = 0.000$ ) (Annexes 5 et 6) et selon les traitements (les trois concentrations des HE et les isolats A1 et A2 de *P. infestans*) ( $F = 7.640$ ,  $P = 0.000$ ) (Annexe 5).

Les taux de réduction ou d'inhibition des infections sont importants pour l'huile essentielle de bergamote (69 %) mais, faibles à très faibles respectivement pour celles de l'orange (42 %) et du citron (0.2 %) (Figure 15a). Ils sont également importants aussi bien pour les huiles essentielles brutes que diluées (Figure 15b).



**Figure 14. Effet des huiles essentielles d'agrumes sur le pouvoir pathogène de *Phytophthora infestans***

- **T0** : Témoin négatif ; **T1** et **T2** : Témoins positifs respectivement isolats **A1** et **A2** de *P. infestans* ;  
**B** : Bergamote ; **C** : Citron ; **O** : Orange ; **HE** : huiles essentielles ; **1** : H.E pure ; **2** : HE diluée à 1/10, **3** :  
HE diluée à 1/100



**Figure 15. Effet des huiles essentielles d'agrumes sur le pouvoir pathogène des isolats de *Phytophthora infestans* selon les concentrations et les isolats pathogènes**

**B** : Bergamote ; **C** : Citron ; **O** : Orange ; **1** : D1A1 ; **2** : D1A2 ; **3** : D2A1 ; **4** : D2A2 ; **5** : D3A1 ; **6** : D3A2 ; **D1** : H.E brute (pure) ; **D2** : HE diluée à 1/10 ; **D3** : HE diluée à 1/100 ; **HE** : huiles essentielles  
**a** : selon les HE d'agrumes ; **b** : selon les traitements (HE ; Concentrations des HE et isolats de *P. infestans*)

### 3.1.1.3 Analyse chimique des huiles essentielles d'agrumes

La composition chimique des huiles essentielles des trois espèces d'agrumes analysés par CG-SM ont montré différents composés. On compte 22, 27 et 30 constituants respectivement pour les huiles essentielles de citron, d'orange et de bergamote. La variabilité réside dans les composés oxygénés. On peut alors classer dans l'ordre décroissant les huiles essentielles de bergamote (6.1%), d'orange (2.7%) et de citron (1.6%).

Si nous nous référons au pouvoir antifongique de ces huiles essentielles testées contre *Phytophthora infestans*, la composition de monoterpènes oxygénés est de 0.8, 2.2 et 5% respectivement pour les huiles essentielles de citron, d'orange et de bergamote. Leur efficacité reste donc liée aux nerol, Neral, geraniol et geranial (Tableau 3).

**Tableau 3. Analyse chimique par CG – SM des huiles essentielles d'agrumes extraites par hydro distillation**

N°	Composés Chimiques	RI non-Polaire	RI Polaire	<i>C. sinensis</i> Cadenera(%)	<i>C. limon</i> Eureka(%)	<i>C. bergamia</i> Castagnara
Monoterpenes Hydrocarbones				95.5	96.6	93.2
1	Thujene<Alpha>	920	1036	*	*	0.1
2	Pinene<Alpha>	926	1023	0.4	0.5	0.2
3	Sabinene	961	1121	0.2	0.3	*
4	Pinene<Beta>	974	1109	0.1	*	0.2
5	Myrcene<Beta>	988	1165	1.6	1.8	1.5
6	Phellandrene<Alpha>	1001	1177	0.1	*	0.1
7	Terpinene<Alpha>	1020	1083	0.4	0.1	0.2
8	Limonene	1030	1206	92.5	93.6	90.4
9	Ocimene<(E)-Beta->	1048	1282	0.2	0.3	0.1
10	Terpinene<Gamma>	1103	1285	*	*	0.2
11	Terpinolene	1120	1304	0.1	*	0.2
Monoterpenes				2.1	0.8	5.0
12	Linalool	1125	1538	0.2	0.1	0.3
13	Citronellal	1167	1478	0.1	0.1	0.1
14	Terpin-4-ol	1191	1590	0.3	0.2	0.2
15	Terpinol<Alpha>	1203	1677	0.1	0.1	0.4
16	Nerol	1237	1781	0.5	*	0.5
17	Neral	1268	1670	0.2	0.1	1.1
18	Geraniol	1271	1828	0.5	0.1	0.6
19	Geranial	1284	1714	0.3	0.1	1.7
20	Thymol	1288	2107	*	*	*
Sesquiterpenes Hydrocarbones				0.7	0.6	0.6
21	Caryophellene<E>	1391	1594	0.1	0.3	0.2
22	Humulene<Alpha>	1450	1657	0.2	0.1	0.1
23	GermacreneD	1477	1696	0.1	0.1	*
24	Valencene	1488	1705	0.1	0.2	0.1
25	Bisabolene<Beta>	1508	1718	0.2	*	0.2
Sesquiterpenes oxygénés				0.6	0.2	0.2
26	Elemol	1540	1381	*	0.1	0.1
27	CaryophelleneAlcohol	1560	-	*	*	*
28	Nootkaone	1799	2250	*	0.2	0.1
Autres Composés oxygénés				0.6	0.5	0.9
29	Octanol<N>	1102	1544	*	*	0.2
30	Nonanal<N>	1126	1400	0.1	*	0.1
31	Decanal	1210	1497	0.1	0.2	0.1
32	Linalylacetate	1255	1553	*	*	*
33	CitronellylAcetate	1342	1645	0.2	0.1	0.2
34	NerylAcetate	1351	1706	0.1	0.2	0.2
35	GeranylAcetate	1366	1742	0.1	*	0.1
Période d'extraction (min)				180.0	180.0	180.0
Rendement(%)				0.0	0.0	0.0
Période d'extraction oxygénée (%)				2.7	1.5	6.0
Total Composés non oxygénés(%)				96.2	97.3	93.8

### 3.1.1.4 Discussion

Les résultats confirment que l'huile essentielle de bergamote a un pouvoir inhibiteur intéressant sur le développement de *P. infestans*.

Quel que soit le test effectué, *in vitro* ou *in vivo*, les huiles essentielles d'agrumes et leurs dilutions expriment divers degrés d'activité antifongique contre *P. infestans*, sans montrer une inhibition complète.

Cette activité ne peut être due à des composés majeurs, mais à une synergie des différents composants des huiles (Del Rio et al., 1998). L'absence de l'activité de l'huile essentielle peut être montrée par l'extraction de ces composés bioactifs dans un solvant qui est différent de l'eau. Le solvant peut réagir avec certains composés pour produire des complexes ou pour provoquer la décomposition, la déshydratation ou l'isomérisation de ces composés (Yrjönen, 2004).

L'inhibition de la croissance mycélienne, de la sporulation et de l'infection des disques foliaires de pomme de terre sont comparables avec des études antérieures effectuées sur l'effet antifongique *in vitro* et *in vivo* de l'huile essentielle de *Xylopiya aethiopica* contre *Fusarium oxysporum*, qui a conduit à une inhibition complète de la croissance du mycélium *in vitro*, ainsi que d'une bonne performance *in vivo* sur les tiges et les feuilles de tomates (Soro et al., 2010).

En effet, plusieurs études coroborent et confirment nos résultats. Il y a ceux qui ont montré que l'activité antimicrobienne *in vitro* était plus élevée pour les terpènes oxygénés que pour les terpènes d'hydrocarbures (Oh et al., 1967 ; Griffin et al., 1998 ; Cox et al., 2000 ; Dorman et Deans, 2000).

Dans le même contexte, l'activité antifongique des huiles essentielles obtenues par hydrodistillation des feuilles de quatre espèces de *Myrtaceae* du Cameroun a révélé que *Callistemon citrinus* et *Eucalyptus camaldulensis* sont les plus efficaces. La première a une teneur plus élevée en composés oxygénés et est fongicide, alors que le second est fongistatique (Bernadin et al., 2010).

Des huiles extraites de diverses variétés d'agrumes ont agi sur la croissance mycélienne *in vitro* de *Phaeoramularia angolensis*, l'agent responsable de la phaeoramulariosis d'agrumes. La croissance mycélienne de cet agent pathogène a été inhibée par les extraits d'huiles essentielles à des degrés variables, avec une activité plus marquée pour les huiles de *Citrus latifolia* et *C. limon*.

L'analyse de la composition chimique a montré que les plus actifs ont une teneur relativement élevée en citrals (néral + géranial >50%). Ceci est en accord avec le fait que les citrals sont connus pour leurs propriétés antifongiques (JazetDongmo et al.,2002).

### **3.1.2 Activité antifongique de l'huile essentielle de sauge sur *Phytophthora infestans***

#### **3.1.2.1 Activité antifongique *in vitro* de l'huile essentielle de sauge**

L'huile essentielle de sauge a montré une variabilité dans l'inhibition de la croissance mycélienne des isolats étudiés de *P. infestans*. Son pouvoir inhibiteur varie en fonction de la concentration en huile essentielle et selon les isolats de *P. infestans*. Il apparaît plus important pour l'huile essentielle brute et l'isolat A1, mais décroît en fonction des dilutions de l'huile à l'égard de l'isolat A2.

L'analyse de la variance des taux d'inhibition de la croissance mycélienne montre une différence significative entre les isolats traités de *Phytophthora infestans* ( $F = 7.517$ ,  $P = 0.014$ ) (Annexe 7) et très hautement significative entre les concentrations de l'huile testée ( $F = 15.527$ ,  $P = 0.000$ ) (Annexe 7).

En outre, c'est l'isolat A2 qui est le plus sensible à l'effet de cette huile essentielle en étant le moins développé et le plus inhibé, jusqu'à atteindre même les 47% (Figure 16a).

Les taux d'inhibition de la croissance mycélienne enregistrés sont compris entre 15 et 54%, voire plus importants pour l'huile essentielle pure (D4) (Figure 16b).

Par ailleurs, la sporulation de *P. infestans* traité par l'huile essentielle de sauge est très faible et parfois négligeable comparée à celle des témoins (Annexe 8).

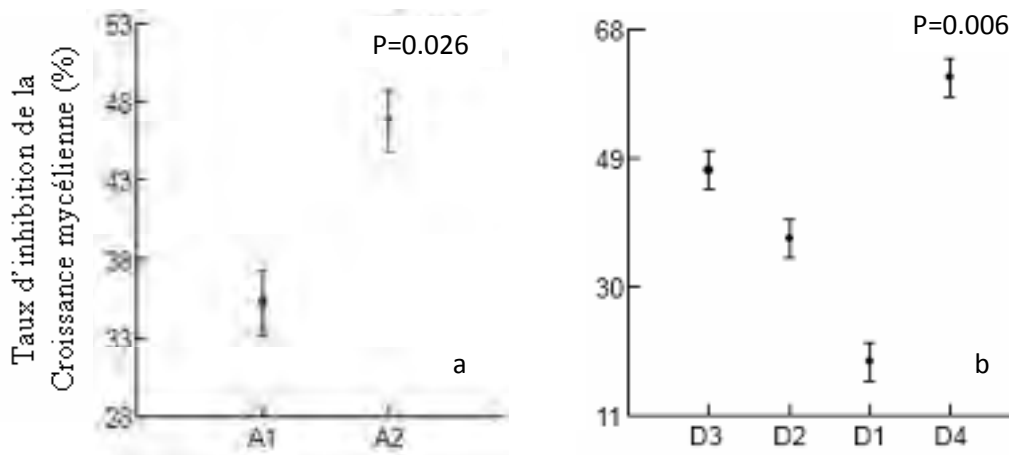
L'analyse de la variance des taux d'inhibition de la sporulation qui des deux isolats de *Phytophthora infestans* sous l'effet de l'huile essentielle de la sauge montre une différence très hautement significative entre les dilutions ( $F = 1922.222$ ,  $P = 0.000$ ) (Annexe 9). D'où une efficacité de 100% d'inhibition de la sporulation qui est révélée pour l'isolat A2 de *P. infestans* avec l'huile essentielle de sauge pure (D4) et à la dilution 1/10 (D3) (Figure 17).

L'activité antifongique de l'huile essentielle de sauge a également affecté la morphologie de *Phytophthora infestans* (Figure 18a). Des modifications morphologiques sont traduites par la lyse et la vésiculation du mycélium présentant parfois un diamètre plus réduit.

En parallèle, l'absence ou la faible sporulation peut être interprétée par la réduction du nombre de sporanges qui présentent parfois des déformations ou la digestion de leur contenu.

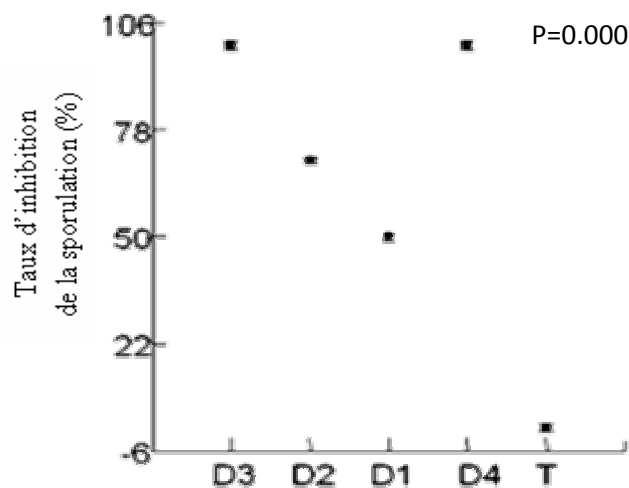
Ce qui conduit à la réduction de la germination et par conséquent celle de la croissance mycélienne (Figure 18b).

Le transfert des explants mycéliens des isolats de *Phytophthora infestans* préalablement inhibés par les émulsions d'huile essentielle, sur milieu PPA frais n'a pas permis la reprise de la croissance de ces derniers même après un mois d'incubation. Ce qui confirme le pouvoir fongicide *in vitro* de l'huile essentielle de sauge sur *Phytophthora infestans*.



**Figure 16. Effet de l'huile essentielle de sauge sur la croissance mycélienne de *Phytophthora infestans***

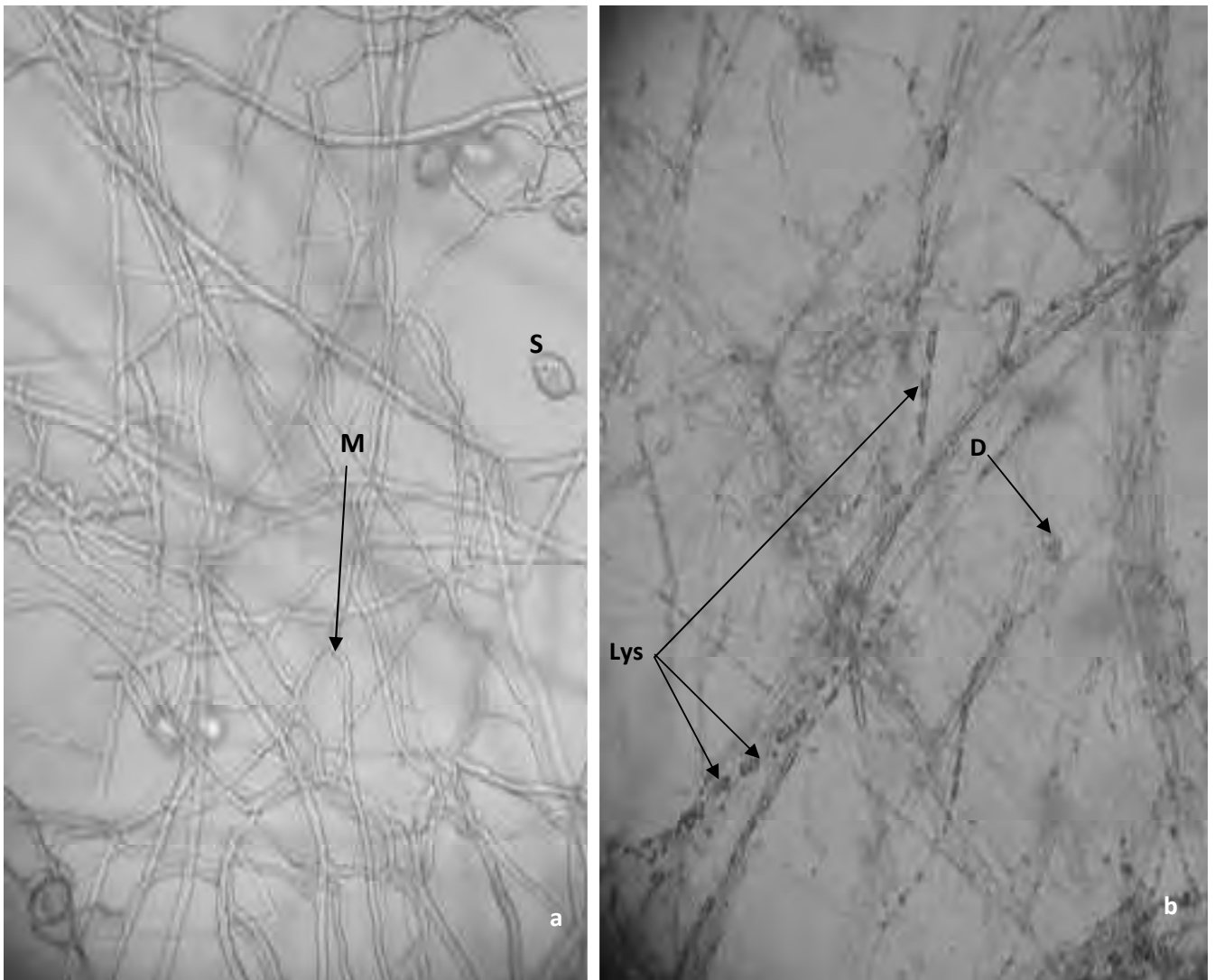
- Selon les concentrations : D4, D3, D2 et D1 respectivement ; Pure, aux dilutions ; 1/10, 1/50 et 1/100 ; a, selon les isolats A1 et A2 de *P. infestans*



**Figure 17. Effet de l'huile essentielle de sauge sur la sporulation de *Phytophthora infestans* selon les concentrations**

- Les concentrations : D4, D3, D2 et D1 respectivement ; Pure, aux dilutions ; 1/10, 1/50 et 1/100 ; T : témoin





**Figure 18. Effet de l'huile essentielle de sauge sur la morphologie de de *Phytophthora infestans*, au grossissement (X500)**

- M : Mycélium ; S : sporange ; Lys : Lyse du mycélium ; D : digestion du contenu des sporanges ; a : isolat témoin de *Phytophthora infestans* ; HE : huile essentielle ; b : Isolat de *P. infestans* traité par HE de sauge

### **3.1.2.2 Activité antifongique *in vivo* de l'huile essentielle de sauge sur le pouvoir pathogène des isolats de *Phytophthora infestans***

L'activité antifongique *in vivo* de l'huile essentielle de sauge sur les deux isolats A1 et A2 de *Phytophthora infestans* est estimée par les taux d'infection enregistrés sur les disques foliaires de la variété Spunta de pomme de terre. Ces derniers s'expriment par la surface infectée du disque foliaire. Leur traitement par pulvérisation de l'huile essentielle testée à différentes concentrations, révèle une réduction de l'infection de la maladie.

Un développement rudimentaire s'est manifesté par de légères nécroses, chloroses, accompagnés d'un léger brunissement suite à l'imprégnation de l'huile essentielle.

Cependant, le témoin positif révèle des taux d'infection plus importants par rapport, aux disques foliaires prétraités par l'huile essentielle et ceux inoculés par les isolats préalablement inhibés *in vitro* (Figure 19).

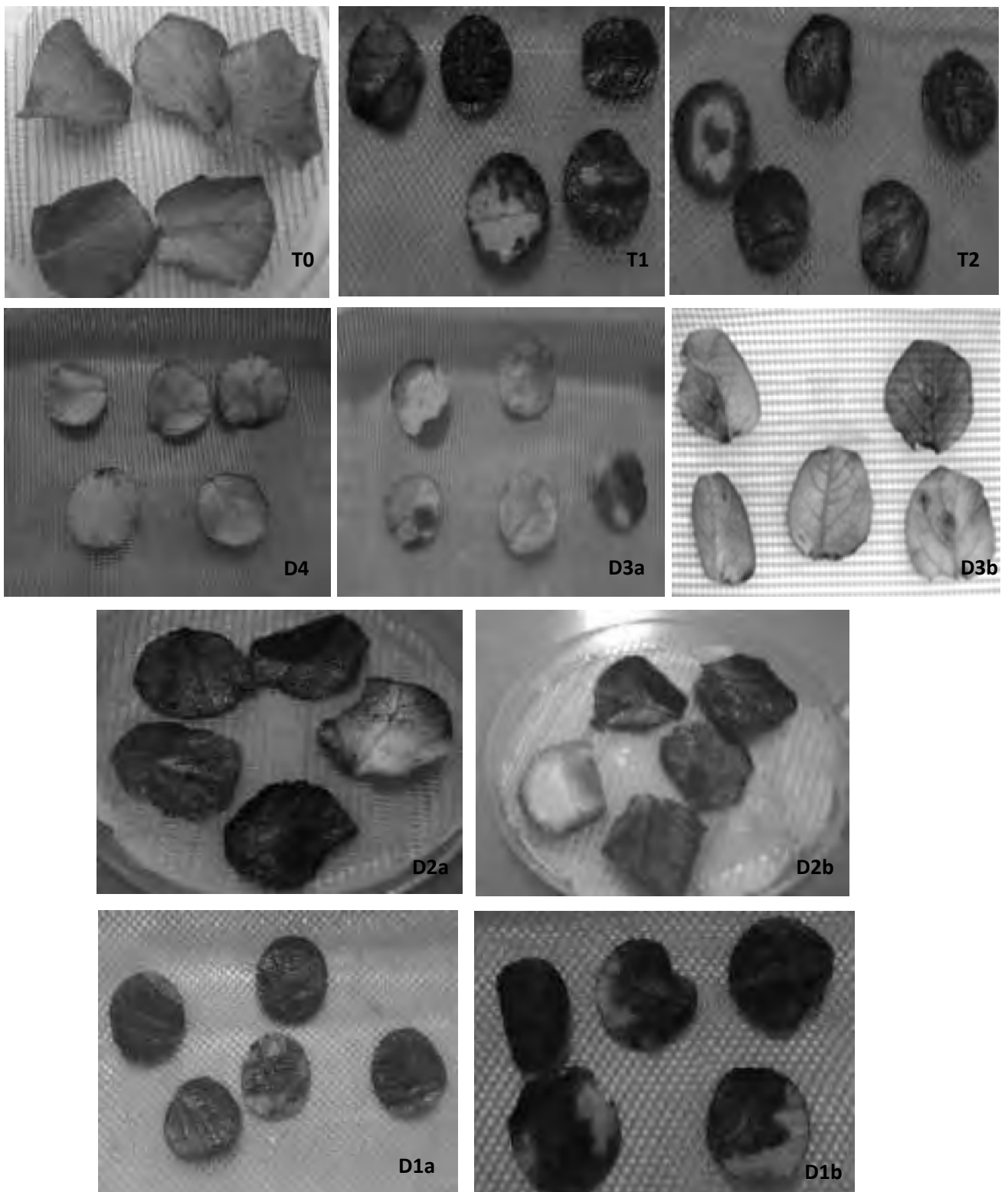
En revanche, le témoin négatif n'a pas montré de symptômes typiques du mildiou mise à part des chloroses par senescence (Figure 19).

L'analyse de la variance des taux d'infection a montré une différence très hautement significative ( $F = 24.769$ ,  $P = 0.000$ ) (Annexe 10) entre les différentes concentrations d'huile essentielle de sauge et significative entre les deux isolats de *P. infestans* ( $F = 6.636$ ,  $P = 0.023$ ) (Annexe 10) et les modes de traitements ( $F = 5.029$ ,  $P = 0.043$ ) (Annexe 10).

En plus, les taux d'infection enregistrés pour le mode de pulvérisation par l'huile essentielle de sauge sont plus faibles que ceux des témoins (32 %) après 48 heures d'incubation.

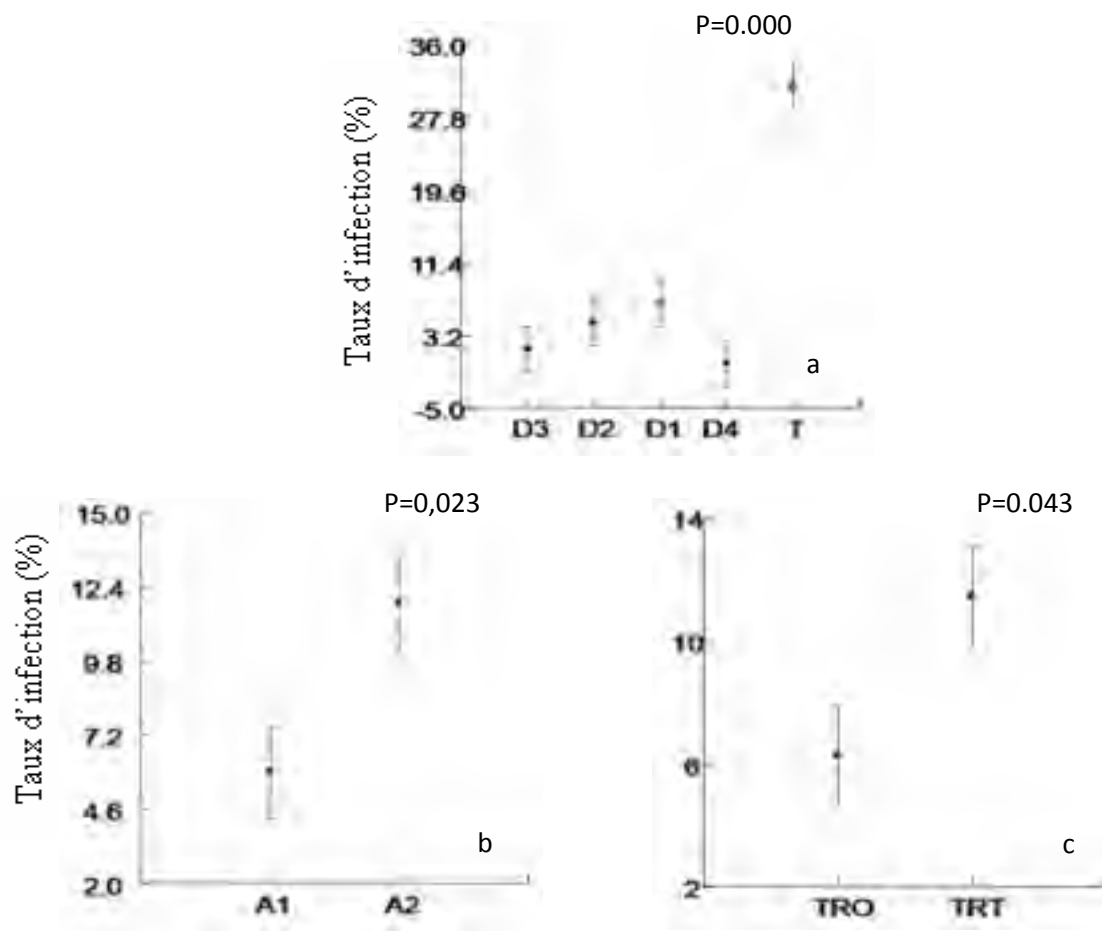
L'infection a progressé pour atteindre en moyenne près de 11%, cela peut s'expliquer par la croissance du champignon qui augmente avec la dilution de l'huile essentielle (Figure 20a) où l'isolat A2 semble aussi être plus agressif que l'isolat A1 (Figure 20b). Parallèlement, l'efficacité de cette huile se révèle aussi percevable *in vivo*, confirmant l'inhibition du pouvoir infectieux et par conséquent le pouvoir fongicide de *Phytophthora infestans* (Figure 20c).

Dans ce sens, le pouvoir inhibiteur de l'huile essentielle de *Salvia officinalis* L. sur les taux d'infection de *P. infestans* est significatif selon les concentrations de l'huile essentielle. Le plus grand pouvoir inhibiteur de l'huile est accordé à l'huile pure (D4), avec des taux d'inhibition d'infection de 100% et à un degré moindre respectivement aux dilutions D3 (85%), D2 (près de 55%) et D1 (20%) (Figure 21).



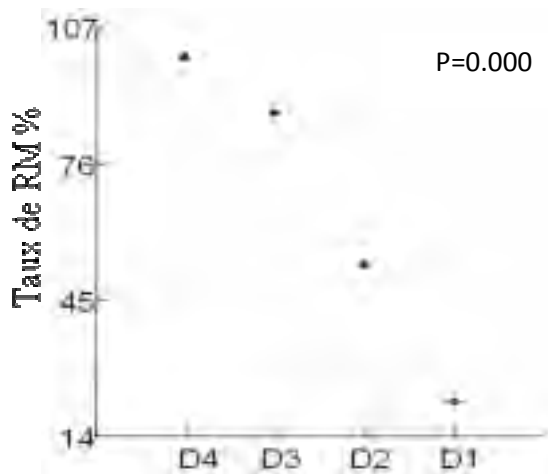
**Figure 19. Effet de l'huile essentielle de sauge sur le pouvoir pathogène de *Phytophthora infestans***

- Les concentrations : **D4, D3, D2** et **D1** ; HE respectivement ; Pure, aux dilutions ; 1/10, 1/50 et 1/100 ; HE, Huile essentielles ; **a** et **b** : isolats **A1** et **A2** de *P. infestans* ; **To** : Temoin negatif ; **T1** et **T2** : Témoins positifs (inoculées respectivement par les isolats **A1** et **A2** de *Phytophthora infestans*)



**Figure 20. Taux d'infection du mildiou après traitements par l'huile essentielle de sauge selon les concentrations en HE (a), les isolats pathogènes (b) et les modes de traitements (c)**

**TRT** : Traitement par pulvérisation de l'huile essentielle de sauge ; **TRO** : isolats de *P.infestans* inhibés *in vitro* par l'huile, essentielle de sauge ; **HE** : huile essentielle ; a : selon les dilutions de l'HE ; b : selon les isolats de *P. infestans* ; c : selon les modes de traitement ; **T** : Témoin, **D4, D3, D2 et D1** : Concentrations en HE de sauge respectivement Pure et ; aux dilutions : 1/10, 1/50 et 1/100.



**Figure 21. Effet de l'huile essentielle de sauge sur le pouvoir pathogène des isolats de *Phytophthora infestans* selon les concentrations**

Les concentrations : D4, D3, D2 et D1 ; Concentrations en HE de sauge respectivement Pure et, aux dilutions ; 1/10, 1/50 et 1/100 ; HE : Huile essentielle

### 3.1.2.3 Discussion

D'une manière générale, l'activité antifongique de l'huile essentielle de *Salvia officinalis* confirme son pouvoir inhibiteur *in vitro* et *in vivo* sur *P. infestans*. Les taux d'inhibition de la croissance mycélienne enregistrés sont compris entre 15 et 54%, voire plus importants pour l'huile essentielle pure (D4), suivie, respectivement, par les dilutions 1/10 (D3), 1/50 (D2) et 1/100 (D1).

En outre, l'isolat A2 s'avère plus sensible à l'effet inhibiteur de cette huile essentielle sur sa croissance mycélienne et sa sporulation. Des modifications morphologiques montrent la lyse et la vacuolisation du mycélium, ainsi que la digestion du contenu des sporanges, sont induites par cette huile essentielle.

Son pouvoir fongicide est aussi souligné *in vitro* par l'inhibition de la croissance mycelienne des isolats pathogènes préalablement inhibés.

L'effet inhibiteur de l'huile essentielle de sauge s'est également manifesté *in vivo* par la réduction de la maladie. Cependant, l'expression de quelques symptômes accentués voire l'apparition de légères nécroses notamment aux dilutions 1/50 (D2) et 1/100 (D1) peut être expliquée *in vitro* par la résistance et la survie de quelques sporanges, visibles sous microscope après 7 jours d'incubation. Un pouvoir inhibiteur important est accordé à l'huile

essentielle pure (D4), avec des taux d'inhibition d'infection de 100% et à moindre degré aux dilutions respectivement 1/10 (D3) (85%), 1/50 (D2) (près de 55%) et 1/100 (D1)(20%).

De même, c'est l'isolat A2 qui s'est révélée plus agressive et par conséquent moins sensible à cette huile essentielle. Ainsi, le pouvoir antifongique de cette huile est lié à sa composition phytochimique. Dans ce sens, de nombreuses études de recherche sur l'activité antifongique des extraits à base de plantes sont actuellement connues et comparables avec nos résultats.

Dans le même contexte, Daferera et *al.* (2000) ont rapporté le pouvoir antifongique de différentes huiles essentielles, y compris *Thymus vulgaris*, *Origanum vulgare*, *Origanum dictamnus*, *Origanum majorana*, *Lavandula angustifolia* Mill., *Rosmarinus officinalis* et *Salvia fruticosa*. Ils ont prouvé qu'à l'exception de l'huile d'origan, toutes les huiles essentielles testées étaient plus efficaces pour l'inhibition de la germination des conidies, que la croissance mycélienne de *Penicillium digitatum*. Les monoterpènes, qui composent ces huiles essentielles sont responsables de l'inhibition fongique.

Ainsi, Dellavalle et *al.* (2011) ont confirmé le pouvoir antifongique des huiles essentielles de *Salvia officinalis* et de *Rosmarinus officinalis* sur la croissance mycélienne des espèces d'*Alternaria*. Par ailleurs, l'étude de Yanar et *al.* en 2011, a révélé une inhibition totale de la croissance mycélienne de *P. infestans* par l'activité antifongique *in vitro* de l'extrait de *Salvia officinalis*.

Des modifications morphologiques ont également affecté la morphologie de *P. infestans*. Il s'agit de la lyse du mycélium et la destruction des sporanges. A ce sujet, les travaux de Feng et Zheng (2007) puis Tavares et *al.* (2008) ont rapporté la désintégration et la mort du mycélium par l'action des extraits de plantes sur les hyphes, provoquant la libération d'inclusions cytoplasmiques, la perte de la rigidité et l'intégrité de la paroi cellulaire.

Blaeser et Steiner (1999) ont évalué l'efficacité antifongique de plusieurs extraits de plantes contre *P. infestans* et ils ont prouvé que les extraits de sauge agissent par la réduction des symptômes foliaires du mildiou et l'augmentation du rendement de pomme de terre de 12 à 17%. Ils ont associé la réduction de la maladie au pouvoir inhibiteur de l'extrait de cette plante sur la germination des sporanges et la mobilité des zoospores de l'agent causal de mildiou de la pomme de terre.

Selon Franchomme (1981), le pouvoir antifongique des huiles essentielles des plantes est principalement lié à leur composition chimique et en particulier à la nature de leurs composés prédominants. Cependant, même les composés mineurs peuvent jouer un rôle important (Tantaoui-El Araki et *al.*, 1995).

De nombreuses études se sont concentrées sur la vérification du potentiel anti-fongique des constituants des plantes sur plusieurs souches de champignons et de levures. Il a été démontré que les composés à pouvoir antifongique élevé sont le thymol, le carvacrol, l'eugénol, le citral et d'autres phénols (Alilou et *al.*, 2007).

Selon l'extraction, l'analyse et la composition chimique de l'huile essentielle de sauge, il semble clair que les espèces de *Salvia* sont de nature aromatique et se caractérisent par un chémotype  $\beta$ -thuyone. À la lumière de ces résultats et par comparaison avec d'autres études, les résultats variables ont été rapportés par Brieskorn (1991) sur les mêmes espèces végétales avec environ 60% de thuyone (mélange d'  $\alpha$  et  $\beta$ -thuyone). Toutefois, dans un autre ouvrage sur la sauge officinale d'Espagne, Fleurentin (2008) a signalé la présence d'un chémotype différent en composés terpéniques avec une prédominance de camphre (11-36%), suivie par le cinéole (11-25%) et très peu de thuyone (<0,5%). Cette divergence dans les résultats, pourrait s'expliquer par le rôle potentiel des facteurs environnementaux et climatiques sur la composition chimique et la qualité de l'extrait des espèces végétales.

En effet, Perry et *al.* (1999) ont étudié et analysé plusieurs échantillons d'huiles essentielles de sauge par CG-SM. Ils ont révélé la présence de trois chémotypes avec des proportions différentes de  $\alpha$ /  $\beta$ -thuyone ( 10 : 1, 1.5 : 1 et 1 : 10).

Selon la composition totale en thuyone, l'huile essentielle de sauge peut être classée à niveau élevé (39-44 %), moyen (22 à 28 %), ou faible (9 %) en thuyone.

Ils ont comparé aussi le rendement en huile essentielle et la composition en  $\beta$ - pinene et en thuyone pour les fleurs et les feuilles de sauge. Ils ont déduit que les pièces florales avaient des teneurs plus élevées en huiles essentielles que les feuilles (1,6 : 1,1%). Il en est de même pour leur composition en  $\beta$ -pinène (27 : 10%). Cependant, les niveaux en thuyone étaient inférieurs (16 : 31%).

Ils ont également affirmé que l'automne et l'hiver sont les meilleures périodes de récolte pour l'obtention des huiles riches en thuyone.

En conclusion, les huiles essentielles de bergamote et de sauge testées pures et à la concentration 1/10 ont confirmé leur pouvoir inhibiteur et fongicide *in vitro* sur les isolats A1 et A2 de *P. infestans*. Comme, elles ont prouvé aussi leur potentiel de réduction du mildiou sur les disques foliaires de pomme de terre des deux variétés Spunta et Kondor.

L'efficacité des huiles essentielles d'agrumes par CG-SM est liée aux monoterpènes oxygénés dont, le nerol, neral, geraniol et geranial.

### **3.1.3 Activité antifongique d'une gamme de préparations à base de plantes sur *Phytophthora infestans***

#### **3.1.3.1 Activité antifongique *in vitro* des extraits aqueux de plantes**

##### **3.1.3.1.1 Activité antifongique *in vitro* des extraits aqueux de plantes sur la croissance mycélienne des isolats de *Phytophthora infestans***

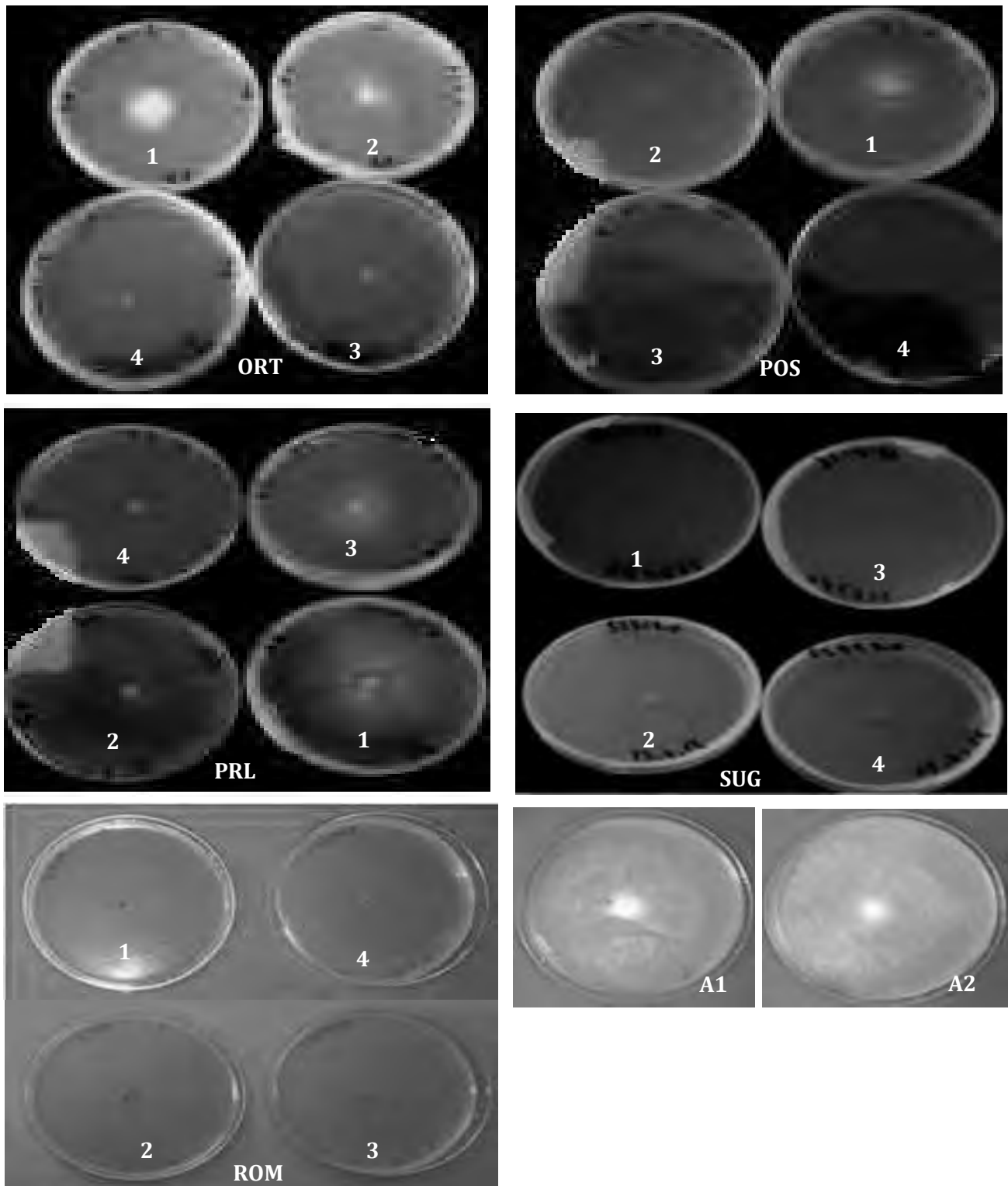
L'activité antifongique *in vitro* des huit extraits aqueux de plantes testés, a révélé une variabilité dans le pouvoir inhibiteur de la croissance mycélienne de *P. infestans*. L'inhibition est très importante quelque soit la concentration pour les extraits du pacanier, de la menthe odorante, de la sauge, du pistachier lentisque et du romarin et peu importante et modérée respectivement pour l'extrait aqueux d'ortie et les extraits de prêle et de posidonie. Elle est aussi proportionnelle aux concentrations des extraits testés (Figure 22).

L'analyse de la variance des taux d'inhibition de la croissance mycélienne montre une différence hautement significative entre les huit extraits aqueux de plantes testés ( $F = 4.684$ ,  $P = 0.000$ ) (Annexe 11), ainsi que leurs doses ( $F = 4.804$ ,  $P = 0.005$ ) (Annexe 11). Par contre une différence non significative est enregistrée pour les deux isolats de *P. infestans* étudiés ( $F = 0.741$ ,  $P = 0.393$ ) (Annexe 11).

En modèle GLM, Les taux d'inhibition enregistrés sur la croissance mycélienne des deux isolats A1 et A2 de *P. infestans* sont très importants, dépassant les 80% pour les extraits aqueux du pacanier, de la menthe odorante, de la sauge, du pistachier lentisque et du romarin, avoisinant les 70% pour l'extrait aqueux d'ortie et en fin ceux de la posidonie et de la prêle avec des taux d'inhibition supérieurs à 50% (Figure 23a).

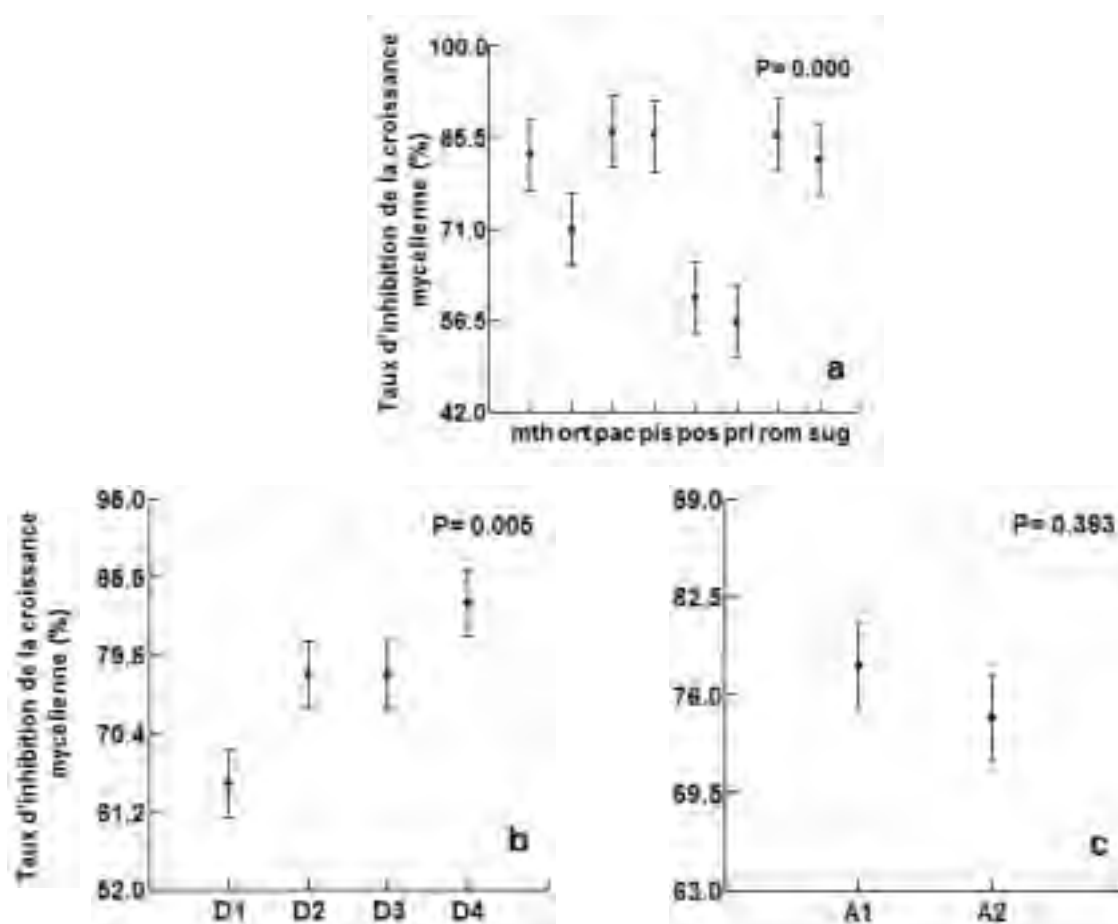
Ils évoluent parallèlement avec les doses des extraits aqueux de plantes, atteignant leur maximum avec les extraits purs (Figure 23b). De même, elle est légèrement plus marquée sur l'isolat A1 de *P. infestans* (Figure 23c).





**Figure 22. Pouvoir inhibiteur des extraits aqueux de plantes sur la croissance mycélienne de *Phytophthora infestans***

- 1 : 5% ; 2 : 10% ; 3 : 20% et 4 : 100% (concentrations des extraits aqueux de plantes) ; **ORT** : Ortie ; **PIS** : Pistachier lentisque ; **POS** : Posidonie ; **PRL** : Prêle ; **ROM** : Romarin ; **SUG** : Sauge ; **A1** et **A2** : Isolats témoins de *Phytophthora infestans*.



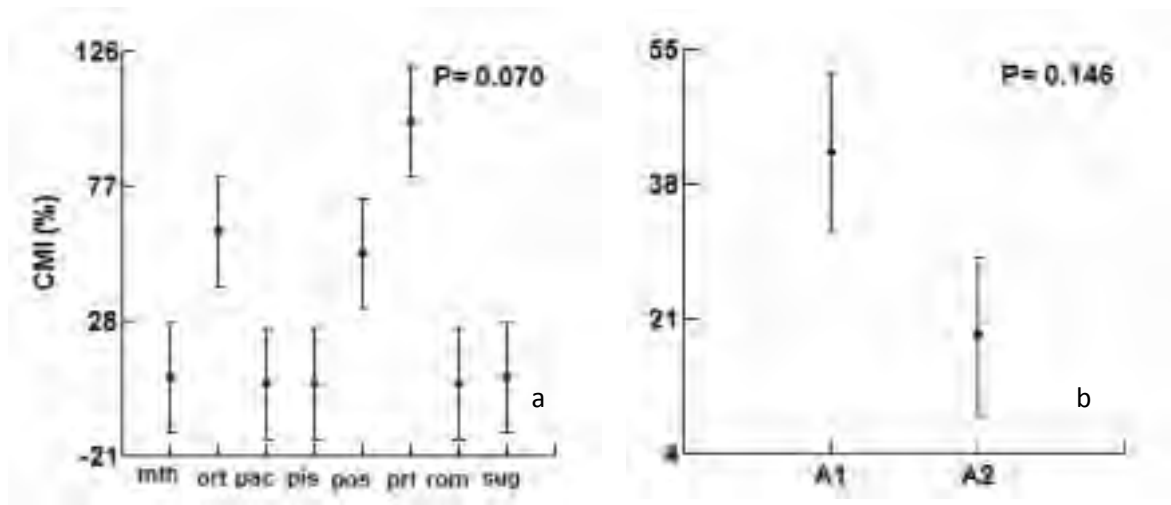
**Figure 23. Effet des extraits aqueux de plantes sur l'inhibition de la croissance mycélienne de *Phytophthora infestans* selon les concentrations et les isolats pathogènes**

- **a** : selon les extraits aqueux de plantes ; **b** : selon les concentrations des extraits aqueux de plantes ; **c** : selon les isolats A1 et A2 de *P. infestans* ; **D1** : 5% ; **D2** : 10% ; **D3** : 20% et, **D4** : 100% ; **Mth** : Menthe ; **Ort** : Ortie ; **Pac** : Pacanier ; **Pis** : Pistachier lentisque ; **Pos** : Posidonie ; **Prl** : Prêle ; **Rom** : Romarin ; **Sug** : Saug

L'analyse de la variance des concentrations minimales inhibitrices (CMI) a montré une différence non significative entre les différents extraits aqueux de plantes et entre les deux isolats de *P. infestans* (Annexe 12).

En présentation GLM, une variabilité des CMI est révélée entre les extraits de plantes. En effet, les extraits aqueux de sauge, de romarin, de pistachier lentisque, de menthe odorante et du pacanier montrent leur pouvoir inhibiteur sur la croissance mycélienne des isolats de *P. infestans* à de faibles concentrations avoisinant les 5%, alors que, des CMI supérieures à 30% et 75% sont enregistrées respectivement pour les extraits aqueux de posidonie et d'ortie, ainsi

que pour celui de la prêle (Figure 24a). Elles sont plus faibles encore pour l'isolat A2 de *P.infestans* (Figure 24b).



**Figure 24. Concentrations minimales inhibitrices des extraits aqueux de plantes sur la croissance mycélienne de *Phytophthora infestans***

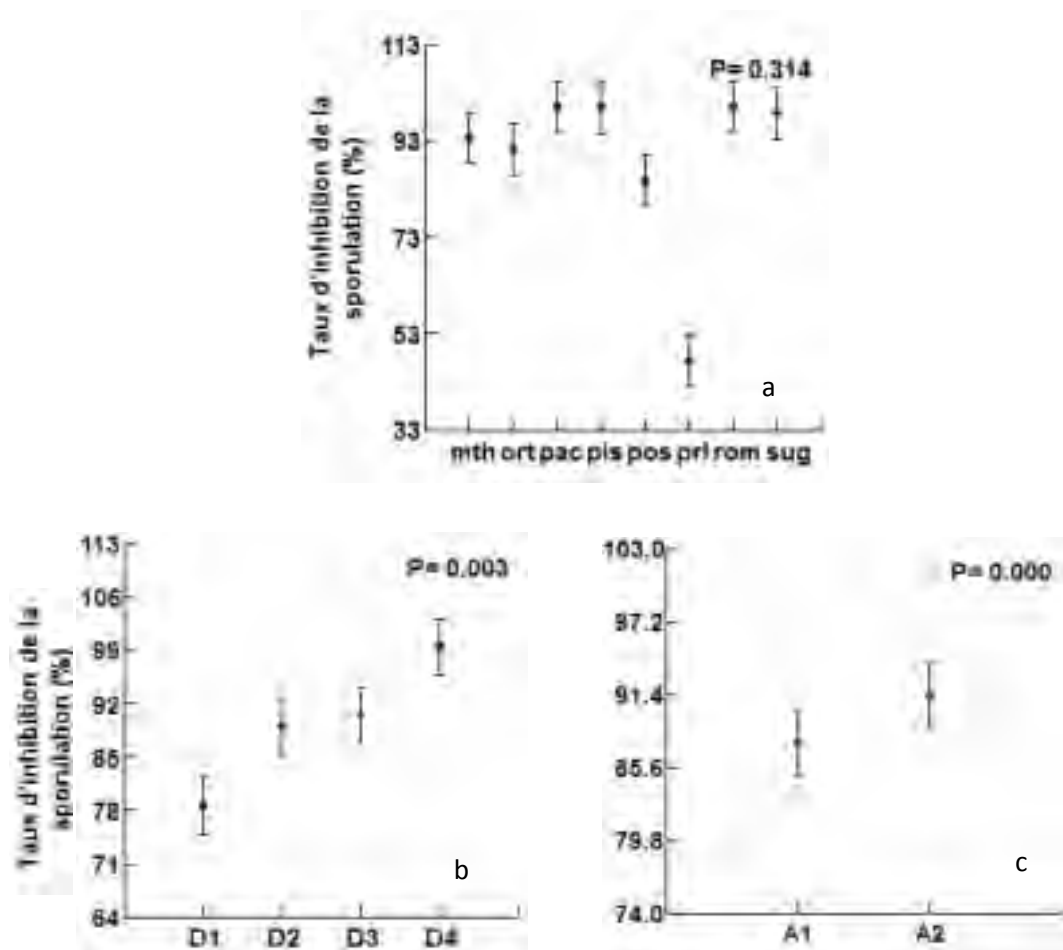
- **Mth** : Menthe ; **ort** : Ortie ; **pac** : Pacanier ; **pis** : Pistachier lentisque ; **pos** : Posidonie ; **prl** : Prêle ; **rom** : Romarin ; **sug** : Sauge ; **a** : selon les extraits aqueux de plantes ; **b** : selon les isolats A1 et A2 de *Phytophthora infestans*

### 3.1.3.1.2 Activité antifongique *in vitro* des extraits aqueux de plantes sur la sporulation des isolats de *Phytophthora infestans*

L'ensemble des extraits aqueux de plantes montrent un effet inhibiteur sur la sporulation des deux isolats de *P.infestans* à n'importe quelle concentration, sauf pour les extraits aqueux de posidonie, de prêle et d'ortie, dont les concentrations sont supérieures à 5% et parfois même à 10%.

L'analyse de la variance des taux d'inhibition de la sporulation montre des différences hautement significatives entre les différents extraits ( $P = 11.445$ ,  $P = 0.000$ ) (Annexe 13) et leurs doses ( $F = 5.249$ ,  $P = 0.003$ ) (Annexe 13) mais, non significative entre les deux isolats A1 et A2 de *P. infestans* ( $F = 1.032$ ,  $P = 0.314$ ) (Annexe 13).

Les extraits aqueux de plantes présentent des taux d'inhibition élevés de la sporulation (supérieurs à 80%) à l'exception de l'extrait de prêle qui montre un taux d'inhibition moyen (de l'ordre de 50%) (Figures 26a, 26c) ; leur pouvoir inhibiteur évolue en fonction de la dose (Figure 26b).



**Figure 25. Effet des extraits aqueux de plantes sur l'inhibition de la sporulation de *Phytophthora infestans* selon les concentrations et les isolats pathogènes**

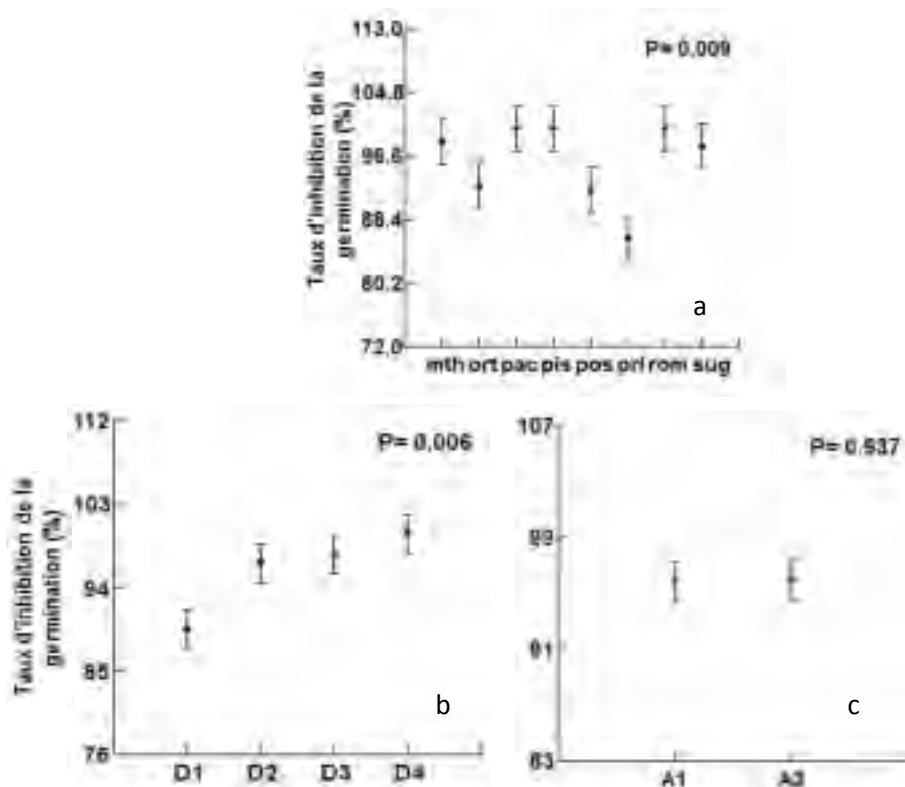
- **D1** : 5%, **D2** : 10%, **D3** : 20% et **D4** : 100%, (concentrations des extraits aqueux de plantes) ; **mth** : Menthe, **ort** : Ortie, **pac** : Pacanier, **pis** : Pistachier lentisque, **pos** : Posidonie, **prl** : Prêle, **rom** : Romarin, **sug** : Sauge, **a** : selon les extraits aqueux de plantes, **b** : selon les concentrations des extraits aqueux de plantes, **c** : selon les deux isolats A1 et A2 de *P. infestans*

### 3.1.3.1.3 Activité antifongique *in vitro* des extraits aqueux de plantes sur la germination des isolats de *Phytophthora infestans*

La germination est aussi affectée par l'activité des extraits aqueux de plantes. L'analyse de la variance des taux d'inhibition de la germination de *P. infestans* montre une différence hautement significative entre les différents extraits de plantes ( $F = 3.079$ ,  $P = 0.009$ ) (Annexe 14) et entre les doses testées ( $F = 4.580$ ,  $P = 0.006$ ) (Annexe 14).

Par contre, elle est non significative pour les isolats A1 et A2 de *P. infestans* ( $F = 0.006$ ,  $P = 0.937$ ) (Annexe 14).

L'ensemble des extraits aqueux enregistrent une forte inhibition de la germination où les taux les plus importants dépassent les 96% (Figures : 27a et 27c ). Ils sont proportionnels aux doses testées (Figure 27b).



**Figure 26. Effet des extraits aqueux de plantes sur la germination de *Phytophthora infestans* selon les concentrations et les isolats pathogènes**

- **D1** : 5% ; **D2** : 10% ; **D3** : 20% et, **D4** : 100 % (concentrations des extraits aqueux de plantes) ; **Mth** : Menthe ; **ort** : Ortie ; **pac** : Pacanier ; **pis** : Pistachier lentisque ; **pos** : Posidonie ; **prl** : Prêle ; **rom** : Romarin ; **sug** : Sauge ; **a** : selon les extraits de plantes ; **b** : selon les concentrations des extraits de plantes ; **c** : selon les deux isolats A1 et A2 de *Phytophthora infestans*

### 3.1.3.1.4 Activité antifongique *in vitro* des extraits aqueux de plantes sur la morphologie des isolats de *Phytophthora infestans*

L'activité antifongique *in vitro* des extraits aqueux de plantes affecte également la morphologie des isolats de *P. infestans*.

Des changements morphologiques sont visibles en comparaison avec les témoins (Figure 25a). Ils sont similaires à ceux engendrés par les huiles essentielles d'agrumes et de sauge, notamment par la lyse et la vacuolisation du mycélium. Les sporanges présentent parfois des déformations ou apparaissent vidées de leur contenu (Figure 25b).

En effet, l'inhibition de la croissance mycélienne et de la sporulation de l'agent pathogène sont accompagnées par ces modifications morphologiques observées à partir de la concentration 5% et 10% pour l'ensemble des extraits aqueux de plantes et à partir des concentrations de 20% et 100% pour les extraits aqueux d'ortie et de prêle.



**Figure 27. Effet de l'extrait aqueux de romarin sur la morphologie de *Phytophthora infestans*, (grossissement X 500)**

**M** : Mycélium ; **S** : Sporangies ; **Lys** : Lyse du Mycélium ; **a** : Isolat témoin ; **b** : Isolat traité par l'extrait aqueux de romarin

### 3.1.3.1.5 Pouvoir fongicide *in vitro* des extraits aqueux de plantes sur les isolats de *Phytophthora infestans*

Le pouvoir fongicide *in vitro* est variable selon les extraits aqueux de plantes, selon leurs concentrations, selon les deux isolats de *P. infestans* après le transfert de leurs explants mycéliens préalablement inhibés sur milieu PPA.

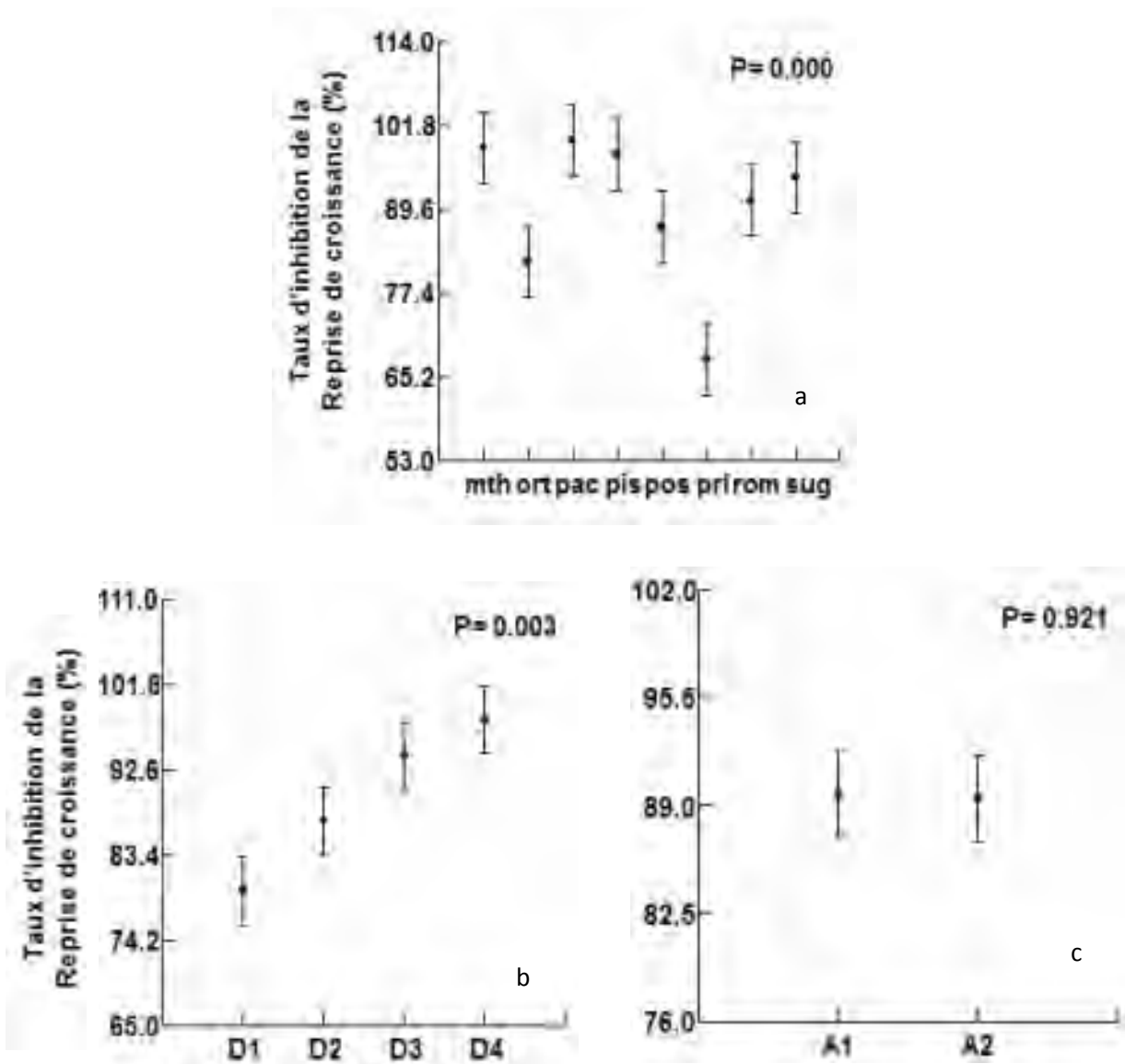
L'analyse de la variance des taux d'inhibition de la reprise de croissance mycélienne montre une différence très hautement significative entre des différents extraits des plantes ( $F = 4.304$ ,  $P = 0.000$ ) (Annexe 15) et entre les quatre doses testées ( $F = 4.898$ ,  $P = 0,003$ ) (Annexe 15). Cependant, cette différence s'avère non significative entre les deux isolats de *P. infestans* ( $F = 0.010$ ,  $P = 0.921$ ) (Annexe 15).

L'inhibition de la reprise de croissance mycélienne des deux isolats pathogènes est très importante, dépassant les 90% pour les extraits de menthe odorante, du pacanier, du pistachier lentisque, de la posidonie, du romarin et de la sauge.

Elle apparaît également intéressante soit d'environ 75% pour les traitements à base des extraits d'ortie et de prêle (Figure 28a). Elle évolue de manière proportionnelle avec la dose de l'extrait utilisé pour atteindre son maximum à l'état pure, enregistrant une inhibition de 90% (Figure 28b). Cette inhibition demeure élevée pour les deux isolats de *P. infestans* (Figure 28c).

L'analyse de la variance des concentrations inhibitrices létales « CIL » montre une différence hautement significative entre les extraits aqueux de plantes ( $F = 8.213$ ,  $P = 0.382$ ) (Annexe 16) mais, non significative entre les isolats A1 et A2 de *P. infestans* ( $F = 0.869$ ,  $P = 0.382$ ) (Annexe 16).

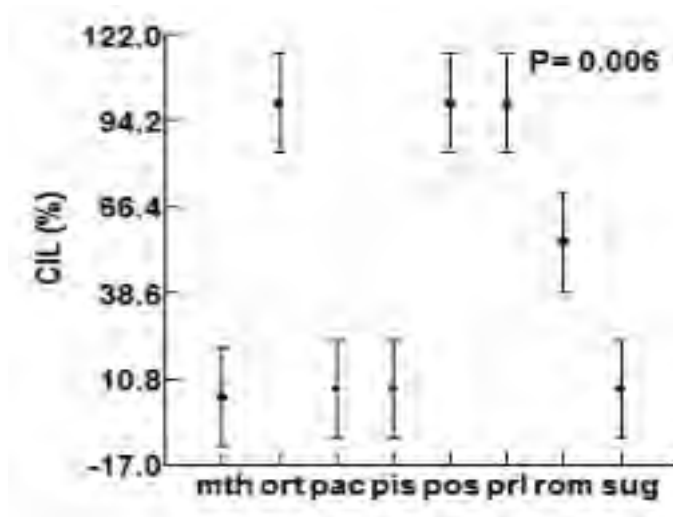
En modèle GLM, les extraits aqueux de menthe odorante, du pacanier, du pistachier lentisque et de la sauge présentent les plus faibles CIL, avoisinant les 10% suivi, par les extraits aqueux de romarin avec des CIL de l'ordre de 70%, et finalement les extraits aqueux d'ortie, de posidonie et de prêle avec des CIL de 100% (Figure 29).



**Figure 28. Pouvoir fongicide *in vitro* des extraits aqueux de plantes sur la reprise de la croissance mycélienne de *Phytophthora infestans***

- **D1** : 5% ; **D2** : 10% ; **D3** : 20% et, **D4** : 100 % (concentrations des extraits aqueux de plantes) ; **Mth** : Menthe ; **ort** : Ortie ; **pac** : Pacanier ; **pis** : Pistachier lentisque ; **pos** : Posidonie ; **prl** : Prêle ; **rom** : Romarin ; **sug** : Saug **a** : selon les extraits aqueux des plantes ; **b** : selon les concentrations des extraits de plantes ; **c** : selon les deux isolats A1 et A2 de *Phytophthora infestans*





**Figure 29. Concentrations inhibitrices létales (CIL) des extraits aqueux de plantes sur les isolats de *Phytophthora infestans***

- **Mth** : Menthe ; **ort** : Ortie ; **pac** : Pacanier ; **pis** : Pistachier lentisque ; **pos** : Posidonie ; **prl** : Prêle ; **rom** : Romarin ; **sug** : Saug

### 3.1.3.2 Activité antifongique *in vivo* d'une gamme de préparations à base de plantes

#### 3.1.3.2.1 Activité antifongique *in vivo* d'une gamme de préparations à base de plantes sur la période d'incubation du mildiou de la pomme de terre

La période d'incubation des symptômes du mildiou développés par les isolats de *P. infestans* et traités par les préparations à base de plantes est généralement située entre le 2<sup>ème</sup> et le 3<sup>ème</sup> jour.

L'analyse de la variance des périodes d'incubation du mildiou a montré des différences significatives entre les modes d'application des préparations à base de plantes ( $F = 3.936$ ,  $P = 0.002$ ), entre les variétés selon les modes d'application par trempage ( $F = 10.028$ ,  $P = 0.003$ ), et par arrosage ( $F = 4.521$ ,  $P = 0.045$ ) (Annexe 17), entre les isolats de *P. infestans* selon le mode par trempage ( $F = 4.518$ ,  $P = 0.038$ ) (Annexe 17), et entre les préparations à base de plantes selon les modes par trempage ( $F = 2.819$ ,  $P = 0.014$ ) et le mode curatif ( $F = 4.157$ ,  $P = 0.001$ ) (Annexe 17).

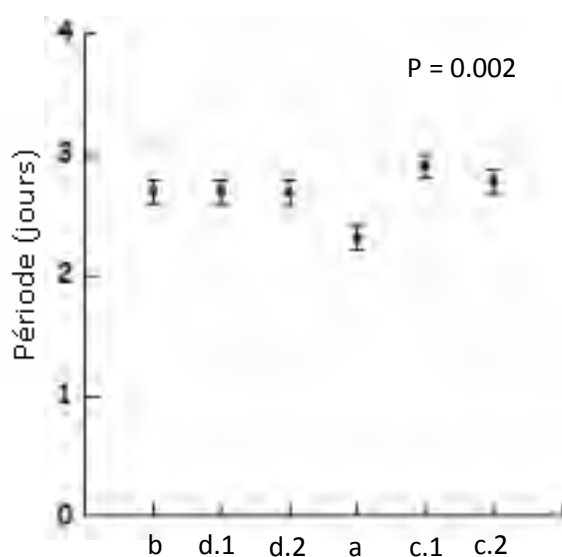
Cependant, une différence non significative est enregistrée entre les concentrations des extraits aqueux de plantes pour le mode d'application par trempage ( $F = 0.995$ ,  $P = 0.323$ ) (Annexe 17) et le mode curatif ( $F = 0.017$ ,  $P = 0.896$ ) (Annexe 17).

En modèle GLM, la période d'incubation est d'environ de 2 à 3 jours. Une période de 2 jours est enregistrée pour le mode par incorporation des poudres de plantes dans le sol alors que, le mode par trempage dans les extraits purs montre une période de 3 jours (Figure 30).

En général, la même période d'incubation avoisinant ou se situant au 3<sup>ième</sup> jour est enregistrée pour les deux variétés testées de pomme de terre concernant les différents modes d'application des traitements à de très légères différences pour le mode par arrosage et le mode par trempage (Figures 31b et 31c).

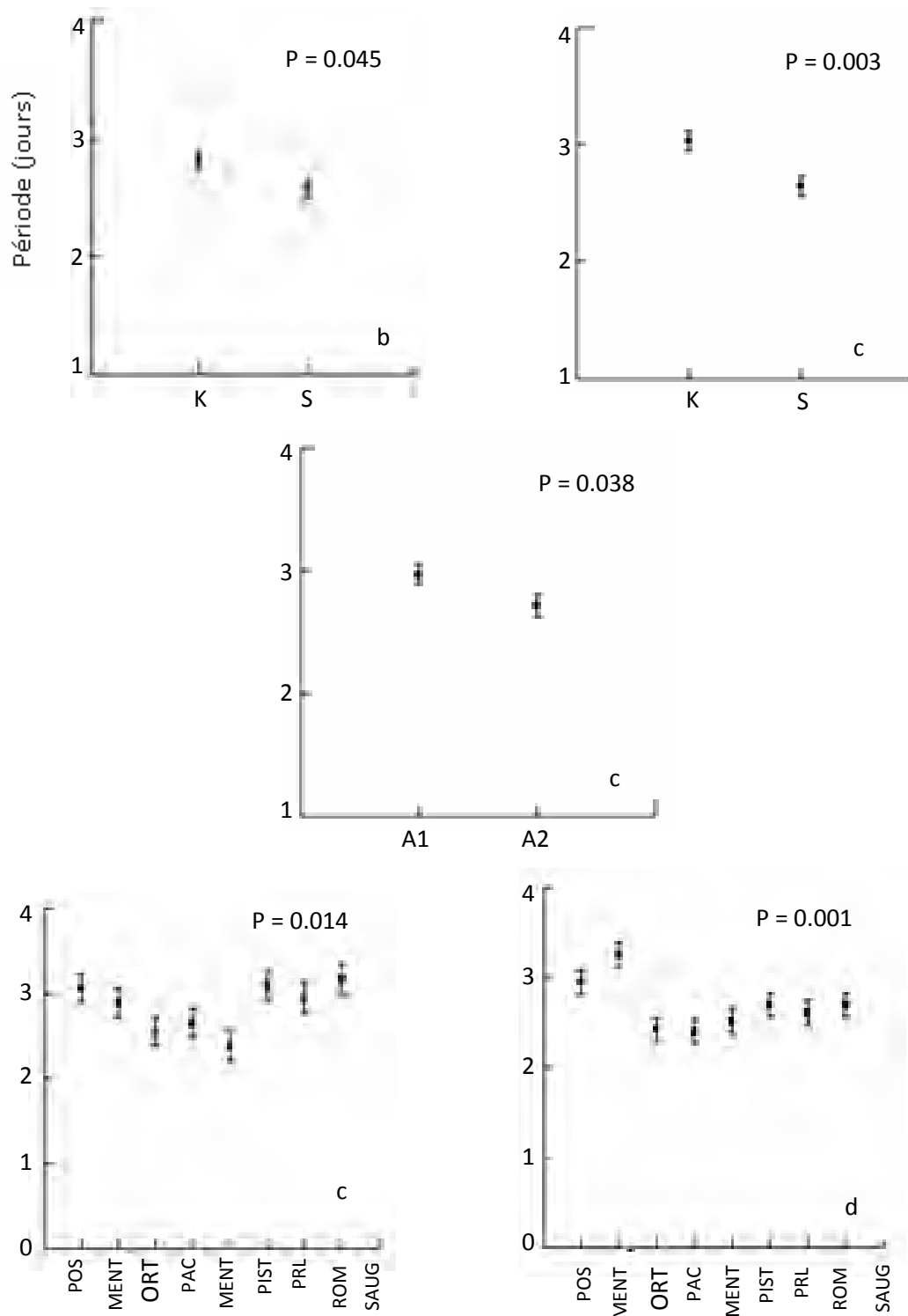
Une très faible différence est également notée entre les deux isolats *P. infestans* concernant le mode d'application préventif par trempage (Figure 31c).

Cependant, cette période semble légèrement plus prolongée (au-delà du 3<sup>ième</sup> jour) sous l'effet des extraits aqueux du pistachier lentisque, de la prêle, du romarin et de la sauge en mode préventif par trempage et en appliquant l'extrait aqueux à base de menthe odorante pour le mode curatif (Figures 31c et 31d).



**Figure 30. Effet des modes d'application des préparations à base de plantes sur la période d'incubation du mildiou**

- **a** : incorporation des poudres de plantes ; **b** : Arrosage ; **c** : Trempage ; **d** : Curatif ; **1** : Extrait pur ; **2** : Extrait dilué à 20%



**Figure 31. Périodes d'incubation du mildiou selon les modes d'application, les extraits aqueux de plantes, les variétés de pomme de terre et les isolats pathogènes**

- **b** : Arrosage par les extraits de plantes ; **c** : Trempage dans les extraits ; **d** : Traitement curatif à base d'extraits ; **K** : kondor ; **S** : spunta ; **POS** : posidonie ; **MENT** : menthe odorante ; **ORT** : ortie ; **PAC** : pacanier ; **PIST** : pistachier lentisque ; **PRL** : prêle ; **ROM** : romarin ; **SAUG** : sauge

### **3.1.3.2.2 Activité antifongique *in vivo* d'une gamme de préparations à base de plantes sur le pouvoir pathogène des isolats de *Phytophthora infestans***

Par ailleurs, les préparations à base de plantes ont affirmé leur activité antifongique *in vitro* par la réduction du pouvoir pathogène de *P. infestans*.

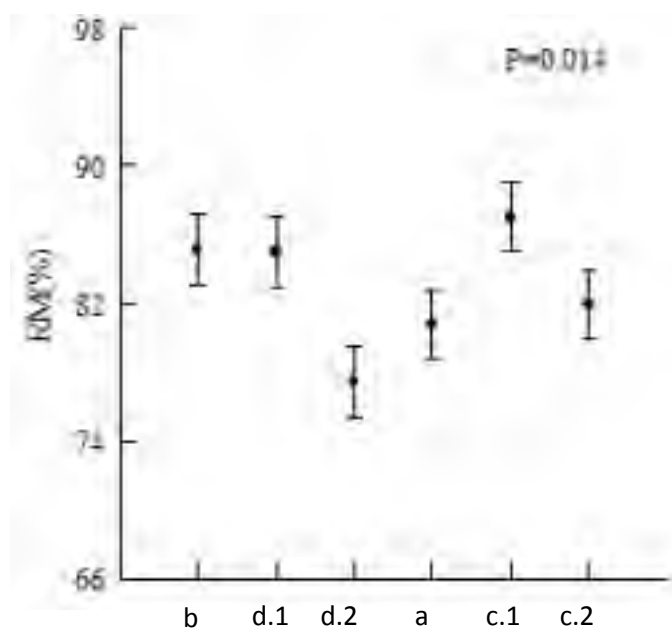
L'analyse de la variance des taux de réduction de la maladie montre une différence significative entre les modes d'application des traitements ( $F=2.934$ ,  $P=0.014$ ) (Annexe 18). Une différence hautement significative est également enregistrée entre les variétés testées de pomme de terre pour le mode curatif ( $F=13.582$ ,  $P=0.001$ ) (Annexe 18), entre les extraits aqueux des plantes pour l'ensemble des modes d'application des traitements et, pour le mode d'application curatif pour les dilutions des extraits aqueux des plantes ( $F=0.546$ ,  $P=0.003$ ) (Annexe 18). Cependant, une différence non significative est constatée entre les deux isolats de *P. infestans* pour l'ensemble des modes d'application des traitements (Annexe 18). En modèle GLM, le taux de réduction de la maladie le plus élevé est enregistré pour le mode préventif par trempage dans les extraits purs (Figure 32, c1: 87%), alors que le plus faible taux est enregistré pour le mode curatif à base d'extraits aqueux des plantes dilués à 20% (Figure 32, d2 : 78%).

La réduction de la maladie s'avère importante selon les modes d'application des traitements, aux deux dilutions des extraits aqueux de plantes testés par le mode par trempage et le mode curatif (taux de réduction supérieurs à 74%). Ainsi, le classement des modes est établi dans l'ordre décroissant suivant (Figure 32) :

- Mode par trempage des disques foliaires dans les extraits purs (c1 : 87%) ;
- Arrosage par extraits aqueux (b : 86%) ;
- Mode curatif à base d'extraits purs (d1 : 85%) ;
- Mode par trempage dans les extraits dilués à 20% (c2 : 82%) ;
- Mode par incorporation des poudres dans le sol (a: 81%) ;
- Mode curatif à base d'extraits dilués à 20% (d2 : 78%).

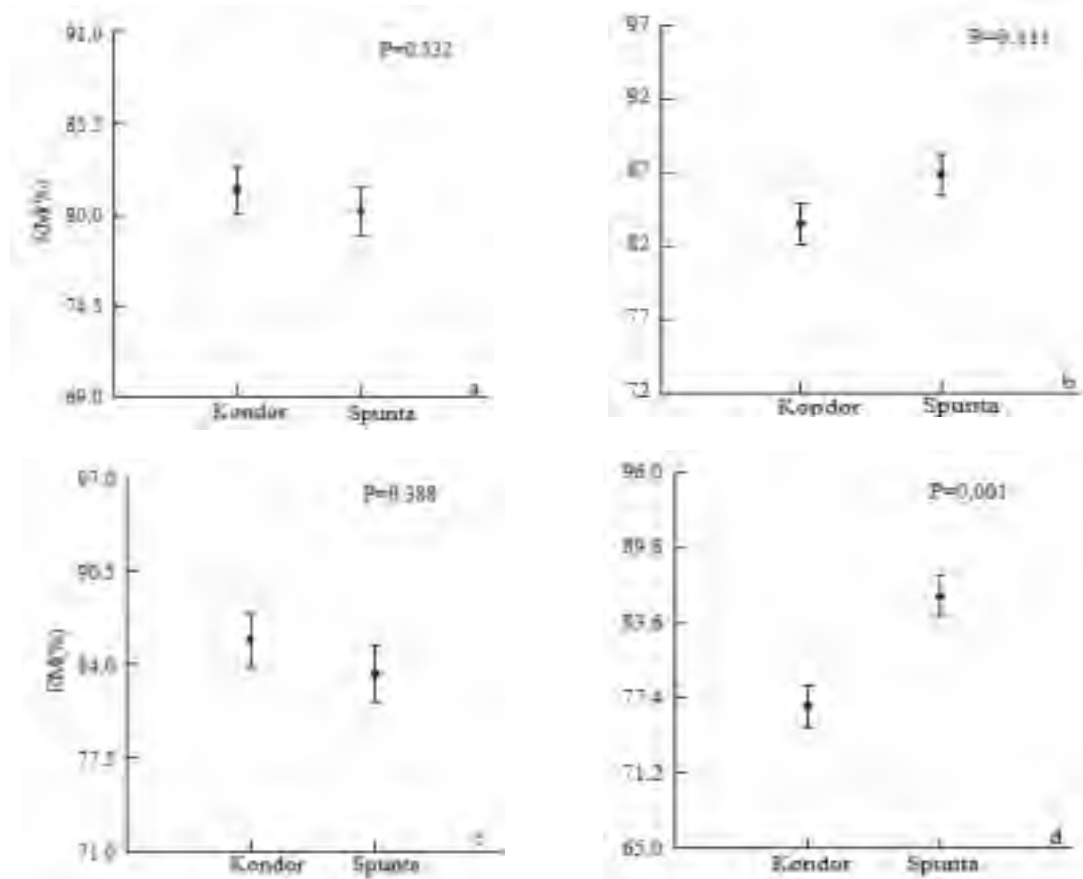
Ces résultats montrent que la réduction de la maladie est notée pour l'ensemble des modes d'application de préparations à base de plantes, comparés aux témoins qui enregistrent une forte infection sur les deux variétés de pomme de terre (Figure 33).

Les taux de réduction de la maladie dépassent les 75% sur les deux variétés de pomme de terre testées, mais la variété Spunta montre une importante réduction pour les modes d'application: curatif (85%) par pulvérisation (Figure 33d) et préventif par arrosage (86%) (Figure 33b), alors qu'elle est plus marquée sur la variété Kondor pour les modes préventifs par incorporation des poudres de plantes (82%) et par trempage (86%) (Figures 33a et 33c ).



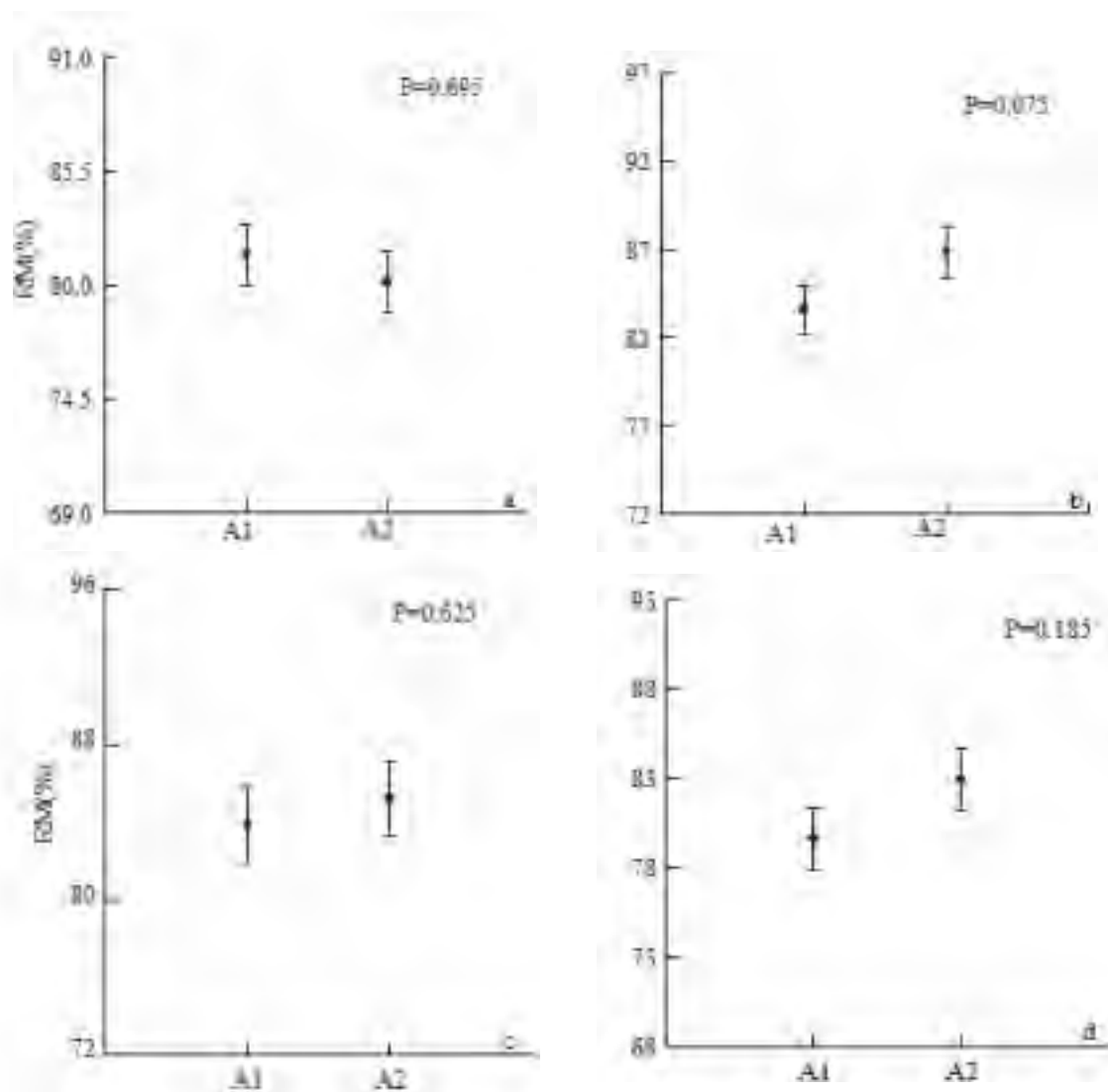
**Figure 32. Effet des modes d'application des préparations à base de plantes sur le pouvoir pathogène de *Phytophthora infestans***

**b** : Mode préventif par arrosage ; **d** : Mode curatif ; **a** : Mode préventif par incorporation des poudres de plantes dans le sol ; **c** : Mode préventif par trempage ; **1** : Extrait pur ; **2** : Extrait dilué à 20% ; **RM (%)** : Taux de réduction de la maladie



**Figure 33. Effet des modes d'application des préparations à base de plantes sur le pouvoir pathogène de *Phytophthora infestans* selon les variétés de pomme de terre**

- **a** : Mode par incorporation des poudres dans le sol ;
- **b** : Mode préventif par arrosage ;
- **c** : Mode préventif par trempage ;
- **d** : Mode curatif par pulvérisation ;
- **K** : Variété kondor ;
- **S** : Variété Spunta ;
- **RM (%)** : Taux de réduction de la maladie



**Figure 34. Effet des préparations de plantes sur le pouvoir pathogène de *Phytophthora infestans* selon les isolats pathogènes**

- **a** : Incorporation des poudres dans le sol ; **b** : Arrosage par les extraits ; **c** : Trempage dans les extraits ; **d** : Traitement curatif à base d'extraits ; **RM (%)** : Réduction de la maladie

En effet, la réduction de la maladie est mise en évidence pour l'ensemble des préparations à base de plantes. Celles à base de posidonie, de menthe odorante, de sauge et de prêle confirment leurs potentialités antifongiques vis-à-vis de *P. infestans*, avec des taux de réduction de la maladie dépassant les 80% (Figure 35). Ainsi, le classement des préparations à base de plantes est établi selon leur modes d'application dans l'ordre décroissant suivant (Figure 36) :

- En modes préventifs par

- Trempage dans les extraits aqueux de sauge (93%), de posidonie (92%), de menthe odorante (90%), de prêle (87%), de romarin (85%), d'ortie (82%), de pacanier (74%) et, de pistachier lentisque (67%).

- Arrosage des plants par les extraits aqueux à base de posidonie (94%), de menthe odorante (92%), de prêle (87%), d'ortie (86%), de sauge (85%), de romarin (80%), de pistachier lentisque (78%) et, de pacanier (75%).

- Incorporation dans le sol des poudres à base de posidonie et de menthe odorante (89%), de prêle (85%), de sauge (83%), de romarin (78%), d'ortie (76%), de pacanier (73%) et de pistachier lentisque (67%).

- En mode curatif par pulvérisation des extraits aqueux à base de posidonie (93%), de menthe odorante (90%), de romarin (82%), de sauge (81%), de prêle (80%), de pistachier lentisque (78%), de pacanier (73%) et d'ortie (67%).

Une importante réduction du pouvoir pathogène est notée pour les deux isolats de *P.infestans* (avoisinant ou dépassant les 80%) selon les différents modes d'application des préparations à base de plantes. Cependant, elle affecte beaucoup plus l'isolat A2 pour les modes de traitements appliqués par arrosage (87%), par trempage (85%) et le mode curatif par pulvérisation (83%), alors qu'elle est sensiblement la même pour les deux isolats concernant le mode par incorporation des poudres de plantes dans le sol (A1 : 81%, A2 : 80%) (Figure 34).

Il est important de souligner que la réduction de la maladie est plus marquée en application des extraits aqueux de plantes purs qu'avec des extraits aqueux de plantes dilués pour le mode d'application par trempage (Figure 37c) et le mode curatif (Figure 37d).





A2

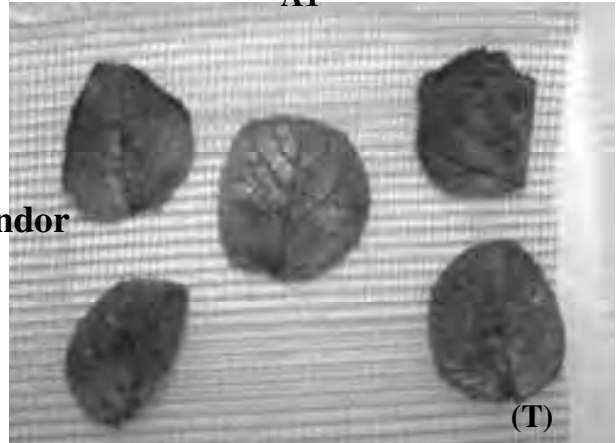


A1

Spunta



Kondor



(T)



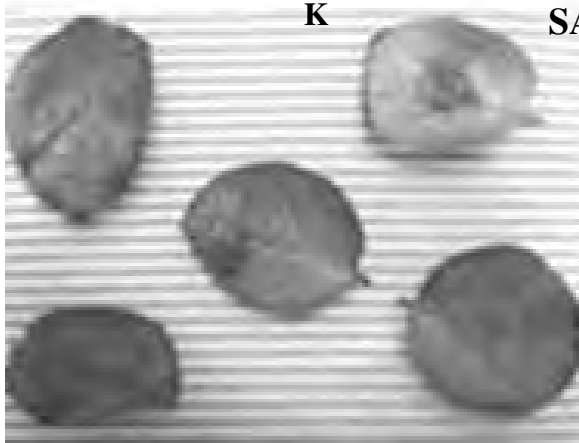
A1



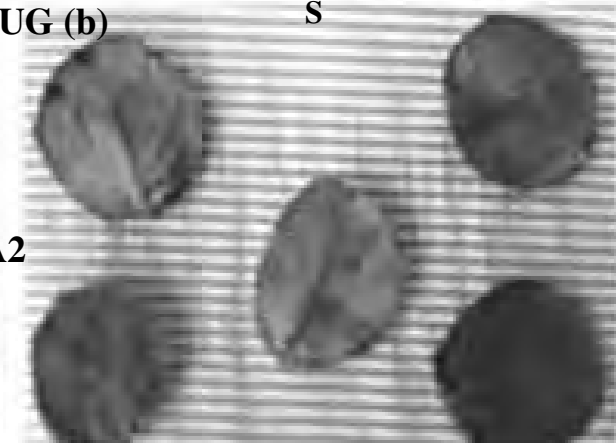
K

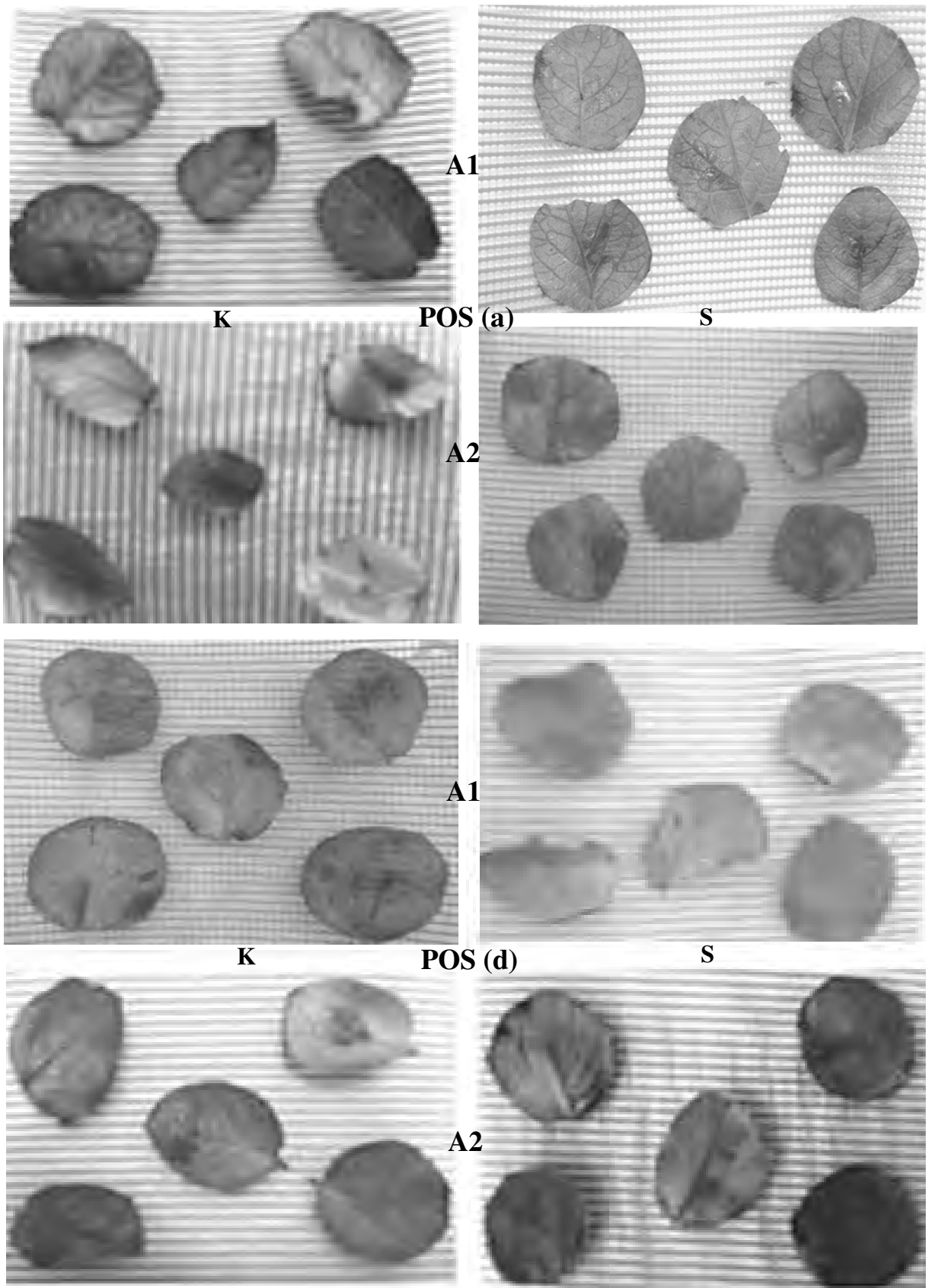
SAUG (b)

S



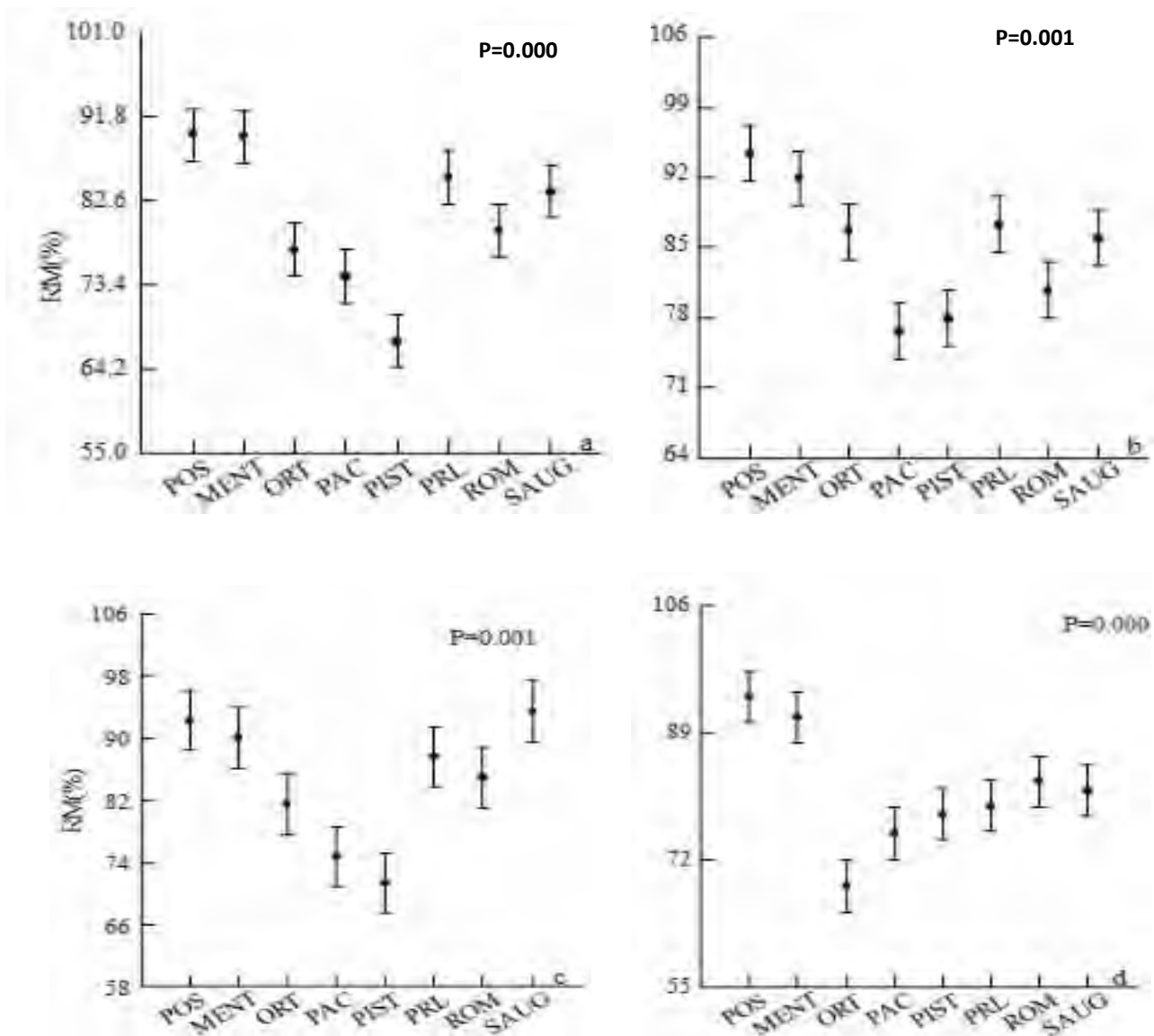
A2





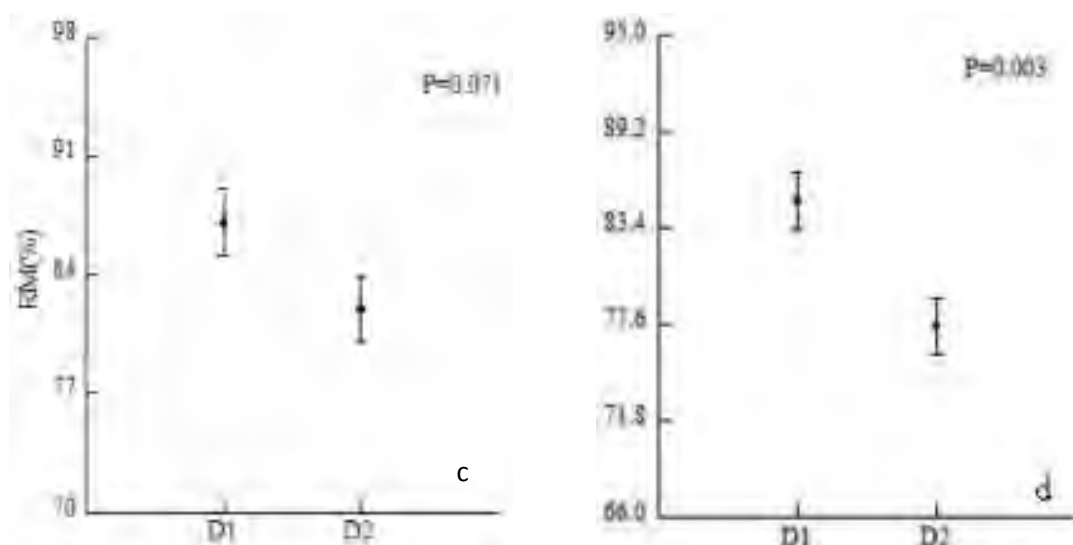
**Figure 35. Effet des préparations à base de plantes et leur modes d'application sur le développement des symptômes du mildiou de la pomme de terre**

- **a** : Mode par incorporation des poudres de plantes dans le sol ; **b** : Mode préventif par arrosage ; **d** : Mode curatif ; **K** : Variété Kondor ; **S** : Variété Spunta ; **POS** : posidonie ; **SAUG** : sauge ; **T** : Témoins



**Figure 36. Effet des préparations à base de plantes sur le pouvoir pathogène de *Phytophthora infestans* selon leur modes d'application**

- **a** : Mode par incorporation des poudres dans le sol, **b** : Mode préventif par arrosage, **c** : mode préventif par trempage ; **d** : Mode curatif par pulvérisation ; **MENT** : menthe odorante ; **ORT** : ortie ; **PAC** : pacanier ; **PIST** : pistachier lentisque ; **PRL** : prêle ; **ROM** : romarin ; **SAUG** : sauge ; **POS** : posidonie ; **RM (%)** : Taux de réduction de la maladie



**Figure 37. Effet des extraits aqueux de plantes sur le pouvoir pathogène de *Phytophthora infestans* selon leurs concentrations**

- **c** : Mode préventif par trempage ; **d** : Mode curatif par pulvérisation ; **D1** : Extraits aqueux purs ; **D2** : Extraits aqueux dilués à 20% ; **RM (%)** : Taux de réduction de la maladie

### 3.1.3.2.3 Activité antifongique *in vivo* d'une gamme de préparations à base de plantes sur la sporulation des isolats de *Phytophthora infestans*

La sporulation des isolats de *P. infestans* est également inhibée *in vivo* par les préparations à base de plantes. Il est très important de signaler que l'ensemble des extraits aqueux de plantes appliqués selon le mode préventif par arrosage ont montré une inhibition totale de la sporulation (100%) des deux isolats de *P. infestans* sur les deux variétés de pomme de terre.

L'analyse de la variance des taux d'inhibition de la sporulation ne montre pas de différence significative entre les trois autres modes d'application des traitements, entre les variétés de pomme de terre, entre les préparations à base de plantes et, entre les dilutions d'extraits aqueux de plantes pour les modes curatif par pulvérisation et préventif par trempage (Valeurs de P supérieures à 0.05) (Annexe 19).

Cependant, une différence significative est révélée entre les deux isolats de *P. infestans* pour le mode préventif par trempage ( $F = 4.544$ ,  $P = 0.038$ ) (Annexe 19).

Par la présentation GLM, l'ensemble des modes d'application des préparations à base de plantes montrent une importante inhibition de la sporulation de *P. infestans* sur les disques foliaires de pomme de terre, avec des taux d'inhibition dépassant les 90% et atteignant même les 100 % (Figure 38). Leur classement est établi dans l'ordre décroissant suivant :

- Arrosage par les extraits aqueux de plantes purs (100%),
- Mode curatif à base d'extraits aqueux de plantes dilués à 20% et préventif par incorporation des poudres de plantes dans le sol (97%),
- Trempage dans les extraits aqueux de plantes purs et dilués à 20% et mode curatif à base d'extraits aqueux de plantes purs (94,5%).

Aussi, l'inhibition *in vivo* de la sporulation est également très importante (supérieure à 90%) sur les deux variétés de pomme de terre pour l'ensemble des modes d'application de traitements (Figure 39).

Cette inhibition est très importante pour les deux isolats de *P. infestans* (taux d'inhibition dépassant les 85% et atteignant même les 100%) (Figure 40). Elle apparaît plus importante pour l'isolat A1 que celui de A2 pour les modes préventifs par trempage et arrosage (Figures 40b et 40c).

Des taux d'inhibition très importants de la sporulation sont enregistrés sur les deux souches de *P. infestans* pour le mode par incorporation de poudres de plantes dans le sol (Figure 38a).

L'inhibition de la sporulation de *P. infestans* est importante *in vivo*, selon les modes d'application des préparations à base de plantes. Les taux d'inhibition sont supérieurs à 75% et atteignent parfois les 100% ( Figure 41). Les préparations à base de plantes sont classées selon les modes d'application et les taux d'inhibition de sporulation *in vivo*, comme suit :

Le mode préventif par

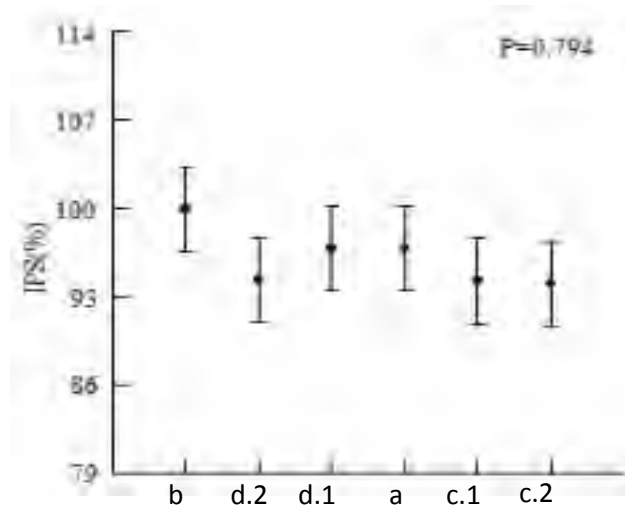
- Incorporation dans le sol des poudres de plantes à base de posidonie, de menthe odorante, de prêle, de sauge, de romarin, de pacanier et de pistachier lentisque (100%) ainsi que d'ortie (75%) ont les % d'inhibition le plus élevé (Figure 41a).

- Trempage des disques foliaires dans les extraits aqueux à base de posidonie, de menthe odorante, de prêle, de romarin et de pacanier (100%), de sauge (90%), de pistachier lentisque (89%) et d'ortie (76%) (Figure 41c).

Le Mode curatif par pulvérisation des extraits aqueux à base de menthe odorante, d'ortie, de prêle, de sauge, de pacanier et de pistachier lentisque (100%), de posidonie (90%) et de romarin (75,5%) ( Figure 41 d).

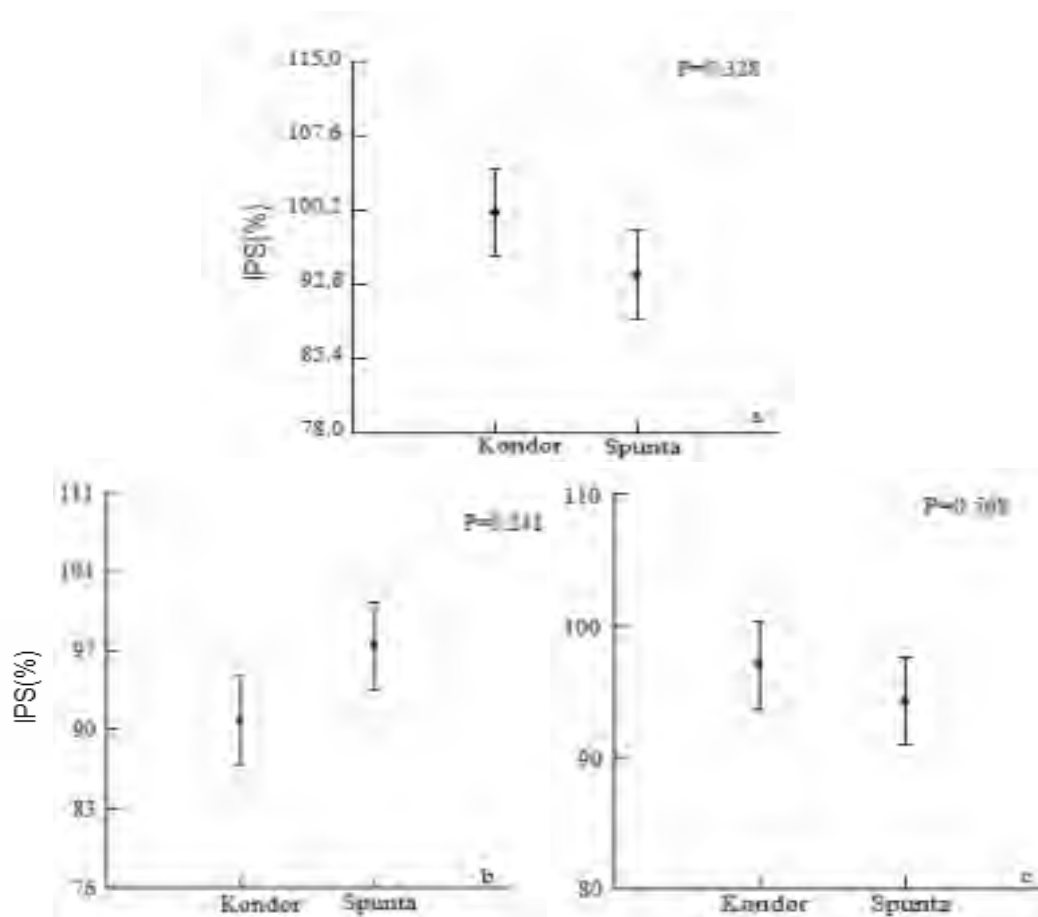
D'autre part, une légère variation des taux d'inhibition de la sporulation est notée entre les deux dilutions des extraits aqueux de plantes pour le mode curatif où on enregistre d'importants taux d'inhibition de la sporulation (97%) pour les extraits aqueux de plantes dilués (Figure 42c) et pour les extraits aqueux de plantes purs (95%) (Figure 42d).

Néanmoins, des taux d'inhibition de la sporulation similaires sont relevés pour les extraits aqueux de plantes purs et dilués en ce qui concerne le mode préventif par trempage (94%) (Figure 42c).



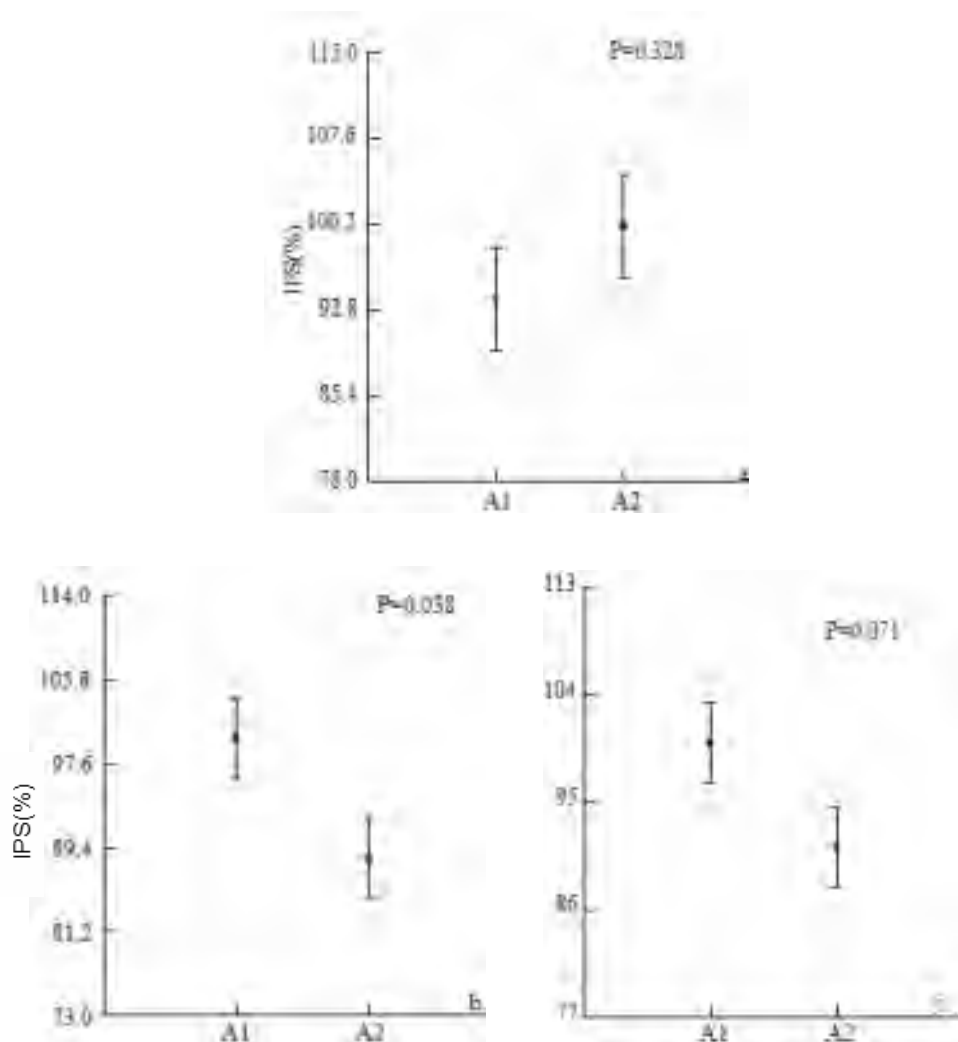
**Figure 38. Effet des modes d'application des préparations à base de plantes sur l'inhibition *in vivo* de la sporulation de *Phytophthora infestans***

**a** : Mode préventif par incorporation de poudres de plantes dans le sol ; **b** : Mode préventif par arrosage ; **c1** : Mode préventif par trempage dans l'extrait aqueux pur ; **c2** : Mode préventif par trempage dans l'extrait aqueux dilué à 20% ; **d1** : Mode curatif par pulvérisation de l'extrait aqueux pur ; **d2** : Mode curatif par pulvérisation de l'extrait aqueux dilué à 20% ; **IPS (%)** : Taux d'inhibition de la production de sporanges.



**Figure 39. Effet des modes d'application des préparations à base de plantes sur l'inhibition *in vivo* de la sporulation de *Phytophthora infestans* selon les variétés de pomme de terre**

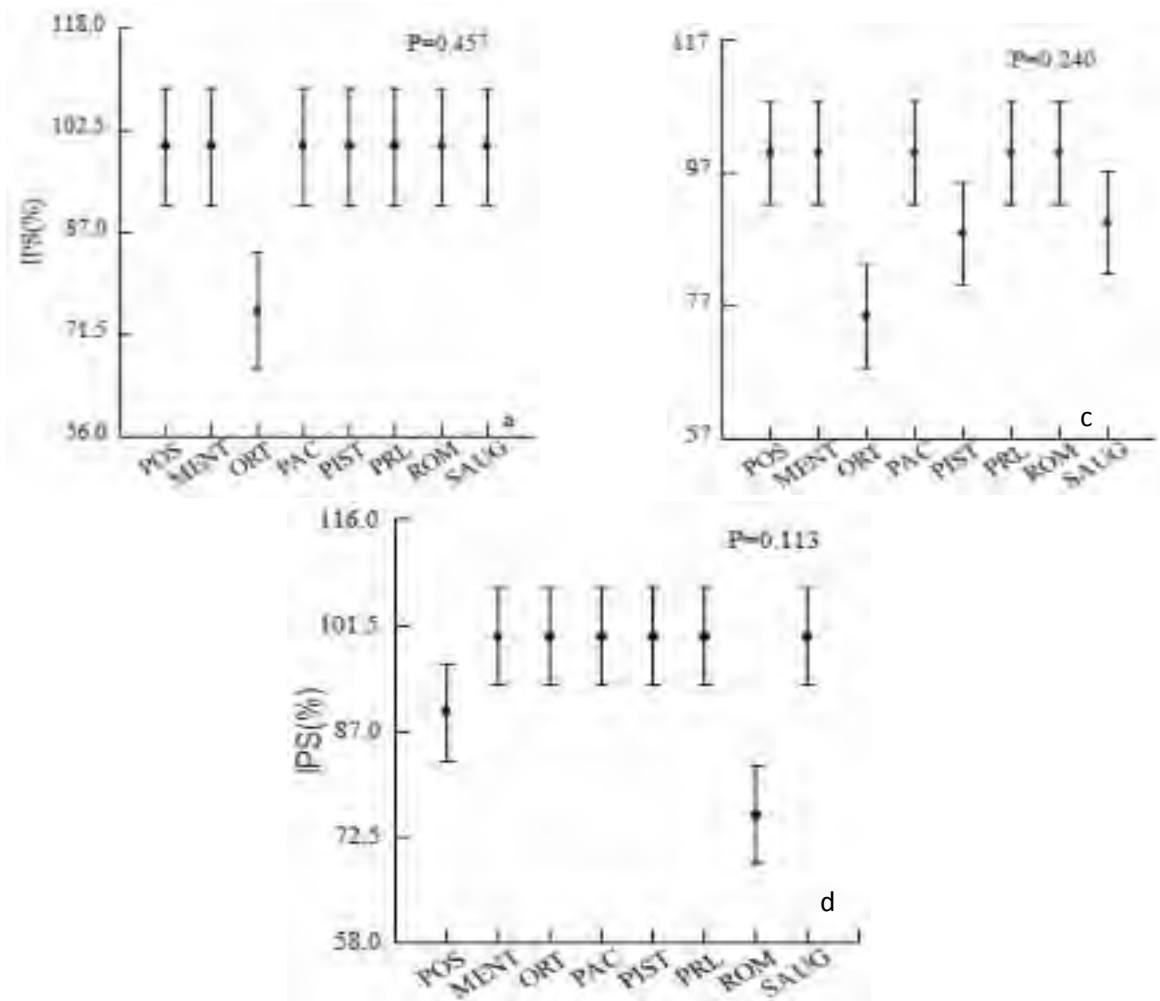
- **a** : Incorporation des poudres dans le sol ; **b** : Arrosage par les extraits aqueux de plantes ; **c** : Trempage dans les extraits aqueux de plantes ; **d** : Traitement curatif à base d'extraits aqueux de plantes ; **IPS (%)** : Inhibition de la production de sporanges.



**Figure 40. Effet des préparations à base de plantes sur l'inhibition *in vivo* de la sporulation de *Phytophthora infestans* selon les modes de leur application et les isolats de *P. infestans***

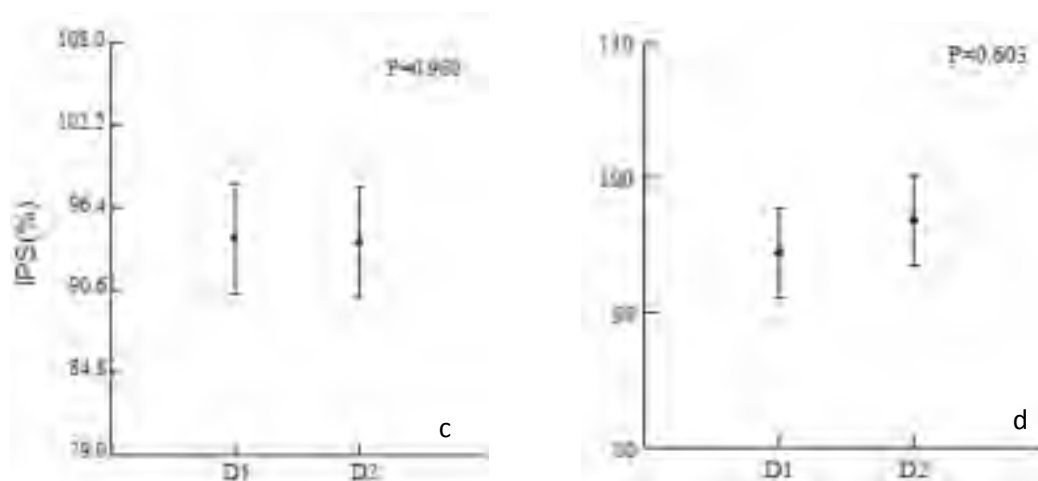
**a** : Mode préventif par incorporation des poudres de plantes dans le sol ; **b** : Mode préventif par arrosage ; **c** : Mode préventif par trempage ; **d** : Mode curatif par pulvérisation ; **IPS (%)** : Taux d'inhibition de la production de sporanges.





**Figure 41. Effet des préparations à base de plantes sur l'inhibition *in vivo* de la sporulation de *Phytophthora infestans* selon les modes de leur application**

- **a** : Mode par incorporation des poudres de plantes dans le sol ; **c** : Mode préventif par trempage ; **d** : Mode curatif ; **POS** : posidonie ; **MENT** : menthe odorante ; **ORT** : ortie ; **PAC** : pacanier ; **PIST** : pistachier lentisque ; **PRL** : prêle ; **ROM** : romarin ; **SAUG** : sauge ; **IPS (%)** : Taux d'inhibition de la production de sporanges.



**Figure 42. Effet des concentrations des extraits aqueux de plantes sur l'inhibition *in vivo* de la sporulation de *Phytophthora infestans* selon les modes de leur application**

- **c** : Mode préventif par trempage ; **d** : Mode curatif ; **D1** : Extraits purs ; **D2** : Extraits dilués à 20%, **IPS (%)** : Taux d'inhibition de la production de sporanges

### 3.1.3.3 Discussion

En effet, de nombreux travaux rapportent que les plantes sont capables de produire des substances naturelles très variées. En plus des métabolites primaires classiques, elles synthétisent et accumulent des métabolites secondaires dont la fonction physiologique n'est pas toujours évidente mais qui présente une large gamme de molécules exploitables en agriculture dans le cadre de la phytoprotection (Regnault-Roger, 2008 ; Haddouchi et Benmansour, 2008).

Dans ce sens, le pouvoir inhibiteur variable des extraits végétaux testés à l'égard des deux isolats de *P. infestans* peut être interprété par les travaux de Burt (2004) ; Lahlou (2004) ainsi que Davicino et *al.* (2007) qui ont souligné que l'activité biologique d'un extrait de plante est liée à sa composition chimique, aux groupements fonctionnels de ses composés majoritaires, à leur effet synergique et à leurs proportions.

Yakhlef et *al.* (2011) ont également affirmé que la valeur d'un extrait tient à l'intégralité des constituants et non seulement à leurs composés majoritaires.

Ainsi, la quantité et la qualité de ces composés actifs dépendent de la plante, du tissu végétal, et de plusieurs facteurs exogènes (Demo et Oliva, 2008; Webster et *al.*, 2008).

Rappelant aussi que, nos résultats sont comparables à de nombreux travaux rapportés par la bibliographie et ayant déjà confirmé l'efficacité de certains extraits de plantes dans le biocontrôle des maladies phytopathogènes.

En effet, un pouvoir inhibiteur élevé de la croissance mycélienne des isolats de *P. infestans* étudiées est enregistré à une faible concentration pour les extraits de sauge, de menthe odorante, du pistachier lentisque et, du romarin, mais à des concentrations plus élevées, pour ceux de la prêle, de l'ortie et de la posidonie. Ces résultats coïncident avec ceux des travaux de Kordali et al. (2003) en utilisant les extraits bruts obtenus à partir des feuilles de *Pistacia lentiscus* à l'égard de *Pythium ultimum* et de *Rhizoctania solani*. Aussi, l'activité antimicrobienne de son huile essentielle est traduite par la haute concentration en  $\alpha$ -pinène (Baranowska et al., 2002) et le linalol (Imelouane et al., 2009). Le terpinenol et le  $\alpha$ -terpinéol sont également deux composants principaux de cette huile essentielle responsable de l'inhibition totale de la croissance mycélienne d'*Aspergillus flavus* (Barra et al., 2007).

De la même façon, l'huile essentielle de sauge a confirmé aussi son activité antifongique contre *Phytophthora infestans* (Kim et al., 2002; Dorn et al., 2007). Son efficacité reste donc liée à la présence des molécules identifiées comme, l'alpha-bisabolol, le farnesol, l'anethole et le carvacrol (Jean et al., 1992 ; Takeuchi et al., 2005).

La même activité a été également démontrée *in vitro* pour l'extrait d'ortie, concernant plusieurs champignons phytopathogènes et saprophytes dont la paroi mycélienne est riche en chitine (Brockaert et al., 1989 ; Huesing et al., 1991 ; Veldhuizen et al., 2006 ; Hadizadeh et al., 2009) et l'extrait brut et à différentes concentrations de *Rosmarinus officinalis* à l'égard d'*Alternaria solani* (Goussous et al., 2010). Dans ce sens, Davidson et Naidu (2000) ont affirmé le pouvoir antifongique élevé du romarin lié à ses composés phénoliques tels que les terpènes où l'on peut citer le borneol, le camphre, le 1,8 cineole, le pinène, le camphène, le verbenone et l'acétate bornyl. Par ailleurs, Dellavalle et al. (2011) ont également démontré le pouvoir inhibiteur des extraits de *Salvia officinalis* et *Rosmarinus officinalis* vis-à-vis de la croissance mycélienne d'*Alternaria* sp.

D'autres travaux ont affirmé le même effet pour les extraits de *Posidonia oceanica* vis-à-vis de *Fusarium oxysporum f.sp. radicum-lycopersici* (Kouki et al., 2012) et pour ceux de *Carya illinoensis* vis-à-vis de *Rhizoctonia solani* (Hernández-Castillo et al., 2010).

Les travaux de Yanar et al. (2011) sur l'activité antifongique *in vitro* de l'extrait de *Salvia officinalis* par l'inhibition totale la croissance mycélienne de *P. infestans*.

En outre, Maxim et al. (2005) ont démontré l'inhibition totale *in vitro* de la germination des conidies de *Venturia inaequalis*, agent causal de la tavelure du pommier par les traitements à base d'extraits aqueux d'*Equisetum arvense*.

De même, Hadizadeh et al. (2009), ont affirmé le pouvoir inhibiteur important de l'extrait d'*Urtica dioica* sur la croissance mycélienne d'*Alternaria alternata* (taux d'inhibition > 97%), *Rhizoctonia solani*, *Fusarium oxysporum* (taux d'inhibition compris entre 80 et 90%) et *Fusarium solani* (taux d'inhibition compris entre 75 et 80%).

Par ailleurs, Oumzil et al. (2002), ont signalé aussi une forte capacité d'inhibition des extraits de *Mentha suaveolens* en testant l'activité antimicrobienne contre des bactéries et des champignons phytopathogènes. Ils ont identifié et classé les principaux constituants aromatiques de cette plante selon le pouvoir antifongique et antibactérien, dans l'ordre décroissant. On peut citer la pulegone, l'oxyde piperitenone et l'oxyde piperitone. D'autres dérivés aromatiques comme le carvone, le limonene et la menthone qui ont fait l'objet à d'autres études.

Hernández-Castillo et al. (2010) ont également évalué l'effet antifongique *in vitro* d'extrait éthanolique des cosques de noix de pecan '*carya illinoensis*' vis-à-vis de *Rhizoctonia solani* et ils ont démontré qu'il était efficace en inhibant considérablement la croissance mycélienne du phytopathogène.

Dans ce sens, il a été jugé important de déterminer la concentration minimale inhibitrice de chaque extrait. En effet, le pouvoir inhibiteur d'un extrait végétal vis-à-vis d'une souche microbienne peut connaître différents classements. Ainsi, les extraits de sauge, du romarin, du pistachier lentisque, de la menthe odorante et du pacanier présentent un pouvoir inhibiteur intéressant mais, il reste faible pour la posidonie, l'ortie et la prêle.

Les modifications morphologiques induites par l'activité des extraits aqueux de plantes peuvent interpréter leur haut pouvoir inhibiteur et fongicide sur *P. infestans*. En effet, il a été déjà affirmé que c'est l'effet toxique des composants d'un extrait sur la fonctionnalité et la structure de la membrane cellulaire qui est responsable du pouvoir antifongique (Bouchra et al., 2003 ; Yoshimura et al., 2011).

Omidbeygi et al. (2007) ont suggéré que les composants des huiles essentielles et des extraits traversent cette dernière et interagissent avec ses enzymes et ses protéines, c'est la production d'un flux de protons vers la cellule extérieure qui incite des changements cellulaires et en fin de compte, la mort du microorganisme.

Cristani et al. (2007), ont affirmé que l'activité antimicrobienne est liée à la capacité des terpènes d'affecter non seulement la perméabilité mais aussi d'autres fonctions des membranes cellulaires. De même, Lucini et al. (2006) ont suggéré aussi que les mono-terpènes présents dans les extraits de plantes augmentent la concentration des

peroxydes lipidiques tels que les radicaux hydroxyle, l'alcoxyl et alkoperoxyl et provoquer ainsi la mort cellulaire.

Nos résultats affirment également que tous les extraits aqueux de plantes testés même à la plus faible dilution (5%), sont d'excellents inhibiteurs de la sporulation et de la germination de *P. infestans*. Leurs taux d'inhibition dépassent généralement les 75% et peuvent atteindre les 100% pour certains extraits tels que, celui du pistachier lentisque, du pacanier et du romarin. Cela peut être traduit par la déformation des sporanges et la lyse de leur contenu par les molécules bioactives renfermées dans ces extraits.

Dans ce sens, plusieurs travaux coïncident avec nos résultats. Il s'est avéré que les extraits de plantes, riches en groupements phénols ont montré également, une activité inhibitrice élevée sur la sporulation des champignons (Inouye et *al.*, 1998).

Les travaux de Duru et *al.* (2003) ont confirmé que les effets antifongiques de plusieurs extraits de plantes semblent avoir une corrélation avec le développement incomplet des conidiophores et des modifications morphologiques d'*Aspergillus fumigatus*.

Dans le même sens, Blaeser et Steiner (1998) ont montré que les extraits de différentes plantes empêchent la germination et affectent la sortie et la mobilité des zoospores de *P. infestans*.

Par ailleurs, tous les extraits aqueux de plantes ont montré un effet fongicide variable selon les doses. La détermination des CIL nous a permis de savoir à partir de quelle concentration chaque extrait devient fongicide. L'échelle de Koba et *al.* (2004) et Webster et *al.* (2008) ont permis le classement des extraits aqueux à base de menthe odorante, de pacanier, de pistachier lentisque et de sauge à pouvoir fongicide intéressant, à partir de la concentration 10%, comparés à ceux à base de romarin, de posidonie, d'ortie et de prêle dont les CIL dépassent les 70%. Leur activité fongicide reste liée à la composition chimique de ces plantes.

Dans ce contexte, Bansa et *al.* (1999) ont révélé des substances à effet fongistatique, dans les extraits de plantes aux concentrations inférieures qui deviennent fongicides aux concentrations plus élevées.

Il est très important de signaler aussi que l'ensemble des extraits aqueux à base de plantes effectués en mode préventif par arrosage montrent une inhibition totale de la sporulation (100%) des deux isolats de *P. infestans* sur les deux variétés de pomme de terre.

L'activité antifongique *in vivo* des préparations à base de plantes sur les deux isolats A1 et A2 de *P. infestans* et, selon les différents modes d'application a montré des taux de

réduction de la maladie compris entre 67 et 94% et des taux d'inhibition de la sporulation dépassant les 75%. Leur pouvoir antifongique est démontré dans cette présente étude.

Il pourrait être attribué à la composition phytochimique des plantes utilisées, qui peuvent renfermer des molécules bioactives efficaces contre *P. infestans*.

De nombreux travaux de recherche relatifs à l'activité antifongique *in vivo* des préparations à base de plantes sont actuellement connus et corroborent avec nos résultats.

Blaeser et *al.* (2002) ont évalué l'efficacité antifongique de plusieurs extraits de plantes contre *P. infestans*. Ils ont affirmé que les extraits de *Salvia officinalis* ont réduit le mildiou sur feuilles et ont augmenté le rendement de la pomme de terre jusqu'à 12 à 17%. Ils ont traduit la réduction de la maladie par l'effet inhibiteur des extraits de cette plante sur la germination des sporanges et la mobilité des zoospores.

D'autre part, les extraits de prêle ont été surtout décrits pour leurs propriétés fongicides. Les travaux de Cwalina-Ambroziak et Nowak (2011), ont affirmé le biocontrôle des champignons phytopathogènes, colonisant les plants et le sol après pulvérisation et arrosage des plants de tomates avec des extraits aqueux d'*Equisetum arvense* purs et dilués à 5%. Dans ce contexte, de nombreux travaux ont affirmé que la prêle est une des plantes les plus riches en silicium qui peut être présent sous de nombreuses formes: silanols, acide orthosilicique, silicium lié à des protéines, des sucres, de l'azote, D'autres ont confirmé sa composition polyphénolique (flavonoïdes, acides-phénols), permettant le renforcement de la résistance des plantes aux bioagresseurs (Syrchina et *al.*, 1975 ; Carnat et *al.*, 1991).

Des études menées par Mekuria et *al.* (2005), sur l'activité antifongique *in vivo* des extraits d'*Urtica dioica* ont souligné aussi une réduction significative des maladies causées par *Alternaria solani*, *Phytophthora infestans* et *Oidium lycopersicum* sur tomate, *Erysiphe graminis f. sp. tritici* sur blé et *Uromyces appendiculatus* sur les haricots.

Bertrand et *al.* (2007), a rapporté aussi que le dépôt d'une poignée de feuilles fraîches d'ortie dans chaque trou au moment de la plantation de tomates et de pommes de terre ainsi que l'arrosage des plants à base du purin d'ortie sont préconisés comme traitements préventifs contre certains bioagresseurs.

Thomidis et Exadaktylou (2010), ont évalué *in vitro* l'efficacité antifongique d'extrait de compost de *Posidonia oceanica* contre *Monilinia sp.*, *Penicillium sp.* et *Rhizopus sp.* et ont confirmé que le traitement préventif à base de cet extrait réduit considérablement le pourcentage de pourritures des fruits en post-récolte.

Par ailleurs, le pouvoir antifongique *in vivo* des extraits de plantes sur *Phytophthora infestans* a été mis en valeur par de nombreux auteurs. Shutong et al. (2007) ont prouvé que les extraits de *Galla chinensis* manifestent une réduction importante du mildiou sur les feuilles de pomme de terre. Stephan et al. (2005), ont mis en évidence l'effet fongicide des extraits à base de *Rheum rhabarbarum* et de *Solidago canadensis*, ces derniers en application préventive, se sont avérés efficaces pour atténuer l'infection de *P. infestans* sur les feuilles détachées de pomme de terre.

De même, Röhner et al. (2003), ont rapporté que, des traitements préventifs à base d'extraits de feuilles d'*Hedera helix* et *Paeonia suffruticosa* ont supprimé quasi-totalement le développement du mildiou sur feuilles détachées de tomate.

Ainsi, Majeed et al. (2011), ont suggéré que des pulvérisations foliaires d'extraits aqueux de feuilles de *Podophyllum hexandrum*, *Xanthium strumarium* et *Withania somnifera*, réduisent la sévérité de la maladie et entraînent une augmentation du rendement en tubercules. Aussi, Khair et Haggag (2007), ont signalé que des pulvérisations foliaires d'extraits aqueux obtenus à partir de feuilles de basilic (*Ocimum bacilicum*), d'eucalyptus (*Eucalyptus globulus*), de citronnelle (*Cymbopogon citratus*), de marjolaine (*Majorana hortensis*), de menthe poivrée (*Mentha piperita*), de fruits de piment (*Capsicum frutescens*) et de bulbes d'ail (*Allium sativum*), réduisent considérablement la sévérité du mildiou sur feuilles détachées des plants de pomme de terre cultivés en pots et en plein champ.

En conclusion, toutes les préparations aqueuses et poudreuses de plantes ont montré leur potentiel de réduction d'inoculum *in vitro* et celui de la maladie, *in vivo* sur les disques foliaires des variétés Spunta et Kondor de pomme de terre. Une résistance des plantes au mildiou est également induite par ces dernières.

Leur pouvoir fongicide a été enregistré pour la sauge, le pistachier lentisque, la Menthe odorante et le pacanier à une CIL de 10 % mais, à une CIL supérieure à 70% pour le romarin, la posidonie, la prêle et l'ortie.

Le mode préventif par arrosage des extraits aqueux de plantes et celui par incorporation des poudres de plantes dans le sol sont recommandés dans la lutte biologique contre le mildiou de la pomme de terre.

## **3.2 Recherche de *Trichoderma* spp. agents antagonistes du mildiou de la pomme de terre**

### **3.2.1 Isolement, caractérisation et identification des isolats de *Trichoderma* spp.**

#### **3.2.1.1 Isolement**

Les isollements réalisés ont permis d'obtenir 11 isolats de genre *Trichoderma* dont 7 proviennent de la rhizosphère de pomme de terre et 4 sont issus des masses d'œufs de nématodes du genre *Meloïdogyne*, provenant des galles racinaires des plants de tomate, collectés de différentes localités d'Algérie (Tableau 4).

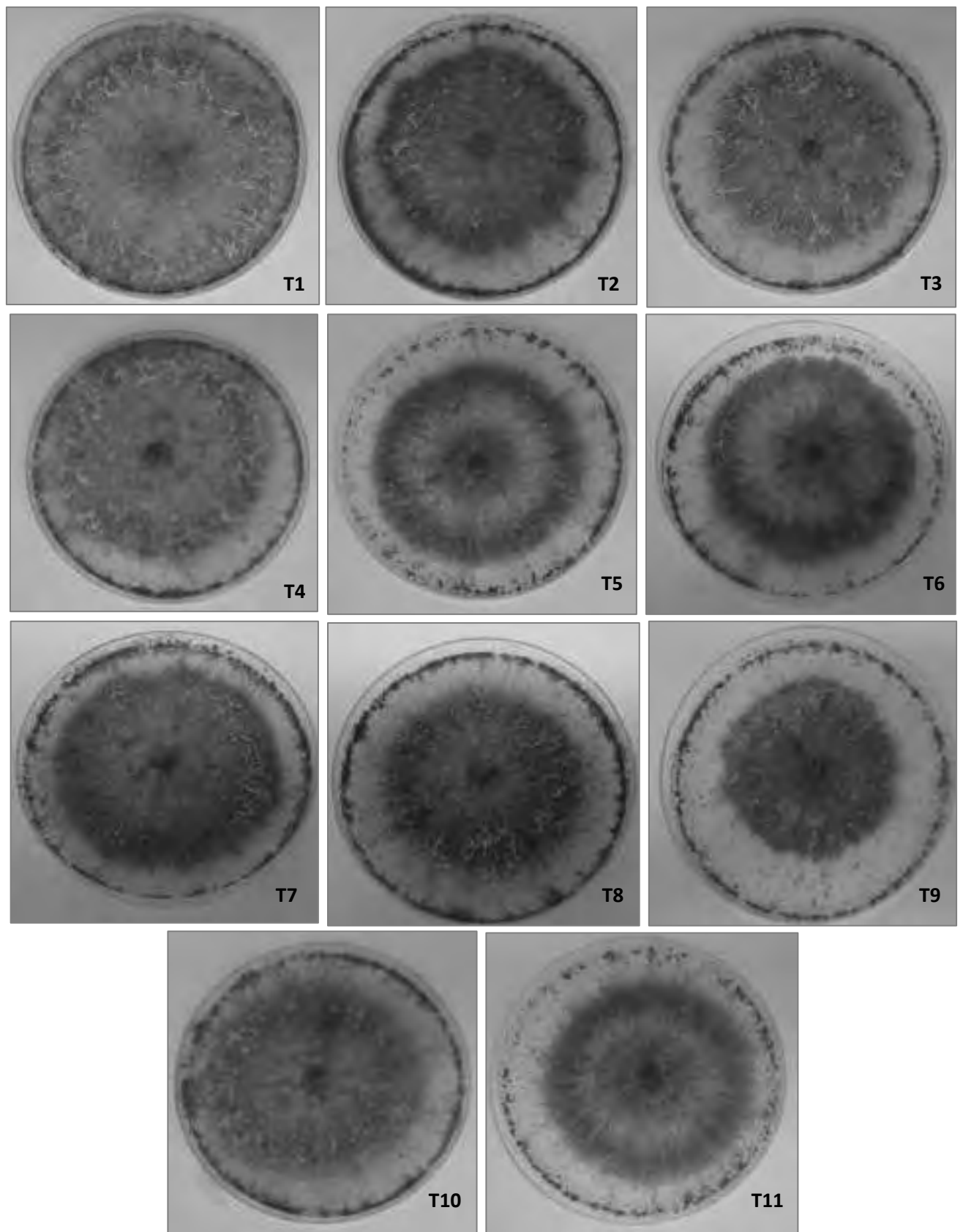
#### **3.2.1.2 Caractérisation culturelle et morphologique**

Les colonies des isolats de *Trichoderma* étudiés sont de type aérien, laineux, à croissance rapide, de couleur blanche au début puis virent vers le jaune-vert pour devenir vert en vieillissant (Figure 43). Un seul isolat (T10) dégage une légère odeur douce aromatique ; les autres présentent une odeur terreuse rappelant l'odeur normale de tous les *Trichoderma*.

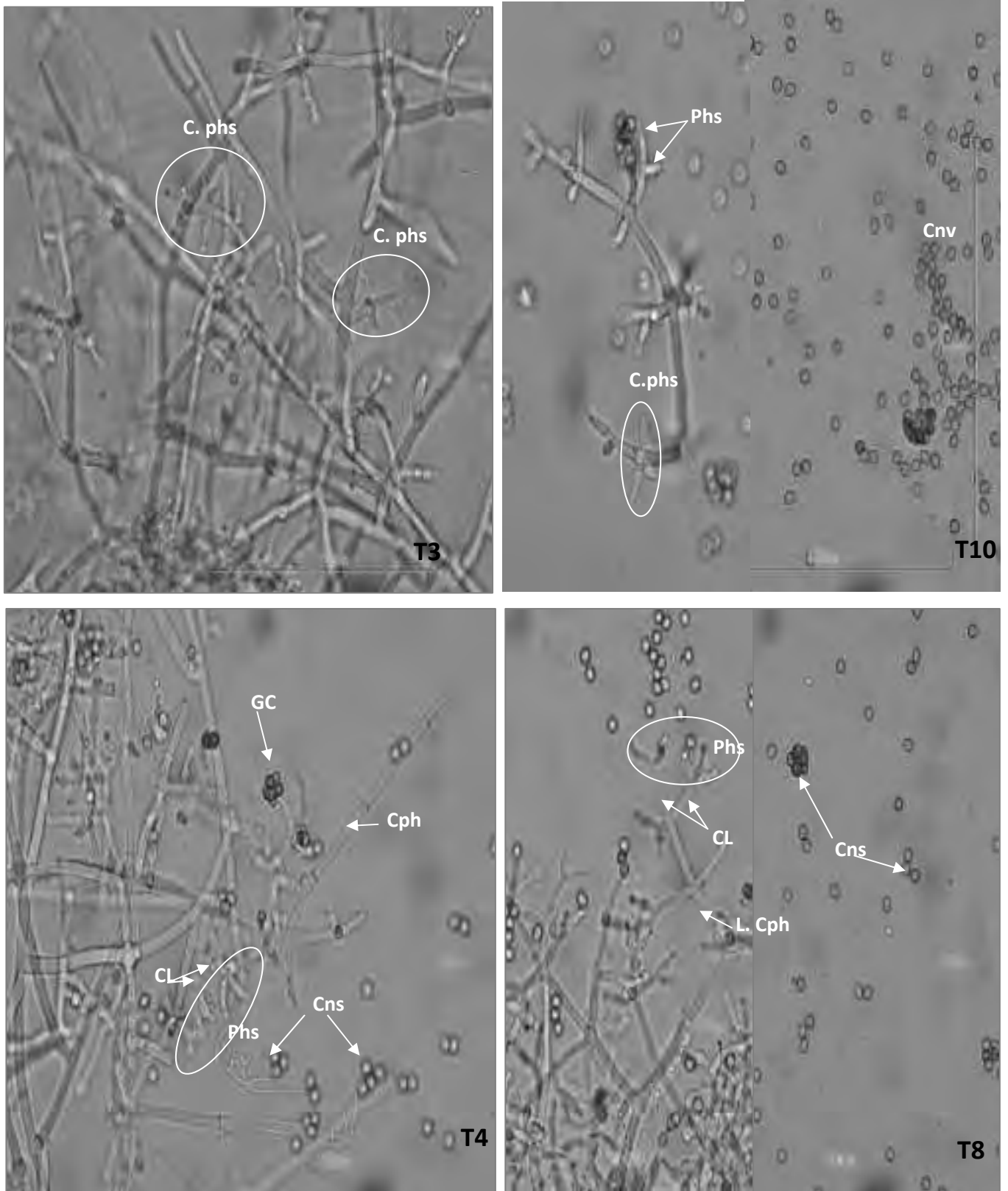
Les conidiophores sont hyalins, en touffes plus ou moins compactes, septés, régulièrement et abondamment ramifiés à angle droit par rapport à l'axe principal. Les phialides sont courtes ou allongées, isolées ou groupées en 2 à 3 et disposées sur les branches, généralement perpendiculaires à l'axe principal (Figure 44).

Les conidies sont unicellulaires, globuleuses à subglobuleuses, produites en masses formant des glomérules au sommet des phialides. Elles sont vertes de dimensions de 2.97- 4.36 X 2.42 - 3.37  $\mu\text{m}$  ou vertes sombres de dimensions de 3.13 - 3.93 x 2.66 - 3.10  $\mu\text{m}$  et à parois lisses (Figure 44 ).





**Figure 43. Cultures des isolats de *Trichoderma* d'Algérie âgées d'une semaine sur milieu PDA**



**Figure 44. Morphologie des isolats de *Trichoderma* d'Algérie (Grossissement X 312)**

**Cph** : Conidiophore ; **L.Cph** : Long conidiophore ; **Phs** : Phialides ; **C. phs** : courtes phialides ; **GC** : Glomerules de conidies ; **Cns** : Conidies sombres ; **Cnv** : Conidies vertes ; **CL** : Collet

### **3.2.1.3 Caractérisation moléculaire**

#### **3.2.1.3.1 Extraction d'ADN**

La migration électrophorétique et la visualisation au transilluminateur aux rayons ultraviolets nous ont permis de nous assurer de l'amplification de l'ADN. Les gels d'électrophorèse montrent la présence des extraits d'ADN de l'ensemble des isolats de *Trichoderma* mis à part celui de T10 dont l'ADN n'était pas présent. Son absence explique la dénaturation de son ADN durant l'extraction (Figure 45a). Par ailleurs, en culture l'isolat T10 a présenté des variations de pigmentation du thalle vers le vert foncé (T10a) et le vert clair (T10b), ce qui nous a amené à refaire l'extraction d'ADN des deux isolats T10a et T10b et compléter aussi celle des isolats T3 et T4. L'état des extraits d'ADN obtenus sur gels affirme leur pureté assez bonne (Figures 45a et 45b).

#### **3.2.1.3.2 Amplification des ITS d'ADN**

Les gels d'électrophorèse présentent les ITS amplifiés d'ADN de l'ensemble des isolats de *Trichoderma* étudiés et ceux des espèces de *T. atroviride*, *T. brevicompactum* (FEM, Italie) et celui du marqueur «GeneRuler» par PCR.

En comparaison avec le marqueur utilisé, toutes les souches de *Trichoderma* présentent des bandes de 600pb. Nos isolats concordent avec ceux utilisés comme souches de références : *T. atroviride* et *T. brevicompactum* (Figure 46).

#### **3.2.1.3.3 Séquences et Blast des ITS d'ADN des isolats de *Trichoderma* spp.**

Les résultats de séquençage ont fait objet de l'alignement des séquences des ITS des isolats de *Trichoderma* spp. étudiés et ceux des espèces de références de *T. atroviride*, *T. brevicompactum*, *T. harzianum* et le Pjem du laboratoire de pathologie et biologie moléculaire de Edmund fondazione Mach (Annexe 20). Leur insertion et leur blast dans le NCBI a permis la confirmation des espèces de *Trichoderma* et le Pjem utilisés comme souches de références en vue de l'identification des espèces des isolats de *Trichoderma* étudiés.

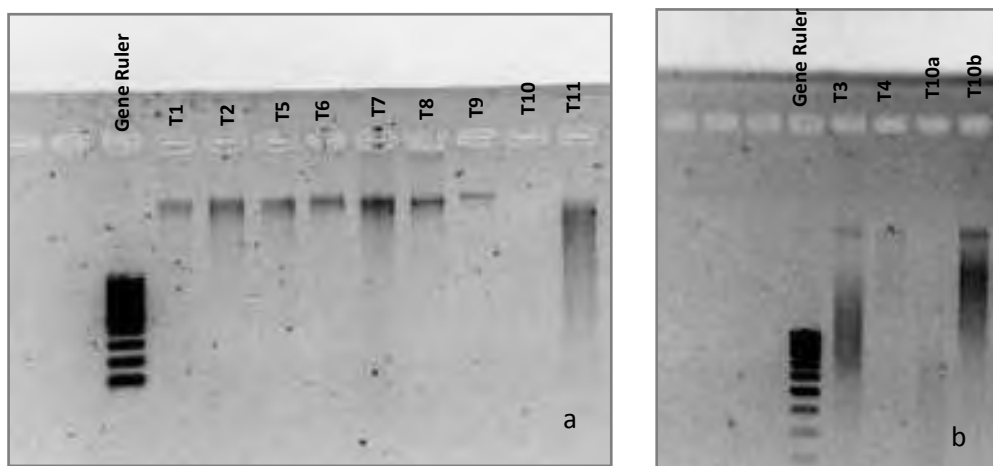


Figure 45. Gels d'électrophorèse montrant les extraits d'ADN des isolats de *Trichoderma* d'Algérie et celui du marqueur moléculaire

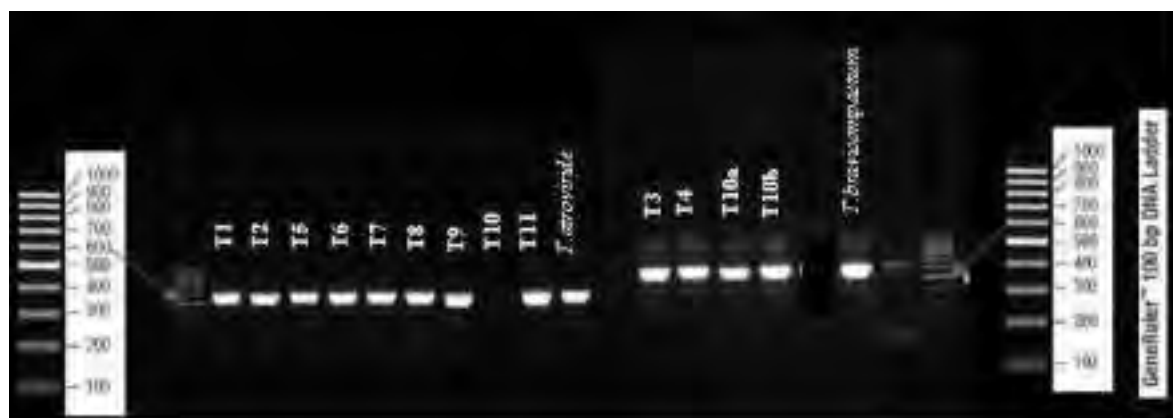


Figure 46. Gels d'électrophorèse montrant l'amplification des ITS des isolats d'Algérie de *Trichoderma*, et ceux de *Trichoderma atroviride*, *Trichoderma brevicompactum* (FEM) et du marqueur moléculaire

### 3.2.1.4 Phylogénie et identification des isolats de *Trichoderma* spp.

L'analyse phylogénétique issue des séquences des ITS est déduite en utilisant la méthode de vraisemblance maximale (Maximum Likelihood method) basée sur le modèle Tamura-Nei (Tamura et Nei, 1993). L'arbre de plus haute probabilité logarithmique est affiché à (-1181.2992). Le pourcentage d'arbres dans lesquels les taxons associés sont regroupés est montré à côté des branches. Les arbres initiaux pour la recherche heuristique ont été obtenus automatiquement en appliquant Neighbor-Joining et les algorithmes Bio NJ à une matrice de distances par paires estimées en utilisant l'approche de vraisemblance maximale Composite

(MCL), puis en sélectionnant la topologie avec la valeur de log de vraisemblance supérieure. L'arbre est représenté à l'échelle, avec des longueurs de branche mesurées dans le nombre de substitutions par site. L'analyse a porté sur 19 séquences de nucléotides. Toutes les positions contenant les lacunes et les données manquantes ont été éliminées. Il y avait un total de 557 postes dans l'ensemble de données finales. Les analyses évolutives ont été menées dans MEGA6 (Molecular evolutionary genetic analysis) (Tamura et *al.*, 2013).

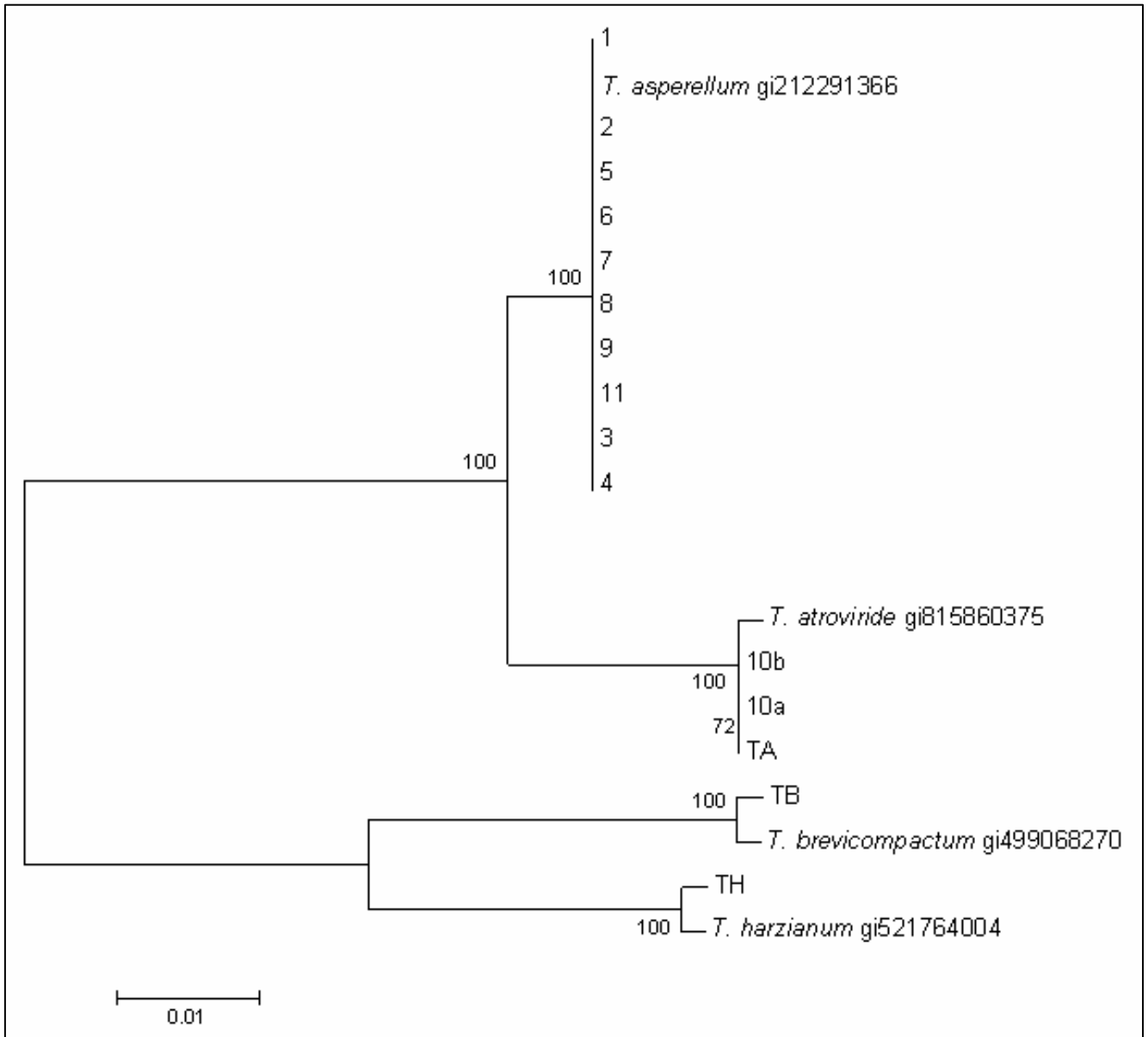
L'analyse des séquences d'ITS d'ADN des isolats du genre *Trichoderma* donne 4 groupes distincts (Figure 47)

un pourcentage de similarité de 100 % ; entre les espèces de *T. asperellum* d'Algérie: T1, T2, T3, T4, T5, T6, T7, T8, T9, T11 et l'espèce de référence de la banque de gènes (GenBank™) : gi212291366 de Malaisie, entre les espèces de *T. atroviride* T10 (T10a et T10 b : même espèce) d'Algérie, et l'espèce de référence de la banque de gènes (GenBank™) : gi815860375 de la Chine (Figure 47).

Cependant, un pourcentage de similarité de 72% est révélé entre les espèces précitées et celle de *T. atroviride* (TA) de fondazione Edmund Mach (FEM) d'Italie (Figure 47).

Par ailleurs, les deux autres espèces : *T. brevicompactum* (TB) et *T. harzianum* (TH) de FEM d'Italie sont classées selon 100% de similarité avec les espèces de références de la banque de gènes (GenBank™) : gi : 499068270, gi : 521764004 (Figure 47).

Dans ce sens, sur l'ensemble des 11 isolats antagonistes du genre *Trichoderma* issus d'Algérie, les isolats T10a et T10b sont identifiés comme *T. atroviride* et tous les autres isolats sont déterminés comme *T. asperellum* (Tableau 4).



**Figure 47. Arbre phylogénique obtenu par la méthode de vraisemblance maximale (Maximum Likelihood method)**

**Tableau 4. Données sur les isolats de *Trichoderma* spp. issus d'Algérie**

Localités d'isolement (Wilaya/ Région)	Substrats	Périodes de prélèvements	Codes des isolats	Identification
Alger, Staoueli	Masses d'oeufs de <i>Meloïdogyne</i>	2009	T1	<i>Trichoderma asperellum</i>
Mostaganem, Stidia	Rhizosphère de pomme de terre	2011	T2	<i>Trichoderma asperellum</i>
Alger, Zeralda	Rhizosphère de pomme de terre	2011	T3	<i>Trichoderma asperellum</i>
Tipaza, Fouka	Masses d'oeufs de <i>Meloïdogyne</i>	2009	T4	<i>Trichoderma asperellum</i>
Ain Defla, Amra	Rhizosphère de pomme de terre	2011	T5	<i>Trichoderma asperellum</i>
Bechar, Abadla	Rhizosphère de pomme de terre	2011	T6	<i>Trichoderma asperellum</i>
Tipaza, Bourkika	Rhizosphère de pomme de terre	2011	T7	<i>Trichoderma asperellum</i>
Skikda, Collo	Masses d'oeufs de <i>Meloïdogyne</i>	2009	T8	<i>Trichoderma asperellum</i>
Ain Defla, El Attaf	Rhizosphère de pomme de terre	2011	T9	<i>Trichoderma asperellum</i>
El Oued, El Oued	Masses d'oeufs de <i>Meloïdogyne</i>	2008	T10	<i>Trichoderma atroviride</i>
Ain Defla, El abadia	Rhizosphère de pomme de terre	2011	T11	<i>Trichoderma asperellum</i>

### 3.2.1.5 Discussion

Considérant les résultats moléculaires, nous pouvons dire que les caractéristiques culturales et morphologiques n'étaient pas suffisantes pour distinguer les isolats de *Trichoderma*, en raison de leur ressemblances. Leur aspect cultural et morphologique coïncident avec plusieurs espèces de *Trichoderma* rapportées par la littérature. Elles montrent généralement une croissance rapide. Elles sont d'abord blanches et duveteuses puis, deviennent plus tard vert jaunâtre à touffes compactes vert foncé, souvent dans de petites zones ou dans des zones annulaires concentriques sur la surface du milieu PDA ([www.fungaltaxonomy.org](http://www.fungaltaxonomy.org); ICTF : International Commission on the Taxonomy of Fungi; <http://www.isth.info/> : International subcomission on *Trichoderma Hypocrea* Taxonomy).

Leurs conidiophores sont généralement allongés mais courts pour certains isolats, ramifiés à plusieurs reprises, irrégulièrement verticillés, portant des bouquets de phialides. Les conidies sont souvent vertes sombres mais, parfois vertes chez quelques isolats, avec des parois lisses et groupées sur les extrémités des phialides. La couleur verte des conidies et l'odeur aromatique caractéristique de l'isolat T10 nous rapproche vers *T. atroviride* mais avec la confusion avec d'autres espèces selon la bibliographie.

*Trichoderma atroviride* a été confondue dans la littérature avec les espèces superficiellement similaires, *T. harzianum* Rifai, qui a aussi des conidies lisses, globuleuses et vertes. Elle se distingue aussi de *T. harzianum* et *T. aggressivum* par sa capacité à produire une odeur de noix de coco distinctive en culture. Cette odeur est celle de l'antibiotique 6-pentyle- $\alpha$ -pyrone antifongique qui est également produit par *T. viride* (Samuels et al., 2002 ; Dodd et al., 2002 ).

Ainsi, la caractérisation moléculaire reste le seul outil précis pour la confirmation de nos isolats dont 10 isolats appartenant à *T. asperellum* et un seul isolat comme *T. atroviride*.

### **3.2.2 Activité antagoniste des isolats de *Trichoderma* spp. sur *Phytophthora infestans***

#### **3.2.2.1 Activité antagoniste *in vitro* de *Trichoderma* spp.**

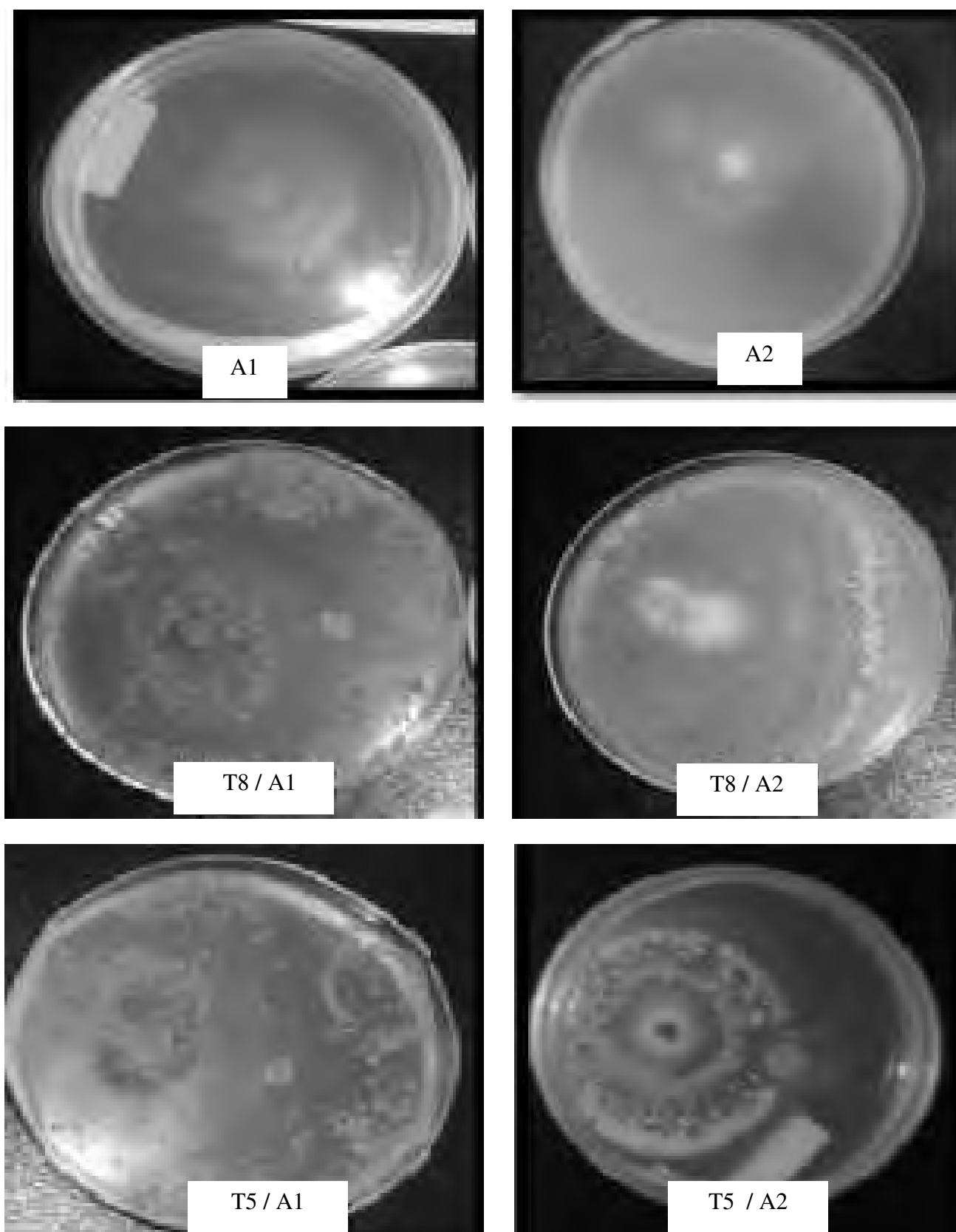
##### **3.2.2.1.1 Activité antagoniste *in vitro* sur le croissance mycelienne, la sporulation et la germination des isolats *Phytophthora infestans***

L'ensemble des isolats antagonistes étudiés ont révélé un pouvoir inhibiteur intéressant sur la croissance mycelienne de *P. infestans* selon la technique de confrontation directe (Figure 48).

L'activité antagoniste *in vitro* selon la technique de confrontation directe des isolats antagonistes et selon la méthode non volatile ou de contact direct de leurs filtrats de cultures a porté sur la croissance mycélienne, la sporulation et la germination des isolats A1 et A2 de *P. infestans*.

L'analyse de la variance des taux d'inhibition enregistrés sur les paramètres biologiques précités a montré une différence significative selon l'activité des isolats antagonistes des *Trichoderma* spp. testés (F = 159.570, P = 0.000) et selon leurs filtrats de cultures (F = 104.000, P = 0.022) (Annexe 21).



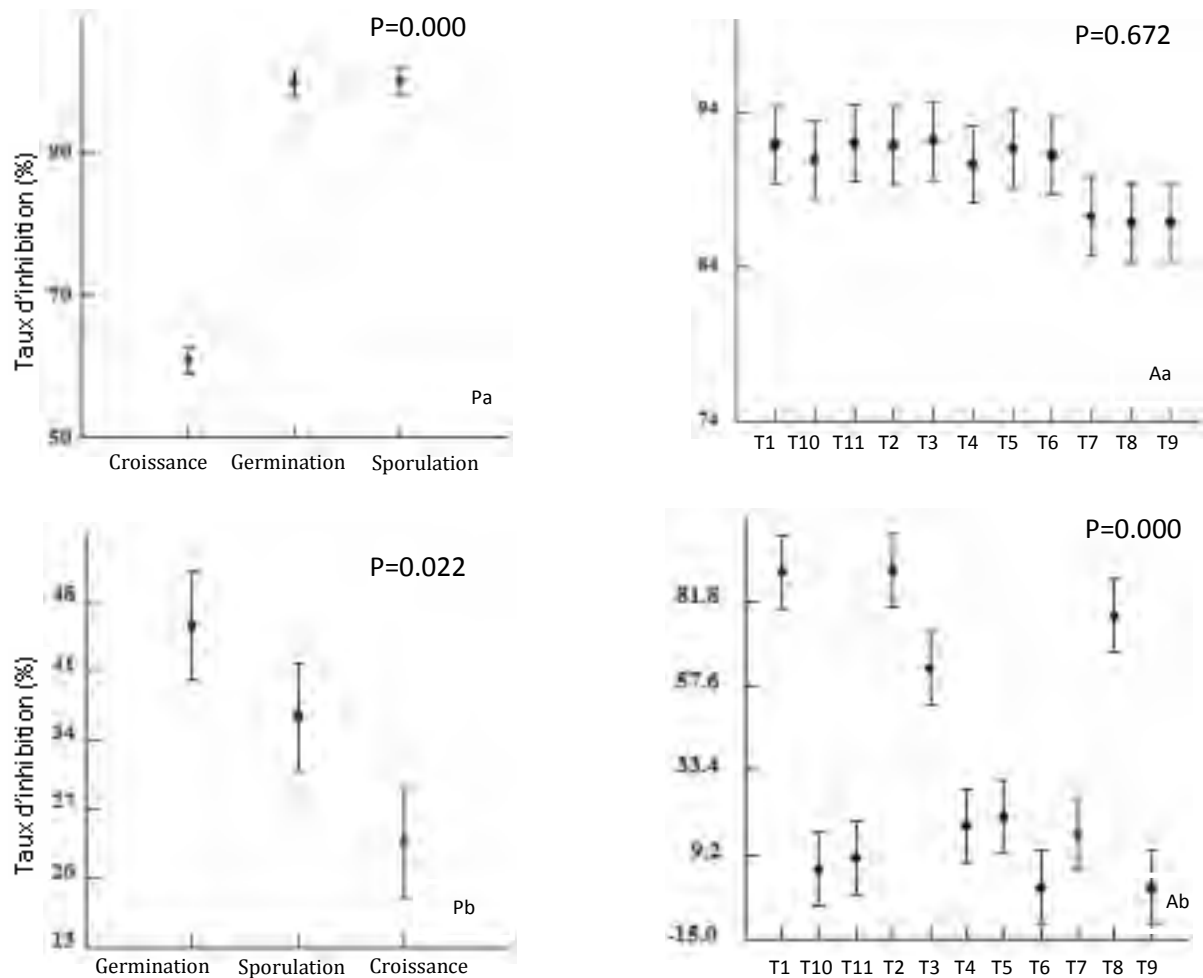


**Figure 48. Pouvoir inhibiteur *in vitro* des isolats du genre *Trichoderma* sur la croissance mycélienne de *Phytophthora infestans*, selon la méthode de confrontation directe après six jours d'incubation**

En outre, l'activité inhibitrice est similaire pour les deux isolats A1 et A2 de *P.infestans* ( $F = 2.575$ ,  $P = 0.115$ , et  $F = 0.105$ ,  $P = 0.747$ ), respectivement pour la technique de confrontation directe et celle des filtrats de cultures des isolats antagonistes testés (Annexe 21).

Leur effet inhibiteur s'avère plus prononcé sur la sporulation et la germination selon la technique de confrontation directe, mais moins important en ce qui concerne la méthode des filtrats de cultures (Figures 49Pa, 49Pb).

Cette variabilité peut être interprétée par l'importance de l'activité antagoniste et la synergie des propriétés des isolats de *Trichoderma* spp. testés. Les taux d'inhibition enregistrés pour les isolats antagonistes sont proches ou dépassent les 90%, tandis que ceux enregistrés pour les filtrats de leurs cultures semblent moins importants (inférieurs à 50%). En ce sens, les taux d'inhibition de la croissance mycélienne, de la sporulation et de la germination de *P .infestans* dépassent les 80% pour l'ensemble des isolats antagonistes selon la technique de confrontation directe (Figure 49) et pour les isolats antagonistes T1 et T2 selon la technique des filtrats de leur cultures (Figures 49Aa, 49Ab).

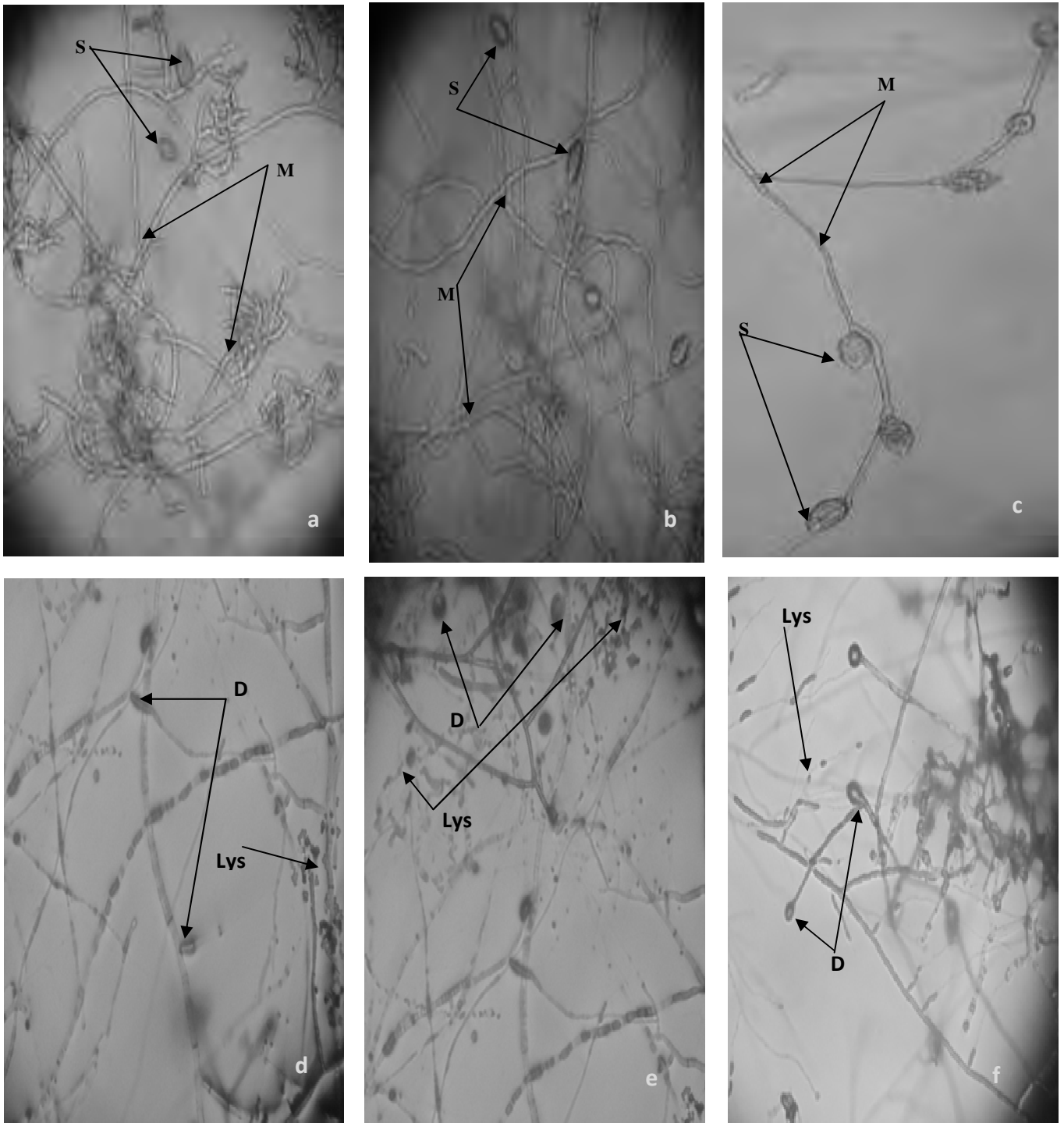


**Figure 49. Effet inhibiteur des isolats de *Trichoderma* sur la croissance mycélienne, la sporulation et la germination de *Phytophthora infestans* selon la méthode de confrontation directe et celle des filtrats de cultures**

**a :** la technique de confrontation directe ; **b :** la technique des filtrats de cultures ; **A :** Antagonistes ; **P :** Paramètres biologiques ; Croissance mycélienne ; Sporulation et germination

### 3.2.2.1.2 Activité antagoniste *in vitro* sur la morphologie des isolats *Phytophthora infestans*

Sur le plan altération, les isolats de *P. infestans* ont présenté des modifications morphologiques sous l'activité des antagonistes du genre *Trichoderma* testés et de leurs filtrats de cultures. Les observations microscopiques montrent la réduction du diamètre, la lyse et la vacuolisation du mycélium, ainsi que la déformation et la digestion du contenu de leurs sporanges (Figure 50).

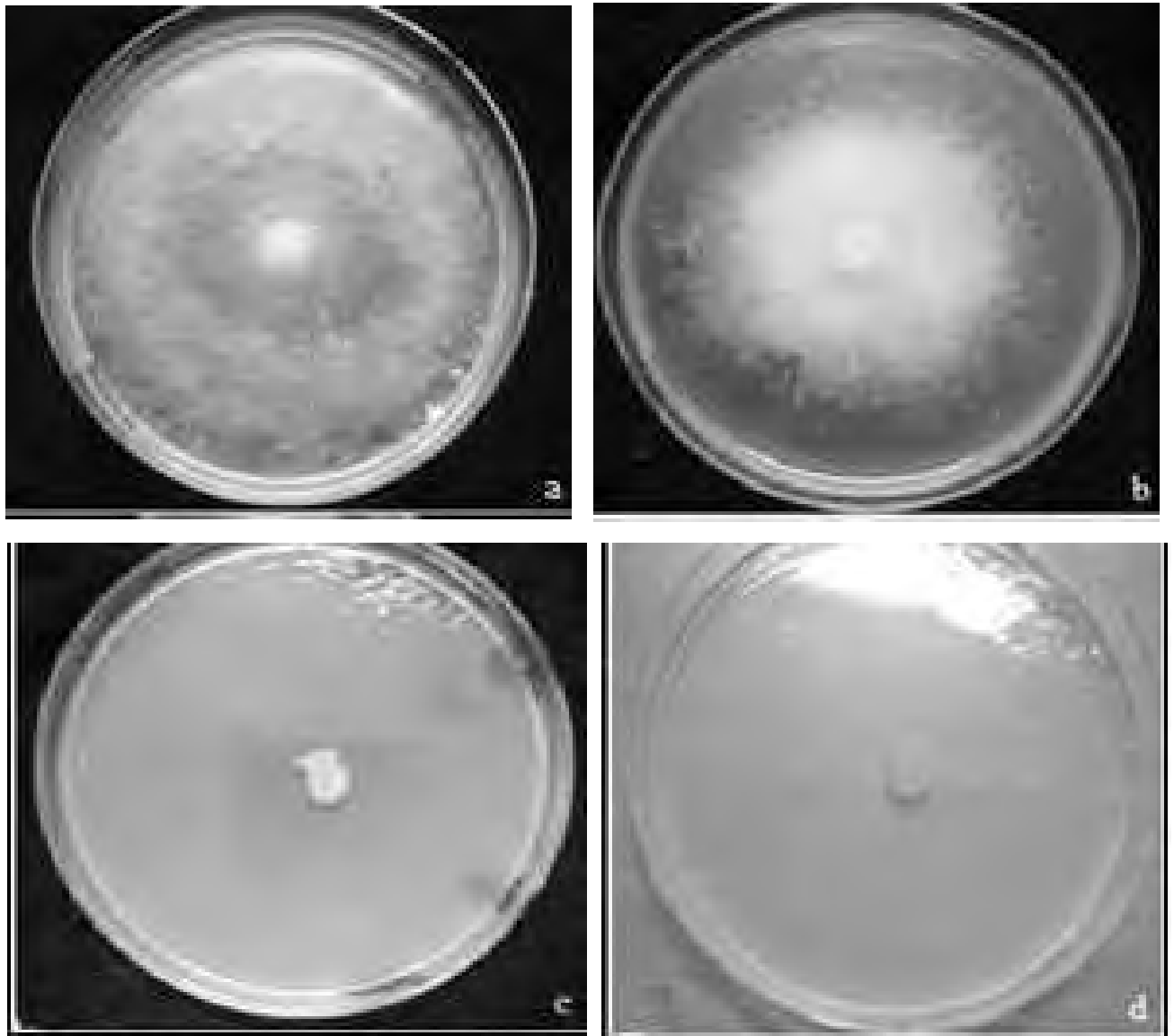


**Figure 50. Modifications morphologiques des isolats de *Phytophthora infestans* sous l'effet d'activité antagoniste *in vitro* des isolats de *Trichoderma* spp. (grossissement × 125)**

**Lys** : Lyse et vésiculation mycélienne ; **D** : Déformation des sporanges ; **S** : Sporanges ; **M** : Mycelium ; **a, c, b** : Isolats témoins respectivement A1 et A2 de *P. infestans* ; **d, e, f** : Isolats respectivement A2 et A1 de *P. infestans* sous l'effet d'antagonisme des isolats T2(d) , T8(e) et T10 (f) de *Trichoderma* spp.

### 3.2.2.1.3 Pouvoir fongicide *in vitro* des isolats de *Trichoderma* spp.

Aussi, les explants d'isolats A1 et A2 de *P. infestans* préalablement inhibés par les isolats antagonistes n'ont pas repris leur croissance après repiquage sur milieu PPA frais (Figure 51). Ce qui confirme le haut pouvoir fongicide *in vitro* de nos isolats antagonistes du genre *Trichoderma* (Figure 51).



**Figure 51. Inhibition de la reprise de croissance *in vitro* des isolats de *Phytophthora infestans***

- **a et b** : Souches témoins respectivement de A1 et de A2 de *P.infestans* ; **c et d** : Souches traitées respectivement de A1 et de A2 de *P.infestans*

### **3.2.2.2 Activité antagoniste *in vivo* des isolats de *Trichoderma* spp.**

#### **3.2.2.2.1 Pouvoir pathogène des isolats de *Phytophthora infestans***

L'infection *in vitro* des disques foliaires de pomme de terre par *P. infestans* est traduite par l'apparition de taches à aspect huileux juste au point de l'inoculation (Figures 52a, 52b et 52c), qui évoluent progressivement et deviennent brunes (Figure 52c).

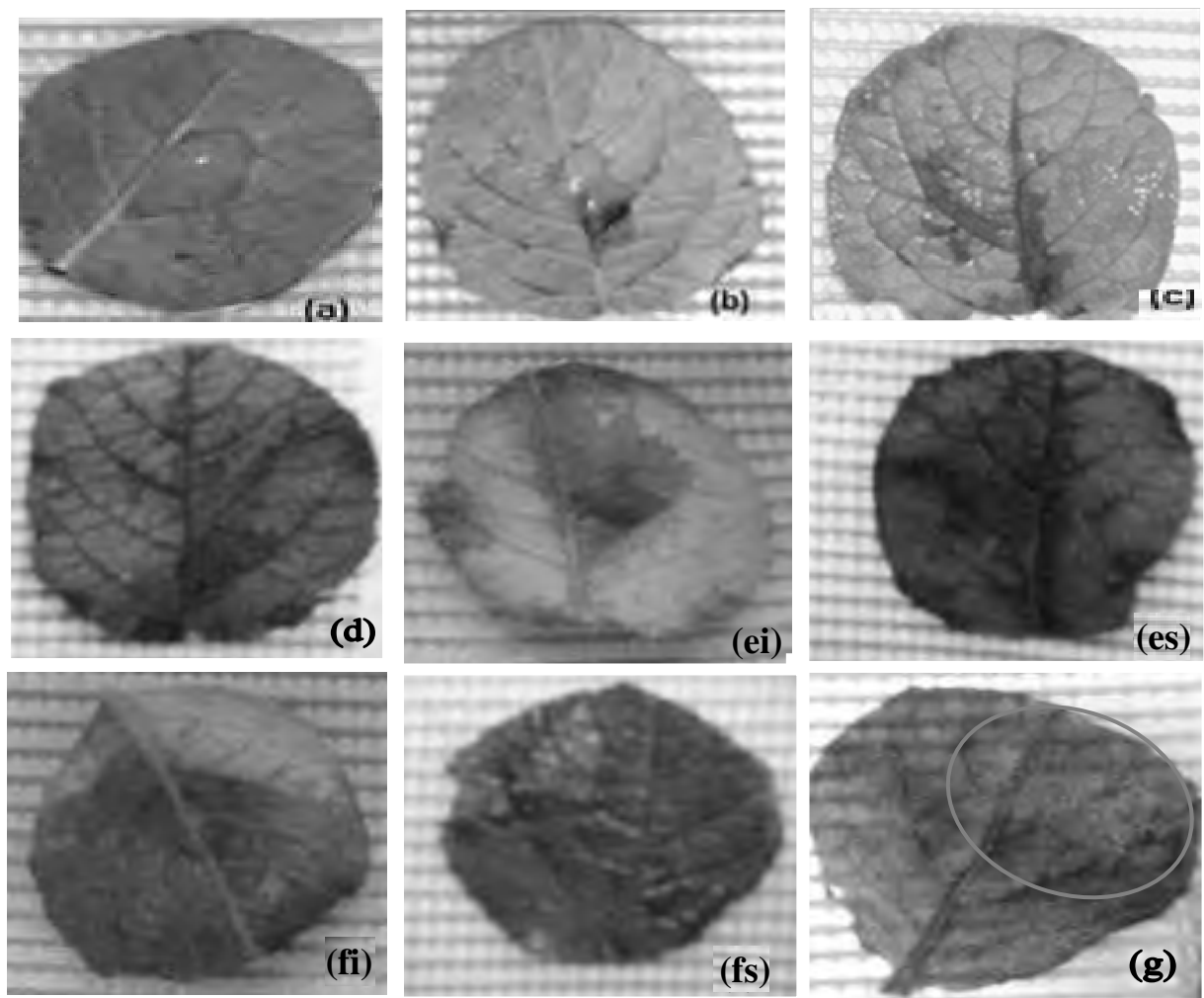
Ces dernières s'élargissent et deviennent nécrotiques, après cinq jours d'incubation (Figures 52d, 52e et 52f). En conditions optimales de température et d'humidité, certaines feuilles infectées montrent une fructification blanchâtre de l'agent phytopathogène sur la face inférieure du limbe (Figure 52g).

#### **3.2.2.2.2 Activité antagoniste *in vivo* sur la période d'incubation**

Les deux isolats de *P. infestans* développent des symptômes au bout de 2 à 4 jours pour les quatre modes d'application des isolats antagonistes de *Trichoderma* spp.

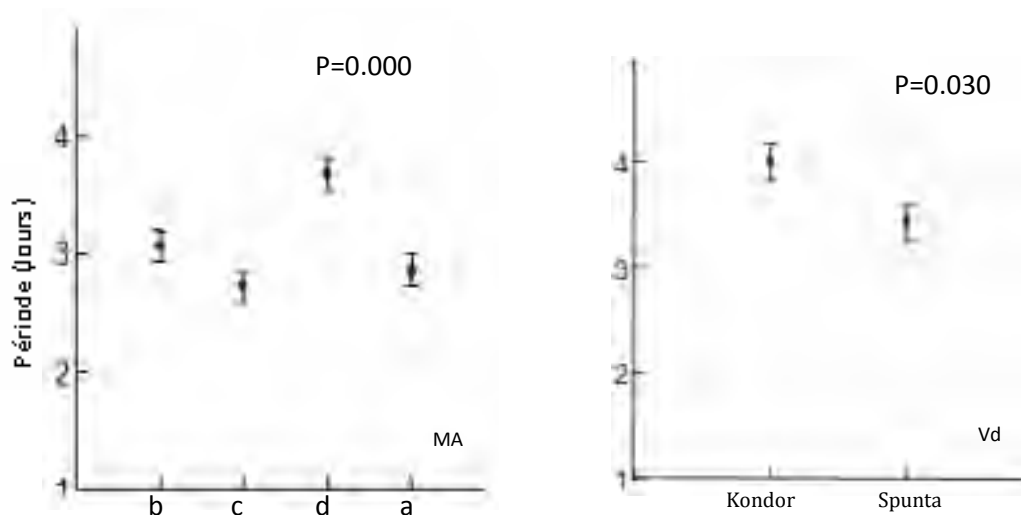
L'analyse de la variance des périodes d'apparition des symptômes montre une différence hautement significative des différents modes d'application des antagonistes et une différence significative entre les deux variétés testées seulement pour le mode d'application par incorporation dans le sol (Annexe 22).

En représentation GLM, la période d'apparition des symptômes est comprise entre 2 et 4 jours. Toutefois, elle semble plus courte pour les trois modes d'application préventifs que le mode curatif (Figure 53 MA). Il reste que les deux variétés testées et les deux isolats A1 et A2 de *P. infestans* ne montrent pas une grande différence dans la période d'expression des symptômes pour l'ensemble des modes d'application, excepté le mode préventif par incorporation dans le sol, où les symptômes se manifestent au 4<sup>ième</sup> jour (Figure 53Vd).



**Figure 52. Symptômes du mildiou sur les disques foliaires de pomme de terre inoculés par *Phytophthora infestans***

**a** : Début d'apparition de la tâche huileuse sur la face inférieure ; **b** : Début de nécrose au point d'inoculation sur face inférieure ; **c** : Evolution de la nécrose sur face supérieure ; **d, e, f** : Brunissement et élargissement de la nécrose (s :sur face supérieure après 4 jours ; i : sur face inférieure après 36 heures d'incubation) ; **g** : Fructification du phytopathogène



**Figure 53. Activité antagoniste *in vivo* des isolats du genre *Trichoderma* sur la période d'incubation du mildiou selon les modes d'application des antagonistes et les variétés de pomme de terre**

MA : Modes d'application des antagonistes ; a : Mode préventif par trempage ; b : Mode préventif par pulvérisation ; c : Mode Curatif ; d : Mode préventif par incorporation des antagonistes dans le sol ; V : Variétés

### 3.2.2.2.3 Activité antagoniste *in vivo* sur le pouvoir pathogène de *Phytophthora infestans*

Par ailleurs, le pouvoir pathogène des deux isolats A1 et A2 de *P. infestans* est réduit sous l'action antagoniste des 11 isolats du genre *Trichoderma* spp., sur les deux variétés de pomme de terre et cela, selon les quatre modes d'application des antagonistes (Figures 54a, 54b, 54c), comparés aux témoins positifs (Figure 54T).

L'analyse de variance des taux de réduction de la maladie montre une différence hautement significative entre les modes d'application des isolats antagonistes du genre *Trichoderma*, entre les variétés de pomme de terre selon les modes préventifs par trempage, par pulvérisation et, selon le mode curatif par pulvérisation. Une différence significative est également remarquable entre les isolats antagonistes selon le mode préventif par trempage et le mode curatif par pulvérisation (Annexe 23).



Une réduction importante de l'infection est particulièrement notée pour les modes d'application des antagonistes en préventif par trempage et par incorporation dans le sol ainsi que, pour le mode curatif. Les taux de réduction de la maladie avoisinent les 50% et peuvent même dépasser les 90% (Figure 55MA). Une variabilité de ces taux caractérise les variétés de pomme de terre.

Ainsi, la variété « Spunta » semble la plus résistante à l'infection selon les modes d'application des antagonistes par trempage, par pulvérisation et selon le mode curatif (Figures 55Va, 55Vb, 55Vc, 55T, 55b et 55c), alors qu'une résistance similaire à l'infection est enregistrée sur les deux variétés selon le mode par incorporation dans le sol (Figure 55d).

Par ailleurs, des taux importants de réduction de la maladie sont relevés pour l'ensemble des isolats antagonistes pour le mode par incorporation dans le sol à l'exception des isolats T2 et T9 (Figure 55Ad) et pour le mode d'application curatif, à l'exception des isolats T1, T4 et T10 (Figure 55Ac).

#### **3.2.2.2.4 Activité antagoniste *in vivo* sur la sporulation de *Phytophthora infestans***

Les isolats antagonistes de *Trichoderma* ont également révélé un pouvoir inhibiteur *in vivo* sur la sporulation de l'agent pathogène.

L'analyse de la variance des taux d'inhibition de la sporulation montre une différence significative seulement pour le mode d'application curatif pour les isolats A1 et A2 de *P. infestans* (Valeur de F= 4.772, P=0.037) (Annexe 24).

Une différence non significative est notée entre les modes d'application des antagonistes, entre les variétés de pomme de terre, entre les isolats de *P. infestans* pour les modes préventifs par trempage, par pulvérisation et par incorporation dans le sol. Il y'a également une différence non significative entre les isolats antagonistes selon leur modes d'application (les valeurs de P sont supérieures à 0.005) (Annexe 24).

Par représentation GLM, un important pouvoir inhibiteur des isolats antagonistes des *Trichoderma* spp. est noté sur la sporulation *in vivo* des isolats A1 et A2 de *P. infestans*.

Les taux d'inhibition enregistrés s'avèrent très importants pour l'ensemble des modes d'application des antagonistes et sur les deux variétés de pomme de terre.

Il semble important et similaire pour les deux isolats de *P. infestans* selon les modes d'application préventifs, mais beaucoup plus intéressants sur l'isolat A1 pour le mode curatif (IS de 90%) (Figure 56Sc).

Dans ce sens, l'ensemble des isolats antagonistes montrent un pouvoir inhibiteur puissant *in vivo* sur la sporulation de l'agent pathogène pour l'ensemble des modes d'application (Figures 56Aa, 56 Ab, 56Ac et 56Ad).

#### **3.2.2.2.5 Pouvoir fongicide *in vivo* des isolats de *Trichoderma* spp.**

Par ailleurs, les isolats de *P. infestans* préalablement inhibés *in vitro* par les isolats antagonistes de *Trichoderma* spp. ne développent pas de symptômes sur les disques foliaires de pomme de terre. Leurs taux d'infection enregistrés sont négligeables à nuls, confirmant ainsi le haut pouvoir fongicide *in vivo* de nos isolats antagonistes (Figure 57).

Dans ce sens, les onze isolats de *Trichoderma* testés présentent un important pouvoir fongicide sur *P. infestans in vivo*.



A2



A1

Spunta



Kondor



(T)



A2

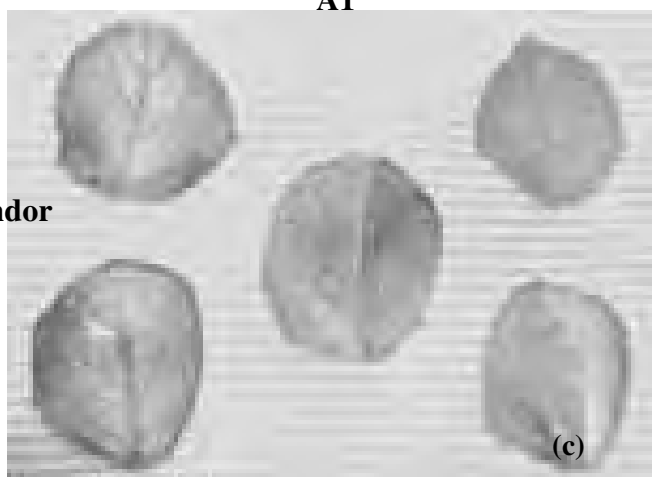


A1

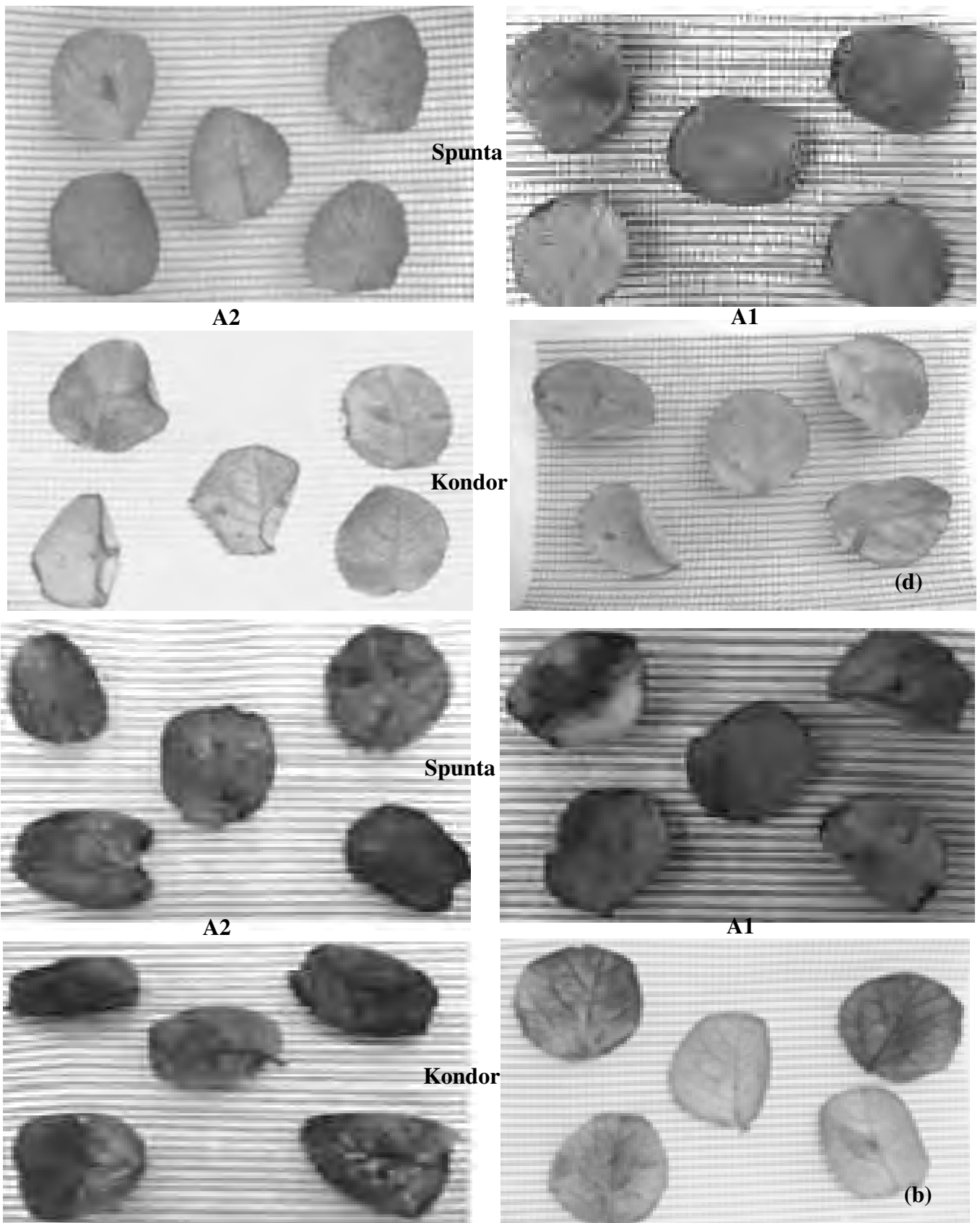
Spunta



Kondor

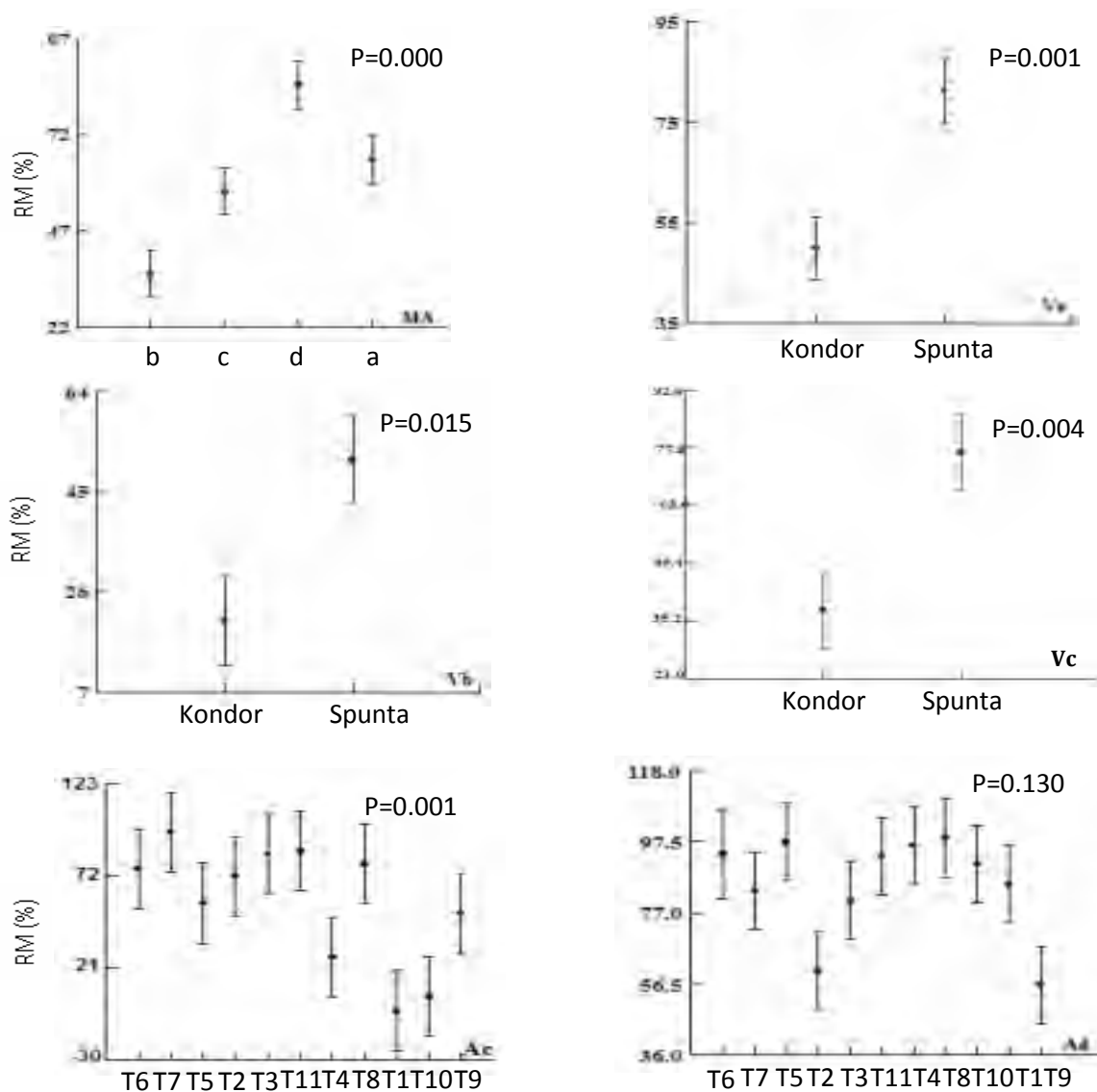


(c)



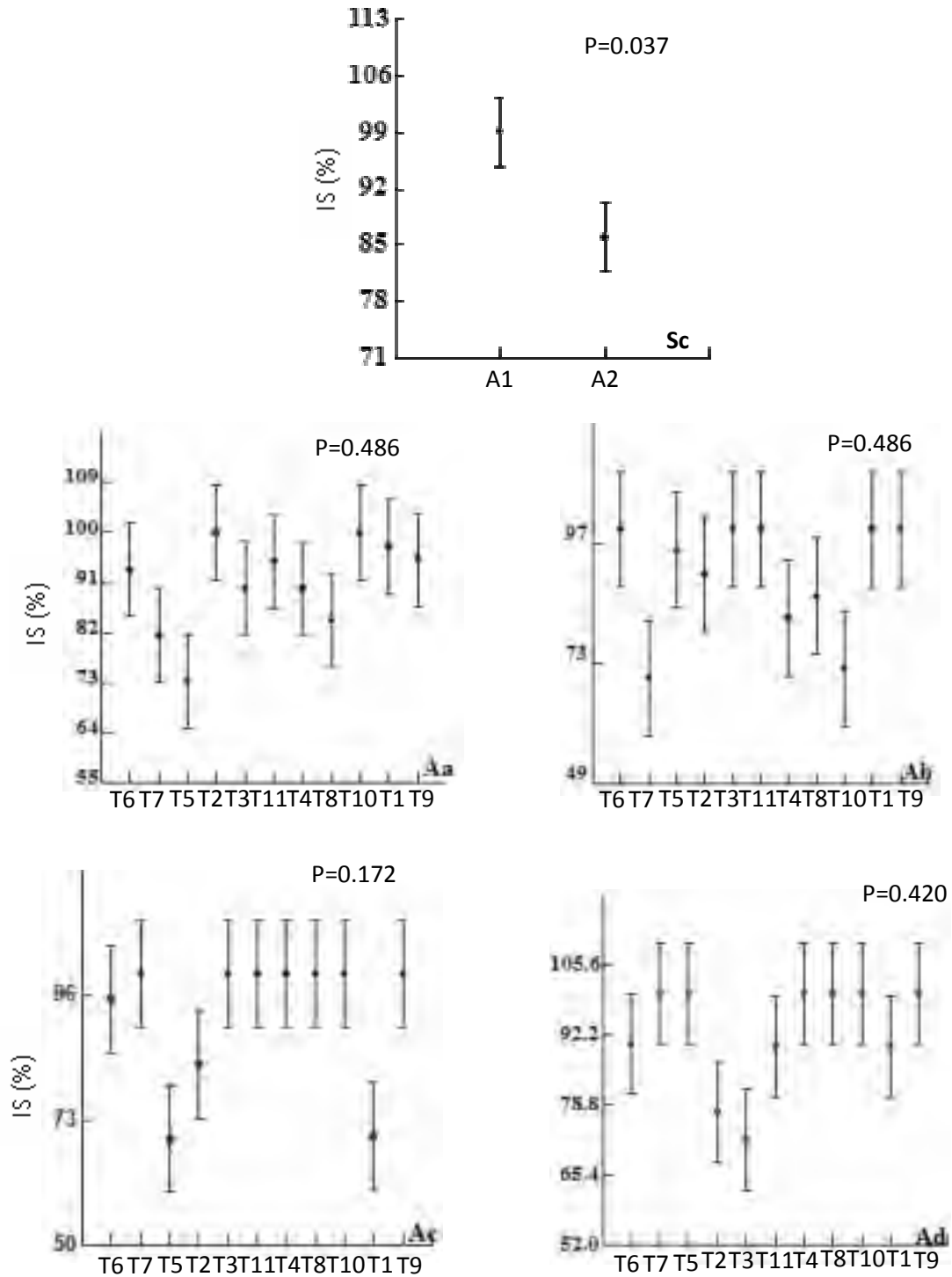
**Figure 54. Effet des modes d'application des isolats antagonistes du genre *Trichoderma* sur le pouvoir pathogène des isolats de *Phytophthora infestans***

**T** : Témoins positifs ; **d** : Application des antagonistes par incorporation dans le sol ; **b** : Application des antagonistes par pulvérisation ; **c** : Application selon le mode curatif par pulvérisation ; A1 et A2 : isolats de *P.infestans*



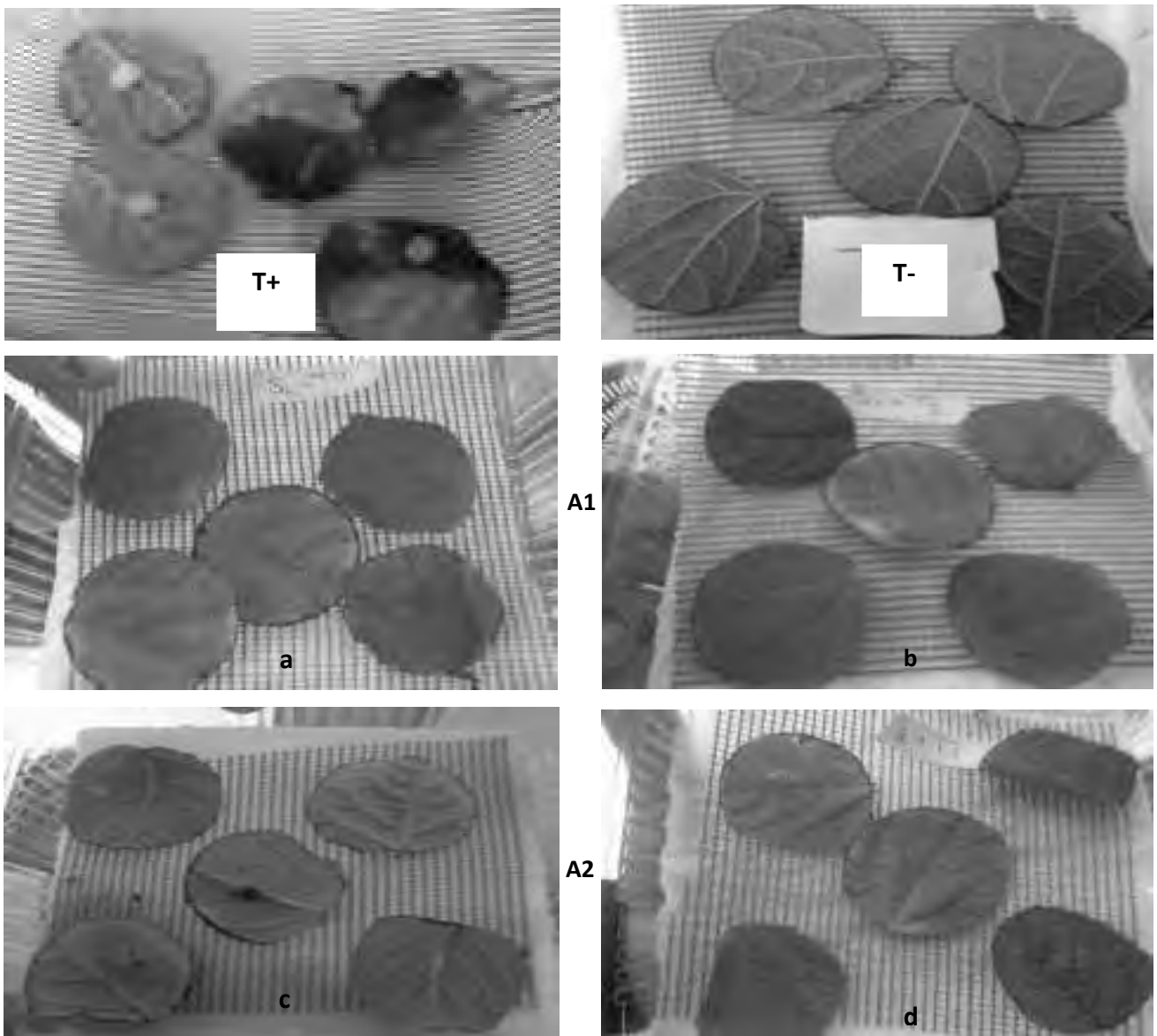
**Figure 55. Activité antagoniste *in vivo* des isolats de *Trichoderma* sur le pouvoir pathogène de *Phytophthora infestans* selon les modes de leur application, les variétés de pomme de terre et les isolats antagonistes**

- **RM** : Taux de réduction de la maladie (%); **MA** : Modes d' application des antagonistes; **a** : Mode préventif par trempage; **b** : Mode préventif par pulvérisation; **c** : Mode Curatif; **d** : Mode préventif par incorporation dans le sol; **V** : Variétés; **A** : isolats Antagonistes



**Figure 56. Activité antagoniste *in vivo* des isolats du genre *Trichoderma* sur la sporulation des isolats de *Phytophthora infestans* selon les modes d'application, les isolats antagonistes et les isolats pathogènes**

IS : Taux d'inhibition de la sporulation (%); a : Mode préventif par trempage; b : Mode préventif par pulvérisation; c : Mode curatif par pulvérisation; d : Mode préventif par incorporation des antagonistes dans le sol; S : Isolats A1 et A2 de *P. infestans*; A: Isolats antagonistes de *Trichoderma* spp.



**Figure 57. Pouvoir pathogène des isolats de *Phytophthora infestans*, témoins et ceux préalablement inhibés par l'activité antagoniste des isolats de *Trichoderma* spp.**

- A1 et A2 : isolats de *P. infestans* ; T: Isolats de *Trichoderma* spp., a : A1/T1 ; b : A1/T2, c : A2/T7 ; d : A2/T8 ; TC+ : Témoin positif ; TC- : Témoin négatif

### 3.2.2.3 Discussion

Les isolats antagonistes identifiés et étudiés comme *T. asperellum* et *T. atroviride* ont confirmé leur antagonisme *in vitro* et *in vivo* sur *P. infestans*. Ils ont prouvé leur potentiel de biocontrôle sur le mildiou de la pomme de terre, confirmant de nombreux travaux antérieurs.

Rappelant que parmi les espèces fongiques antagonistes qui ont montré un bon potentiel de lutte biologique, les *Trichoderma* spp. sont sans doute les plus rapportés dans la littérature.

De nombreux isolats de ce genre ont été identifiés comme des éliciteurs des mécanismes de défense, donc un excellent agent de lutte biologique contre un large spectre d'agents phytopathogènes (Elad et al., 1982; Harman, 2006).

L'inhibition des champignons phytopathogènes par différentes espèces de *Trichoderma* a été étudiée *in vitro* par de nombreux chercheurs. Ils ont montré notamment la variabilité selon les isolats de *Trichoderma* spp. contre différentes espèces de phytopathogènes (Dennis et Webster, 1971), voire de différentes souches de la même espèce pathogène (Bell et al., 1982).

Poinar et Buckley (2007) ont montré une activité mycoparasitaire de certaines espèces de *Trichoderma* par la technique de confrontation directe et ont affirmé que cet antagoniste fongique peut avoir des mécanismes liés à la concurrence, l'antibiose, le myco-parasitisme et l'hyper-parasitisme.

De nombreuses études sur l'antagonisme *in vitro* par le genre *Trichoderma* coïncident avec nos résultats. Hibbar et al. (2005) ont montré l'effet antagoniste *in vitro* de *T. harzianum* contre *F. oxysporum* f. sp. *radicis lycopersici*, agent responsable de la pourriture du collet des racines de la tomate, par la méthode de confrontation directe. *T. harzianum* envahit les colonies phytopathogènes et sporule même après 6 jours d'incubation, révélant son pouvoir hautement myco-parasitaire.

De même, Berber et al. (2009) ont évalué *in vitro* et *in vivo* l'activité antagoniste de trois isolats de *T. harzianum* et deux isolats de *T. viride* contre *Bipolaris maydis*, *B. sorghicola*, *B. tetramera* et *B. sorokiniana*, des pathogènes foliaires de sorgho. Ils ont conclu que toutes les souches de *Trichoderma* ont inhibé efficacement la croissance mycélienne et la germination des conidies des agents phytopathogènes étudiés avec des degrés variables et par des mécanismes différents.

Pelegriini et al. (2014) ont montré le contrôle effectif du pourridie-agaric sur des plants de fraises qui ont été paillis d'écorce pré-inoculé avec *Trichoderma atroviride* SC1.

Plusieurs auteurs ont rapporté des événements de mycoparasitisme d'isolats de *Trichoderma* qui a coïncidé avec les changements morphologiques observés dans cette étude. L'activité antagoniste de *Trichoderma harzianum* s'est traduite par l'enroulement de filaments autour des hyphes du champignon phytopathogène (Elad et al., 1983). En ce sens, Benhamou et Chet (1996) ont rapporté l'altération du mycélium de *Sclerotinium rolfsii* résultant de l'agrégation, rétraction et vacuolisation du cytoplasme provoquées par *T. harzianum*.



En outre, Vivian et al. (2008) ont affirmé que certains isolats de *Trichoderma* spp. étaient responsables de la déformation de conidies de *Fusarium* spp. comme, la lyse et la destruction des conidiophores et des spores de *Penicillium* spp.

Les changements morphologiques du mycélium et des sporanges de *P. infestans*, résultant de l'antagonisme, pourraient être traduits par la production d'enzymes lytiques. Ainsi, une lyse a fait suite à la production d'enzymes telles que la  $\beta$ -1,3 glucanase et de la chitinase (De la Cruz et al., 1995), de la cellulase et la protéase (Goldman et al., 1994, Harman, 2006). Des différences dans l'activité de la laminarinase ont été observées parmi plusieurs isolats de *T. asperellum*, en particulier en présence du mycélium de *Phytophthora* (Tondje et al., 2007 Widmer, 2014). Un des premiers rapports publiés sur la lutte biologique du mildiou était sur l'utilisation de suspensions de conidies de *Penicillium aurantiogriseum* et *Stachybotrys atra* appliquées aux plantes de pommes de terre cultivées en serre avant l'inoculation avec *P. infestans* et rapportant la réduction de la sévérité de la maladie (Jindal et al., 1988). L'application simultanée de ces deux agents de lutte biologique vis-à-vis de *P. infestans* a également permis le contrôle du mildiou de la pomme de terre. De même, l'application des filtrats de cultures de ces deux organismes avant l'inoculation a réduit la gravité de la maladie. Les auteurs expliquent leurs résultats par l'activité antibiose et la concurrence pour l'espace et les nutriments exercées par les antagonistes.

D'autres études concernant l'antagonisme des *Trichoderma* spp. contre *Phytophthora* spp. ont été citées dans la littérature. *T. harzianum* a été signalé à réduire l'inoculum de *Phytophthora drechsleri*, l'agent causal de fonte de semis du concombre (Sharifi- Tehrani et Nazari, 2004). Aussi, Daami-Remadi et El Mahjoub (2001) ont étudié la lutte biologique de *T. harzianum* contre *Phytophthora capsici*.

De même, Kebe et al. (2009) ont montré la variabilité de l'inhibition *in vitro* de la croissance mycélienne de *Phytophthora palmivora* par des isolats antagonistes de *Trichoderma* spp. et ont confirmé leurs effets fongicides importants sans capacité de survie de *P. palmivora*.

La plupart des isolats testés dans cette étude appartiennent à *T. asperellum*. Cette espèce a été largement utilisée dans la lutte biologique contre les maladies des plantes causées par les champignons et les nématodes (Watanabe et al., 2005) et montre un pouvoir antibactérien via la production de peptaïbols de trichotoxine (Chutrakul et al., 2008).

Par ailleurs, Widmer (2014) a testé seize isolats de *Trichoderma* spp. pour leur mycoparasitisme vis-à-vis des deux souches A1 et A2 de *Phytophthora ramorum* selon la technique de confrontation directe. Les isolats de *Trichoderma* spp. ont révélé une variabilité

dans l'activité antagoniste avec une inhibition de l'inoculum. Cette recherche a également confirmé pour certains isolats de *T. asperellum* un potentiel intéressant de bioremédiation du sol et la prévention de l'infection par *P. ramorum*. Cependant, Joeniarti et al. (2014) ont affirmé une faible activité inhibitrice de *T. asperellum* contre les isolats de *P. infestans* indonésiens, en confrontation directe malgré leurs taux significatifs de croissance mycélienne *in vitro*.

Tondje et al. (2007) a montré la réduction de l'infection de la pourriture brune de cacao par le traitement de *T. asperellum* sur les cacaoyers infectés.

Enfin, plusieurs isolats de *Trichoderma* spp. ont été testés pour le contrôle du mildiou sur les feuilles détachées de plants de pomme de terre cultivés sous serre. Les agents antagonistes ont montré une réduction de la maladie par rapport aux témoins positifs (Lozoya-Saldalla et al., 2006).

En conclusion, 11 isolats de *Trichoderma* spp. ont été collectés des régions d'Algérie dont 7 isolats sont indigènes à la rhizosphère des zones de production de pomme de terre et 4 isolats sont issus des masses d'œufs de Meloïdogyne des plants tomates

L'identification par approche moléculaire a permis l'amplification des ITS d'ADN 4 et 5 par PCR, le séquençage, l'alignement et le blast dans NCBI. A cet effet, deux isolats T10 a et T10 b sont identifiés comme *T. atroviride* homologues à un isolat de chine alors que, les 10 autres isolats sont identifiés comme *T. asperellum* homologues aux isolats de Turquie, et de Malaisie.

Il faut signaler aussi que, *\*T. asperellum\** est identifié pour la 1<sup>ère</sup> fois en Algérie et, pas encore en France, en Tunisie, au Maroc et en Italie mais, formulé comme T34 en Espagne en 2014.

Le pouvoir inhibiteur, fongicide et Mycoparasitaire a été révélé pour les 11 isolats de *Trichoderma* spp. sur *P. infestans*. Il en est de même pour leur potentiel de réduction de la maladie, l'inhibition de la sporulation de l'agent pathogène et la résistance induite aux variétés sensibles de pomme de terre selon les modes d'application préventifs et curatifs.

Ainsi, tous les isolats de *T. asperellum* et *T. atroviride* prélevés des régions d'Algérie constitueraient à l'avenir des agents de lutte biologique contre le mildiou de la pomme de terre.

On recommande alors, le mode de traitement par incorporation dans le sol des isolats T4, T2, T5, T6, T7, T8, T9, T10 et T11.

## *Chapitre 4*

# **CONCLUSION GENERALE ET PERSPECTIVES DE RECHERCHE**

#### 4. CONCLUSION GENERALE ET PERSPECTIVES DE RECHERCHE

Le présent travail porte sur la lutte biologique contre le mildiou de la pomme de terre en Algérie. Il s'articule autour de deux principaux volets :

- L'activité antifongique des plantes et de leurs extraits,
- L'activité antagoniste des isolats de *Trichoderma* spp. d'Algérie

Il comporte les trois parties d'étude suivantes :

- Activité antifongique des huiles essentielles d'agrumes et de la sauge,
- Activité antifongique d'une gamme de préparations aqueuses et poudreuses à base de plantes,
- Activité antagoniste des isolats de *Trichoderma* spp. provenant de différentes régions d'Algérie.

Au terme de cette étude, des résultats probants ont été obtenus montrant des effets certains des huiles essentielles, des préparations à base de plantes et des agents antagonistes du genre *Trichoderma*, offrant de réelles perspectives quant à leur utilisation dans le cadre des programmes de lutte contre la maladie du mildiou de la pomme de terre. Ces résultats sont énumérés ci après :

Quel que soit le test effectué, *in vitro* ou *in vivo*, les huiles essentielles d'agrumes testées à l'état brut ou diluées expriment une activité antifongique contre *P. infestans* mais, sans inhibition complète de l'agent phytopathogène.

Ces substances ont confirmé *in vitro* leur effet inhibiteur variable sur la croissance mycélienne et la sporulation ainsi que leur effet fongicide sur *P. infestans*.

Le plus important pouvoir inhibiteur de la croissance mycélienne de *P. infestans* est enregistré par l'huile essentielle de bergamote (55%), suivi par celle de l'orange (53%). Les huiles essentielles brutes sont plus efficaces que leurs dilutions et, leur activité est significativement plus élevée sur la souche A2 de *P. infestans*.

La sporulation des deux souches de *P. infestans* semble être complètement inhibée par les huiles essentielles d'orange et de bergamote brutes et diluées au 1/10.

D'autre part, les composés volatils des huiles essentielles d'agrumes ont induit des modifications structurelles qui se manifestent par la lyse mycélienne et la digestion du contenu des sporanges, qui pourraient expliquer l'inhibition de la croissance mycélienne et de la sporulation.

Par ailleurs, le pouvoir fongicide des huiles essentielles d'agrumes est noté à l'état brute et à la dilution 1/10<sup>ième</sup> par l'absence de reprise de croissance mycélienne des isolats de *P. infestans* préalablement inhibées *in vitro* et par l'inhibition de leur pouvoir pathogène *in vivo*.

Des taux de réduction d'infection encourageants sont relevés pour l'huile essentielle de bergamote (69%) mais, moyennement faibles à très faibles respectivement pour celles d'orange (42%) et de citron (0.2%). Ils sont également importants pour les huiles essentielles brutes que diluées.

Ainsi, l'huile essentielle de bergamote montre un pouvoir inhibiteur intéressant sur l'agressivité de *Phytophthora infestans*.

En outre, la composition chimique des huiles essentielles des trois espèces d'agrumes analysés par CG-SM, ont montré différents composés, y compris 22, 27 et 30 respectivement pour les huiles essentielles de citron, d'orange et de bergamote.

En effet, la variabilité de leur composition chimique par CG-SM réside dans les monoterpènes oxygénés qui sont de 0.8, 2.2 et 5% respectivement pour les huiles essentielles de citron, d'orange et de bergamote. Leur efficacité reste donc liée aux nerol, Neral, geraniol et geranial.

Il serait alors, intéressant d'optimiser leur rendement par un autre mode d'extraction pour aboutir à une meilleure activité antifongique contre l'agent causal du mildiou de la pomme de terre. Comme, il est également nécessaire de choisir des plantes plus riches en ces biomolécules actives pour la synthèse de nouveaux fongicides efficaces contre cette redoutable maladie.

D'une manière générale, l'activité antifongique de l'huile essentielle de sauge a confirmé son pouvoir inhibiteur *in vitro* et *in vivo* sur *Phytophthora infestans*. Les taux d'inhibition de la croissance mycélienne enregistrés sont compris entre 15 et 54%, voire plus importants pour l'huile essentielle brute qu'aux dilutions :1/10, 1/50 et 1/100.

En outre, la souche A2 s'avère plus sensible à l'effet inhibiteur de cette huile essentielle testée à l'état brute et à la dilution 1/10<sup>ième</sup>. Ses taux d'inhibition enregistrés sont de 47% pour la croissance mycélienne et de 100% pour la sporulation.

L'effet de cette huile essentielle de sauge a affecté la morphologie de l'agent pathogène en engendrant la destruction du mycélium et des sporanges. Ce qui confirme son pouvoir inhibiteur élevé sur la croissance mycélienne et la sporulation ainsi que, son effet mycoparasitaire important sur *P. infestans*.

Par ailleurs, son pouvoir fongicide s'exprime également par l'inhibition de la reprise de croissance mycélienne des isolats de *P. infestans* préalablement inhibés *in vitro* et par la réduction de la maladie *in vivo*.

Cependant, l'expression de quelques symptômes aux dilutions 1/50 et 1/100 peut être expliquée *in vitro* par la résistance et la survie de quelques sporanges, visibles au microscope après 7 jours d'incubation. Un pouvoir antifongique élevé caractérise cette huile essentielle, avec des taux de réduction de l'infection de 100% à l'état brute et 85%, 55% et 20% respectivement pour les dilutions 1/10, 1/50 et 1/100.

Il faut noter que c'est l'isolat A2 qui s'est révélé le plus agressif et par conséquent moins sensible à l'huile essentielle de sauge testée.

Ainsi, le pouvoir antifongique *in vitro* et *in vivo* de cette huile essentielle reste lié à sa composition phytochimique qui décroît en fonction des dilutions.

En conclusion, l'huile essentielle de sauge mérite une étude plus approfondie pour exploiter ses propriétés antifongiques à l'échelle industrielle comme moyen de lutte biologique. Pour ce faire, il serait nécessaire de déterminer l'identité des composés antifongiques et la période propice à leur bon rendement. Comme, il serait également intéressant de valoriser cette plante avec une autre méthode d'extraction pour optimiser les rendements en principes actifs pour la synthèse de produits fongicides à l'égard de *P. infestans*.

L'étude *in vitro* du pouvoir antifongique de la gamme d'extraits aqueux de plantes contre *P. infestans* a servi de base pour la sélection des plantes à propriétés inhibitrices et réductrices d'inoculum phytopathogène et à la connaissance de leurs concentrations suffisantes et efficaces et leur mode d'application en vue de leur utilisation contre le *P. infestans*.

Les extraits aqueux des plantes s'avèrent très intéressants contre *P. infestans*, en particulier ceux du pistachier lentisque, du pacanier, de la menthe à feuilles rondes, de la sauge et du romarin en vue de la réduction d'inoculum responsable du mildiou de la pomme de terre.

Nos résultats affirment également que tous les extraits aqueux de plantes testés même à la plus faible dilution (5%), sont d'excellents inhibiteurs de la sporulation et de la germination de *P. infestans*. Leurs taux d'inhibition dépassent généralement les 75% et peuvent atteindre les 100% pour les extraits du pistachier lentisque, du pacanier et du romarin.

De même, des modifications morphologiques observées résultent de l'activité des extraits aqueux des plantes testés. Elles sont similaires à celles induites par les huiles essentielles décrites précédemment, confirmant leur pouvoir inhibiteur élevé et fongicide sur *P. infestans*.

En effet, la détermination des CIL a permis le classement des extraits aqueux à base plantes selon leur pouvoir fongicide.

Les extraits de menthe odorante, de pacanier, de pistachier lentisque et de sauge ont montré leur pouvoir fongicide intéressant, à partir de la concentration 10%, comparés à ceux à base de romarin, de posidonie, d'ortie et de prêle, dont les CIL dépassent les 70%. Tous ces résultats cités sont prometteurs et suggèrent l'utilisation des produits dérivés de ces plantes comme moyens de lutte biologique contre le mildiou de la pomme de terre.

Aussi, les préparations à base de plantes ont montré une réduction de la maladie (75 à 94%) et même à l'inhibition de la sporulation (75 à 100%) de l'agent phytopathogène.

Il est important de signaler le potentiel de réduction de la maladie par les extraits de prêle et de posidonie qui semblent être moins efficaces *in vitro* mais, leur aptitude dans l'inhibition de la pathogénicité s'explique par les mécanismes de résistance induite par ces médiateurs chimiques. Il reste que le mode préventif par arrosage s'avère le plus intéressant par l'inhibition totale de la sporulation (100%) des deux isolats de *P. infestans*.

Il serait alors nécessaire d'établir le profil phytochimique des plantes les plus efficaces et, les formuler pour les tester en plein champ, afin d'évaluer leur efficacité en vue de leur utilisation comme bio-fongicides contre le mildiou de la pomme de terre en Algérie. Il serait intéressant de compléter le travail par l'étude des mécanismes de résistance induite par ces médiateurs chimiques.

Par ailleurs, la sauge a montré une meilleure activité antifongique sous forme d'extrait aqueux et de poudre, qu'en huile essentielle.

Dans ce cas, la récupération de ses hydrolats et de son matériel végétal est à envisager des distilleries. Les premiers seront lyophilisés et conservés, pour être utilisés à titre préventif sous forme d'extraits par arrosage des plants. Les seconds vont être appliqués comme biocompost par incorporation dans le sol, afin de réduire l'inoculum responsable de cette maladie.

En conclusion, nous pouvons dire que toutes les poudres de la gamme de plantes testées ont prouvé un pouvoir antifongique élevé à l'égard de *P. infestans*, selon le mode par incorporation dans le sol. Ce dernier est traduit par le potentiel de réduction de l'inoculum et l'induction de la résistance des plantes à la maladie. Il serait intéressant de les tester en serre ou en plein champ sur d'autres agents phytopathogènes. Il est également intéressant de formuler un biocompost à base des plantes testées pour son utilisation dans la culture biologique de la pomme de terre. Il est important d'évaluer leurs effets éliciteurs afin d'envisager leur utilisation contre le mildiou de la pomme de terre ainsi que d'autres agents phytopathogènes.

La partie d'étude basée sur la recherche des isolats provenant de différentes régions d'Algérie du genre *Trichoderma* et l'étude de leur activité antagoniste à l'égard de *P. infestans*, a mis en exergue 11 isolats de *Trichoderma* dont 7 isolats indigènes à la rhizosphère de pomme de terre et d'autres isolés à partir des masses d'oeufs de nématodes du genre *Meloidogyne*, prélevés des galles racinaires des plants de tomates collectées de différentes localités du pays.

En effet, leurs caractéristiques culturales et morphologiques n'étaient pas suffisantes pour leur identification, en raison des ressemblances des colonies et de leurs fructifications. D'où notre choix de l'approche moléculaire.

En effet, les gels d'électrophorèse obtenus présentent des ITS amplifiés des ADN par PCR de l'ensemble des isolats de *Trichoderma* étudiés et ceux des espèces de *T. atroviride*, *T. brevicompactum* en comparaison avec le marqueur moléculaire utilisé (GeneRuler : 100pb Step Ladder. Promega), tous les isolats de *Trichoderma* spp. présentent des bandes de 600 pb.

Les résultats de séquençage de cet fragment ont fait objet de l'alignement des séquences des ITS des isolats de *Trichoderma* étudiés et ceux des espèces de références de *T. atroviride*, *T. brevicompactum*, *T. harzianum* et le Pgem. Leur insertion et leur blast dans le NCBI a permis la confirmation des espèces de *Trichoderma* et le Pgem utilisés comme souches de références pour l'identification des espèces des isolats de *Trichoderma* étudiés dans nos recherches.

L'analyse de l'ITS5 a permis après séquençage, et leur blast dans le NCBI, leur identification dont, un isolat appartenant à *T. atroviride* et les dix autres à *T. asperellum*.

D'autres informations ont complété leur identification par le rapprochement de nos isolats à celles d'autres pays.

L'isolat d'Algérie de *T. atroviride* identifié est proche de celui de la chine, alors que ceux de *T. asperellum* sont homologues à ceux de la Malaisie et de la Turquie.

Les effets fongicides et mycoparasitaires des isolats d'Algérie du genre *Trichoderma* constitueraient à l'avenir des agents de lutte biologique contre le mildiou de la pomme de terre en Algérie.

L'étude *in vitro* de l'activité antagoniste des onze isolats de notre pays de *Trichoderma* spp. a confirmé leur pouvoir inhibiteur sur la croissance, la sporulation et la germination des isolats de *P. infestans*. Les taux d'inhibition enregistrés pour ces paramètres ont montré une variabilité liée aux isolats antagonistes.



Par ailleurs, l'étude *in vivo* de leur activité antagoniste, selon différents modes d'application ont confirmé leur efficacité significative par la réduction du développement de la maladie et l'inhibition de la sporulation de l'agent pathogène.

De nos résultats, plusieurs isolats antagonistes du genre *Trichoderma* pourraient être recommandés pour réduire l'inoculum de *P. infestans* dans le sol ou sur la partie aérienne des plants de pomme de terre selon le mode préventif et le mode curatif.

Plus précisément, l'incorporation des isolats «T4, T2, T5, T6, T7, T8, T9, T10 et T11» dans le sol permettrait de réduire non seulement l'incidence du mildiou, mais aussi induire une résistance possible des variétés sensibles de pomme de terre. Il serait donc plus judicieux de proposer leur mode d'application par incorporation dans le sol. Comme, il est également intéressant d'évaluer leur pouvoir antagoniste en serre et au champ afin de les formuler et de les utiliser à l'avenir dans la lutte biologique contre le mildiou de la pomme de terre en Algérie.

Ainsi, il est important de souligner l'identification pour la première fois en Algérie tout en précisant aussi que cette espèce n'a pas été encore signalée ni en France, ni en Italie, ni en Tunisie et au Maroc. Mais, elle est récemment signalée et formulée comme T34 en Espagne. Il s'agit de *Trichoderma asperellum*.

Plusieurs perspectives s'ouvrent à la recherche dans ce domaine en Algérie. Il est notamment recommandé de poursuivre la caractérisation moléculaire de ces isolats par les microsattellites pour interpréter la variabilité du pouvoir antagoniste de nos isolats au sein de la même espèce de *Trichoderma*.

Il serait aussi très intéressant d'étudier les activités antifongiques contre d'autres champignons phytopathogènes, les activités bactéricides, nématocides et insecticides.

Il serait aussi très utile d'étudier leur potentiel solubilisant des minéraux, tels que: N, P et K pour leur utilisation comme biofertilisants et biostimulants en agriculture biologique.

On recommande également, l'analyse chimique et biochimique des filtrats de leurs cultures pour identifier les principes actifs impliqués dans le biocontrôle de *P. infestans*.

Comme, il serait intéressant de recommander leur valorisation dans le secteur industriel dans le domaine cosmétique, alimentaire et pharmacologique.

Il est aussi judicieux de produire en masse les souches antagonistes d'Algérie les plus performantes pour les formuler et les utiliser dans l'agriculture biologique en Algérie.